

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 104**

51 Int. Cl.:
C12N 15/65 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02770322 .2**
96 Fecha de presentación: **29.10.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1440157**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2004**

54 Título: **Métodos y medios para producir proteínas con modificaciones postraduccionales predeterminadas**

30 Prioridad:
29.10.2001 WO PCT/NL01/00792
19.04.2002 WO PCT/NL02/00257

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2012

73 Titular/es:
CRUCCELL HOLLAND B.V.
ARCHIMEDESWEIG 4
2333 CN LEIDEN, NL

72 Inventor/es:
OPSTELTEN, Dirk, Jan, Elbertus;
KAPTEYN, Johan, Christiaan;
PASSIER, Petrus, Christianus, Johannes,
Josephus;
BRUS, Ronald, Hendrik, Peter y
BOUT, Abraham

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

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).

ES 2 381 104 T3

DESCRIPCIÓN

Métodos y medios para producir proteínas con modificaciones postraduccionales predeterminadas

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la tecnología de ADN recombinante. La invención se refiere además a la producción de proteínas. Más particularmente, la presente invención se refiere a la producción de proteínas recombinantes para su uso como constituyente terapéuticamente activo de una preparación farmacéutica. La solicitud también se refiere a líneas celulares de mamíferos, identificadas, seleccionadas y/o creadas para la producción recombinante de proteínas. La invención se refiere además al uso de proteínas así producidas.

Antecedentes de la invención

Se conocen sistemas de expresión celulares recombinantes para la producción de proteínas. Estos sistemas varían desde bacterias, levaduras y hongos hasta células vegetales, desde células de insectos hasta células de mamíferos. La elección del huésped de producción y el sistema de expresión depende generalmente de consideraciones tales como la facilidad de uso, el coste de cultivo, las características de crecimiento, los niveles de producción y la capacidad para crecer en medio libre de suero. Se sabe que los sistemas de expresión celulares mencionados anteriormente también difieren en la capacidad para ejercer modificaciones cotraduccionales y postraduccionales tales como plegamiento, fosforilación, γ -carboxilación y γ -hidroxilación. A pesar del reconocimiento de que la elección del sistema de expresión recombinante puede tener drásticas consecuencias sobre la estructura final de las proteínas expresadas, las modificaciones postraduccionales no han desempeñado en general un papel decisivo en la selección de un sistema de expresión adecuado para una proteína dada.

En los últimos varios años, los estudios han revelado más sobre las complejidades de modificaciones postraduccionales diferenciales de proteínas humanas y las posibles implicaciones en funciones en el cuerpo humano. Por ejemplo, hallazgos relativamente recientes sugieren que patrones de glicosilación diferencial de proteínas humanas que se producen en la sangre (las denominadas modificaciones "de tipo sérico") son diferentes de las que se producen en el líquido cefalorraquídeo en el cerebro (modificaciones "de tipo cerebral"). Esta diferencia puede ser una cuestión clave que es de importancia primordial para el diseño de agentes terapéuticos eficaces.

En general, las glicoproteínas neurales humanas se caracterizan por su glicosilación, que se ha denominado en la bibliografía glicosilación de "tipo cerebral" (Margolis y Margolis 1989; Hoffmann *et al.* 1994). En contraposición a proteínas glicosiladas "de tipo sérico" (es decir, glicoproteínas que circulan en la sangre), las proteínas glicosiladas de tipo cerebral presentan de manera característica azúcares N-unidos de tipo complejo que se modifican con una fucosa unida en $\alpha 1,3$ acoplada a N-acetil-glucosamina en antenas de tipo lactosamina formando de ese modo estructuras de Lewis x o sialil-Lewis x (figura 5). Hay dos tipos de estructuras de Lewis x: una con un residuo de galactosa terminal y una con un residuo de N-acetil-galactosamina (GalNAc) terminal. Si estos grupos terminales se unen a un ácido siálico, la estructura de Lewis x se denomina estructura de sialil Lewis x. Otra diferencia entre oligosacáridos de tipo sérico y de tipo cerebral es que estos últimos contienen a menudo N-acetil-glucosamina terminal y/o galactosa terminal, y pueden incluir una modificación de N-acetil-galactosamina terminal, mientras que oligosacáridos de tipo sérico contienen habitualmente sólo bajas cantidades de tales estructuras.

Los oligosacáridos que se encuentran generalmente en proteínas que circulan en el suero contienen a menudo estructuras fuertemente galactosiladas. Esto significa que una galactosa se une a una N-acetil-glucosamina periférica formando de ese modo una estructura de lactosamina. La glicoproteína está de algún modo protegida de la endocitosis por los receptores de N-acetil-glucosamina (es decir, receptores que reconocen N-acetil-glucosamina terminal) presentes en células reticuloendoteliales hepáticas y macrófagos (Anchord *et al.* 1978; Stahl *et al.* 1978). Los oligosacáridos de tipo sérico también contienen habitualmente ácidos siálicos terminales (también denominado a menudo ácido neuramínico) que protegen a la glicoproteína del aclaramiento a través del receptor de asialoglicoproteína. Estos mecanismos de aclaramiento se aplican específicamente a glicoproteínas que circulan en la sangre y que faltan probablemente en el sistema nervioso central humano (SNC) (Hoffmann *et al.* 1994).

Están disponibles en la técnica sistemas de expresión recombinantes para la producción de proteínas que comprenden modificaciones de tipo "sérico", tal como se muestra a modo de ejemplo mediante células de ovario de hámster chino (CHO) y células de riñón de cría de hámster (BHK). Para la producción de proteínas con otras modificaciones, tales como modificaciones de "tipo cerebral", sin embargo, no se han descrito sistemas convenientes de este tipo. Por tanto, hay una necesidad de sistemas de expresión que tengan en cuenta las diferentes modificaciones postraduccionales en proteínas terapéuticas. En particular, existe una necesidad de un sistema de expresión eficaz para proteínas que comprenden modificaciones postraduccionales "de tipo cerebral".

Proteínas que tienen estas necesidades específicas pueden ser beneficiosas en el tratamiento de toda clase de trastornos, entre los que están las enfermedades relacionadas con el SNC, el sistema nervioso periférico y el tejido cardíaco. Los trastornos que afectan al SNC abarcan diferentes tipos de afecciones tales como daño cerebral agudo,

enfermedades neurodegenerativas y otras disfunciones tales como epilepsia, esquizofrenia y trastornos del estado de ánimo. Otros trastornos patológicos que podrían aquejar a células y tejidos neurales se deben a lesiones que podrían ser un resultado de hipoxia, trastornos convulsivos, envenenamiento con neurotoxinas, esclerosis múltiple, hipotensión, paro cardíaco, radiación o hipoglucemia. Las lesiones neurales también podrían producirse durante procedimientos quirúrgicos tales como reparación de aneurisma o resección de tumores.

Un ejemplo de una proteína que tiene diferentes papeles que están relacionados al menos en parte con diferencias en modificaciones postraduccionales es una hormona conocida como eritropoyetina (EPO). La EPO, una proteína famosa por su papel en la diferenciación de células madre hematopoyéticas para dar glóbulos rojos, tiene varias otras funciones, incluyendo funciones en tejidos neurales. Se ha sugerido un papel de la EPO en el desarrollo del SNC (Dame *et al.* 2001). También se ha detectado proteína EPO en el líquido cefalorraquídeo (CSF) de recién nacidos y adultos humanos (Juul *et al.* 1997; Buemi *et al.* 2000). La EPO, tal como se presenta en el CSF, parece producirse localmente en el cerebro ya que no cruza la barrera hematoencefálica intacta (Marti *et al.* 1997; Buemi *et al.* 2000). La regulación de la expresión de EPO es específica de tejido, lo que refuerza adicionalmente la hipótesis de que la EPO tiene funciones específicas de tejido que son diferentes en el cerebro y la médula ósea (Masuda *et al.* 1999; Chikuma *et al.* 2000; Sasaki *et al.* 2001). Se ha postulado por tanto que la EPO, además de su función hematopoyética, puede tener un papel neurotrófico. Los factores neurotróficos se definen como moléculas humorales que actúan sobre neuronas para influir en su desarrollo, diferenciación, mantenimiento y regeneración (Konishi *et al.* 1993). Los resultados de varios estudios han demostrado ahora que la EPO puede actuar como un factor neurotrófico (por ejemplo Sadamoto *et al.* 1998; Brines *et al.* 2000). Además de los efectos mencionados de la EPO sobre la eritropoyesis y la neuroprotección, se han descrito otros papeles de la EPO, por ejemplo en células endoteliales y células musculares. Se ha establecido bien en la técnica que el efecto de la EPO (recombinante) depende mucho del patrón de glicosilación de los oligosacáridos presentes en la proteína. Los oligosacáridos N-unidos de la EPO humana son sumamente importantes para su actividad biológica bien conocida: la estimulación de la eritropoyesis (Takeuchi y Kobata 1991; Wasley *et al.* 1991; Tsuda *et al.* 1990; Morimoto *et al.* 1996; Takeuchi *et al.* 1989; Misaizu *et al.* 1995).

En el caso de la EPO, también puede hacerse referencia a EPO de tipo sérico (una EPO "de tipo renal", o "de tipo urinario") para la proteína que se produce en el riñón y que circula en la sangre, en comparación con EPO que está produciéndose por otros tejidos tales como el cerebro (tipo cerebral). Están bien establecidos en la técnica sistemas de producción y purificación para EPO de tipo sérico, y se usa de manera rutinaria y satisfactoria EPO de tipo sérico producida de manera recombinante por ejemplo en pacientes que padecen un bajo nivel de glóbulos rojos. Está bien establecido en la técnica que esta EPO recombinante tenía que satisfacer todos los requisitos de una proteína estable que pueda circular en el torrente sanguíneo durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir la inducción de la eritropoyesis. Habitualmente, se usa un sistema de células a base de CHO o BHK para la producción de EPO con estas características. Sin embargo, la EPO de tipo sérico que resulta de este sistema de producción y purificación es relativamente inútil en el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema nervioso central o periférico así como en el tratamiento de afecciones relacionadas con trastornos inducidos por isquemia/reperfusión. Esto se debe a su patrón de glicosilación, que no es adecuado para el tratamiento de estos trastornos, y también porque conduce a un aumento en el número de glóbulos rojos (eritropoyesis) debido a su fuerte actividad hematopoyética, que va a calificarse como efectos secundarios no deseados en el contexto de estos trastornos no hematopoyéticos (Wiessner *et al.* 2001). Por tanto, existe una necesidad de nuevos sistemas de producción para proteínas tales como EPO, que tienen los rasgos característicos de una molécula de EPO que es activa en el cerebro o en tejidos que implican direccionamiento o transporte basado en selectinas. Además, existe una necesidad de preparaciones farmacéuticamente aceptables de proteínas tales como EPO, con modificaciones postraduccionales que difieren de la glicosilación de tipo sérico, que tienen preferiblemente una glicosilación de tipo cerebral, y sistemas de producción y purificación eficaces para proporcionar esto.

Otro ejemplo de una proteína que tiene diferentes patrones de glicosilación en tejidos separados, lo que sugiere un papel diferencial de los diferentes patrones de glicosilación, es la transferrina, que se produce en cantidades significativas como asialotransferrina en el CSF pero no en esa forma en el suero (Van Eijk *et al.* 1983; Hoffmann *et al.* 1995).

Una cierta familia de glicoproteínas, denominadas selectinas, desempeña un papel importante en las etapas iniciales de adhesión de leucocitos al endotelio en lesión por isquemia/reperfusión. Hay tres miembros en la familia de selectinas: P-selectina, E-selectina y L-selectina. Las selectinas tienen un dominio de lectina que reconoce las estructuras de azúcar de los ligandos de glicoproteínas que se unen a las mismas. Hay un posible papel de las modificaciones de sialil Lewis x en oligosacáridos en la unión a selectinas (Foxall *et al.* 1992). Varios estudios han indicado la importancia de selectinas y estructuras de sialil Lewis x para la adhesión de leucocitos en modelos de isquemia/reperfusión. Por ejemplo, se demostró que el oligosacárido de sialil Lewis x Sle^x-OS era cardioprotector en un modelo felino de isquemia/reperfusión al reducir la necrosis cardíaca en un 83% (Buerke *et al.* 1994). Además, la solicitud de patente WO 02/38168 describe el uso de selectinas en proteínas de unión que comprenden estructuras de sialil Lewis x para su uso como agentes antiinflamatorios en el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, no se han descrito sistemas de expresión adecuados para la preparación de proteínas que comprenden glicanos de (sialil) Lewis x. Por tanto, existe una necesidad de un sistema de expresión recombinante para proteínas que necesitan estructuras de glicosilación predeterminadas, tales como estructuras de (sialil) Lewis x. Más en

general, hay una necesidad de sistemas de expresión para la producción recombinante de proteínas que necesitan modificaciones postraduccionales predeterminadas.

Breve descripción de tablas y figuras

- 5 Tabla I. Resumen de las proteínas marcadoras que pueden usarse para caracterizar células.
- Tabla II. Tejidos control positivo que pueden usarse para algunas de las proteínas marcadoras representadas en la tabla I.
- 10 Tabla III. Información detallada (números de proveedor y catálogo) de anticuerpos dirigidos a proteínas marcadoras que se usaron para caracterizar la línea celular PER.C6™.
- Tabla IV. Puntuación de la presencia de las proteínas marcadoras en PER.C6™.
- 15 Tabla V. Composición de monosacáridos de los azúcares N-unidos de PER.C6™-EPO y Eprex.
- Tabla VI. Asignaciones de picos de EM observados para los iones moleculares de N-glicanos desialilados liberados por N-glicanasa F a partir de EPO producida en DMEM por el clon P7 de PER.C6™ productor de EPO. Los picos con valores de masa (m/z) que se encuentran también en Eprex están subrayados e indicados en negrita.
- 20 Tabla VII. Asignaciones de picos de EM observados para los iones moleculares de N-glicanos desialilados liberados por N-glicanasa F a partir de EPO producida en DMEM por el clon P8 de PER.C6™ productor de EPO. Los picos con valores de masa (m/z) que se encuentran también en Eprex están subrayados e indicados en negrita.
- 25 Tabla VIII. Actividades FUT en células CHO y PER.C6™.
- Tabla IX. Asignación de picos de EM observados para los iones moleculares de N-glicanos desialilados liberados por N-glicanasa F a partir de EPO fraccionada en una columna AAL para seleccionar un contenido en fucosa alto y bajo.
- 30 Tabla X. Expresión de E1A relativa y morfología de los clones de HT1080 E1A.EPO y E1A.E1B.EPO productores de EPO. Se evaluó la cantidad de expresión de E1A mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Se seleccionaron los clones marcados con * para el ensayo de producción de EPO.
- 35 Tabla XI. Presencia relativa de perfiles de masa de los azúcares N-unidos de EPO obtenida a partir del clon de HT1080/Epo 033, el clon de HT1080/E1A-EPO 008 y el clon de HT1080/E1A.E1B-EPO 072. Se usó el programa informático de ExPASy para predecir la composición de azúcares. Se muestran en la tabla el número de las hexosaminas, hexosas y desoxihexosas presentes en las antenas de los glicanos y las estructuras propuestas.
- 40 Figura 1. Espectros de masas de los azúcares N-unidos de Eprex, P7-EPO (conjuntos A, B y C) y P8-EPO (conjuntos A, B y C). (A) Eprex; (B) P7, conjunto A; (C) P7, conjunto B; (D) P7, conjunto C; (E) P8, conjunto A; (F) P8, conjunto B; y (G) P8, conjunto C.
- Figura 2. Contenido en ácido siálico de PER.C6™-EPO y CHO-EPO.
- 45 Figura 3. Estructuras de glicanos de Lewis x presentes en PER.C6™-EPO.
- Figura 4. Expresión de estructuras de Lewis x en la superficie de células PER.C6™.
- 50 Figura 5. Representación esquemática de estructuras de Lewis x y sialil Lewis x.
- Figura 6. Efecto de PER.C6™-EPO y Eprex sobre la eritropoyesis *in vivo*.
- Figura 7. Volúmenes de infarto en ratas no tratadas (control) y ratas tratadas con Eprex y PER.C6™-EPO basados en los mapas de ADC (figura 7A) y los mapas de T2 (figura 7B) generados a las 24 h tras el comienzo de la perfusión, usando MRI.
- 55 Figura 8. Concentración de Eprex a los puntos de tiempo indicados tras una inyección i.v. única de 150 UE de Eprex en tres animales.
- 60 Figura 9. Cromatograma de EPO de PER.C6™ fraccionada en una columna AAL para seleccionar un contenido en fucosa alto y bajo.
- 65 Figura 10A. Espectros de masas de los azúcares N-unidos de la fracción 1 - 4 a partir de la columna AAL. B. Espectro de masas de los azúcares N-unidos de la fracción 4 a partir de la columna AAL en un experimento independiente.

Figura 11. Fotografías del clon de HT1080/EPO 033 (A) y del clon de HT1080/E1A.E1B.EPO 058 (B) y 026 (C). Se muestra su expresión de E1A mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western (D). Los clones que expresan E1A tienen una morfología plana.

Figura 12. Perfil de HPAEC-PAD de N-glicanos liberados a partir de EPO producida por el clon de HT1080/EPO 033 y el clon de HT1080/E1A.E1B 072. Las líneas en la parte inferior indican la elución de glicanos no cargados (0), monocargados, doblemente cargados, triplemente cargados y tetracargados (1-4, resp.). Obsérvese el desplazamiento a glicanos N-unidos menos cargados del clon 072.

Figura 13. Análisis de Maldi-EM de EPO producida por 3 clones diferentes (A). El clon de HT1080/EPO 033, el clon de HT1080/E1AEPO 008 y el clon de HT1080/E1A.E1B-EPO 072. Los últimos 2 clones muestran un perfil más complejo.

Figura 14. Perfiles obtenidos a partir de análisis de monosacáridos de los glicanos N-unidos del clon de HT1080/EPO 033, el clon de HT1080/E1A-EPO 008 y el clon de HT1080/E1A.E1B-EPO 072. La razón de los monosacáridos indicados (Fuc = Fucosa, GAIN = N-acetil-galactosamina, GlcNac = N-acetil-glucosamina, Gal = Galactosa, Man = Manosa) se normalizó con respecto a manosa.

Figura 15. Análisis de Maldi-EM de EPO producida por el clon de HT1080/EPO 033 (A, B) y el clon de HT1080/E1A.E1B-EPO 072 (C, D) tratados con (B, D) o sin (A, C) α -fucosidasa. Sólo se observaron diferencias en los perfiles de glicanos de EPO derivadas del clon 072. Se encuentra un cambio claro de picos con valores de m/z de ~ 2039, ~ 2185 y ~ 1892 (C y D), que representan lo más probablemente la disminución de estructuras propuestas que contienen desoxihexosas antenarias.

Figura 16. Diversas isoformas de las diferentes preparaciones de EPO separadas mediante IEF. Las isoformas de EPO contienen 0 - 14 ácidos siálicos por molécula. Se aplicaron las siguientes muestras (2000 UE por tira): Eprex (A); Eprex tratadas con neuraminidasa (B); CHO-EPO, producción total (C); PER.C6TM-EPO, clon 022 (D); frCHO-EPO (E).

Figura 17. Hematocrito (HCR, porcentaje en volumen) de ratas a las que se les inyectaron 5000 UE/kg de Eprex, frCHO-EPO, PER.C6TM-EPO, o tampón diluyente (control). Las ratas tratadas con EPO revelaron un HCR significativamente superior frente al control, frCHO-EPO y PER.C6TM-EPO ($p < 0,001$).

Figura 18. Porcentaje de reticulocitos en sangre de ratas a las que se les inyectaron 5000 UE/kg de Eprex, frCHO-EPO, PER.C6TM-EPO, o tampón diluyente (control). Las ratas tratadas con EPO revelaron un porcentaje de reticulocitos significativamente superior frente al control ($p < 0,001$). El porcentaje de reticulocitos de ratas tratadas tanto con Eprex como frCHO-EPO era significativamente superior en comparación con PER.C6TM-EPO ($p < 0,001$).

Figura 19. Porcentaje de reticulocitos inmaduros (IFR) de la población de reticulocitos total cuatro días tras la inyección con 5000 UE/kg de Eprex, frCHO-EPO, PER.C6TM-EPO, o con tampón diluyente (control). Las ratas tratadas con Eprex revelaron un % de reticulocitos inmaduros significativamente superior frente al control, frCHO-EPO o PER.C6-EPO ($p < 0,001$).

Figura 20. Sitio de escisión de PNGasa F (marcada con F) y endoglicosidasa F2 (marcada con F2).

Figura 21. Espectro de MALDI de glicanos de PER.C6TM-EPO liberados con PNGasa F (A) y con endoglicosidasa F2 (B). El eje x del espectro inferior se alinea de tal modo que los picos correspondientes en ambos espectros están directamente uno por encima del otro (diferencia de 349 Da, véase el texto).

Figura 22. Algunos enlaces de monosacáridos de glicanos N-terminales.

Figura 23. La parte superior del esquema proporciona los glicanos desialilados liberados a partir de PER.C6TM-EPO; los valores en la parte inferior se detectan en el espectro tras el tratamiento con galactosidasa. Entre corchetes el porcentaje total del espectro reflejado en las estructuras dadas. Espectros en la figura 26.

Figura 24. La parte superior del esquema proporciona los glicanos desialilados liberados a partir de PER.C6TM-EPO que se incubaron con galactosidasa; los valores en la parte media se detectan en el espectro tras el tratamiento con fucosidasa de riñón bovino y los valores inferiores se obtienen tras la incubación con GlcNAc-asa. Entre corchetes el porcentaje total del espectro reflejado en las estructuras dadas. Espectros en la figura 26.

Figura 25. La parte superior del esquema proporciona los glicanos desialilados liberados a partir de PER.C6TM-EPO que se incubaron con galactosidasa; los valores en la parte media se detectan en el espectro tras el tratamiento con fucosidasa de harina de almendras y los valores inferiores se obtienen tras la incubación con GlcNAc-asa. Entre corchetes el porcentaje total del espectro reflejado en las estructuras dadas. Espectros en la figura 26.

Figura 26. Espectros de MALDI de tratamientos con exoglicosidasa de los glicanos N-unidos de PER.C6™-EPO.

A.) PER.C6™-EPO incubadas con PNGasa F y neuraminidasa.

5 B.) PER.C6™-EPO incubadas con PNGasa F, neuraminidasa y galactosidasa.

C.) PER.C6™-EPO incubadas con PNGasa F y neuraminidasa, y posteriormente tratadas con galactosidasa y fucosidasa de riñón bovino.

10 D.) PER.C6™-EPO incubadas con PNGasa F y neuraminidasa, y posteriormente tratadas con galactosidasa, fucosidasa de riñón bovino y GlcNAc-asa.

E.) PER.C6™-EPO incubadas con PNGasa F y neuraminidasa, y posteriormente tratadas con galactosidasa y fucosidasa de harina de almendras.

15 F.) PER.C6™-EPO incubadas con PNGasa F y neuraminidasa, y posteriormente tratadas con galactosidasa, fucosidasa de harina de almendras y GlcNAc-asa.

Sumario de la invención

20 Un aspecto de la presente invención es proporcionar composiciones que comprenden moléculas de eritropoyetina caracterizadas porque el número promedio de 27 estructuras de lewis-X en glicanos N-unidos por molécula de eritropoyetina es al menos aproximadamente de 27. En otras realizaciones, dicho número promedio es al menos de aproximadamente 3,6, 4,1 o 5,7. En otro aspecto, las composiciones o fracciones según la invención se usan para la

25 preparación de un medicamento.

En otro aspecto la invención proporciona el uso de de eritropoyetina que puede producirse de manera recombinante en una célula de mamífero que expresa ácido nucleico que codifica para E1A a partir de un adenovirus, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en

30 isquemia, una lesión por reperfusión, un trastorno inducido por hipoxia, una enfermedad inflamatoria, un trastorno neurodegenerativo y daño agudo al sistema nervioso central o periférico. En ciertas realizaciones preferidas, dicha célula es una célula PER.C6™.

Descripción detallada

35 La presente descripción proporciona sistemas de producción recombinantes adecuados para la producción de proteínas que necesitan una modificación postraducciona l predeterminada. En un primer aspecto, tales sistemas recombinantes pueden proporcionarse usando métodos para identificar sistemas de expresión que pueden aplicar la modificación postraducciona l necesaria para la proteína en cuestión o el uso previsto de la proteína en cuestión. La descripción también proporciona un método de preparación de sistemas de expresión que tienen la capacidad para

40 aplicar una modificación postraducciona l deseada de una proteína que la necesita. Aspectos adicionales comprenden proteínas aisladas que tienen modificaciones postraducciona l s predeterminadas así producidas, métodos de uso y composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas.

45 Una molécula proteínica tal como se usa en el presente documento se refiere a, pero sin limitarse a, moléculas tales como péptidos, polipéptidos y proteínas, así como a mutantes de péptidos, polipéptidos y proteínas (moléculas que comprenden deleciones, mutaciones puntuales, intercambios y/o alteraciones inducidas químicamente), siempre que puedan recibir la modificación postraducciona l predeterminada, es decir, tienen el/los residuo(s) de aminoácido requerido(s) en el contexto adecuado susceptible(s) a la modificación (por ejemplo, deben comprender una

50 secuencia Asn-X-Ser/Thr en el caso de que se desee la adición de una estructura de glicano N-unido, que puede aplicarse al residuo de Asn en este contexto). También se refiere a péptidos, polipéptidos y proteínas que portan etiquetas y/u otros marcadores proteínicos y no proteínicos (por ejemplo compuestos radiactivos). Un ejemplo de una proteína de este tipo es EPO humana, que tiene además de la forma de tipo renal o de tipo sérico otros fenotipos tales como una forma de tipo cerebral.

55 Según una realización específica, se proporcionan sistemas de producción que pueden aplicar estructuras de lewis X y/o LacdiNAc en proteínas que pueden recibir estructuras de glicanos N-unidos. Según la descripción, tales sistemas de expresión pueden identificarse, seleccionarse o diseñarse específicamente. Un ejemplo de tal diseño intencional es la introducción en una célula de mamífero de ácido nucleico que comprende una secuencia de E1A de un adenovirus de manera que dicha secuencia de E1A se expresa en dicha célula de mamífero. Ejemplos de tales

60 células que ya existen son HEK293, PER.C6™, 911. Aunque estas líneas celulares se conocen *per se* y se han usado para la producción de proteínas (Van den Nieuwenhof *et al*, 2000; documento WO 00/63403; Grinnell *et al*, 1994), el efecto decisivo de E1A sobre la capacidad para aplicar estructuras de lewis X y/o LacdiNAc a proteínas producidas sobre las mismas no se ha apreciado hasta la fecha.

65 Una modificación postraducciona l tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier modificación que

esté presente sobre o en dicha molécula proteínica. Se refiere a modificaciones que se introducen durante o posteriormente a la traducción de dicha molécula a partir de ARN *in vivo* o *in vitro*. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, plegamiento, fosforilación, γ -hidroxilación, multimerización, unión por puentes disulfuro y por ejemplo acontecimientos de procesamiento tales como el corte o la adición de uno o más aminoácidos. Una modificación postraducciona l predeterminada tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier modificación postraducciona l que sea útil para el tratamiento seleccionado. Según una realización preferida, modificación postraducciona l predeterminada se refiere a una forma de modificación que hace que la proteína modificada sea particularmente útil para tratar trastornos de tejidos, órganos, compartimentos y/o células específicos de un cuerpo humano o animal. La molécula proteínica que porta tales modificaciones postraduccionales predeterminadas podrían carecer como resultado de efecto significativo (tales como efectos secundarios perjudiciales y otros efectos secundarios no deseados) distinto de sobre el tejido, órgano compartimento y/o célula que va a tratarse. Según una realización, la modificación postraducciona l predeterminada provoca que la proteína que comprende la modificación postraducciona l predeterminada se aclare de la sangre más rápidamente, por ejemplo, para reducir efectos secundarios adversos. La modificación postraducciona l predeterminada puede entenderse completamente en detalle de antemano, pero también puede denominarse que es un estado deseado que se requiere para una actividad apropiada y deseada de la molécula proteínica que comprende tal modificación postraducciona l predeterminada, lo que significa que las modificaciones detalladas presentes sobre la molécula proteínica de interés no tienen necesariamente que entenderse y/o definirse completamente, siempre que esté en la misma la actividad deseada. Ejemplos de modificaciones de glicosilación deseadas en O- y/o N-glicanos, dependiendo del uso previsto, son estructuras tales como Lewis x, sialil Lewis x, GalNac, GlcNac, LacdiNac, fucosa unida en α 1,3 acoplada a N-acetil-glucosamina, N-acetil-glucosamina terminal, galactosa terminal, N-acetil-glucosamina bisectriz, grupo sulfato y ácido siálico.

Las células de mamíferos son preferiblemente humanas o de origen humano, para la producción de proteínas humanas para producir proteínas que lo más probablemente portan características de mamíferos, y preferiblemente humanas. Para producir moléculas proteínicas que deben tener modificaciones postraduccionales neurales, se prefiere usar células que tienen características neurales, tales como marcadores proteicos que son indicativos de células neuronales. Esto no excluye que una célula no neural pueda ser extremadamente útil en la producción de proteínas que comprenden modificaciones postraduccionales de tipo neural. Depende de la actividad proteica que se requiera seleccionar, identificar u obtener una célula que puede producir tales modificaciones postraduccionales.

Puesto que se requiere producir grandes cantidades de proteínas cuando éstas se aplicarán en entornos terapéuticos, se prefiere que las células de mamíferos de la invención estén inmortalizadas. La inmortalización puede ocasionarse de muchos modos. Ejemplos de métodos para obtener células inmortalizadas son transformar de manera activa una célula en reposo para dar una célula en división mediante la adición de ácidos nucleicos que codifican para proteínas de transformación y/o inmortalización, o a través de tratamiento químico a través de lo cual proteínas endógenas podrían volverse transformantes, o tomando células del material tumoral. Un método preferido para inmortalizar células no tumorales es mediante la adición de la región E1 de adenovirus tal como se mostró para líneas celulares tales como 911 y PER-C6TM. Se conocen otros métodos de inmortalización de células, tales como transformación usando ciertas secuencias que codifican para proteínas del virus del papiloma humano (VPH) (por ejemplo células HeLa). La adición de ciertas proteínas virales, tales como E1 de adenovirus podría ser beneficiosa para la producción de proteínas recombinantes, puesto que muchas de tales proteínas tienen características de activación de la transcripción, así como efectos antiapoptóticos. Se ha encontrado ahora sorprendentemente que la expresión de E1A de adenovirus en la célula huésped usada como sistema de expresión según la invención cambia las características del sistema de expresión de manera que adquiere la capacidad para aplicar estructuras de glicosilación N-unidas que comprenden lewis X y/o LacdiNac.

Un línea celular adecuada para los métodos para producir moléculas proteínicas que necesitan glicanos N-unidos que contienen lewis X y/o LacdiNac es PER.C6TM, depositada con el n.º 96022940 en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales en el Centro de Microbiología Aplicada e Investigación. Otras líneas celulares adecuadas según este aspecto incluyen HEK293, 911 y otras células de mamíferos que se modifican mediante la introducción en una o más de dichas células o ancestros de las mismas de ácido nucleico que contiene secuencias de E1A de un adenovirus en formato expresable. Opcionalmente, se incluyen secuencias de E1B en formato expresable, que pueden ser ventajosas porque los efectos antiapoptóticos ejercidos por E1B, contrarrestan los posibles efectos apoptóticos de la expresión de E1A.

Los métodos para producir moléculas proteínicas comprenden además la etapa adicional de purificar dicha molécula proteínica a partir del cultivo de células de mamíferos. La purificación tal como se usa en el presente documento pudo realizarse usando métodos convencionales que se han descrito en la técnica, sin embargo, se prefiere usar métodos de purificación que comprenden una etapa en la que se emplean las modificaciones postraduccionales presentes en y/o sobre dichas moléculas proteínicas. Incluso se prefieren más métodos de purificación que comprenden una etapa en la que se emplean las modificaciones postraduccionales predeterminadas presentes en y/o sobre dichas moléculas proteínicas. Cuando se aplican métodos de purificación por afinidad, se prefiere usar anticuerpos u otras moléculas de unión, tales como lectinas específicas para restos de hidratos de carbono particulares y que están dirigidas contra ciertos tipos de modificaciones postraduccionales. Ejemplos de tales anticuerpos son anticuerpos dirigidos contra estructuras de (sialil) Lewis x, estructuras de lacdiNac o estructuras de

GalNac Lewis x. Ejemplos no limitativos de lectinas son AAL y selectinas, tales como E-selectina, P-selectina, L-selectina. El uso de tales moléculas de unión permite purificar las proteínas (recombinantes) de manera que un alto porcentaje de la proteína purificada porta la modificación postraducciona l predeterminada. Incluso se prefieren más métodos en los que la molécula proteínica se purifica hasta la homogeneidad. Se proporcionan ejemplos de métodos para la purificación de proteínas a partir de cultivo de células de mamífero y abarcan por ejemplo métodos de cromatografía de afinidad para la purificación de EPO glicosilada de tipo cerebral usando anticuerpos o lectinas que reconocen estructuras de Lewis x presentes en los N-glicanos del producto producido de manera recombinante.

La presente invención proporciona una composición farmacéuticamente aceptable que comprende una molécula proteínica que tiene una modificación postraducciona l predeterminada, que puede obtenerse según métodos de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los expertos habituales en la técnica conocen vehículos farmacéuticamente aceptables. Según la invención, dicha molécula proteínica en dicha composición farmacéuticamente aceptable es eritropoyetina. Según la invención, la eritropoyetina producida en células con marcadores proteicos neurales adquiere una modificación postraducciona l que es activa en tejido neural o en células neuronales. Sin embargo, las modificaciones postraduccionales no son comparables con las modificaciones postraduccionales observadas en EPO que circula en la sangre. Los efectos eritropoyéticos de la EPO producida en células con los marcadores proteicos neurales son significativamente inferiores. Según la presente invención, se sugiere ahora fuertemente que esto se debe a la ausencia de un alto porcentaje de ácidos siálicos, y/o a la presencia de características de tipo cerebral tales como estructuras de Lewis x y galactósidos terminales. Esto es ventajoso, puesto que tal EPO de tipo cerebral puede usarse en dosificaciones relativamente altas en el tratamiento de trastornos relacionados con tejido neural o en el tratamiento de tejido dañado por isquemia (tal como un corazón isquémico), mientras que tiene al mismo tiempo un efecto significativamente reducido sobre la eritropoyesis en comparación con las preparaciones de EPO actualmente disponibles. La invención proporciona eritropoyetina recombinante que comprende al menos una modificación postraducciona l seleccionada del grupo que consiste en: una estructura de sialil Lewis x, una estructura de Lewis x, una fucosa unida en α 1,3 acoplada a N-acetil-glucosamina, una estructura de LacdiNAc, un grupo N-acetil-glucosamina terminal y un grupo galactosa terminal. Dicha eritropoyetina recombinante puede producirse en una célula de mamífero que puede obtenerse según la presente invención, así como en células de mamíferos anteriormente conocidas, pero que no se apreció anteriormente que eran adecuadas para este fin. Un ejemplo son células PER.C6TM. La presente descripción proporciona además el uso de células PER.C6TM para la producción de una molécula proteínica que comprende una modificación postraducciona l predeterminada, en la que se prefiere que dicha molécula proteínica se aclare rápidamente de la sangre y/o que se use en alta dosificación. En el caso de EPO, que puede producirse en PER.C6TM, puede usarse una alta dosificación para tratar o prevenir daño agudo asociado con hipoxia, mientras que se limitan los efectos secundarios adversos de la eritropoyesis.

En una realización, las moléculas proteínicas de la presente invención son adecuadas para el tratamiento de un ser humano o un cuerpo humano mediante cirugía, terapia o diagnóstico. Preferiblemente, se usan moléculas de tipo EPO según la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos inducidos por hipoxia, afecciones neurodegenerativas o daño agudo al sistema nervioso central o periférico. En otra realización preferida, dichas moléculas de EPO se usan para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de lesiones por isquemia y/o reperfusión. Aún en otra realización preferida, dichas moléculas de EPO se usan para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastorno inmunitario y/o enfermedad inflamatoria.

Se dan a conocer en el presente documento métodos y composiciones para la producción y fabricación de proteínas recombinantes. La invención es particularmente útil para la producción de proteínas que requieren modificaciones cotraduccionales y/o postraduccionales tales como glicosilación y plegamiento apropiado y se refiere además al uso de células humanas que pueden producir modificaciones cotraduccionales y/o postraduccionales de tipo cerebral en moléculas proteínicas. Estas células pueden usarse por ejemplo para la producción de glicoproteínas humanas con características neurales que podrían ser terapéuticamente beneficiosas, debido a sus características naturales.

La descripción también proporciona el uso de una línea celular humana con características neurales que modifica proteínas expresadas de manera recombinante con propiedades neurales tales como modificaciones postraduccionales "de tipo cerebral" o "de tipo neural" tales como glicosilación, fosforilación o plegamiento. Un ejemplo de una línea celular de este tipo, denominada PER.C6TM (patente estadounidense n.º 6.033.908), se generó mediante la immortalización de células de retina embrionaria humana usando un constructo que alberga genes EI de adenovirus. Anteriormente, se ha demostrado que las células PER.C6TM son particularmente adecuadas para la producción de proteínas humanas recombinantes, puesto que pueden obtenerse altos rendimientos de proteínas tales como la EPO humana y anticuerpos monoclonales completamente humanos (descrito en el documento WO 00/63403). La presente invención da a conocer que proteínas recombinantes producidas por células PER.C6TM pueden adquirir ciertas características específicas de tejido tales como características neurales (por ejemplo, modificaciones postraduccionales tales como glicosilación). Esto se muestra a modo de ejemplo mediante la producción de una proteína que alberga los denominados oligosacáridos de tipo cerebral. Se muestra que EPO humana producida por células PER.C6TM se modifica con azúcares N-unidos que difieren significativamente de los azúcares N-unidos encontrados en EPO urinaria humana o en EPO humana recombinante producida por células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón de cría de hámster (BHK). EPO urinaria humana y EPO humana recombinante producidas en células CHO y BHK contienen estructuras de glicosilación que pueden denominarse

oligosacáridos “de tipo renal” o “de tipo sérico”. Normalmente, los azúcares N-unidos de estas preparaciones de CHO- y BHK-EPO están altamente ramificados, altamente galactosilados y altamente sialilados, mientras que carecen de fucosa unida en α 1,3 periférica (Tsuda *et al.* 1988; Takeuchi *et al.* 1988; Nimtz *et al.* 1993; Watson *et al.* 1994; Rahbek-Nielsen *et al.* 1997).

En el presente documento, la naturaleza de los oligosacáridos unidos a EPO humana producida en PER.C6™ se ha dilucidado y se muestra que es significativamente diferente de los oligosacáridos presentes en EPO urinaria humana y EPO humana recombinante producida en células CHO y BHK. En primer lugar, el contenido en ácido siálico promedio de los oligosacáridos de EPO humana producida por PER.C6™ es significativamente inferior que el contenido en ácido siálico promedio de EPO urinaria humana o EPO humana recombinante (a partir de CHO y BHK). El contenido en ácido siálico muy bajo en EPO humana producida por PER.C6™ es indicativo de la presencia de oligosacáridos N-unidos que contienen galactosa de terminación y/o N-acetil-galactosamina y/o N-acetil-glucosamina. En segundo lugar, se encuentra N-acetil-galactosamina en cantidades significativas en los azúcares N-unidos de EPO humana producida por PER.C6™, mientras que no se encuentra N-acetil-galactosamina en los azúcares N-unidos de EPO urinaria humana y EPO humana recombinante producidas por células CHO. Se ha notificado que sólo se producen cantidades traza de N-acetil-galactosamina en los azúcares N-unidos en unos cuantos lotes de EPO humana recombinada producida en células BHK (Nimt2 *et al.* 1993). En tercer lugar, se encuentra que los azúcares N-unidos de EPO humana producida en células PER.C6™ contienen una cantidad muy alta de fucosa. Una fracción de las fucosas está unida en α 1,3 a N-acetil-glucosamina periférica formando de ese modo una denominada estructura de Lewis x (figura 5). Nunca se ha notificado que se producen estructuras de Lewis x en EPO urinaria humana o EPO humana recombinante producida en células CHO y BHK. Las estructuras de (sialil) Lewis x presentes en EPO según la invención hacen que esta EPO sea adecuada para unirse a selectivas y se prevé una aplicación adicional en la cardioprotección.

Debido a que los oligosacáridos unidos a proteínas tienen un gran impacto sobre las propiedades fisicoquímicas del polipéptido tales como la conformación terciaria, solubilidad, viscosidad y carga, la EPO humana producida por PER.C6™ tiene propiedades fisicoquímicas que difieren significativamente de la EPO urinaria humana y EPO humana recombinante producidas por células CHO y BHK (Toyoda *et al.* 2000). Claramente, la EPO humana producida por PER.C6™ está menos cargada que la EPO urinaria humana y EPO humana recombinante producidas por células CHO y BHK debido a un contenido en ácido siálico inferior y puede ser mas hidrófoba debido al contenido en fucosa muy alto. Como resultado, el pl promedio de EPO humana producida por PER.C6™ es significativamente superior al pl promedio de EPO urinaria humana o EPO humana recombinante producida por células CHO y BHK. Debido a que los glicanos de la EPO, en particular los ácidos siálicos, también tienen una influencia sobre la unión al receptor de EPO, se espera que la EPO humana producida por PER.C6™ tenga una afinidad diferente por el receptor de EPO que EPO urinaria humana y EPO humana recombinante producidas por células CHO y BHK. Aunque la producción de EPO en células PER.C6™ se ha dado a conocer anteriormente (documento WO 00/63403), ninguno de los detalles estructurales de la EPO producida se dieron a conocer entonces. Por tanto, el discernimiento obtenido en el presente documento justifica ahora la conclusión de que la producción de EPO en PER.C6™ la hace adecuada para aplicaciones completamente nuevas, especialmente en las que la eritropoyesis va a considerarse un efecto secundario (no deseado). Por supuesto, otras proteínas pueden beneficiarse del nuevo discernimiento proporcionado en el presente documento. Según otro aspecto, se proporciona un método para la producción de proteína que necesita N-glicanos que contienen lewis X y/o LacdiNAc, usando PER.C6™ o cualquier célula de mamífero que expresa EIA. Fragmentos tal como se usa en el presente documento son partes de la proteína y pueden ser péptidos de varios aminoácidos de largo hasta casi la proteína completa. Las variantes pueden ser muteínas, proteínas de fusión, proteínas o péptidos acoplados a otros restos no proteicos y similares. Tales fragmentos o variantes según la invención deben poder recibir las modificaciones postraduccionales.

Es el mérito de la presente descripción enseñar que células de mamíferos que expresan E1A adenoviral pueden usarse para producir las proteínas con glicanos N-unidos que comprenden estructuras de (sialil)Lewis X y/o LacdiNAc a propósito, y además para enriquecer estas fracciones particulares. Preferiblemente, dichas fracciones se enriquecen mediante un método que comprende una etapa de purificación por afinidad que emplea las estructuras de glicano deseadas, tal como el uso de la unión a una lectina o un anticuerpo monoclonal que se une a dichos glicanos N-unidos que comprenden estructuras de (sialil)Lewis X y/o LacdiNAc. Se muestra en el presente documento que usando estos métodos para la producción de EPO pueden obtenerse fracciones de EPO con perfiles de glicosilación particulares. Es un aspecto de la invención proporcionar composiciones que comprenden moléculas de eritropoyetina caracterizadas porque el número promedio de estructuras de lewis-X en glicanos N-unidos por molécula de eritropoyetina es al menos de aproximadamente 2,7. En otras realizaciones, dicho número promedio de estructuras de lewis-X en glicanos N-unidos por molécula de eritropoyetina es al menos de aproximadamente 3,6, 4,1 o 5,7. Tales composiciones pueden ser valiosas para fines medicinales tal como se da a conocer en el presente documento.

La presente invención da a conocer además el uso de proteínas de tipo cerebral producidas en células neuronales humanas para el tratamiento de lesión por isquemia/reperfusión en mamíferos y especialmente en seres humanos. La lesión por isquemia/reperfusión tal como se usa en el presente documento se define como el daño celular que se produce tras la reperfusión de tejidos isquémicos anteriormente viables. La lesión por isquemia/reperfusión está asociada con, por ejemplo, pero sin limitarse a terapia trombolítica, angioplastia coronaria, pinzamiento transversal

de la aorta, derivación cardiopulmonar, trasplante de órganos o tejidos, traumatismo y choque.

La presente invención proporciona el uso de proteínas terapéuticas, producidas en células de mamíferos, con oligosacáridos de tipo cerebral. Estos oligosacáridos de tipo cerebral comprenden en particular estructuras de Lewis x, estructuras de sialil Lewis x, o derivados de los mismos que contienen la estructura de (sialil) Lewis x, para el tratamiento de lesión por isquemia/reperfusión en sujetos mamíferos tales como seres humanos. La presencia de estructuras de (sialil) Lewis x en proteínas recombinantes dirige estas proteínas al sitio lesionado de isquemia/reperfusión y de ese modo ejercen su efecto protector de isquemia/reperfusión de manera más eficaz que proteínas que no contienen estructuras de (sialil) Lewis x. La presencia de oligosacáridos de tipo cerebral en proteínas expresadas de manera recombinante se muestra a modo de ejemplo en la presente invención mediante la eritropoyetina (EPO), que se produce en células PER.C6™. Este tipo particular de EPO contiene las estructuras de Lewis x así como las de sialil Lewis x. En la presente invención, se describen experimentos que muestran la superioridad de EPO de tipo cerebral (o de tipo neural) de PER.C6™ en comparación con EPO de tipo sérico (o de tipo renal) con respecto a la función cardioprotectora en modelos *in vivo* de lesión por isquemia/reperfusión cardíaca y con respecto a accidente cerebrovascular.

Otra ventaja presentada por la presente invención es que la EPO humana producida por PER.C6™ tiene una actividad neurotrófica. EPO producida por PER.C6™ proporciona a la proteína EPO ventajas fisicoquímicas y/o farmacocinéticas y/o farmacodinámicas en su funcionamiento como agente neurotrófico y/o neuroprotector. EPO producida por PER.C6™ tiene afinidad superior por células neuronales y por el EPO-R en células neuronales que la EPO recombinante humana glicosilada de tipo sérico altamente sialilada producida en células CHO y BHK. EPO humana recombinante producida en células no neurales (Goto *et al.* 1988) tiene una afinidad inferior por el EPO-R en células neuronales que por el EPO-R en células progenitoras eritroides (Musada *et al.* 1993 y 1994).

El papel neuroprotector de EPO abre claramente nuevas posibilidades para el uso de EPO humana recombinante como terapia neuroprotectora en respuesta a agentes químicos tóxicos que pueden inducirse por inflamación o por hipoxia y/o isquemia, o en trastornos neurodegenerativos. Aún, una desventaja importante es que cuando se aplica como agente neuroprotector, la EPO recombinante presente en la circulación sanguínea también dará lugar a un aumento de la masa de glóbulos rojos o hematocrito. Esto, a su vez, conduce a una viscosidad de la sangre superior, lo que puede tener efectos perjudiciales en isquemia cerebral (Wiessner *et al.* 2001).

La presente invención proporciona una solución para el problema de que la EPO humana recombinante que se ha aplicada hasta la fecha como agente neuroprotector tiene el efecto secundario hematotrópico no deseado (Wiessner *et al.* 2001). Por tanto, se muestra que la EPO humana recombinante glicosilada de tipo cerebral producida por PER.C6™ tiene un alto potencial como agente de neurogénesis y/o neuroprotector mientras que tiene un bajo potencial en la estimulación de la eritropoyesis.

Según la invención, puede administrarse de manera sistémica (intravenosa, intraperitoneal, intradérmica) EPO producida en una célula de mamífero que expresa EIA, tal como EPO producida por PER.C6™, para inhibir, para prevenir y/o para reparar el daño neural que está provocado, por ejemplo, por lesión cerebral y craneal aguda o trastornos neurodegenerativos. La presente invención también proporciona productos que pueden usarse para modular la función de tejidos que podrían dañarse gravemente por la hipoxia, tales como el sistema nervioso central y periférico, tejido retiniano y tejido cardíaco en mamíferos. Tales tejidos pueden estar enfermos pero también pueden ser normales y sanos. Los trastornos que pueden tratarse mediante productos proporcionados por la presente invención pueden resultar de lesiones craneales, cerebrales y/o cardíacas agudas, enfermedades neurodegenerativas, trastornos convulsivos, envenenamiento con neurotoxinas, hipotensión, paro cardíaco, radiación, esclerosis múltiple y/o de lesiones debidas a hipoxia. La hipoxia puede ser el resultado de la falta de oxígeno prenatal o posnatal, sensación de ahogo, enfisema, choque séptico, paro cardíaco, asfixia, casi ahogamiento, crisis de células falciformes, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, disritmia, narcosis de nitrógeno, disfunción cognitiva posquirúrgica, envenenamiento con monóxido de carbono, inhalación de humo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, choque anafiláctico o choque de insulina. Las lesiones convulsivas incluyen, pero no se limitan a, epilepsia, trastorno convulsivo crónico o convulsiones. En el caso de que la patología sea un resultado de enfermedades neurodegenerativas, el trastorno puede deberse a demencia del SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, accidente cerebrovascular, parálisis cerebral, traumatismo de la médula espinal, traumatismo cerebral, pérdida de función cognitiva relacionada con la edad, esclerosis lateral amiotrófica, alcoholismo, isquemia retiniana, glaucoma, pérdida neural general, pérdida de memoria o envejecimiento. Otros ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con productos proporcionados por la presente invención incluyen autismo, depresión, trastornos de ansiedad, trastornos del estado de ánimo, trastorno de hiperactividad con déficit de atención (THDA) y disfunción cognitiva.

PER.C6™-EPO puede cruzar de manera pasiva la barrera hematoencefálica en el caso de disfunción de la barrera hematoencefálica. En el caso de que la barrera hematoencefálica esté intacta, se cree que PER.C6™-EPO se transporta de manera activa por la barrera hematoencefálica a través del EPO-R. Algunos estudios sugirieron que la propia EPO puede cruzar la barrera hematoencefálica cuando se administran altas dosis de EPO recombinante (documento WO 00/61164). Otra vía pronosticada para que PER.C6™-EPO cruce la barrera hematoencefálica es mediante la interacción de las estructuras de (sialil-)Lewis x glicano presentes en la EPO producida por PER.C6™

EPO con moléculas de E-selectina presentes en células endoteliales de microvasos cerebrales humanos (Lou *et al.* 1996). La interacción entre E-selectina y EPO puede facilitar el transporte de EPO a través de la barrera endotelial cerebral puesto que también se ha implicado a E-selectina en la migración de linfocitos T al SNC (Wong *et al.* 1999). Si se requiere para una neuroprotección óptima, puede administrarse EPO producida por PER.C6™ a una dosis
 5 significativamente superior que EPO de tipo sérico, porque PER.C6™-EPO inducirá la eritropoyesis de manera mucho menos eficaz, de manera que los efectos perjudiciales del aumento de hematocrito se reducen o incluso están ausentes.

En otro aspecto de la invención, puede administrarse EPO producida en una célula de mamífero que expresa EIA,
 10 tal como PER.C6™-EPO, por vía intratecal mediante infusión, o a través de un catéter ventricular permanente, o a través de inyección lumbar, para inhibir o prevenir el daño neural. De nuevo, la ventaja de usar EPO de tipo cerebral con respecto a EPO de tipo sérico es que en caso de fuga a la circulación sanguínea en el caso de disfunción de la barrera hematoencefálica, debido a accidente cerebrovascular por ejemplo, no se producirán efectos secundarios no deseados con respecto a eritropoyesis.

La presente invención establece que células transformadas en crecimiento indefinido que crecen hasta densidades muy altas en condiciones libres de suero y que tienen características neurales, tales como PER.C6™, son extremadamente útiles para producir factores que dependen para su funcionalidad de estas características. Esto proporciona también inherentemente la posibilidad de producir factores que no tienen características neurales o
 20 funciones relacionadas con el sistema neural pero que no obstante se benefician de las modificaciones postraduccionales que se ocasionan por tales células. Puede preverse que algunos factores también desempeñan un papel en tejido no neural pero que todavía requieren estructuras de glicosilación que incluyen por ejemplo estructuras de Lewis x o residuos de fucosa tal como se describe para EPO en la presente invención y que pueden proporcionarse mediante los medios y métodos de la presente invención. Los ejemplos de factores que podrían producirse mediante PER.C6™ y que se aprovecharían de las características neurales de células PER.C6™
 25 incluyen, pero no se limitan a, eritropoyetina de tipo cerebral, transferrina y los diferentes factores mencionados anteriormente. La invención muestra que es muy probable que la producción de otras glicoproteínas neurotróficas recombinantes se beneficie de las modificaciones de tipo cerebral que tienen lugar en tales células.

Según la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que moléculas de tipo eritropoyetina que tienen en promedio un recuento de residuos de ácido siálico inferior por estructura principal de proteína son todavía eficaces en el tratamiento y/o la prevención de diversos trastornos. Esto abre completamente nuevos modos de uso de EPO y moléculas de tipo EPO que hasta la fecha se creía que eran de menos uso o sin uso, incluyendo pero sin limitarse a fracciones de EPO con bajo contenido en sialilo de lotes de EPO producidos en sistemas de células de
 30 mamíferos recombinantes, desechadas tras su fraccionamiento debido a su bajo grado de sialilación promedio y/o baja actividad eritropoyética asociada.

De este modo, la presente invención demuestra que EPO con un bajo contenido en ácido siálico es aproximadamente tan potente en la reducción del tamaño del infarto en un accidente cerebrovascular inducido experimentalmente en ratas que EPO con un contenido en ácido siálico superior. Está bien establecido en la técnica que un contenido en ácido siálico alto de EPO se correlaciona con semividas circulatorias más largas y aumento de la potencia eritropoyética *in vivo* (Tsuda *et al.* 1990; Morimoto *et al.* 1996).
 40

Por consiguiente, en términos generales, la invención proporciona el uso de una composición de moléculas de eritropoyetina para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en isquemia, una lesión por reperfusión, un trastorno inducido por hipoxia, una enfermedad inflamatoria, un trastorno neurodegenerativo y daño agudo al sistema nervioso central o periférico, teniendo dicha composición de moléculas de eritropoyetina basándose en el contenido en proteína una actividad eritropoyética inferior *in vivo* que epoetina alfa y epoetina beta. Las realizaciones de la invención comprenden composiciones y el uso de las mismas en las que dicha actividad eritropoyética *in vivo* es al menos el 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60,
 50 el 70, el 80 o el 90% inferior a la de la epoetina alfa (Eprex) o epoetina beta. Moléculas de tipo eritropoyetina pretenden incluir moléculas que tienen una estructura principal de proteína que es idéntica a o similar a las formas actualmente conocidas de EPO, por ejemplo muteínas de EPO, derivados de EPO o moléculas de EPO que difieren en la glicosilación de la estructura principal de proteína en sentido cualitativo y/o cuantitativo. Se pretende que muteínas tal como se usa en el presente consistan en moléculas de tipo eritropoyetina que tienen una o más mutaciones en la estructura principal de proteína mediante delección, adición, sustitución y/o translocación de aminoácidos en relación con la estructura principal de proteína de epoetina alfa y deben incluir variantes alélicas que se producen de manera natural así como variantes obtenidas de manera genética y/o química y/o enzimática. Tales moléculas deben poder conferir todavía una actividad funcional de EPO. Pueden obtenerse usando técnicas convencionales de biología molecular, bien conocidas por los expertos en la técnica. Un derivado tal como se usa en el presente documento es una molécula de tipo eritropoyetina que puede obtenerse a partir de eritropoyetina o epoetina alfa, o cualquier otra muteína funcional de epoetina alfa mediante la modificación química o enzimática de la misma. Actividad eritropoyética tal como quiere decirse en el presente documento es el efecto estimulador de la EPO sobre la producción de glóbulos rojos en un sujeto humano o animal, tal como puede medirse mediante el
 60 aumento de los valores de hematocrito a un cierto punto en el tiempo tras la administración al sujeto humano o animal de moléculas de tipo eritropoyetina (véase por ejemplo el ejemplo 9), o la medición de la concentración de

hemoglobina. Estos métodos los conocen bien los expertos en la técnica. La epoetina alfa es la forma de EPO humana recombinante presente en Eprex-™ comercializada actualmente, y es similar o idéntica (con respecto a la composición de aminoácidos e hidratos de carbono) a eritropoyetina humana aislada de orina de pacientes anémicos. Están bien establecidos regímenes de tratamiento para fines eritropoyéticos. En general, las dosificaciones de EPO se proporcionan en UI (unidades internacionales), que se refieren a la actividad de EPO en eritropoyesis. Tales UI se correlacionan con el contenido en proteína de EPO pero se definen operativamente, y por tanto la correlación puede variar entre diferentes lotes. Como norma general, una UI corresponde a 8-10 ng de epoetina alfa. Para el fin de describir la invención, se hace referencia a la actividad eritropoyética de las moléculas de tipo eritropoyetina basándose en el contenido en proteína, para librarse de la variable introducida al definir UI. Quedará claro para el experto en la técnica que aunque las UI se proporcionan habitualmente para preparaciones de EPO comerciales, la concentración de moléculas de EPO en tales preparaciones puede definirse fácilmente según procedimientos convencionales. Esto permitirá determinar la actividad específica relativa por ejemplo en UI/g (véase por ejemplo el documento EP 0428267). También se describen varios ensayos *in vivo* e *in vitro* útiles para estos fines por Storrington *et al.* (1992). Ejemplos de otras formas de EPO actualmente en el mercado son Procrit o Epogen (ambas epoetina alfa) y Aranesp (darbepoetina alfa, EPO con sitios de N-glicosilación adicionales para aumentar la semivida circulatoria y la actividad eritropoyética).

Aunque la actividad eritropoyética puede variar algo entre las diversas preparaciones de epoetina alfa y epoetina beta comerciales en el mercado, generalmente están optimizadas para una actividad eritropoyética alta. La presente invención da a conocer el uso de moléculas de tipo EPO o formas de EPO que tienen una actividad eritropoyética o hematopoyética inferior, disminuyendo o evitando de ese modo los efectos secundarios de aumento de la eritropoyesis cuando esto no se desea.

Lo dado a conocer es una composición de moléculas de tipo eritropoyetina caracterizada por un número promedio de residuos de ácido siálico por molécula de tipo eritropoyetina que es al menos el 10% inferior al número promedio de residuos de ácido siálico por molécula de eritropoyetina en epoetina alfa. Según otras realizaciones, dicho número promedio de residuos de ácido siálico puede elegirse para que sea al menos el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% inferior al número promedio de residuos de ácido siálico por estructura principal de proteína EPO en epoetina alfa. Dicho número promedio de residuos de ácido siálico en la molécula de tipo eritropoyetina se encuentra preferiblemente entre el 0 y el 90% del número promedio de residuos de ácido siálico por molécula de EPO en epoetina alfa, aunque el porcentaje exacto puede depender de trastorno a trastorno y, algunas veces, de paciente a paciente, ya que algunas combinaciones de paciente-trastorno son menos vulnerables a valores de hematocrito altos que otras. Alternativamente, el número de residuos de ácido siálico podría describirse por molécula de tipo EPO, por ejemplo 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ó 0 residuos de ácido siálico por molécula de tipo EPO. Puesto que los valores son promedios calculados para una composición que consiste en moléculas de tipo epo de grado variable de sialilación, son posibles valores de números no enteros entre los valores mencionados para definir las moléculas según la invención. El intervalo óptimo podría determinarse empíricamente sin carga excesiva por el experto en la técnica. El número promedio de residuos de ácido siálico por molécula o el contenido en ácido siálico de EPO puede determinarse según procedimientos publicados, y los conocen bien los expertos en la técnica. Se describe un posible procedimiento en el documento EP 0428267. En resumen, los residuos de ácido siálico se escinden de las moléculas de tipo EPO mediante hidrólisis con ácido sulfúrico 0,35 M a 80°C durante 30 minutos, y las disoluciones se neutralizan con hidróxido de sodio antes de su análisis. Alternativamente, los ácidos siálicos pueden eliminarse mediante escisión enzimática según procedimientos convencionales. La cantidad de EPO se estima usando procedimientos bien conocidos, por ejemplo usando kits de ensayo de proteínas disponibles comercialmente (por ejemplo ensayo de Bradford, Biorad) y curvas patrón usando EPO humana recombinante como patrón, absorbancia a 280 nm, ELISA, RIA y similares. El contenido en ácido siálico puede analizarse mediante el procedimiento de Jourdain *et al.* (1971). Alternativamente, los ácidos siálicos pueden analizarse usando cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución, usando procedimientos bien conocidos por el experto (por ejemplo análisis de ácidos siálicos usando cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución, número de formulario de solicitud TN41, Dionex). El contenido en ácido siálico puede expresarse como moles de ácido siálico por mol de EPO, o un número promedio de residuos de ácido siálico por molécula de tipo EPO. También puede proporcionarse una indicación del número promedio de residuos de ácido siálico por molécula de tipo EPO mediante isoelectroenfoque (véase el ejemplo 4), que mide el pI.

Pueden preverse varios modos para obtener moléculas de tipo eritropoyetina con un número promedio inferior de residuos de ácido siálico por molécula de tipo eritropoyetina. Estos incluyen, pero no se limitan a tratamiento de moléculas de tipo EPO, por ejemplo producidas de manera recombinante en cualquier línea de célula huésped adecuada, usando enzimas que eliminan por escisión el ácido siálico particular, tales como neuraminidasas, o enzimas que eliminan por escisión más sustituyentes (incluyendo ácido siálico) de las estructuras de glicosilación, tales como por ejemplo N-glicanasa F (elimina el N-glicano completo), endoglicosidasa F2 (elimina estructuras biantenarias), endoglicosidasa F3 (elimina estructuras bi y triantenarias) y similares, o tratamiento de moléculas de tipo EPO con agentes químicos, incluyendo pero sin limitarse a ácidos, lo que da como resultado una disminución del número promedio de residuos de ácido siálico por molécula de tipo EPO. En particular, una fracción de EPO altamente sialilada podría desialilarse así y usarse en la presente invención. Aún en otra realización, se obtienen moléculas de tipo EPO con un número promedio inferior de moléculas de ácido siálico purificando o separando tales formas de una mezcla de contiene EPO con sialilación tanto superior como inferior. Los sistemas de producción

usados actualmente dan como resultado generalmente tales mezclas, y la EPO que se destina a fines eritropoyéticos se prepara purificando las formas con un número promedio alto de residuos de ácido siálico. La presente invención da a conocer el uso de otras fracciones a partir de este procedimiento, es decir, las formas de EPO con un número inferior de residuos de ácido siálico. La purificación o separación de tales fracciones puede realizarse usando técnicas bien establecidas conocidas por el experto, tales como intercambio iónico, purificación por afinidad y similares. Las moléculas de tipo eritropoyetina de la invención se producen preferiblemente de manera recombinante. Esto puede realizarse en cualquier sistema de expresión adecuado, incluyendo pero sin limitarse a células de ovario de hámster chino, células de riñón de cría de hámster, células humanas, tales como HeLa, HEK293 o PER.C6™. También es posible la expresión en células eucariotas inferiores tales como células de insectos o levaduras. La producción de moléculas de tipo EPO que tienen un bajo contenido en ácido siálico puede realizarse en sistemas celulares de sialilación deficiente, debido a una falta natural de enzimas de sialilación, tales como ciertos huéspedes procariotas, o mediante mutagénesis o modificación genética de huéspedes que aparte de esto pueden producir proteínas sialiladas. Están bien documentados métodos y medios para producir proteínas recombinantes y los conoce el experto en la técnica, y quedará claro para el experto que es posible el uso de una fuente diferente para la proteína de tipo EPO sin apartarse del alcance de la invención. En un aspecto de la invención, las moléculas de tipo EPO se producen mediante métodos según la invención, produciendo de ese modo moléculas con una modificación postraducciona l predeterminada.

En otro aspecto de la invención, la composición que comprende moléculas de tipo eritropoyetina se caracteriza por la presencia de moléculas de tipo eritropoyetina que una vez administradas por vía parenteral a un sujeto humano o animal se aclaran del torrente sanguíneo a una velocidad más rápida que epoetina alfa y epoetina beta. El aclaramiento del torrente sanguíneo puede medirse mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo determinando la semivida de una proteína en la sangre tal como se realiza en el ejemplo 18. En voluntarios sanos, la epoetina alfa tiene una semivida circulatoria de aproximadamente 4 horas tras inyecciones intravenosas repetidas. Se ha notificado una semivida de aproximadamente 5 horas en pacientes con insuficiencia renal crónica, y aproximadamente 6 horas en niños. Usando el método del ejemplo 8, se mide una semivida de 180 min. para epoetina alfa (Eprex). Debe quedar claro para el experto que este método puede usarse para determinar la semivida de las composiciones de la invención, y expresar esta semivida en horas o en un porcentaje de la semivida de la EPO convencional EPO (Eprex). Son viables experimentos similares en seres humanos para determinar la semivida en seres humanos. Moléculas de tipo eritropoyetina con una razón inferior de estructuras tetraantenarias con respecto a estructuras biantenarias también tendrán una semivida más corta en plasma (Misaizu *et al*, 1995; Takeuchi *et al*, 1989). La producción de EPO en líneas celulares que dan lugar a tales razones inferiores es viable, o alternativamente estas formas se purifican de las formas que contienen más estructuras tetraantenarias. Tales composiciones que comprenden relativamente más estructuras biantenarias también son útiles según la invención. Quedará claro que una ventaja de la invención actual es que pueden alcanzarse concentraciones máximas superiores de moléculas de tipo eritropoyetina en la circulación en comparación con las formas de EPO usadas actualmente tales como Eprex, Procrit, NESP. Si se deseasen altas concentraciones de moléculas de tipo EPO para dicho tratamiento, esto puede realizarse administrando altas dosis de las composiciones de la invención, por ejemplo en forma de preparaciones farmacéuticas que contienen dosis altas. La administración de dosis similares basándose en el contenido en proteína de las moléculas de tipo EPO usadas actualmente conduciría a una eritropoyesis superior, lo que es un efecto secundario no deseado para dichos tratamientos.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas de eritropoyetina, y métodos para el tratamiento o la prevención de trastornos seleccionados de dichos grupos, así como composiciones de moléculas de eritropoyetina para el tratamiento preventivo y/o terapéutico del cuerpo humano o animal.

Ejemplos

Ejemplo 1. Estudios sobre la expresión de proteínas marcadoras en células PER.C6™.

Se derivaron las células que se transformaron con la región E1 del adenovirus humano tipo 5 y que dieron como resultado la línea celular PER.C6™ (tal como se depositó en la ECACC con el n.º 96022940) de una retina embrionaria humana. Las retinas comprenden generalmente varios tipos de células diferentes (al menos 55 subtipos neuronales diferentes), incluyendo células de tipo fibroblasto y neuronales (Masland 2001). Con el fin de rastrear el origen celular de PER.C6™, se realizó un estudio para someter a prueba la expresión de proteínas marcadoras en o sobre las células. Estos marcadores se conocen en la técnica por ser característicos de ciertos tipos de células y/o tejidos. En la tabla 1 se facilitan las proteínas marcadoras.

Se sometió a prueba la expresión de la proteína marcadora usando anticuerpos dirigidos contra las proteínas marcadoras. En cada experimento, se llevó un control negativo (células PER.C6™ no incubadas con anticuerpo) y un control positivo. Estos controles positivos son cortes de tejido humano que se sabe que expresan la proteína marcadora (tabla II).

Se cultivaron células PER.C6™ en portaobjetos de vidrio en una cámara de medio (Life Technologies, Nunc Lab-Tek, portaobjetos de cámara, esterilizados por radiación, 2 cámaras de medio, n.º de catálogo 154464A). Se

sembraron células PER.C6™ a una confluencia del 65-70% (2 pocillos por cámara de cultivo) y se cultivaron durante 24 h a 37°C (10% de CO₂, 95% de aire). Se aspiró el medio y se lavaron los portaobjetos de vidrio con células con PBS estéril, se retiraron de la cámara de medio y se secaron al aire. Se fijaron las células sobre los portaobjetos de vidrio mediante incubación en acetona durante 2 min. Tras el secado al aire, se envolvieron los portaobjetos en lámina de aluminio y se congelaron a una temperatura inferior a -18°C hasta su uso.

Se obtuvieron tejidos de control positivo de bancos de portaobjetos de tejido preparados para su uso de rutina en la división de patología, Academic Hospital Erasmus University (Rotterdam, Países Bajos). Se prepararon cortes congelados (5 µm) y se fijaron en acetona, según procedimientos de rutina.

En la tabla III se facilitan los anticuerpos primarios, sus proteínas marcadoras respectivas, los proveedores y los números de catálogo de los anticuerpos. Las diluciones, también detalladas en la tabla III, se realizan en solución salina tamponada con fosfato (PBS), albúmina sérica bovina al 1%. Se realizaron incubaciones de los portaobjetos con el anticuerpo primario durante 30 min. a temperatura ambiente, se enjuagaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario. Estos anticuerpos secundarios fueron o bien anticuerpo de cabra anti-conejo (DAKO E0432; dilución 1:50) o bien anticuerpo de cabra anti-ratón (DAKO E0433; dilución 1:50), dependiendo de la naturaleza del anticuerpo primario usado. Se conjugó el anticuerpo secundario con biotina. Tras enjuagar con PBS, se incubaron los portaobjetos con complejo de estreptavidina-avidina/biotina conjugado con fosfatasa alcalina (DAKO, K0376). Tras 30 min. de incubación, se enjuagaron las muestras con Tris/HCl pH 8,0, se revelaron con fucsina-sustrato cromógeno (DAKO K0624) en la sala a oscuras durante 30 min. Posteriormente, se enjuagaron los portaobjetos con agua corriente durante 2 min. y se contratiñeron con hematoxilina según procedimientos de rutina bien conocidos por personas expertas en la técnica. Entonces, se examinaron los portaobjetos microscópicamente y se clasificaron para la expresión de la proteína marcadora (negativos o positivos). Los resultados se presentan en la tabla IV. Para la tinción de neurofilamentos (positivos) no todas las células PER.C6™ se tiñeron positivamente como resultado de una fase de maduración o ciclo celular diferente de la población celular. Esto es una observación normal para las tinciones de neurofilamentos.

A partir de los datos obtenidos se concluyó que las células PER.C6™ son de origen neuronal puesto que las células se tiñeron positivas para vimentina, sinaptofisina, neurofilamentos, GFAP y N-CAM.

Ejemplo 2. Composición de monosacáridos de N-glicanos derivados de PERC6™-EPO en comparación con los de Eprex.

Una primera etapa en la caracterización de las estructuras de N-glicanos producidos por PER.C6™ es la medición de la razón molar de los diversos monosacáridos. El análisis de los monosacáridos se realizó usando cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Para este análisis se seleccionaron muestras de EPO, producidas por los clones derivados de PER.C6™, P7, P8 y C25 (P7 y P8 se describen en el documento WO 00/63403, y C25 se generó generalmente según estos métodos, usando el gen de resistencia a neomicina como marcador de selección [plásmido pEPO2001/Neo]) en medio DMEM y/o JRH. Se analizó en paralelo Eprex (Jansen Cilag), que es la eritropoyetina derivada de CHO disponible comercialmente, y por tanto se usó como referencia.

Se purificaron muestras de PER.C6™-EPO mediante cromatografía de afinidad usando una columna empaquetada con perlas de C4 Sepharose (volumen de la perla de 4 ml, Amersham Pharmacia Biotech) acopladas con anticuerpos monoclonales de ratón anti-EPO (IgG1). Se eluyeron las moléculas de EPO unidas con glicina-HCl 0,1 M, pH 2,7, y se neutralizaron inmediatamente las fracciones resultantes mediante la adición de tampón fosfato de sodio/potasio, pH 8,0. Posteriormente, se reunieron las fracciones que contenían EPO y se cambió el tampón a Tris-HCl 20 mM que contenía Tween 20 al 0,1% (v/v) utilizando columnas de desalinización Hiprep 26/10 (Amersham Pharmacia Biotech).

Para los análisis de glicanos, se dializaron muestras de EPO purificadas durante la noche frente a agua de calidad MilliQ, y se secaron en un evaporador Speedvac. Las muestras de EPO secadas (cantidades que oscilaban desde 39 hasta 105 µg) se disolvieron en tampón de incubación (tampón de perfilado C3 diluido 1:1, Glyko). Tras la adición de dodecilsulfato de sodio (SDS) y beta-mercaptoetanol hasta concentraciones finales del 0,1% (p/v) y el 0,3% (v/v), respectivamente, se desnaturalizaron las muestras durante 5 min. a 100°C. Después se añadió Nonidet P- 40 (BDH) hasta una concentración final del 0,75% (v/v), y se desglicosiló EPO durante la noche a 37°C, usando N-glicanasa F (mU, Glyko). Tras la desglicosilación, se separaron los N-glicanos liberados de las proteínas, las sales y los detergentes usando columnas SPE (Alltech) con negro de carbón grafitizado (Carbograph), según Packer *et al.* (1998).

Se sometieron a hidrólisis las cadenas de N-glicano purificadas en ácido trifluoroacético 2 M (TFA) a 100°C durante 4 h. Tras la hidrólisis, se secaron los monosacáridos en un evaporador Speedvac, se lavaron con agua, y se evaporaron de nuevo en un evaporador Speedvac. Se disolvieron los monosacáridos secos en 26 µl de agua de calidad MilliQ. Tras la adición de 6 µl de desoxiglucosa (100 nmol/ml), que se usó como patrón interno, se aplicaron las muestras (24,5 µl) a un sistema BioLC de HPAEC-PAD con una columna CarboPac PA 1 de 2 mm de diámetro

(Dionex). La columna se eluyó isocráticamente en NaOH 16 mM (Baker) a una velocidad de flujo de 0,25 ml/min. Se calculó la composición de monosacáridos comparando el perfil con el obtenido con una mezcla de patrones de monosacáridos que consistía en fucosa, desoxiglucosa, galactosamina, glucosamina, galactosa y manosa.

- 5 El análisis de monosacáridos demostró que el estado de glicosilación de PER.C6™-EPO es significativamente diferente de Epex (tabla V). Se normalizó la razón de los monosacáridos indicados (Man = manosa, Fuc = fucosa, GalNAc = N-acetilgalactosamina, GlcNAc = N-acetil-glucosamina, Gal = galactosa) a 3 Man. Entre paréntesis se facilitan los valores por duplicado. Las muestras de PER.C6™-EPO contienen cantidades significativas de GalNAc, mientras que los azúcares N-unidos de Epex carecen de este residuo. Esto sugiere que PER.C6™-EPO contiene
- 10 las denominadas estructuras de LacdiNAc (por ejemplo, GalNAc β 1-4GlcNAc). Otra característica de PER.C6™-EPO es la relativa abundancia de residuos de fucosa mostrada en la tabla V. Esto indica fuertemente la presencia de estructuras de Lewis en los N-glicanos de PER.C6™-EPO. En contraposición, se sabe que Epex está desprovisto de estructuras de Lewis. Por consiguiente, la cantidad de fucosa encontrada en Epex puede atribuirse únicamente a la fucosilación del núcleo de N-glicanos. De manera notable, los datos de los análisis de monosacáridos también
- 15 demostraron que las condiciones de cultivo afectan al estado de glicosilación de EPO en PER.C6™. No debe concluirse que las condiciones de cultivo son las únicas responsables de las modificaciones postraduccionales predeterminadas que están presentes en las proteínas producidas. Naturalmente, las líneas celulares deben poder modificar las modificaciones postraduccionales de las proteínas producidas en tales células a través de la presencia de ciertas enzimas de glicosilación específicas tales como transferasas. Las condiciones de cultivo sólo pueden
- 20 ejercer actividades aditivas.

Por ejemplo, cuando se cultivan clones que producen EPO (en suspensión) en medio JRH Excell 525, se encontró que los glicanos N-unidos de EPO contenían niveles superiores de GlcNAc, GalNAc, Gal y Fuc en comparación con los azúcares N-unidos de EPO derivados de células cultivadas (adherentes) en medio DMEM (tabla V). Este efecto

25 fue particularmente evidente en el caso del clon P8. El elevado nivel de GlcNAc puede sugerir que ha aumentado la ramificación de los azúcares N-unidos y/o que los azúcares N-unidos contienen más repeticiones de lactosamina, cuando las células se cultivan en medio JRH. El aumento en N-acetil glucosaminilación y en (N-acetil-) galactosilación da lugar a su vez a un aumento del número de sitios aceptores de fucosa proporcionando de ese modo una explicación para el aumento del contenido en Fuc.

30 Ejemplo 3. Análisis espectrométrico de masas para revelar diferencias estructurales entre N-glicanos de PER.C6™-EPO y Epex.

Para obtener información más detallada sobre la estructura de los N-glicanos producidos por PER.C6™, se decidió

35 analizar las cadenas de azúcar completas de PER.C6™-EPO mediante MALDI-MS. Para este análisis, se utilizaron muestras de EPO purificadas por afinidad, producidas por los clones derivados de PER.C6™, P7 y P8 en medio DMEM, que se fraccionaron adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico (tal como se describe más adelante). Se sometieron muestras de PER.C6™, purificadas por afinidad tal como se describe en el ejemplo 2, de las que el tampón se cambió después a PBS, a cromatografía de intercambio aniónico usando una columna de

40 HiTrap Sepharose Q HP (Amersham Pharmacia Biotech). Se obtuvieron tres subfracciones de EPO aplicando un gradiente escalonado en Tris-HCl 20 mM / CuSO₄ 20 μ M, comenzando con NaCl 45 mM (fracción 1), seguido por NaCl 75 mM (fracción 2) y finalizando con NaCl 135 mM (fracción 3). Cada escalón en el gradiente duró 10 min. con una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las fracciones 1 de cuatro rondas se reunieron en el conjunto A, las fracciones 2 en el conjunto B, y las fracciones 3 en el conjunto C. Después se desalaron los conjuntos resultantes A, B y C

45 utilizando columnas de desalinización HiPrep 26/10 (Amersham Pharmacia Biotech). Se liberaron los glicanos N-unidos de los conjuntos de EPO mediante tratamiento con N-glicanasa F y se desalilaron mediante tratamiento con neuraminidasa. Se analizó en paralelo Epex como referencia. En la figura 1A-G se muestran espectros de masas representativos de diversas muestras de EPO: Epex y las muestras purificadas, fraccionadas (conjuntos A, B y C de la columna de cromatografía de intercambio aniónico). Se trataron muestras de PER.C6™-EPO derivadas de los

50 clones indicados cultivados en medio DMEM con glicanasa F y neuraminidasa, y después se analizaron mediante MALDI-MS. Los símbolos (representados en el espectro de Epex) son: cuadrado negro es GlcNAc, círculo blanco es Man, círculo negro es Gal, triángulo blanco es Fuc. El perfil de masas de los azúcares N-unidos de Epex (figura 1A) corresponde a los datos publicados previamente e indica que los azúcares tetraantenarios con o sin repeticiones de lactosamina predominan en esta preparación de EPO. Aunque Epex y PER.C6™-EPO contienen estructuras de

55 azúcares con una masa similar (figura 1H-G), el perfil de las estructuras de azúcares del segundo es mucho más complejo, lo que sugiere que estos azúcares presentan un gran grado de heterogeneidad. Se usó el programa informático de ExpAsy para predecir la composición de azúcares partiendo de la base de la masa observada (tablas VI y VII). También se presentó la abundancia relativa de los diferentes oligosacáridos en cada conjunto. Los datos demostraron que la mayoría de los oligosacáridos N-unidos derivados de PER.C6™-EPO contienen múltiples

60 residuos de fucosa (tablas VI y VII, véase el nivel de residuos de dHex). Algunos glicanos estaban incluso fucosilados de manera cuádruple. Por consiguiente, estos datos están en línea con los análisis de monosacáridos y sugieren fuertemente que PER.C6™-EPO está hiperfucosilada, y, por tanto, lo más probablemente decorada ampliamente con N-glicanos que tienen las denominadas estructuras de Lewis. Se sabe que los oligosacáridos con epítomos de Lewis x (sialilados) son secuencias de reconocimiento esenciales para selectinas, que median

65 adhesiones célula-célula tanto en respuestas inflamatorias como inmunitarias (Varki *et al.* 1999) y se encuentran de manera característica en glicoproteínas de cerebro (Margolis y Margolis 1989). Por tanto, se ha demostrado que

numerosas glicoproteínas que portan estas estructuras de Lewis x tienen potencial terapéutico mostrando actividades antiinflamatorias e inmunosupresoras. Se observa en este caso que una señal de masa no siempre puede asignarse inequívocamente a una cierta estructura de azúcar: por ejemplo, residuos como GlcNAc y GalNAc tienen la misma masa. Dado que el análisis de monosacáridos de PER.C6™-EPO reveló la aparición de GalNAc en los azúcares N-unidos, se espera que algunos de estos picos representen N-glicanos con las denominadas estructuras de LacdiNAc (por ejemplo, GalNAc β 1-4GlcNAc). Por ejemplo, picos con valores de m/z de ~ 2038 y ~ 2185 (tablas VI y VII) representan lo más probablemente N-glicanos con motivos de LacdiNAc. Por lo demás, estos picos representarían estructuras tetraantenarias, que terminan en GlcNAc debido a la ausencia de Gal o GalNAc. Aunque pueden estar presentes tales estructuras debido a glicosilación incompleta, la presencia de Fuc proximal implica que el azúcar contenía un residuo de Gal o GalNAc que es necesario para formar un motivo que se reconoce por la fucosiltransferasa (FUT) que cataliza la formación de la estructura de Lewis.

La aparición relativa de los diferentes azúcares varía entre las preparaciones de EPO derivadas de dos clones de PER.C6™ independientes, tal como se considera por la diferencia en la altura relativa de ciertos picos. En particular, los supuestos azúcares biantenarios con motivos de LacdiNAc (figura 1; tablas VI y VII, señales con valores de m/z de ~ 2038 y ~ 2185) son los azúcares principales en las muestras de EPO derivadas de P8, mientras que en las muestras de P7 estas estructuras son mucho menos abundantes. En este último clon, el pico con un valor de m/z de ~ 2541 , que corresponde supuestamente a un glicano tetraantenario completamente galactosilado, fue la estructura más abundante. Estos datos están de acuerdo con los análisis de monosacáridos, que ya indicaron que, cuando se hacía crecer en medio DMEM, P8 producía EPO que portaba glicanos con un grado inferior de ramificación que los derivados de P7-EPO (tabla V).

Ejemplo 4. Comparación del contenido en ácido siálico de PER.C6™-EPO y CHO-EPO.

Se analizó el contenido en ácido siálico de PER.C6™-EPO y se comparó con la eritropoyetina derivada de células de ovario de hámster chino (CHO-EPO) mediante isoelectroenfoque (IEF) usando tiras de IPG (Amersham Pharmacia Biotech) que tienen un gradiente de pH lineal de 3-10. Tras el enfoque, se transfirieron de manera pasiva las isoformas de EPO a nitrocelulosa y se visualizaron usando un anticuerpo específico para EPO y ECL (figura 2). Se analizó mediante isoelectroenfoque EPO producida por cuatro clones de PER.C6™ diferentes (carriles C, D, E, y F) y tres clones de CHO diferentes que expresan EPO de manera estable (carriles G, H, y I) para determinar el contenido en ácido siálico. Se generaron las líneas celulares CHO y PER.C6™ productoras de EPO generalmente según métodos descritos en el documento WO 00/63403 usando el gen de resistencia a neomicina como marcador de selección. Se cargaron por tira mil UE de PER.C6™-EPO y 500 UE de CHO-EPO. Se usaron quinientas UI de Eprex (carril A) y Eprex tratada con neuraminidasa (parcialmente desialilada) (carril B) para identificar las diversas isoformas de EPO. Tras el enfoque, se transfirió EPO a filtro de nitrocelulosa y se visualizó usando un anticuerpo monoclonal contra EPO y ECL. La muestra de Eprex, que representa una EPO disponible comercialmente es una formulación que contiene isoformas altamente sialiladas y se usó como marcador.

Los resultados demostraron que las células CHO pueden producir isoformas de EPO que contienen hasta al menos 12 ácidos siálicos por molécula (carriles G-I), lo que confirma los datos de Morimoto *et al.* (1996). En contraposición, aunque se produjeron algunas isoformas con 8-10 ácidos siálicos por PER.C6™, éstas estuvieron representadas de manera insuficiente y sólo podían detectarse tras la exposición prolongada de la película (carriles C-F). En consecuencia, puede concluirse que PER.C6™-EPO está considerablemente menos sialilada que CHO-EPO.

Ejemplo 5. Actividades α 1,3-, α 1,6- y α 1,2-fucosiltransferasa en células PER.C6™.

El potencial de glicosilación de una célula se determina en buena parte por un amplio repertorio de glicosiltransferasas implicadas en la biosíntesis gradual de azúcares N- y O-unidos. La actividad de estas glicosiltransferasas varía entre líneas celulares y, por tanto, las glicoproteínas producidas en diferentes líneas celulares adquieren diferentes glicanos. En vista de los datos mostrados en el presente documento, que demuestran que los glicanos de PER.C6™-EPO están fuertemente fucosilados, se analizó la actividad de numerosas fucosiltransferasas (FUT) implicadas en la síntesis de azúcares N-unidos usando métodos conocidos generalmente por los expertos en la técnica (Van den Nieuwenhof *et al.* 2000). En este estudio, se estudiaron las actividades de α 1,6-FUT, que está implicada en la fucosilación en núcleo de N-glicanos, α 1,2-FUT que media la ocupación de los residuos de galactosa terminales, dando lugar a los denominados epítopos de Lewis y, y α 1,3-FUT, que genera estructuras de Lewis x. Para comparación, también se analizaron las correspondientes actividades FUT presentes en células CHO.

Se midieron las actividades de las FUT indicadas en extractos celulares de PER.C6™ y CHO usando un ensayo de actividad glicosiltransferasa. Este ensayo mide la reacción catalizada por glicosiltransferasa entre un sacárido (en este caso fucosa) y un sustrato de azúcar. También se midió la actividad GAIT como control interno. Los valores representan los valores medios de dos experimentos. Todos los valores, y en particular los de PER.C6™ fueron 2-3 veces inferiores en el segundo experimento. De manera notable, se expresaron las actividades per mg de proteína (presente en el extracto celular). Debido a que las células PER.C6™ son significativamente más grandes que las células CHO, las diferencias entre las actividades FUT y GAIT de células CHO y PER.C6™ pueden ser mayores o menores de lo que parecen. Los resultados de los ensayos de actividad glicosiltransferasa se muestran en la tabla

VIII y revelan que PER.C6TM así como CHO presentan actividad α 1,6-FUT significativa, lo que sugiere que ambas líneas celulares pueden producir cadenas de glicanos fucosilados en núcleo. Sin embargo, la actividad α 1,3-FUT sólo fue significativa en células PER.C6TM mientras que apenas podía detectarse en células CHO. Ninguna de las dos líneas celulares mostró actividad α 1,2-FUT. Conjuntamente, estos datos muestran una diferencia entre el potencial de glicosilación de CHO y PER.C6TM, y explican por qué PER.C6TM-EPO contiene más fucosas que EPO producida por CHO (Eprex).

Ejemplo 6. Glicanos con epítomos de Lewis x presentes en PER.C6TM-EPO.

Puesto que PER.C6TM posee actividad α 1,3-, pero no α 1,2-fucosiltransferasa, es muy probable que las cadenas de N-glicanos producidas por PER.C6TM contengan epítomos de Lewis x en lugar de epítomos de Lewis y. Se verificó esto marcando PER.C6TM-EPO con un anticuerpo monoclonal de ratón (IgM humana, anti-Lewis x; Calbiochem) que reconoce específicamente estructuras de Lewis x, usando inmunotransferencia de tipo Western. Se corrieron en un gel de SDS-poliacrilamida cantidades iguales de PER.C6TM-EPO (derivada del clon P7, indicado en este caso como P7.100) y Eprex, no tratadas (-) o tratadas con HCl (+), y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se usó un anticuerpo monoclonal (IgM anti-ratón, Calbiochem) y ECL (Amersham Pharmacia Biotech) para detectar el epítomo de Lewis x. Tal como puede observarse en la figura 3, sólo pudo marcarse PER.C6TM-EPO con el anticuerpo específico para el epítomo de Lewis x. Se indica la ubicación del marcador de peso molecular (52, 35 y 29 kDa). Puesto que el enlace α 1,3-fucosa es lábil en ácido, la señal se perdió tras el tratamiento con HCl.

Ejemplo 7. Expresión de estructuras de Lewis x en la superficie celular de células PER.C6TM.

Para determinar si se producen generalmente estructuras de Lewis x en células PER.C6TM, se marcó la superficie de células CHO y PER.C6TM normales (es decir, que no producen EPO) con anticuerpos específicos para Lewis x (Calbiochem). Se incubaron las células con los anticuerpos primarios (el Acm frente a Lewis x se usó a 0,16 μ g/ml, y el Acm frente a sialil-Lewis x se usó a 5 μ g/ml). Se usó anti-IgM conjugado con FITC como anticuerpo secundario. Las células marcadas se analizaron mediante FACS. La línea discontinua representa la señal de las células incubadas con el anticuerpo secundario sólo (control negativo). Los resultados mostrados en la figura 4 revelaron que las células PER.C6TM estaban fuertemente marcadas con los anticuerpos en contraposición a las células CHO que no pueden producir estas estructuras. De manera notable, se observó repetidamente que las células PER.C6TM mostraban un patrón heterogéneo de tinción con anticuerpos frente a Lewis x. El marcaje con un anticuerpo específico para estructuras de sialil-Lewis x (Calbiochem) dio una señal positiva moderada sólo cuando se usó una concentración muy alta del anticuerpo.

Ejemplo 8. Inhibición de apoptosis mediante PERC6TM-EPO (de tipo cerebral) *in vitro*, en células NT2 y células hNT cultivadas en condiciones hipóxicas.

Se comparan EPO de tipo sérico y EPO (de tipo cerebral) producida por PER.C6TM en su actividad *in vitro* para proteger a células neuronales corticales de rata, ratón y ser humano de la muerte celular en condiciones hipóxicas y con privación de glucosa. Para esto, se prepararon cultivos de células neuronales a partir de embriones de rata tal como describieron otros autores (Koretz *et al.* 1994; Nagayama *et al.* 1999; White *et al.* 1996). Para evaluar los efectos de EPO de tipo sérico y EPO de tipo cerebral producida por PER.C6TM, se mantuvieron las células en cámaras incubadoras modulares en una incubadora con camisa de agua durante hasta 48 h a 37°C, en medio libre de suero con glucosa 30 mM y 95% de aire humidificado/5% de CO₂ (normoxia) o en medio libre de suero sin glucosa y 95% de N₂ humidificado/5% de CO₂ (hipoxia y privación de glucosa), en ausencia o presencia de Eprex 30 pM o EPO de tipo cerebral producida por PER.C6TM purificada 30 pM. Se exponen los cultivos celulares a hipoxia y privación de glucosa durante menos de 24 h y después de eso se devuelven a las condiciones normóxicas durante el resto de las 24 h. Se analiza la citotoxicidad mediante la fluorescencia de azul de Alamar, que notifica la viabilidad celular como una función de la actividad metabólica.

En otro método, se exponen los cultivos de células neuronales durante 24 h a L-glutamato 1 mM o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) en condiciones normóxicas, en ausencia o presencia de diversas concentraciones de Eprex o EPO producida por PER.C6TM purificada. Se analiza la citotoxicidad mediante la fluorescencia de azul de Alamar, que notifica la viabilidad celular como una función de la actividad metabólica. Se espera que la viabilidad de las células tratadas con PER.C6TM-EPO sea similar a la viabilidad de las células tratadas con Eprex.

Ejemplo 9. Actividad de PERC6TM-EPO (de tipo cerebral) en la estimulación de la eritropoyesis en ratas en comparación con EPO de tipo sérico.

Puede monitorizarse el potencial de EPO humana recombinante para estimular la producción de glóbulos rojos en un modelo de roedor que han descrito Barbone *et al.* (1994). Según este modelo, se usa el aumento en los recuentos de reticulocitos como medida de la actividad biológica de la preparación de EPO humana recombinante. Los reticulocitos son los precursores de los glóbulos rojos y su producción, en respuesta a EPO, puede usarse como

medida del potencial de EPO en la estimulación de la producción de glóbulos rojos. Un aumento en la producción de glóbulos rojos, a su vez, conduce a un valor de hematocrito superior.

Se compararon las actividades de PER.C6™-EPO y Eprex en seis grupos de tres ratas Wag/Rij. Se inyectaron por vía intravenosa diversas dosis de PER.C6™-EPO (P7-EPO), Eprex y tampón diluyente como control negativo en la vena peneana en el día 0, 1 y 2. Se administró PER.C6™-EPO a una dosis de 5, 25 ó 125 UE (unidades Elisa) tal como se determina mediante el kit de Elisa R&D específico para EPO disponible comercialmente, mientras que se administró Eprex a una dosis de 1 ó 5 UE. Se diluyeron todas las preparaciones de EPO hasta la concentración apropiada en PBS/Tween 80 al 0,05% en un volumen total de 500 µl. En el día 3, se extrajeron 250 µl de sangre con EDTA mediante punción en la lengua. En el mismo día, se determinó el porcentaje de reticulocitos en la población total de glóbulos rojos.

Tal como se muestra en la figura 6 (las barras indican el porcentaje de reticulocitos presentes en la población total de glóbulos rojos), la administración diaria de 1 UE de Eprex a las ratas, durante un periodo total de tres días, provocó un aumento significativo en los recuentos de reticulocitos en el cuarto día en comparación con los recuentos de reticulocitos en ratas que recibieron sólo tampón diluyente. Los recuentos de reticulocito se elevaron incluso más aumentando la dosis de Eprex cinco veces. Los recuentos de reticulocitos aumentaron claramente menos usando cantidades equivalentes de PER.C6™-EPO. Se observó un aumento similar en los recuentos de reticulocitos cuando se usó 1 UE de Eprex y 25 UE de PER.C6™-EPO, lo que indica que PER.C6™-EPO es al menos 25 veces menos activa en la estimulación de la producción de glóbulos rojos que Eprex. La diferencia entre el potencial de Eprex y PER.C6™-EPO en la estimulación de la producción de glóbulos rojos fue incluso más pronunciada a una dosis superior (es decir, 5 UE de Eprex y 125 UE de PER.C6™-EPO).

Ejemplo 10. Efecto de PER.C6™-EPO sobre la isquemia cerebral tras hemorragia subaracnoidea experimental.

Para demostrar que PER.C6™-EPO es más eficaz en la protección neuronal durante la isquemia cerebral que EPO de tipo sérico, se comparan los efectos de la administración sistémica de EPO de tipo sérico y EPO de tipo cerebral producida por PER.C6™ en un modelo de conejo de isquemia cerebral aguda inducida por hemorragia subaracnoidea. Por tanto, se estudian 32 animales que se dividen en 4 grupos (n=8).

Grupo 1, hemorragia subaracnoidea;

Grupo 2, hemorragia subaracnoidea más placebo;

Grupo 3, hemorragia subaracnoidea más EPO de tipo sérico recombinante humana; y

Grupo 4, hemorragia subaracnoidea más EPO producida por PER.C6™ recombinante.

La hemorragia subaracnoidea experimental se produce mediante una inyección percutánea de sangre autóloga en la cisterna magna tras anestesiarse al animal. Tras la inyección, se colocan los conejos en decúbito prono durante 15 min. para permitir la formación de coágulos sanguíneos ventrales. Se inyecta a los animales de los grupos 2, 3 y 4 tampón diluyente, Eprex y EPO de tipo cerebral producida por PER.C6™ purificada, respectivamente, a los 5 min. tras la inducción de hemorragia subaracnoidea, y se continúa a las 8, 16 y 24 h después de eso. Todas las inyecciones se administran por vía intraperitoneal. El tampón diluyente consiste en albúmina sérica (2,5 mg/ml), cloruro de sodio (5,84 mg/ml), ácido cítrico anhidro (0,057 mg/ml, H₂O). Se sacrifican los animales a las 24 h tras la hemorragia subaracnoidea, y se extraen sus cerebros. Después de eso se realiza la sección coronal de los cerebros a 10-25 µm en un microtomo de congelación, comenzando en el bregma y continuando posteriormente para incluir el cerebelo (Ireland y MacLeod 1993). Para visualizar y evaluar el número de neuronas con daño inducido por isquemia, se tiñen los cortes con hematoxilina y eosina. Se determina el número de perfiles neuronales eosinófilos que contienen núcleos picnóticos, por campo microscópico de gran aumento (100x) en cinco cortes seleccionados aleatoriamente de la corteza lateral obtenidos a varios niveles coronales posteriores al bregma. Se espera que los animales tratados con PER.C6™-EPO tengan un número inferior de neuronas dañadas que los animales que no se tratan o que se tratan con un placebo.

Ejemplo 11. Expresión del receptor de eritropoyetina en cardiomiocitos neonatales de rata tras hipoxia/reoxigenación.

Se preparan cultivos primarios de cardiomiocitos neonatales de rata a partir de los ventrículos de ratas Sprague-Dawley de 1 día de edad, tal como se ha descrito previamente (Simpson y Savion 1982). Se creó hipoxia incubando los cardiomiocitos en una cámara de Plexiglas estanca al aire con < 1% de O₂ y 5% de CO₂/95% de N₂ a 37°C durante 2 h usando un sistema Gas Pak Plus (BBL). Sustituyendo el medio saturado por 95% de aire y 5% de CO₂, se expusieron las células a una atmósfera normotóxica (reoxigenación).

Se lavaron dos veces los cardiomiocitos con PBS helado y se aisló el ARN total usando Trizol (GIBCO), se extrajo mediante cloroformo y se precipitó mediante alcohol isopropílico. Para el análisis de tipo Northern, se separan 15 µg de ARN total en un gel de agarosa – MOPS/formaldehído al 1,5%, se transfieren a nitrocelulosa y se hibridan con

una sonda marcada con ^{32}P para el receptor de EPO (fragmento de ADNc de ± 400 pb). La hibridación tiene lugar durante la noche a 65°C en tampón fosfato, pH 7,2 y va seguida por 2 lavados en $2\times\text{SSC}$ a temperatura ambiente, 2 lavados en $0,2\times\text{SSC}/\text{SDS}$ al 0,1% a 65°C y 2 lavados en $2\times\text{SSC}$ a temperatura ambiente. Se visualizan las señales de hibridación exponiendo la membrana a una película de rayos X (Kodak). Se corrigen los niveles de expresión para los niveles de ARNm de GAPDH.

Ejemplo 12. Efecto de PER.C6TM-EPO de tipo cerebral y EPO de tipo sérico (Eprex) sobre la apoptosis en cardiomiocitos neonatales de rata, cultivados en condiciones hipóxicas.

Se preparan cultivos primarios de cardiomiocitos neonatales de rata a partir de los ventrículos de ratas Sprague-Dawley de 1 día de edad, tal como se ha descrito previamente (Simpson y Savion 1982). Se crea hipoxia incubando los cardiomiocitos en una cámara de Plexiglas estanca al aire con $< 1\%$ de O_2 y 5% de $\text{CO}_2/95\%$ de N_2 a 37°C durante 2 h usando un sistema Gas Pak Plus (BBL). Sustituyendo el medio saturado por 95% de aire y 5% de CO_2 , se exponen las células a una atmósfera normotóxica (reoxigenación). El experimento se divide en 4 grupos:

A) cardiomiocitos cultivados en condiciones normóxicas (95% de aire/ 5% de CO_2);

B) cardiomiocitos cultivados en condiciones de hipoxia/reoxigenación en presencia de EPO producida por PER.C6TM purificada 30 pM ;

C) cardiomiocitos cultivados en condiciones de hipoxia/reoxigenación en presencia de Eprex purificada 30 pM ; y

D) cardiomiocitos cultivados en condiciones de hipoxia/reoxigenación en ausencia de EPO.

Todos los experimentos se realizan por triplicado. Se cuantifica la apoptosis mediante análisis morfológico, desarrollo escalonado del ADN y mediante marcaje de extremos con mellas por dUTP mediado por desoxirribonucleótido transferasa terminal (TUNEL). Para el análisis morfológico se fijan monocapas de miocitos y se tiñen con Hoechst 33324. Se monitorizan las características morfológicas de la apoptosis (encogimiento celular, condensación de cromatina y fragmentación) mediante microscopía de fluorescencia. Se cuentan al menos 400 células de 12 campos seleccionados aleatoriamente por placa.

Para determinar el desarrollo escalonado del DNA (característico para la apoptosis), se lisan cardiomiocitos en tampón de lisis y se someten a electroforesis en gel de agarosa al 2% . El gel se tiñe con bromuro de etidio y se visualizan los fragmentos de DNA con luz ultravioleta. Se realiza la detección *in situ* de cardiomiocitos apoptóticos usando TUNEL con un kit de detección de muerte celular *in situ* (Boehringer Mannheim).

Ejemplo 13. Efecto de PER.C6TM-EPO y EPO sérica sobre el tamaño del infarto en un modelo de rata de isquemia/reperfusión miocárdica.

Se anestesian ratas Sprague-Dawley macho adultas (de 300 a 400 g) con pentobarbital sódico (20 mg/kg i.p.) y ketamina HCl (60 mg/kg i.p.). Se canulan la venal yugular y la tráquea, y se mantiene ventilación con oxígeno al 100% mediante un respirador para roedores ajustado para mantener el CO_2 exhalado entre el $3,5\%$ y el 5% . Se realiza una toracotomía izquierda y se coloca una sutura a de 3 a 4 mm del origen de la arteria coronaria izquierda. Cinco minutos antes de la isquemia, se administran aleatoriamente a los animales diversas concentraciones de PER.C6TM-EPO, EPO de tipo sérico o solución salina ($n=6$ por cada grupo). Se inicia la isquemia (30 min.) tensando la sutura alrededor de la arteria coronaria y le siguen 4 h de reperfusión. Se preparan ratas operadas de manera simulada idénticamente, excepto porque la sutura no se tensa ($n=6$).

Tras la reperusión, se determina el tamaño del infarto mediante tinción diferencial con azul violeta permeable (5%) y cloruro de trifetil-tetrazolio (TTC). Se vuelve a tensar la ligadura coronaria y se administra una inyección intravenosa de azul violeta permeable para teñir las regiones profundas normalmente del corazón. Entonces se extrae el corazón y se sumerge en un baño de solución salina helada antes de extraer las aurículas, los grandes vasos y el ventrículo derecho. Se corta el ventrículo izquierdo en secciones finas y se separa el área no teñida en riesgo (AAR) de las secciones azules profundas normalmente, se corta en fragmentos de $1-2\text{ mm}^3$ y se incuban con TTC. Con un microscopio de disección, se separan las áreas necróticas (AN, pálidas) de las zonas positivas para TTC (tinción de color rojo ladrillo). Entonces se pesan individualmente todas las áreas del miocardio y se calcula el tamaño del infarto.

Ejemplo 14. Aislamiento y fraccionamiento de glicoformas de PER.C6TM-EPO que contienen un alto contenido en fucosa unida en $\alpha 1,3$.

Se usó lectina de *Aleuria aurantia* (AAL) específica de fucosa para purificar preferentemente glicoformas de PER.C6TM-EPO con un alto contenido en Lewis x y/o sialil-Lewis x. En primer lugar se eliminaron de EPO que se secretó en el medio de cultivo por células PER.C6TM que producen EPO desechos celulares y otros contaminantes mediante cromatografía en columna de afinidad usando anticuerpos monoclonales específicos para EPO humana (véase el ejemplo 2). Después de eso, se sometieron aproximadamente $270\text{ }\mu\text{g}$ (o 27.000 UE) de la EPO purificada

a un segundo procedimiento de cromatografía en el que las moléculas de EPO se unían a una columna que contenía la AAL inmovilizada a 0,1 ml/min. (columna Hitrap de ALL, 1 ml, Bio Med Labs). Se eluyeron de la columna las glicoformas de EPO que portaban fucosa usando L-fucosa (Sigma) como competidor para la unión a AAL. Se obtuvieron cuatro subfracciones de EPO aplicando un gradiente escalonado en PBS (Gibco, que contenía NaCl 154 mM, KH₂PO₄ 1,05 mM y Na₂HPO₄ 3,0 mM, pH = 7,4), comenzando con fucosa 60 µM (fracción 1), seguido por fucosa 200 µM (fracción 2), seguido por fucosa 400 µM (fracción 3) y finalizando con fucosa 1000 µM (fracción 4). La primera etapa del gradiente duró 10 min. y las otras etapas duraron 5 min. con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. La señal UV a 214 nm del cromatograma mostró que el material se eluía de la columna en cada fracción (véase la figura 9). Se recogieron porciones de 0,5 ml y se reunieron dos o tres fracciones pico (véase la figura 9).

Se cambió el tampón de las fracciones usando un dispositivo Microcon de 10 kDa (Millipore) a fosfato 20 mM y se concentraron las fracciones en el mismo dispositivo Microcon hasta 20 – 30 µl. Se liberaron los glicanos N-unidos de los conjuntos de EPO mediante tratamiento con N-glicanasa F y se desialilaron mediante tratamiento con neuraminidasa. En la figura 10A se muestran espectros de EM MALDI-TOF representativos de las diversas muestras de EPO. También se presentó la abundancia relativa de los diferentes oligosacáridos en cada conjunto (véase la tabla IX). Los datos demuestran que las fracciones que eluyen más tarde de la columna de AAL contienen relativamente más residuos de fucosa. Por ejemplo, las fracciones que eluyen más tarde de la columna están enriquecidas en glicanos dando lugar a picos a 2507,9 y 2978,1 Dalton, que contienen 3 ó 4 residuos de fucosa, mientras que los glicanos con una masa de 1891,7 y 2215,8, que sólo contienen 1 residuo de fucosa, están representados de manera relativamente insuficiente en estas fracciones. Por tanto, estas fracciones están enriquecidas con N-glicanos que tienen las denominadas estructuras de Lewis X. El número promedio por molécula de EPO de estructuras de Lewis X en glicanos N-unidos que se liberan usando PNGasa F y se detectan con EM MALDI-TOF fue, para este experimento: 2,2 para la fracción 1, 2,7 para la fracción 2, 3,6 para la fracción 3, 4,1 para la fracción 4. El material de partida contenía 2,6 estructuras de Lewis X por molécula de EPO. En un experimento independiente con el clon C25, se obtuvo una fracción 4 (espectro en la figura 10B) que estaba incluso más enriquecida para estructuras de Lewis X, que tenía 5,7 estructuras X de Lewis en glicanos N-unidos por molécula de EPO. Este método permite purificar la eritropoyetina del medio de cultivo empleando la características específicas de las modificaciones postraduccionales, tales como estructuras de Lewis x ocasionadas por las células en las que se produce la proteína. Esto no implica, sin embargo, que no puedan emplearse otros métodos para la purificación apropiada de la proteína con las modificaciones postraduccionales (predeterminadas).

El material eluido en la fracción 4 representa una forma novedosa de EPO; contiene predominantemente glicanos N-unidos con una masa de ~2185 kDa, que a su vez corresponde a un complejo biantenarico de azúcar N-unido con estructuras de GalNAc-Lewis x en ambas antenas. La fracción 4 contenía aproximadamente un 8% de la EPO total que se había eluido en las fracciones 1-4. Esto indica que la forma novedosa de EPO con estructuras de GalNAc-Lewis x predominantemente biantenarias representa una forma poco abundante de EPO, que puede enriquecerse usando el método descrito anteriormente.

Ejemplo 15. Aislamiento y fraccionamiento de glicoformas de PER.C6™-EPO con un alto contenido en LacdiNAc.

Se aíslan específicamente glicoformas de PER.C6™-EPO que portan las denominadas estructuras de oligosacárido lacdiNAc mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra estas estructuras de lacdiNAc. Anticuerpos monoclonales de ratón tales como 99-2A5-B, 100-2H5-A, 114-2H12-C, 259-2A 1 y 273-3F2 (Van Remoortere *et al.* 2000) reconocen específicamente las estructuras de lacdiNAc y se purifican y acoplan a perlas de Sepharose 4B activadas por CNBr según procedimientos conocidos comúnmente por un experto en la técnica. En primer lugar, se separa de manera aproximada PER.C6™-EPO que se secreta en el medio de cultivo por células PER.C6™ que producen EPO humana de desechos celulares y otros contaminantes mediante cromatografía en columna de afinidad usando anticuerpos monoclonales específicos para EPO humana. Después de eso, se somete la EPO purificada a un segundo procedimiento de cromatografía en el que las moléculas de EPO que portan estructuras de lacdiNAc se unen a una columna que contiene los anticuerpos monoclonales específicos de lacdiNAc inmovilizados. Las glicoformas de EPO que carecen de las estructuras de lacdiNAc no se unen a la columna y se recogen en la fracción no retenida. Las glicoformas de EPO que portan las estructuras de lacdiNAc se eluyen de la columna a un pH bajo o usando oligosacáridos de lacdiNAc sintéticos o GalNAc como competidor para la unión a los anticuerpos específicos de lacdiNAc. Las glicoformas de EPO que portan un porcentaje relativamente alto de estructuras de lacdiNAc se eluyen por separado de la columna aumentando la concentración de GalNAc o lacdiNAc progresiva o gradualmente durante la elución. Las glicoformas de EPO con un porcentaje relativamente alto de estructuras de lacdiNAc se eluyen a una concentración superior de GalNAc o lacdiNAc que las glicoformas de EPO que poseen un porcentaje relativamente bajo de estructuras de lacdiNAc. Según el método descrito anteriormente, este método también permite purificar la eritropoyetina del medio de cultivo empleando las características específicas de las modificaciones postraduccionales, tales como estructuras de Lewis x y lacdiNAc ocasionadas por las células en las que se produce la proteína.

Ejemplo 16. Aislamiento y fraccionamiento de glicoformas de PER.C6™-EPO con un alto contenido en GalNAc-Lewis x.

Se aíslan específicamente glicoformas de PER.C6™-EPO que portan las denominadas estructuras de

oligosacáridos de GalNAc-Lewis x mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra estas estructuras de GalNAc-Lewis x. Anticuerpos monoclonales de ratón tales como 114-5B1-A, 176-3A7, 290-2D9-A y 290-4A8 (Van Remoortere *et al.* 2000) reconocen específicamente las estructuras de GalNAc-Lewis x y se purifican y acoplan a perlas de Sepharose 4B activadas por CNBr según procedimientos conocidos comúnmente por un experto en la técnica. En primer lugar, se separa de manera aproximada PER.C6™-EPO que se secreta en el medio de cultivo por células PER.C6™ que producen EPO humana de desechos celulares y otros contaminantes mediante cromatografía en columna de afinidad usando anticuerpos monoclonales específicos para EPO humana. Después de eso, se somete la EPO purificada a un segundo procedimiento de cromatografía en el que las moléculas de EPO que portan estructuras de GalNAc-Lewis x se unen a una columna que contiene los anticuerpos monoclonales específicos de GalNAc-Lewis x inmovilizados. Las glicofomas de EPO que carecen de las estructuras de GalNAc-Lewis x no se unen a los anticuerpos unidos a la columna y se recogen en la fracción no retenida. Las glicofomas de EPO que portan las estructuras de GalNAc-Lewis x se eluyen de la columna a un pH bajo o usando oligosacáridos de GalNAc-Lewis x sintéticos como competidor para la unión a los anticuerpos específicos de GalNAc-Lewis x. Las glicofomas de EPO que portan un alto contenido en GalNAc-Lewis x pueden eluirse separadamente de la columna aumentando la concentración del competidor de GalNAc-Lewis x progresiva o gradualmente durante la elución. Las glicofomas de EPO con un alto contenido en GalNAc-Lewis x se eluyen a una concentración superior de GalNAc-Lewis x que las glicofomas de EPO que poseen un bajo contenido en GalNAc-Lewis x. De nuevo, según los métodos descritos anteriormente, este método también permite purificar EPO del medio de cultivo empleando las características específicas de las modificaciones postraduccionales, tales como estructuras de Lewis x, lacdiNac o GalNAc-Lewis x ocasionadas por las células en las que se produce la proteína. Esto no implica, sin embargo, que no puedan emplearse otras modificaciones con las modificaciones postraduccionales (predeterminadas) para la purificación apropiada de la proteína.

Los expertos en la técnica entenderán que, aunque la invención se ha ilustrado con ejemplos detallados acerca de EPO, la presente invención no se limita a la producción y/o purificación de EPO con características de tipo cerebral. Pueden producirse otros diversos péptidos y proteínas (humanos) terapéuticos y/o de diagnóstico diversos, que pueden encontrar uso en el tratamiento de trastornos del cerebro y otras partes del sistema nervioso central y periférico y/u otros tejidos isquémicos/dañados por reperusión, mediante los medios y métodos de la presente invención.

Ejemplo 17. EPO con un bajo contenido en ácido siálico tiene una potencia similar a EPO con un alto contenido en ácido siálico en la reducción del tamaño del infarto tras la oclusión de la arteria cerebral media en ratas.

Se estudió el efecto de PER.C6™-EPO y Eprex en el tamaño de un infarto cerebral, que se indujo experimentalmente mediante la oclusión de la arteria cerebral media (MCA), en ratas macho F344/Ico que pesaban 200-250 g, usando un método similar al método publicado por Sirén *et al.*, 2001. Se ocluyó permanentemente la arteria carótida derecha de los animales mientras que se ocluía de manera reversible la MCA durante 60 min. usando una pinza de metal. Se aplicó PER.C6™-EPO purificada con un contenido promedio en ácido siálico < 6 ácidos siálicos por molécula o Eprex (Jansen-Cilag; EPO disponible comercialmente) con un contenido promedio en ácido siálico > 9 ácidos siálicos por molécula) por vía intravenosa a los 5 min. antes del comienzo de la oclusión de la MCA a una dosis de 5000 UE (unidades ELISA) por kg de peso corporal. De manera notable, el contenido en ácido siálico de la preparación de PER.C6™-EPO oscilaba desde 0-9 ácidos siálicos por molécula mientras que Eprex contenía más de 8 ácidos siálicos por molécula. Tras un periodo de 60 min., se terminó la oclusión mediante la retirada de la pinza de metal que rodeaba la MCA. Se observó la repercusión microscópicamente tras la retirada de la pinza. Veinticuatro h después se examinaron los cerebros de las ratas vivas usando MRI para revelar el coeficiente de difusión aparte (ADC) y mapas de T2. Estos mapas se usaron para cuantificar los volúmenes de infarto (figuras 7A y 7B).

Los resultados en las figuras 7A y 7B muestran que las ratas tratadas con las preparaciones de PER.C6™-EPO y Eprex presentaban una reducción similar en el tamaño del infarto en comparación con los animales no tratados. Puesto que la preparación de PER.C6™-EPO tiene un contenido en ácido siálico mucho menor que la preparación de Eprex, este resultado demuestra que un alto contenido en ácido siálico no es esencial para la actividad neuroprotectora de EPO *in vivo*.

Ejemplo 18. Determinación de la semivida de EPO en ratas.

Para determinar la semivida de Eprex *in vivo*, se ha inyectado por vía intravenosa a ratas Wag/Rij macho 150 UE de Eprex diluida en PBS/Tween-80 al 0,05% hasta un volumen final de 500 µl. Justo antes de la administración del sustrato, se extrajeron 200 µl de sangre con EDTA como control negativo usando la técnica descrita en Lab. Animals 34, 372. A t=5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 y 540 min. tras la inyección, se extrajeron 200 µl de sangre con EDTA de los animales usando la misma técnica. Tras la última extracción de sangre, se sacrificaron los animales. La muestra se centrifugó a 760 x g durante 15 min. a TA en el plazo de 30 min. de la recogida. Se sometieron a prueba las muestras de plasma en un ELISA (R&D) específico de EPO para determinar la concentración de EPO en cada muestra.

Tal como se muestra en la figura 8, la disminución en la concentración de Eprex en el plasma muestra una curva

bifásica que representa una fase de distribución y una fase de aclaramiento. Basándose en estos resultados, puede estimarse que Eprex tenía una semivida de aproximadamente 180 min. durante la fase de aclaramiento. La semivida de PER.C6™-EPO se mide usando el mismo protocolo.

5 Ejemplo 19. Efecto de la expresión de E1A sobre la glicosilación de EPO en células HT1080.

Se transfectaron de manera estable células HT1080 con vectores de expresión que codificaban para los genes E1A (plg.E1A.neo) o E1A + E1B (plg.E1A.E1B; ambos plásmidos se describen en la patente estadounidense 5.994.128) de adenovirus de tipo 5 para determinar el efecto de la expresión de los genes E1A y/o E1A + E1B de adenovirus de tipo 5 en la glicosilación. Para realizar un seguimiento de la glicosilación de una proteína marcadora, se cotransfectaron las células con un vector de expresión que codifica para EPO (pEP02001/neo). Se transfectaron células HT1080 control con el vector de expresión de EPO sólo.

La transfección se realizó con Lipofectamine (Gibco) cuando las células alcanzaron una confluencia del 70-90% usando 1,0 µg de pE1A.neo o pE1A.E1B y 1,0 µg de pEP02001.neo por placa de 7,85 cm². Se substituyó el medio en los días 2, 3, 7, 10 y 13 por medio de selección que contenía DMEM, NEAA al 1% (aminoácidos no esenciales, Invitrogen), Geneticin 250 µg/ml (Gibco) y FBS al 10%. Experimentos preliminares con células HT1080 transfectadas de manera estable con E1A revelaron que la expresión de E1A produce una morfología alterada de las células. En línea con observaciones descritas por Frisch *et al.* (1991), se observó que una expresión estable del gen E1A induce una morfología plana. Sabiendo esto, se realizó una selección aproximada de clones que expresan E1A recogiendo clones planos. Los clones se recogieron en el día 14 y se cultivaron en placas de 24 pocillos con medio de selección a 37°C/10% de CO₂.

Se seleccionaron células productoras de EPO basándose en la presencia de EPO en el medio cuando las células habían alcanzado la subconfluencia. Se midió EPO usando un ELISA específico de EPO (Quantikine® IVD human EPO-ELISA, R&D systems). Se ampliaron a escala los cultivos que producían EPO y se analizaron para determinar la expresión de E1A. Por tanto, se lisaron las células en tampón de lisis (NP40 al 1%, ácido desoxicolico al 5%, SDS al 0,5%, NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) complementado con 1 comprimido de inhibidores de proteínasa Complete Mini (Roche Diagnostics) por 10 ml. Se separaron los lisados mediante centrifugación durante 10 min. a 14.000g. Se sometieron a electroforesis cantidades iguales (basadas en el contenido en proteínas) de los lisados celulares separados en condiciones reductoras a través de un gel de BisTris al 10% (NuPAGE, Invitrogen). Después de eso se transfirieron las proteínas a una membrana de PDVF (P-Immobilon) usando el sistema Trans-Blot de NuPAGE (Invitrogen). Se bloquearon las transferencias durante 1 h o durante la noche a TA con Protifar al 5% (Nutricia) en TBST, seguido por una incubación con IgG2 monoclonal de ratón anti-E1A humana (clon M73, Santa Cruz), diluida 1:400 en Protifar al 5%/TBST, durante 1 h a TA o durante la noche a 4°C. Se lavaron las transferencias con TBST y se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Biorad), diluido 1:1000 en Protifar al 5%/TBST, durante 45 min. a TA. Tras el lavado con TBST, se tiñeron las transferencias usando el sistema ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech). El 55% de los clones de E1A positivos para EPO y el 68% de los clones de E1A.E1B positivos para EPO reveló una clara expresión de E1A (tabla X). Los clones HT1080/E1A-EPO y HT1080/E1A.E1B-EPO que expresaban E1A a un alto nivel mostraban una morfología plana (por ejemplo, figura 11).

Se produjo EPO por los clones HT 1080/EPO, HT1080/E1A-EPO y HT1080/E1A.E1B-EPO para el análisis de glicanos. Por tanto, se sembraron el clon de HT1080/E1A.EPO 008, el clon de HT1080/E1A.E1B.EPO 072 y el clon de HT1080/EPO 033 (tabla X) en matraces de 175 cm² con un número de pases (np) de 7. Tras 24 h, cuando las células alcanzaron una confluencia del 60-80%, se substituyó el medio de selección por medio de producción (DMEM, NEAA al 1%). Se recogió este medio tras 3 días y se lisaron las células con tampón de lisis. Se purificó EPO del medio según el ejemplo 2.

Los glicanos N-unidos de las diversas preparaciones de EPO se liberaron mediante tratamiento con N-glicanasa F y posteriormente se analizaron mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD; Dionex). En este sistema de cromatografía particular, se separan las cadenas de glicanos derivados de EPO en condiciones alcalinas basándose en su carga. Tal como se demuestra en la figura 12, los glicanos de EPO producida por las células HT1080/E1AEPO están menos cargados que los de EPO producida por las células HT1080/EPO control, lo que indica que la EPO producida por estas últimas células está sialilada más ampliamente que la EPO producida por las células que expresan E1A. Se obtuvo información más detallada sobre la estructura de los N-glicanos mediante el análisis de EM MALDI de las cadenas de azúcar de las preparaciones de EPO. Se liberaron los glicanos N-unidos de las preparaciones de EPO mediante tratamiento con N-glicanasa F y se desialilaron mediante tratamiento con neuraminidasa. En la figura 13 se muestran los espectros de masas de diversas preparaciones de EPO representativas. Se usó el software GlycoMod (www.expasy.ch/tools/glycomod) para predecir la composición de azúcares basándose en la masa observada (tabla XI). Los datos muestran que el espectro de masas de los glicanos de EPO producida por las células HT1080/EPO control difiere de los de EPO producida por las células HT1080/E1A-EPO y HT1080/E1A.E1B-EPO. Los espectros de masas revelaron que la EPO producida por estas últimas células posee relativamente menos hexosas y relativamente más desoxihexosas en comparación con la EPO producida por las células control. Además, se encontraron estructuras de glicanos con una masa relativamente baja que contienen una cantidad relativamente alta

de hexosaminas y desoxihexosas en la EPO producida por las células HT 1080/E 1A-EPO y HT 1080/E 1A.E 1B-EPO. Algunos de éstos estaban ausentes en la EPO producida por las células control. Los perfiles de masas de los glicanos de EPO producida por las células HT1080 que expresan E1A y E1A + E1B son similares a los de los glicanos de EPO producida en células PER.C6™ (véase el ejemplo 3) lo que sugiere que los glicanos de EPO producido por las primeras células contienen estructuras de Lewis x y LacdiNAc, y estructuras que carecen de galactosas terminales.

Para confirmar que EPO producida por las células HT1080 que expresan E1A y E1A + E1B contiene más fucosas y GalNAc que EPO producida por las células HT1080 control, se realizó un análisis de monosacáridos. Por tanto, se liberaron los glicanos N-unidos de las preparaciones de EPO mediante tratamiento con N-glicanasa F y neuraminidasa, y después de eso se hidrolizaron y se analizaron mediante HPAEC-PAD. La figura 14 muestra los perfiles de monosacáridos de los glicanos de EPO, normalizados para la cantidad de manosa. Los datos muestran que los glicanos N-unidos de EPO producida por las células que expresan E1A y E1A + E1B poseen de hecho cantidades relativamente altas de fucosa y GalNAc.

Los datos de espectros de masas y monosacáridos sugieren fuertemente que EPO producida por las células que expresan E1A y E1A + E1B contiene múltiples residuos de fucosa. Para apoyar estos datos, se trataron las preparaciones de EPO con alfa-fucosidasa (harina de almendras) que escinde residuos de fucosa alfa 1-3 y alfa 1-4 terminales. Después de eso, se analizaron las muestras mediante EM MALDI y se compararon los resultados con los resultados obtenidos a partir de preparaciones de EPO que no se sometieron al tratamiento con alfa-fucosidasa. La figura 15 muestra que tras el tratamiento con alfa-fucosidasa disminuyeron los picos que representan N-glicanos con fucosas antenarias y aumentaron los picos que se derivaban de estas estructuras. Por ejemplo, disminuyeron los picos con valores de m/z de ~ 2038 y ~ 2184, mientras que aumentó el pico de - 1892.

Conjuntamente, los datos muestran que la expresión de E1A de adenovirus sola o junto con E1B puede cambiar el perfil de glicosilación de las células. La observación de que la expresión de E1A sola es suficiente para este cambio indica que E1A es responsable de este cambio. Los cambios en la glicosilación normalmente incluyen la formación de estructuras de Lewis x, LacdiNAc y GalNAc-Lewis x. Se han caracterizado muchas células HT1080 que expresan E1A y E1A + E1B y la mayoría de estas células producían glicanos que poseen estas estructuras de glicanos características. Sin embargo, variaba la abundancia de estas estructuras, en comparación con las estructuras de glicanos que se producen por las células HT1080 originales (datos no mostrados). La abundancia de las estructuras de glicanos se correlacionaba en buena parte con el nivel de expresión de E1A. Esto indica que el grado en que el perfil de glicosilación resulta influido por E1A es en buena parte dependiente del nivel en que se expresa el gen E1A.

Ejemplo 20. Comparación de la actividad hematopoyética de PERC6™-EPO y CHO-EPO a una dosis alta.

Se determinó la actividad hematopoyética de PER.C6™-EPO en ratas y se comparó con la de EPO derivada de células de ovario de hámster chino (CHO-EPO). Se eligieron dos preparaciones de CHO-EPO; (1) Eprex (Jansen Cilag), que es una CHO-EPO recombinante disponible comercialmente con un alto contenido en ácido siálico y (2) frCHO-EPO, una preparación de CHO-EPO con un contenido inferior (similar al de PER.C6™-EPO) en ácido siálico (véase la figura 16), que se obtuvo produciendo EPO mediante células CHO y la posterior purificación de estas isoformas escasamente sialiladas mediante métodos cromatográficos tal como se describe en los ejemplos 2 y 3 y en el documento EP 0428267.

Se realizó el estudio con cuatro grupos de seis ratas WAG/Rij. Se inyectó por vía intravenosa una única dosis de 5000 UE (unidades ELISA, tal como se determina mediante el kit de Elisa R&D específico de EPO disponible comercialmente) por kg de peso corporal de Eprex, frCHO-EPO, PERC6- EPO o tampón diluyente (como control) en la vena peneana. Se diluyeron todas las preparaciones de EPO hasta la concentración apropiada en tampón diluyente (PBS, Tween-80 al 0,03%, glicina al 0,5%) en un volumen total de 500 µl. Tras cuatro días, se extrajeron 250 µl de sangre con EDTA mediante punción en la lengua. En el mismo día, se analizaron las muestras de sangre para determinar el hematocrito y el porcentaje de reticulocitos en la población total de glóbulos rojos usando un hematocitómetro automático.

Se determinaron los niveles de hematocrito y se expresaron como un porcentaje en volumen de glóbulos rojos empaquetados, obtenidos mediante la centrifugación de la sangre (figura 17). Los resultados demuestran que PER.C6™-EPO y frCHO-EPO no indujeron el hematocrito, mientras que Eprex sí lo hizo. Tal como se muestra en la figura 18, la EPO indujo un aumento significativo en los recuentos de reticulocitos en comparación con ratas que recibieron tampón diluyente sólo. Eprex y frCHO-EPO mostraron una estimulación similar; esta estimulación fue significativamente superior ($p < 0,001$) que en animales tratados con PERC6-EPO.

La evaluación del contenido en ARN en los reticulocitos permitió demostrar su grado de madurez. En la figura 19 se muestra la fracción de reticulocitos inmaduros (IRF). Las ratas tratadas con Eprex revelaron porcentajes significativamente superiores de reticulocitos inmaduros en comparación con las ratas control. Esto indica que la formación de reticulocitos estimulada por Eprex todavía está en curso tras cuatro días de inyección. Este efecto es menos pronunciado o está ausente en las ratas tratadas con frCHO-EPO y PER.C6™-EPO, respectivamente (figura 19). Conjuntamente, los datos muestran que las tres preparaciones de EPO inducen la formación de reticulocitos; sin

embargo, la duración del efecto fue la más larga para Eprex y la más corta para PER.C6TM-EPO, mientras que frCHOEPO mostró un efecto intermedio. Esto sugiere que el efecto hematopoyético bajo de PER.C6TM-EPO no sólo se debe a su bajo contenido en ácido siálico, sino que también se debe a otras características de los glicanos.

5 Ejemplo 21. Análisis detallado de la estructura de los N-glicanos de PER.C6TM-EPO

No siempre pueden asignarse señales de masa, obtenidas mediante espectrometría de masas, de manera inequívoca a una cierta estructura de azúcar, debido al hecho de que pueden existir diversas estructuras isoméricas. Para obtener información adicional sobre la estructura de los glicanos N-unidos de PER.C6TM-EPO, se han empleado tratamientos con endo y exoglicosidasa de PER.C6TM-EPO.

En primer lugar, se usó endoglicosidasa F2. Esta enzima escinde entre los residuos de GlcNAc del núcleo de trimanosilo de los glicanos de N-unidos de tipo complejo biantenarios o con alto contenido en manosa (figura 20). En contraposición a PNGasa F, la endoglicosidasa F2 no escinde glicanos tri- o tetraantenarios y por tanto puede usarse para diferenciar entre estructuras de glicanos bi- y tri-/tetraantenarios. En la figura 21, se presentan los espectros de MALDI de PER.C6TM-EPO tratada o bien con PNGasa F o bien con endoproteinasa F2. Cuando se comparan estos espectros, debe tenerse en cuenta que los glicanos liberados por la endoglicosidasa F2 son más pequeños que los glicanos liberados por la PNGasa F. Esto es por una diferencia de un residuo de GlcNAc y fucosa (349 Da) y se debe a los diferentes sitios de escisión de las enzimas (véase la figura 20). Todas las estructuras observadas en un digesto de PNGasa F a $m/z > 2185$ son estructuras tri- o tetraantenarias, puesto que no se observa ninguno de estos glicanos en el digesto de endoglicosidasa F2. La mayoría de las estructuras a masas inferiores, es decir, m/z 1485, 1648, 1689, 1835, 1851, 1997, 2038 y 2185 tienen un pico correspondiente en el digesto de endoglicosidasa F2 y son biantenarias. Es posible que también estén presentes algunas estructuras tri- o tetraantenarias isoméricas, pero esto no supone mucho, puesto que las razones de los picos en ambos espectros en la figura 21 son en buena parte comparables. El espectro del digesto de endoglicosidasa F2 carece de los picos correspondientes a m/z 1892 y 2054 en el espectro de PNGasa F. Esto demuestra que estos picos representan glicanos que no son biantenarios, sino que en cambio son tetraantenarios con o sin un residuo de galactosa, respectivamente. Estos datos confirman que PER.C6TM-EPO contiene glicanos con GlcNAc terminal.

A continuación, se usaron exoglicosidasas para investigar adicionalmente las estructuras de N-glicanos. Se liberaron los glicanos de PER.C6TM-EPO mediante PNGasa F y se desialilaron usando neuraminidasa. Posteriormente, se trataron las muestras con diferentes combinaciones de las siguientes exoglicosidasas:

1) β -galactosidasa, que escinde Gal β 1-4GlcNAc terminal, no reductora (y Ga β 1-4GalNAc y a razones de enzima superiores, enlaces Gal β 1-3).

2) α -fucosidasa de riñón bovino, que escinde fucosa unida en α 1-2,3,4 y 6 de N-y O-glicanos. Escinde fucosa unida en α 1-6 en el núcleo de trimanosilo de glicanos N-unidos de manera más eficaz que otros enlaces de α -fucosa.

3) α -fucosidasa de harina de almendras, que escinde residuos de α 1-3 o α 1-4 fucosidasa terminales, no reductores.

4) α -N-Acetilglucosaminidasa (GlcNAc-asa), que escinde N-acetilglucosamina unida en β 1-2,3,4,6 terminal, no reductora de hidratos de carbono complejos. No escinde residuos de N-acetilgalactosamina.

En la figura 22 se muestran los tipos de enlace esperados en glicanos de PER.C6TM-EPO. Se realizaron las incubaciones con galactosidasa y fucosidasa simultáneamente, es decir, durante la incubación con fucosidasa todavía estaba presente galactosidasa activa. Además, se realizaron los tratamientos con GlcNAc-asa cuando la galactosidasa y la fucosidasa habían perdido su actividad.

En la figura 23, se presentan los resultados para el tratamiento con galactosidasa. En esta figura, se facilitan los valores de m/z y las intensidades relativas de todos los picos en el espectro, que tienen una intensidad relativa (es decir, altura del pico dividida entre las alturas resumidas de todos los picos) del 5% o superior. También se indican las estructuras propuestas de los glicanos. Los picos que se asignaron a estructuras galactosiladas se habían desplazado tras el tratamiento con galactosidasa, aunque no siempre de manera completa. Se encontró que la galactosidasa no libera galactosa cuando está presente una fucosa en el residuo de GlcNAc adyacente. Parecía que algunos glicanos triantenarios aparecían tras el tratamiento con galactosidasa (m/z 1689). Esto se provocó mediante GlcNAc-asa contaminante, que se demostró que estaba presente en la preparación de galactosidasa usando glicanos patrón (datos no mostrados).

Entonces se sometieron los glicanos tratados con galactosidasa a tratamiento con fucosidasa (figuras 24 y 26). En el caso de la fucosidasa de riñón bovino, esto dio como resultado un desplazamiento de 146 Da de todos los picos en el espectro. Esto corresponde a la masa de un residuo de fucosa. Puesto que esta fucosidasa escinde preferiblemente residuos de fucosa unidos en α 1-6, y puesto que todos los picos sólo pierden una unidad de 146 Da, esto indica que todos los glicanos contenían una fucosa en el núcleo.

El conjunto de glicanos tratados con galactosidasa que se incubó posteriormente con fucosidasa de harina de almendras dio un espectro relativamente sencillo (figuras 25 y 26). Se eliminaron todos los residuos de fucosa de las antenas, dejando sólo glicanos fucosilados de manera individual (núcleo). También se eliminaron los residuos de galactosa terminales restantes, puesto que la galactosidasa todavía era activa durante la incubación con fucosidasa. Tras el tratamiento con GlcNAc-asa de los glicanos desfucosilados, sólo quedaron cuatro picos. El pico principal se observó a m/z 1079 y representa el núcleo de trimanosilo fucosilado. Los picos a m/z 1485 y m/z 1891 confirman la presencia de residuos de GalNAc en la antena, puesto que este residuo no se elimina mediante la GlcNAc-asa. El pico a m/z 1444 demuestra la presencia de repeticiones de lactosamina: la galactosa debe haberse protegido por una GlcNAc durante el tratamiento con galactosidasa.

Referencias

Anchord DT, Brot FE, Bell CE y Sly WS (1978) Human beta-glucuronidase: *in vivo* clearance and *in vivo* uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. *Cell* 15:269

Barbone AG, Aparicio B, Anderson DW, Natarajan J y Ritchie DM (1994) Reticulocyte measurements as a bioassay for erythropoietin. *J Pharm Biomed Anal* 12:515-522

Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, De Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM y Cerami A (2000) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10526-10531

Buemi M, Allegra A, Corica F, Floccari F, D'Avella D, Aloisi C, Calapai G, Iacopino G y Frisina N (2000) Intravenous recombinant erythropoietin does not lead to an increase in cerebrospinal fluid erythropoietin concentration. *Nephrol Dial Transplant* 15:422-423

Buerke N, Weyrich AS, Zheng Z, Gaeta FCA, Forrest MJ y Lefer AM (1994) Sialyl Lewis x-containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *J Clin Invest* 93:1140-1148

Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M y Sasaki R (2000) Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 279:E1242-E1248

Dame C, Juul SE y Christensen RD (2001) The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* 79:228-235

Foxall CS, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA *et al.* (1992) The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope: the sialyl Lewis x oligosaccharide. *J Cell Biol* 117:895-902

Goto M, Akai K, Murakami A, Hashimoto C, Tsuda E, Ueda M, Kawanishi G, Takahashi N, Ishimoto A, Chiba H y Sasaki R (1988) Production of recombinant erythropoietin in mammalian cells: host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein. *Bio/Technology* 6:67-71

Grinnell BW, Hermann RB, Yan SB (1994) Human Protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide. *Glycobiol* 4: 221-225.

Hoffmann A, Nimtz M, Wurster U y Conradt HS (1994) Carbohydrate structures of β -trace protein from human cerebrospinal fluid: evidence for "brain-type" N-glycosylation. *J Neurochem* 63:2185-2196

Hoffmann A, Nimtz M, Getzlaff R y Conradt HS (1995) brain-type N-glycosylation of asialo-transferrin from human cerebrospinal fluid. *FEBS Lett* 359:164-168

Ireland WP y MacLeod WS (1993) A method for finding stereotaxic coordinates from brain sections. *J Neurosci Methods* 49:93-96

Jourdain GW, Dean L y Roseman S (1971). The sialic acids. XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides.

Juul SE, Harcum J, Li Y y Christensen RD (1997) Erythropoietin is present in the cerebrospinal fluid of neonates. *J Pediatr* 130:428-430

Konishi Y, Chui D-H, Hirose H, Kunishita T y Tabari T (1993) Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons *in vitro* and *in vivo*. *Brain Res* 609:29-35

Koretz B, Von B Ahern K, Wang N, Lustig HS y Greenberg DA (1994) Pre-and postsynaptic modulators of excitatory neurotransmission: comparative effects on hypoxia/ hypoglycemia in cortical cultures. *Brain Res* 643: 334-337

Lou J, Dayer J-M, Grau GE y Burger D (1996) Direct cell/cell contact with stimulated T lymphocytes induces the

expression of cell adhesion molecules and cytokines by human brain microvascular endothelial cells. *Eur J Immunol* 26:3107-3113

Margolis RU y Margolis RK (1989) *Neurobiology of glycoconjugates*. Plenum Press, Nueva York

Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann C, Kossmann T, Trentz O y Bauer C (1997) Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin in the brain. *Kidney Int* 51:416-418

Masland RH (2001) The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4:877-886

Masuda S, Nagao M y Sasaki R (1999) Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *Int J Hematol* 70:1-6

Misaizu T, Matsuki S, Strickland TW, Takeuchi M, Kobata A y Takasaki S (1995) Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood* 86:4097-4104

Morimoto K, Tsuda E, Said AA, Uchida E, Hatakeyama S, Ueda M y Hayakawa T (1996) Biological and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietins fractionated by Mono Q column chromatography and their modification with sialyltransferase. *Glycoconjugate* 13:1013-1020

Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham S, Jin K y Greenberg DA (1999) Cannabinoids and neuroprotection from global and focal cerebral ischemia and *in vitro*. *J Neurosci* 19:2987-2995

Nimtz M, Martin W, Wray V, Klöppel K-D, Augustin J y Conradt HS (1993) Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells. *Eur J Biochem* 213:39-56

Rahbek-Nielsen H, Roepstorff P, Reischl H, Wozny M, Koll H y Haselbeck A (1997) Glycopeptide profiling of human urinary erythropoietin by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 32:948-958

Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S y Sasaki R (1998) Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 253:26-32

Sasaki R, Masuda S y Nagao M (2001) Pleiotropic functions and tissue-specific expression of erythropoietin. *News Physiol Sci* 16:110-113

Simpson P y Savion S (1982) Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells *Circ Res* 50:101-116

Sirén A-L, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H y Ghezzi P (2001) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4044-4049

Stahl PD, Rodman JS, Millar M J y Schlesinger P H (1978) Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:1399

Storring PL y Gaines Das RE (1992) The international standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *J. Endocrinol.* 134: 459-484

Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N y Kobata A (1988) Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 263:3657-3663

Takeuchi M, Inoue N, Strickland TW, Kubota M, Wada M, Shimizu R, Hoshi S, Kozutsumi H, Takasaki S, y Kobata A (1989) Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7819-7822

Takeuchi M y Kobata A (1991) Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiol* 1:337-346

Toyoda T, Itai T, Arakawa T, Aoki KH y Yamaguchi H (2000) Stabilization of human recombinant erythropoietin through interactions with the highly branched N-glycans. *Japan Biochem Soc* 128:731-737

Tsuda E, Goto M, Murakami A, Akai K, Ueda M, Kawanishi G, Takahashi N, Sasaki R, Chiba H, Ishihara H, Mori M,

Tejima S, Endo S y Arata Y (1988) Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. *Biochemistry* 7:5646-5654

5 Tsuda E, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S y Sasaki R (1990) The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur J Biochem* 188:405-411

10 Van den Nieuwenhof IM, Koistinen H, Easton RL, Koistinen R, Kamarainen M, Morris HR, Van Die I, Seppala M, Dell A y Van den Eijnden DH (2000) Recombinant glycodelin carrying the same type of glycan structures as contraceptive glycodelin-A can be produced in human kidney 293 cells but not in chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 267:4753-62

Van Eijk HG, Van Noort WL, Dubelaar M-L y Van der Heul C (1983) The microheterogeneity of human serum transferrins in biological fluids. *Clin Chim Acta* 132:167-172

15 Van Reemoortere A, Hokke CH, Van Dam GJ, Van Die I, Deelder AM and Van den Eijnden DH (2000) Various stages of *Schistosoma* express Lewis x, LacdiNAc, GalNAc β 1-4(Fuc α 1-2Fuc α 1-3)GlcNAc carbohydrate epitopes: detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins. *Glycobiol* 10:601-609

20 Wasley LC, Timony G, Murtha P, Stoudemire J, Domer AJ, Caro J, Krieger M y Kaufman RJ (1991) The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and *in vitro* and *in vivo* biological activities of erythropoietin. *Blood* 77:2624-2632

25 Watson E, Bhide A y Van Halbeek H (1994) Structure determination of the intact major sialylated oligosaccharide chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Glycobiol* 4:227-237

White MJ, DiCaprio MJ y Greenberg DA (1996) Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures. *J Neurosci Meth* 70:195-200

30 Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, Jewell UR, Stallmach T y Gassmann M (2001) Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:857-864

35 Wong D, Prameya R y Dorovini-Zis K (1999) *In vitro* adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selection and PECAM-1. *J Neuropath Exp Neurology* 58:138-152

Tabla I.

Proteína marcadora	Descripción
Pan-queratina	Detección de casi todas las citoqueratinas. Marcadores queratinizados y epidermis de córnea, epitelios escamosos estratificados de órganos internos, epitelios estratificados, queratinocitos hiperproliferativos y epitelios simples.
EMA	Antígeno de membrana epitelial. Marcadores normales y epitelio neoplásico.
S100	Proteínas de unión a Ca ²⁺ de tipo de banda EF. Expresadas en tejidos neuronales y otros tejidos.
Vimentina	Filamentos intermedios citoesqueléticos (= proteína estructural). Es un marcador general de células que se originan en el mesénquima. Expresada durante el desarrollo del músculo esquelético.
Desmina	Filamentos intermedios citoesqueléticos (= proteína estructural). Expresada durante el desarrollo del músculo esquelético.
Actina m.l.	Actina de células del músculo liso. Tiñe células del músculo liso y células mioepiteliales.
Sinaptofisina	Reacciona con células neuroendocrinas.
Cromogranina	Glicoproteínas ácidas que se expresan ampliamente dentro de gránulos secretores de tejido endocrino, neuroendocrino y neuronal.
NSE	Enolasa específica de neuronas. Células marcadoras de origen neuronal y neuroendocrino
Neurofilamento	Reacciona con proteína de neurofilamentos fosforilados y marca proyecciones neuronales y nervios periféricos así como células ganglionares simpáticas y médula suprarrenal.

GFAP (Polycon)	Proteína ácida fibrilar glial. GFAP se encuentra específicamente en astroglia, que es altamente sensible a ataques neurológicos. Se encuentra que la astrogliosis es un resultado de traumatismo mecánico, demencia por SIDA e infección por priones y va acompañada por un aumento en la expresión de GFAP. Marcador inmunohistoquímico para localizar astrocitos benignos y células neoplásicas de origen glial en el sistema nervioso central.
CD31	Reacciona con PECAM-1. Presente en plaquetas, monocitos, granulocitos, linfocitos, células endoteliales.
CD34	Reconoce glicoproteínas transmembrana O-glicosiladas. Se expresa en células madre hematopoyéticas, CE vasculares, fibroblastos embrionarios, algunas células en tejido nervioso fetal o adulto.
N-CAM	Moléculas de adhesión de células neuronales. N-CAM está implicada en interacciones célula-célula durante el crecimiento.

Tabla II.

Proteína marcadora	Tejido control
Pan-queratina	Carcinoma de colon
EMA	Carcinoma de colon
S100	Páncreas
Vimentina	Amígdalas
Desmina	Colon
Actina m.l.	Amígdalas
Sinaptofisina	Páncreas
Cromogranina	Páncreas
NSE	Páncreas
Neurofilamento	Colon
GFAP (Polycon)	Cerebro
CD31	Colon
CD34	Amígdalas
N-CAM (CD56)	Colon

Tabla III.

Proteína marcadora	Proveedor	Anticuerpo	N.º de catálogo	Dilución de anticuerpo
Pan-queratina	Biogenex	IgG1 de ratón	MU071-UC	1:200
EMA	Dako	IgG2a de ratón	M0613	1:50
S100	Dako	conejo	Z0311	1:3000
Vimentina	Biogenex	IgG1 de ratón	MU074-UC	1:3200
Desmina	Sanbio	IgG de ratón	MON 3001	1:50
Actina m.l.	Biogenex	IgG2a de ratón	MU128-UC	1:150
Sinaptofisina	Dako	IgG1 de ratón	M0776	1:50
Cromogranina	Biogenex	IgG1 de ratón	MU126-UC	1:150
NSE	Dako	IgG1 de ratón	M0873	1:250
Neurofilamento	Sanbio	IgG de ratón	MON3004	1:300
GFAP (Polycon)	Dako	IgG1 de ratón	M0761	1:200
CD31	Dako	IgG1 de ratón	M0823	1:60
CD34	Biogenex	IgG1 de ratón	MU236-UC	1:20

N-CAM (CD56)	Neomarcadores	IgG1 de ratón	MS.204.P	1:10
--------------	---------------	---------------	----------	------

Tabla IV.

Proteína marcadora	Puntuación
Pan-queratina	Negativa
EMA	Negativa
S100	Negativa
Vimentina	Positiva
Desmina	Negativa
Actina m.l.	Negativa
Sinaptofisina	Positiva
Cromogranina	Negativa
NSE	Negativa
Neurofilamento	Positiva
GFAP (Polycon)	Positiva
CD31	Negativa
CD34	Negativa
N-CAM (CD56)	Positiva

Tabla V.

Condiciones de clonación y cultivo	Razón molar de monosacáridos neutros normalizados para tres residuos de manosa				
	Man	Fuc	GalNAc	GlcNAc	Gal
P8 - DMEM	3	0,5 (0,9)	0,4 (0,4)	2,2 (2,7)	1,7 (1,3)
P8 - JRH	3	1,5 (1,4)	0,7 (0,8)	6,1 (6,4)	3,5 (3,9)
P7 - DMEM	3	1,5 (1,4)	0,4 (0,3)	5,5 (6,1)	2,3 (3,3)
P7 - JRH	3	1,8 (1,7)	0,4 (0,4)	6,1 (6,8)	3,6 (4,2)
C25 - DMEM	3	2,0	1,0	6,0	2,2
Eprex	3	0,7	-	5,4	4,1

5

Tabla VI.

Masa de P7 (m/z)	Porcentaje del total			Razón de Hex:HexNAc:dHex
	Conjunto A	Conjunto B	Conjunto C	
1809,64	2,34	2,99	2,44	5:4:1
1850,67	2,57	5,31	2,49	4:5:1
1891,69	5,06	10,39	1,31	3:6:1
1955,70	-	1,95	2,16	5:4:2
1996,72	6,37	7,96	6,38	9:5:2
2037,75	6,33	5,16	5,39	3:6:2
2053,74	3,70	4,11	1,98	5:5:1
2142,78	2,19	3,68	2,45	4:5:3
<u>2174,77</u>	6,53	3,63	8,04	6:5:1
2183,81	6,69	5,02	7,57	3:6:3
2199,80	3,78	4,65	1,58	4:6:2

ES 2 381 104 T3

2215,80	4,13	4,95	4,15	5:6:1
2256,82	-	1,30	-	4:7:1
2320,83	2,34	2,04	3,29	6:5:2
2361,86	4,35	3,30	3,23	5:6:2
2377,85	3,77	3,79	2,86	6:6:1
2507,91	1,62	2,32	1,32	5:6:3
2523,91	2,09	2,60	1,61	6:6:2
<u>2539,90</u>	11,89	4,81	19,32	7:6:1
2580,93	3,32	1,53	1,69	6:7:1
2612,94	-	-	1,78	6:5:3
2669,97	1,95	2,34	-	6:6:3
2685,96	6,21	3,11	5,81	7:6:2
2726,99	1,62	1,38	1,36	6:7:2
2832,02	3,64	1,55	3,08	7:6:3
<u>2905,04</u>	1,79	-	2,45	8:7:1
2978,08	2,23	1,65	-	7:6:4

Tabla VII.

Masa de P8 (m/z)	Porcentaje del total			Razón de Hex:NAC:dHex
	Conjunto A	Conjunto B	Conjunto C	
<u>1809,64</u>	-	1,03	-	5:4:1
1850,67	3,36	2,05	-	4:5:1
1891,69	5,11	2,11	3,09	3:6:1
1955,70	1,46	1,22	1,08	5:4:2
1996,72	5,05	4,61	6,54	4:5:2
2012,72	1,34	1,38	1,35	5:5:1
2037,75	14,62	14,34	12,48	3:6:2
2053,79	3,73	2,76	4,29	4:6:1
2142,78	2,57	1,97	2,06	4:5:3
2158,78	1,43	1,91	-	5:5:2
<u>2174,77</u>	2,40	2,53	5,58	6:5:1
2183,81	16,91	15,79	14,90	3:6:3
2199,80	1,74	3,18	4,90	4:6:2
2215,80	4,23	4,20	3,08	5:6:1
2256,82	2,08	3,04	2,17	4:7:1
2320,83	1,67	1,88	2,23	6:5:2
2361,86	3,25	2,25	3,02	5:6:2
2377,85	1,50	1,84	2,73	6:6:1
2402,88	2,05	2,20	4,26	4:7:2
2418,88	0,97	1,54	-	5:7:1
2466,89	1,03	-	-	6:5:3
2507,91	2,04	2,48	-	5:6:3

2523,91	1,58	1,73	1,47	6:6:2
2539,90	2,48	4,79	9,56	7:6:1
2548,94	1,26	1,14	0,66	4:7:3
2580,93	1,87	2,07	2,48	6:7:1
2685,96	2,74	3,39	4,30	7:6:2
2726,99	2,55	3,12	-	6:7:2
2768,01	1,35	-	-	5:8:2
2832,02	2,14	3,06	1,91	7:6:3
2873,05	1,70	1,81	1,63	6:7:3
2889,04	1,14	0,67	-	7:7:2
2978,08	0,89	0,99	2,39	7:6:4
3019,10	1,09	1,26	-	6:7:4

Tabla VIII.

Actividades de FT (nmol)/h/mg de proteína)

	α 1,2 FT	α 1,3 FT	α 1,6 FT	GalT
CHO	< 0,01	0,03	4,31	12,5
PER.C6	< 0,01	0,65	3,62	3,41

Tabla IX.

Masa (m/z)	Hex	HexNAC	dHex	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4
1631,6	3	4	2	ND	ND	ND	1,16
1688,6	3	5	1	3,22	3,09	2,22	2,82
1793,7	4	4	2	1,29	1,15	ND	0,83
1809,6	5	4	1	ND	1,50	2,10	2,82
1834,7	3	5	2	1,71	1,77	1,73	1,41
1891,7	3	6	1	10,98	7,96	5,19	4,31
1955,7	5	4	2	0,86	3,36	0,87	1,33
1996,7	4	5	2	2,40	2,65	2,47	2,32
2037,8	3	6	2	4,03	4,86	4,82	3,65
2053,7	5	5	1	6,43	5,39	3,89	2,65
2101,8	5	4	3	1,29	1,55	ND	DN
2142,8	4	5	3	1,71	2,03	1,36	2,98
2174,8	6	5	1	1,29	1,95	1,36	0,00
2183,8	3	6	3	8,57	11,05	16,44	22,54
2199,8	4	6	2	4,54	5,04	4,94	3,81
2215,8	5	6	1	5,66	4,60	2,84	2,32
2256,8	4	7	1	1,97	1,77	0,87	1,33
2320,8	6	5	2	1,03	1,27	0,87	1,49
2361,9	5	6	2	4,46	4,86	4,39	3,31
2377,9	6	6	1	5,23	2,21	2,10	1,66
2507,9	5	6	3	1,65	1,68	3,71	5,47

2523,9	6	6	2	3,43	2,21	2,22	1,82
2539,9	7	6	1	10,72	6,19	4,94	4,47
2580,9	6	7	1	2,14	2,21	1,85	1,16
2670,0	6	6	3	0,86	1,68	2,47	2,82
2686,0	7	6	2	6,69	6,90	5,93	3,81
2727,0	6	7	2	2,70	3,36	2,72	1,82
2832,0	7	6	3	2,83	4,60	6,43	3,81
2873,1	6	7	3	1,29	1,55	4,57	2,98
2978,1	7	6	4	1,03	1,55	3,58	3,73
3019,1	6	7	4	ND	ND	2,47	2,90
3124,1	7	6	5	ND	ND	0,62	2,49

Tabla X.

	Clon	Morfología	Expresión de E1A
Clones de E1A.EPO	004	Plana	++
	008*	Plana	++
	025	Plana	+++
	028	Agujas pequeñas	-
	034	Plana	± -
	056	Plana + parental	-
	062	Plana	+++
	066	Plana	++
	076	Parental	-
Clones de E1A.E1B.EPO	002	Plana	++
	003	Plana + Parental	++
	005	Plana	++
	023	Plana	+++
	025	Plana + Parental	-
	026	Plana	+++
	028	Plana + Parental	+
	031	Plana	+
	033	Plana	+++
	035	Parental	-
	049	Plana	++
	051	Plana + Parental	+
	057	Plana, irregular	+
	058	Plana	++
	062	Plana	++
	067	Plana	++
	072*	Plana, irregular	++
	076	Plana	+++
	077	Plana	+++

Tabla XI.

[M+Na] +	1647,6	1809,6	1891,7	1996,7	2037,8	2174,8	2183,8	2215,8	2361,9
HexNAc	2	2	4	3	4	3	4	4	4
Hex	1	2		1		3		2	2
dHex				1	1		2		1
Estructura propuesta									
Clon 033						11%			
Clon 008	2%	2%		1%	4%	4%	8%	4%	3%
Clon 072		1%	6%	2%	9%	4%	8%	2%	2%
Otra estructura posible									
[M+Na] +	2377,9	2402,9	2539,9	2580,9	2686,0	2727,0	2832,0	2873,1	2905,0
HexNAc	4	?	4	5	4	5	4	5	5
Hex	3		4	3	4	3	4	3	5
dHex					1	1	2	2	
Estructura propuesta									
Clon 033	3%		78%		4%				4%
Clon 008		3%	28%	6%	14%	6%	8%	3%	3%
Clon 072		3%	26%	11%	9%	7%	6%	3%	2%

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende moléculas de eritropoyetina recombinantes que comprenden glicanos N-unidos, caracterizada porque el número promedio de estructuras de lewis-X en glicanos N-unidos por molécula de eritropoyetina es al menos de 2,7.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el número promedio de estructuras de lewis-X en glicano N-unido por molécula de eritropoyetina es al menos de aproximadamente 3,6.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el número promedio de estructuras de lewis-X en glicanos N-unidos por molécula de eritropoyetina es al menos de aproximadamente 4,1.
4. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque el número promedio de estructuras de lewis-X en glicanos N-unidos por molécula de eritropoyetina es al menos de aproximadamente 5,7.
- 15 5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que los glicanos N-unidos en dichas moléculas de eritropoyetina son principalmente estructuras biantenarias.
- 20 6. Preparación farmacéutica que comprende una composición de moléculas de eritropoyetina recombinantes según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso como medicamento.
- 25 8. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en isquemia, una lesión por reperfusión, un trastorno inducido por hipoxia, una enfermedad inflamatoria, un trastorno neurodegenerativo y daño agudo al sistema nervioso central o periférico.

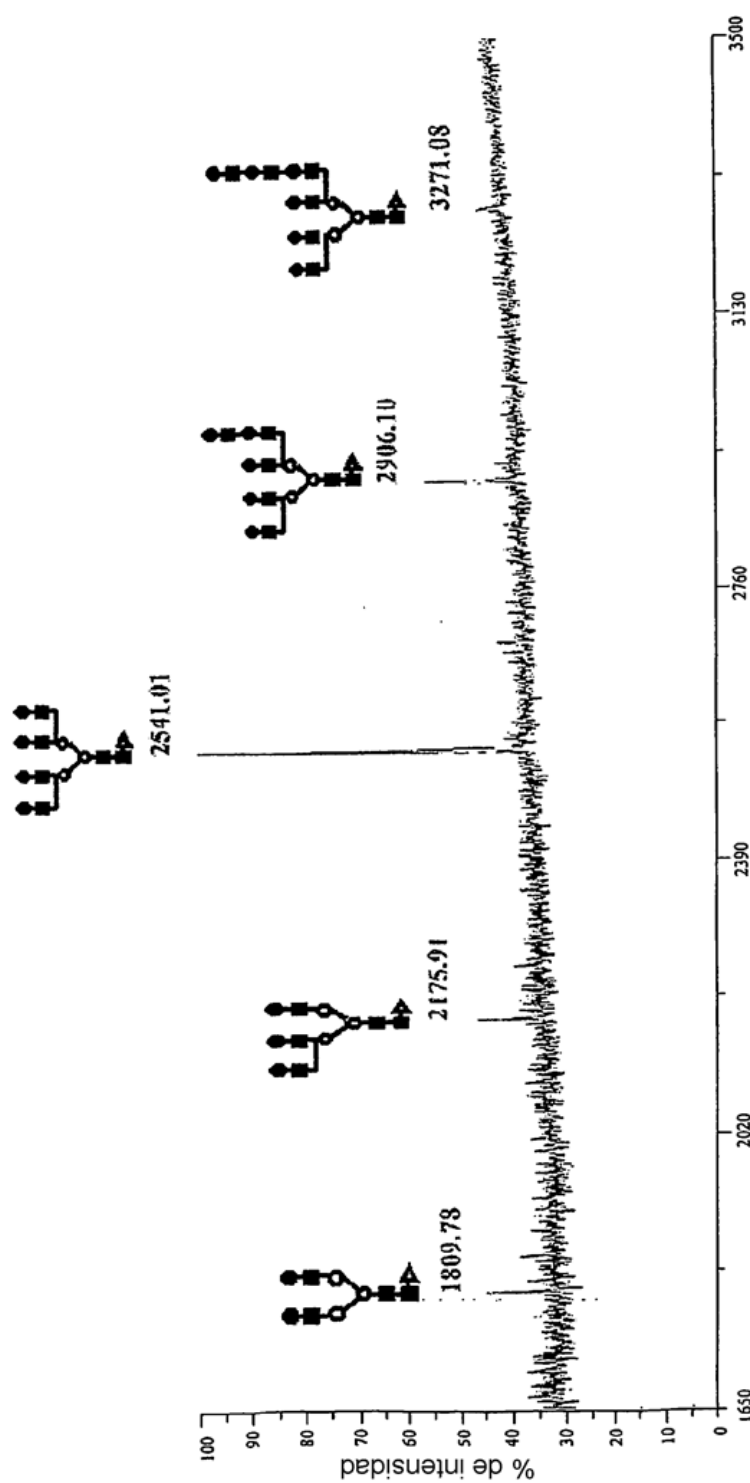


Fig. 1A

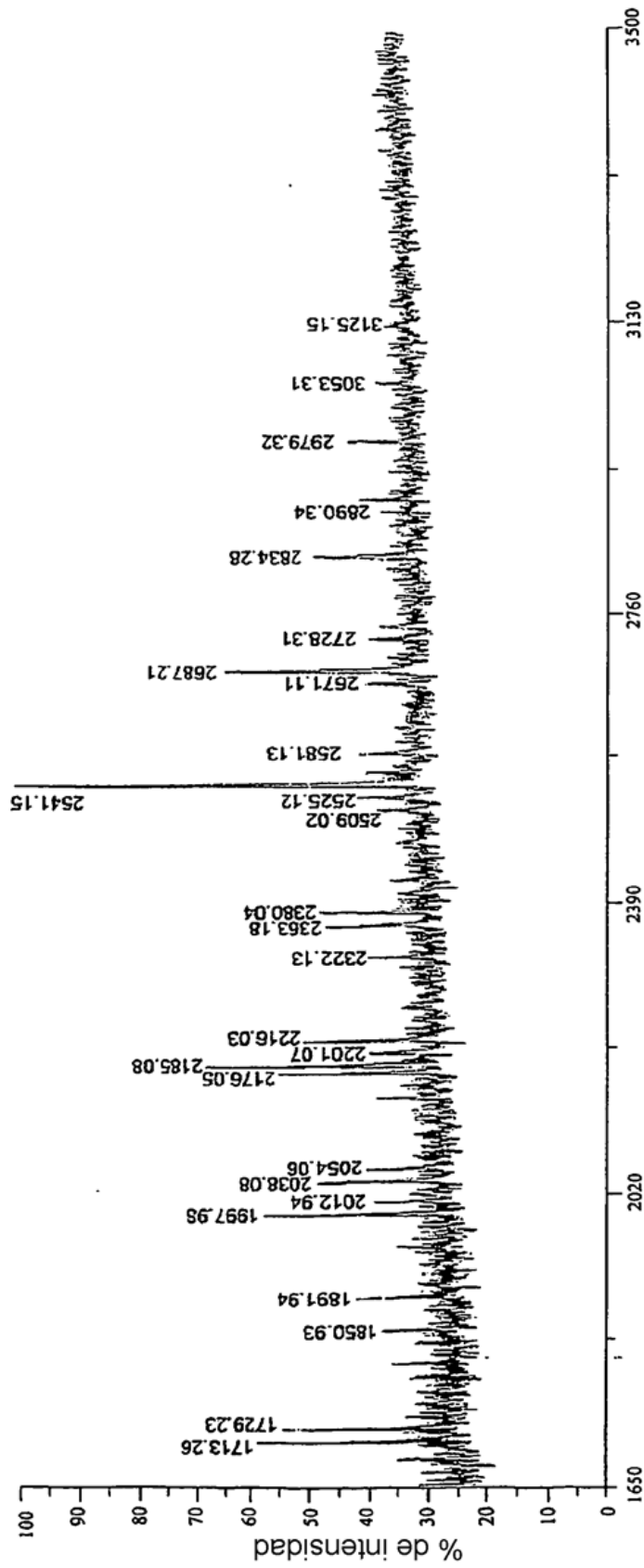


Fig. 1B

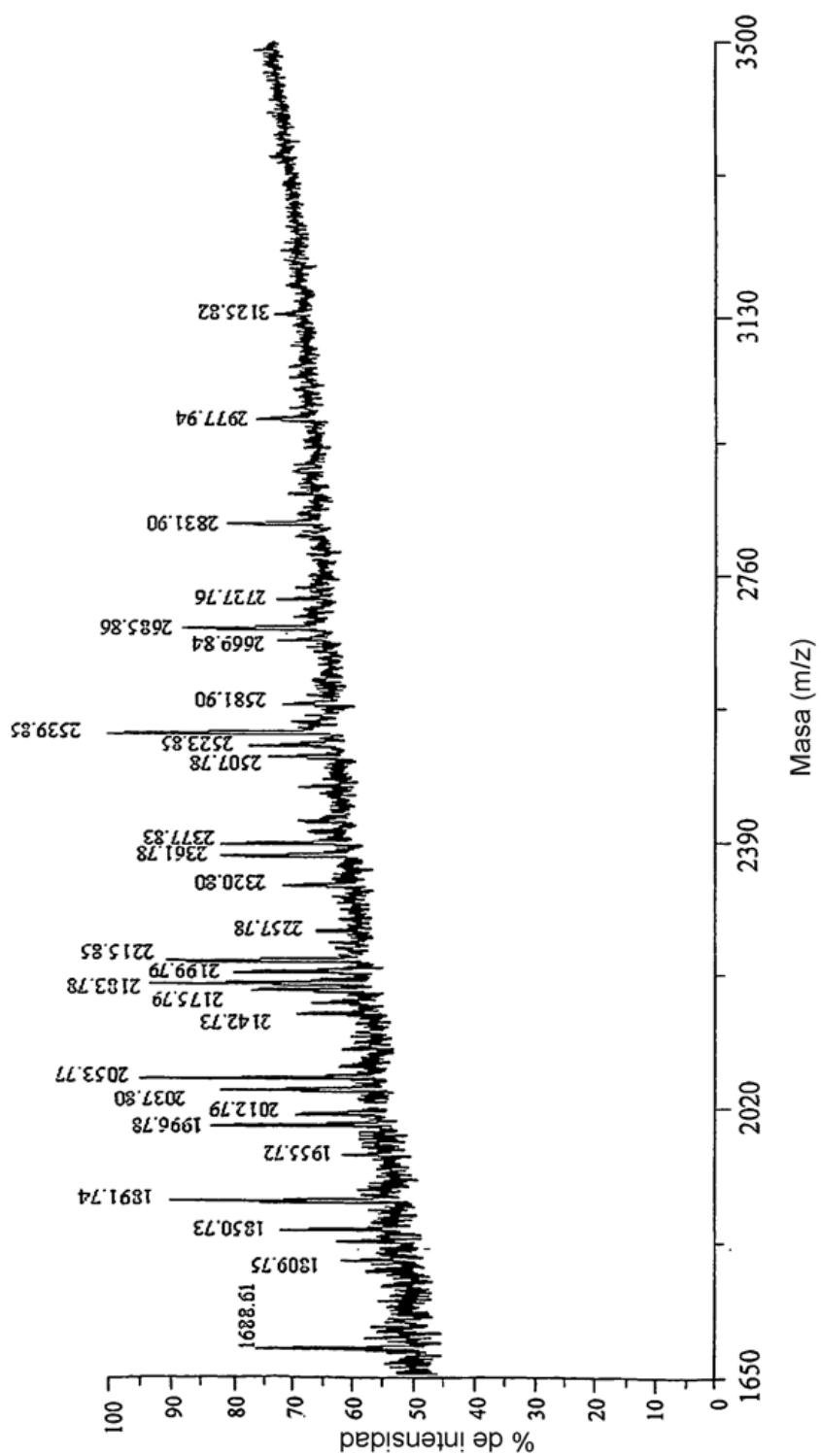


Fig. 1C

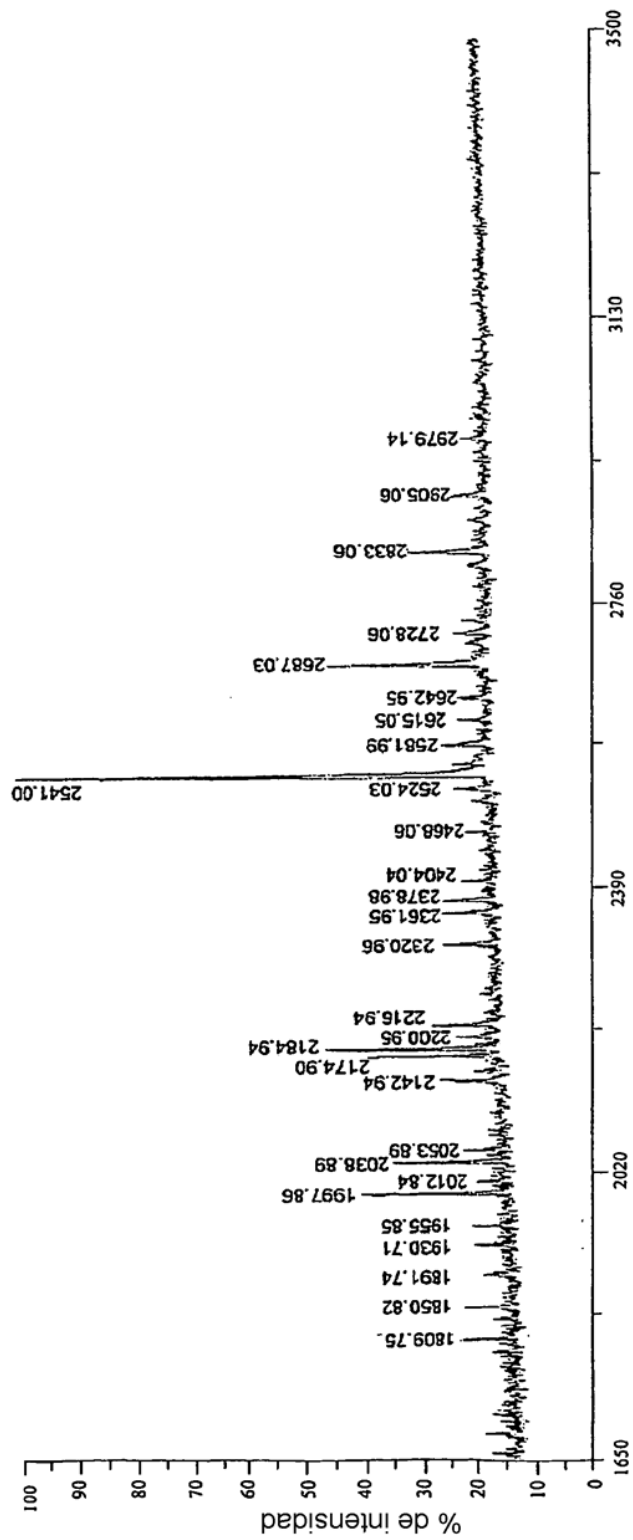


Fig. 1D

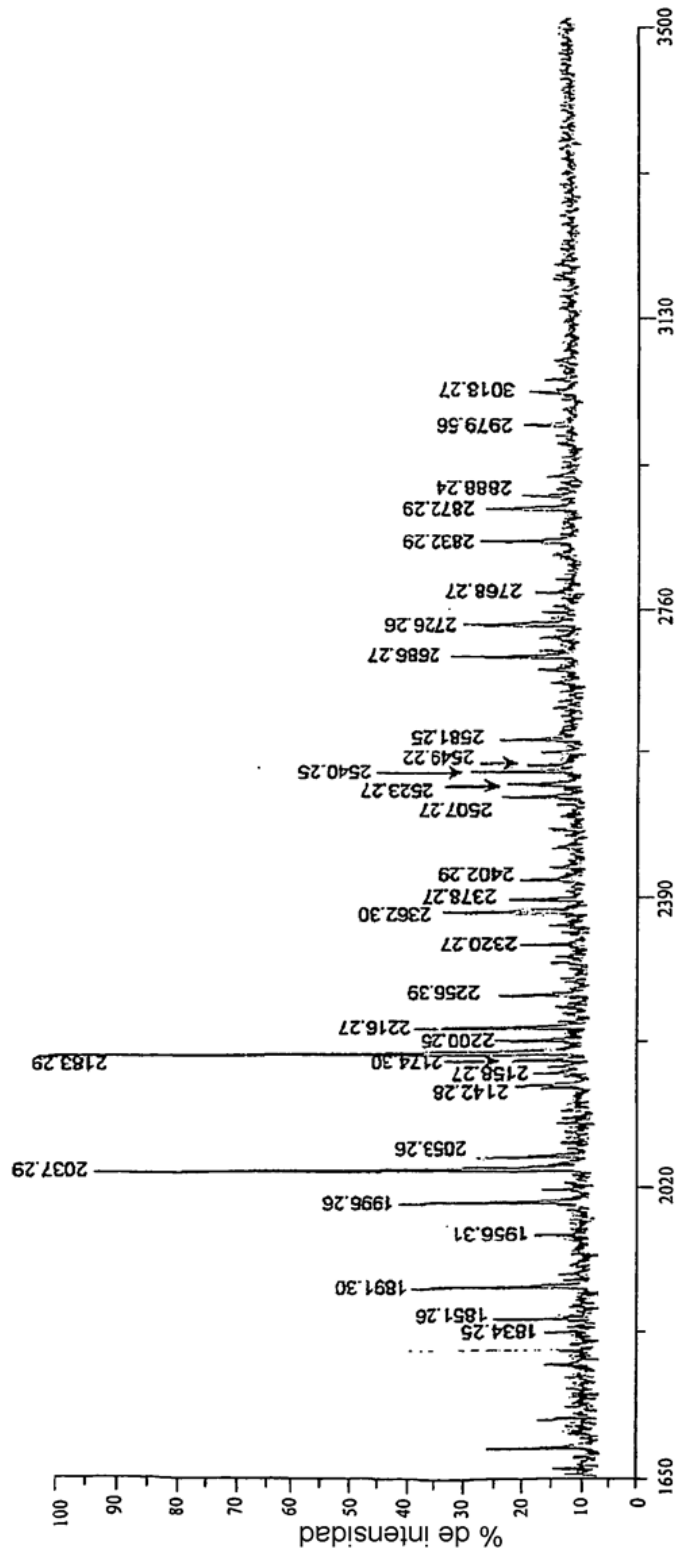


Fig. 1E

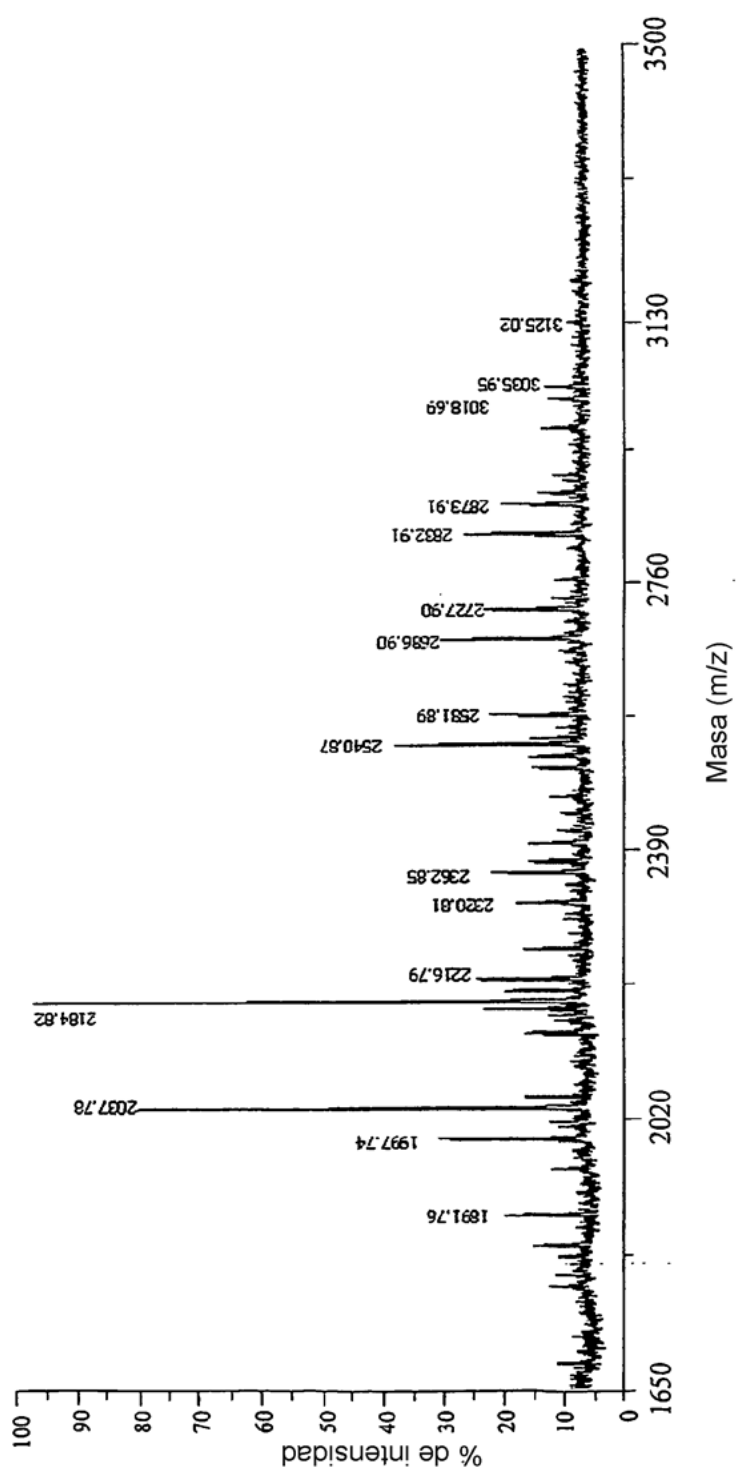


Fig. 1F

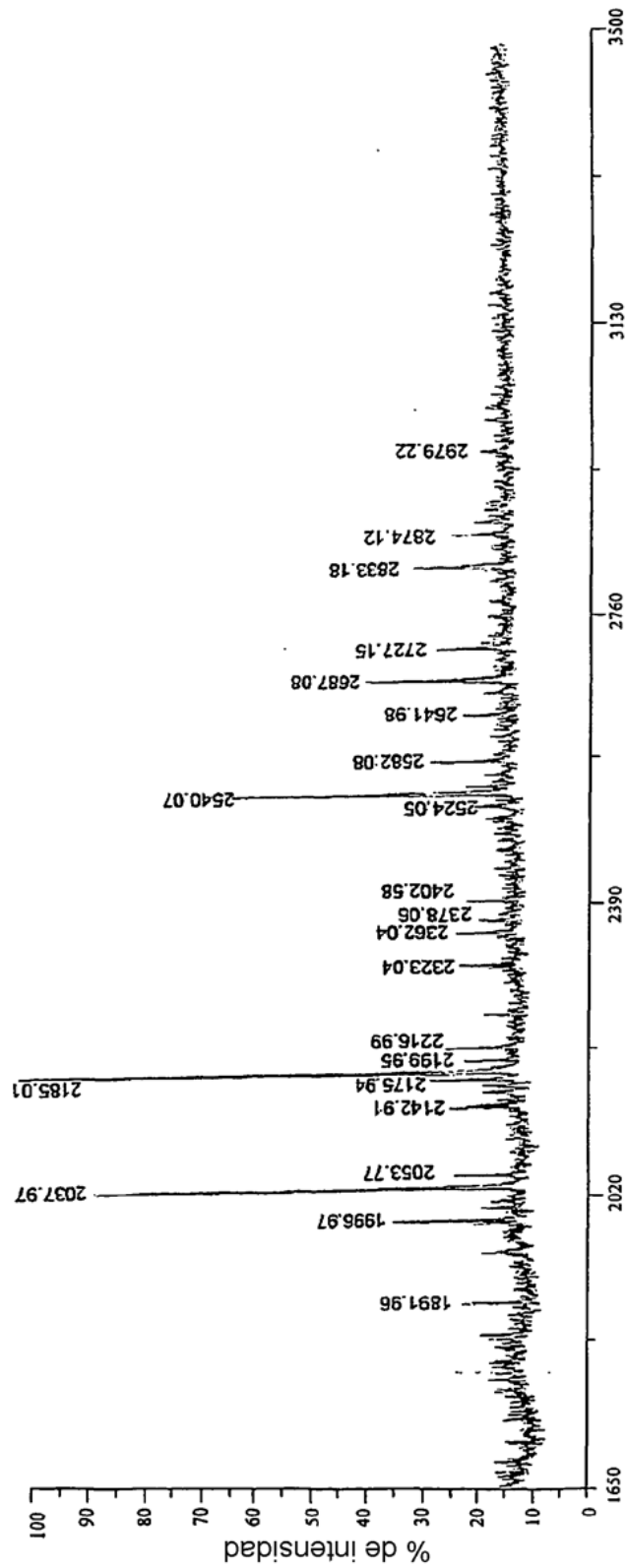


Fig. 1G

Fig. 2

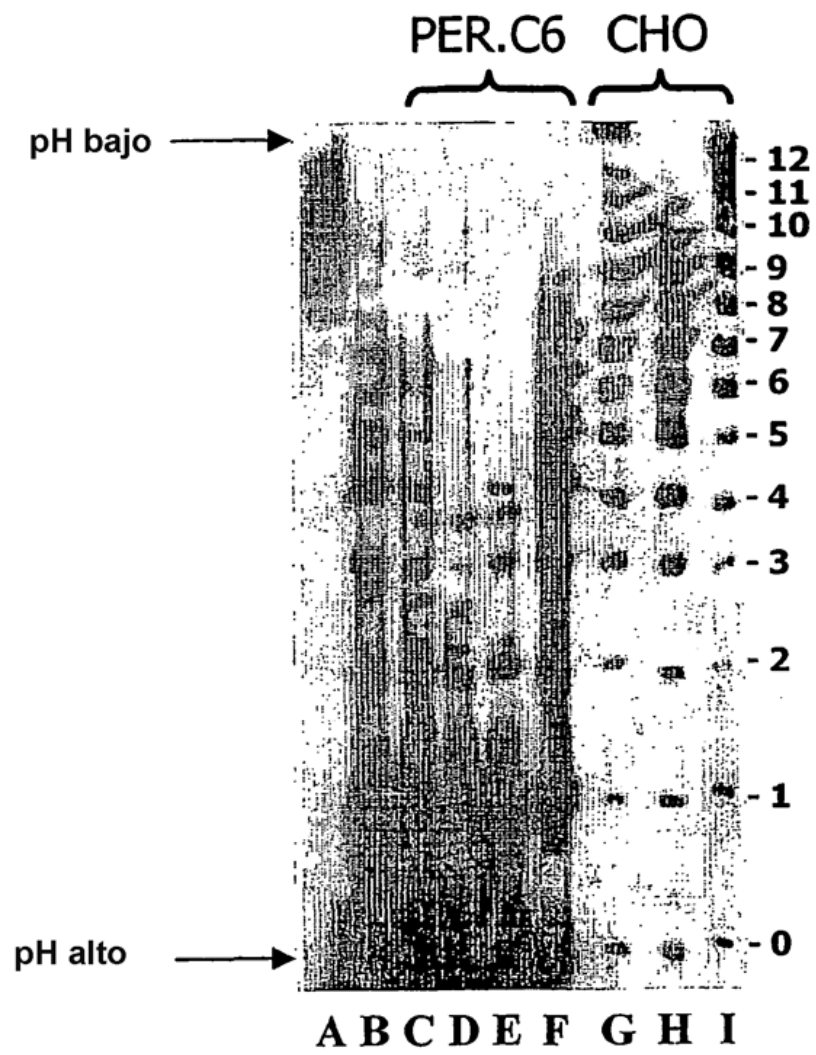
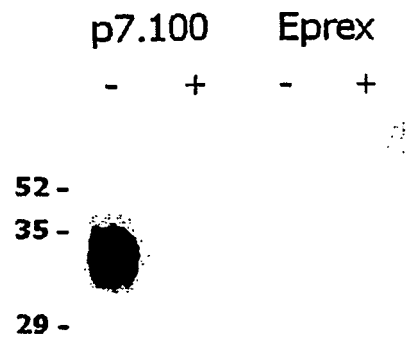


Fig. 3



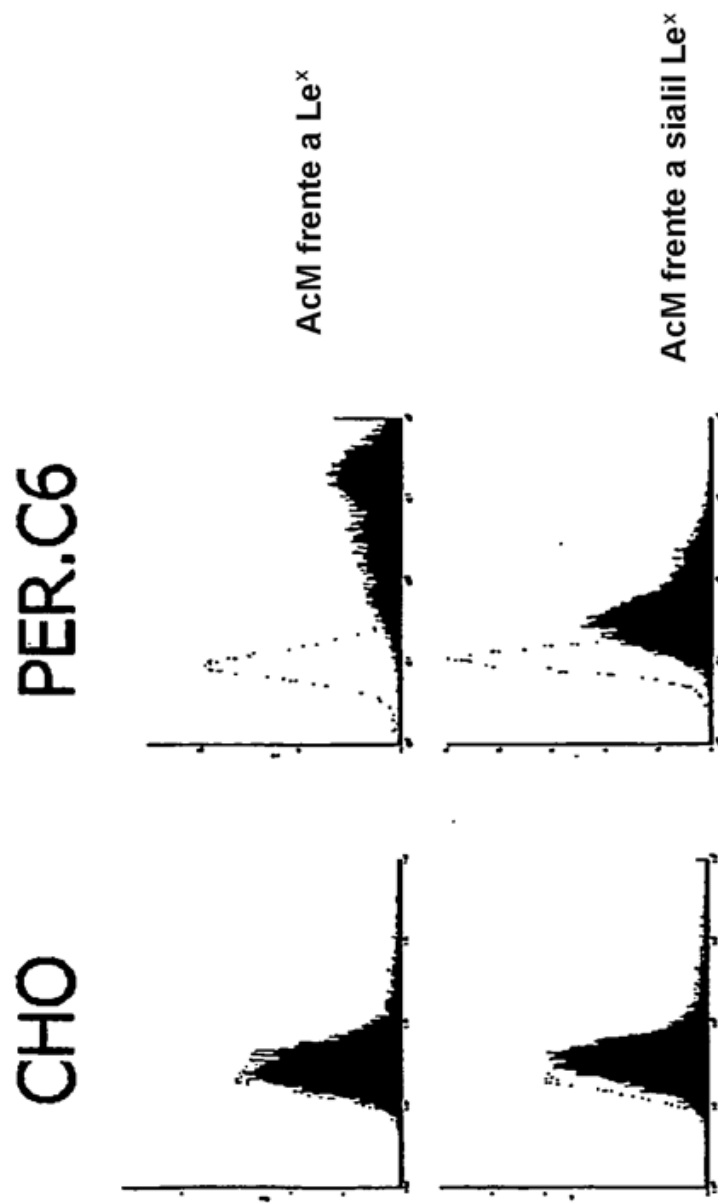
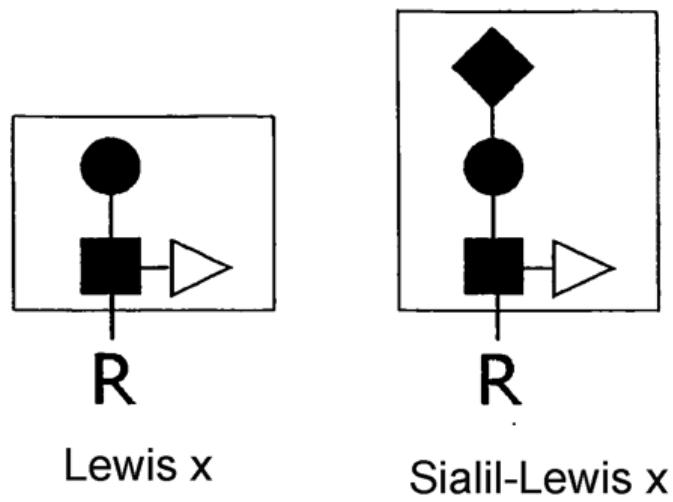


Fig. 4

Fig. 5



◆ Ácido siálico

● Galactosa

■ N-acetil-glucosamina

▷ Fucosa

R Subestructura de azúcar N-unido

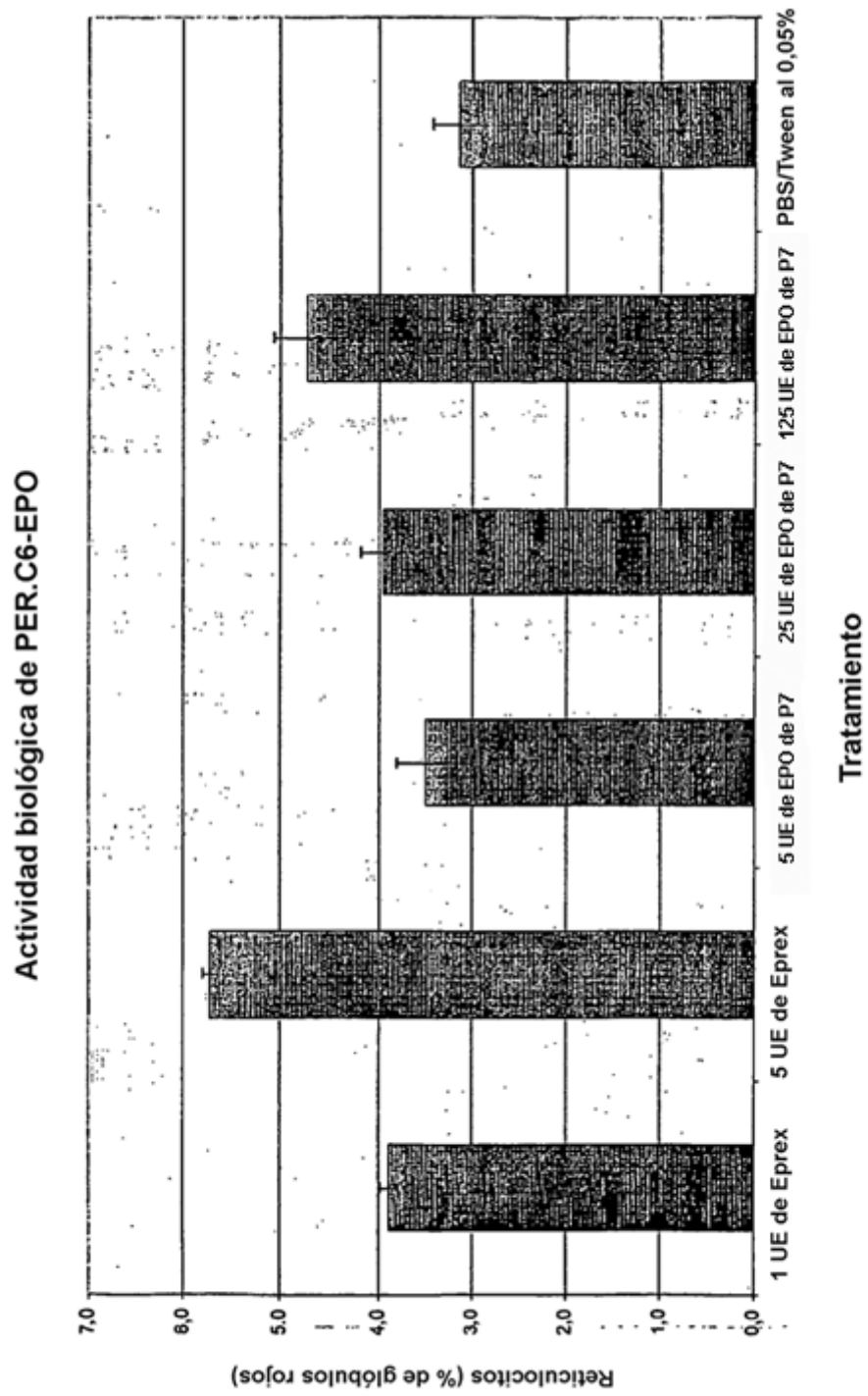


Fig. 6

Mapas de ADC 24 h tras el accidente cerebrovascular

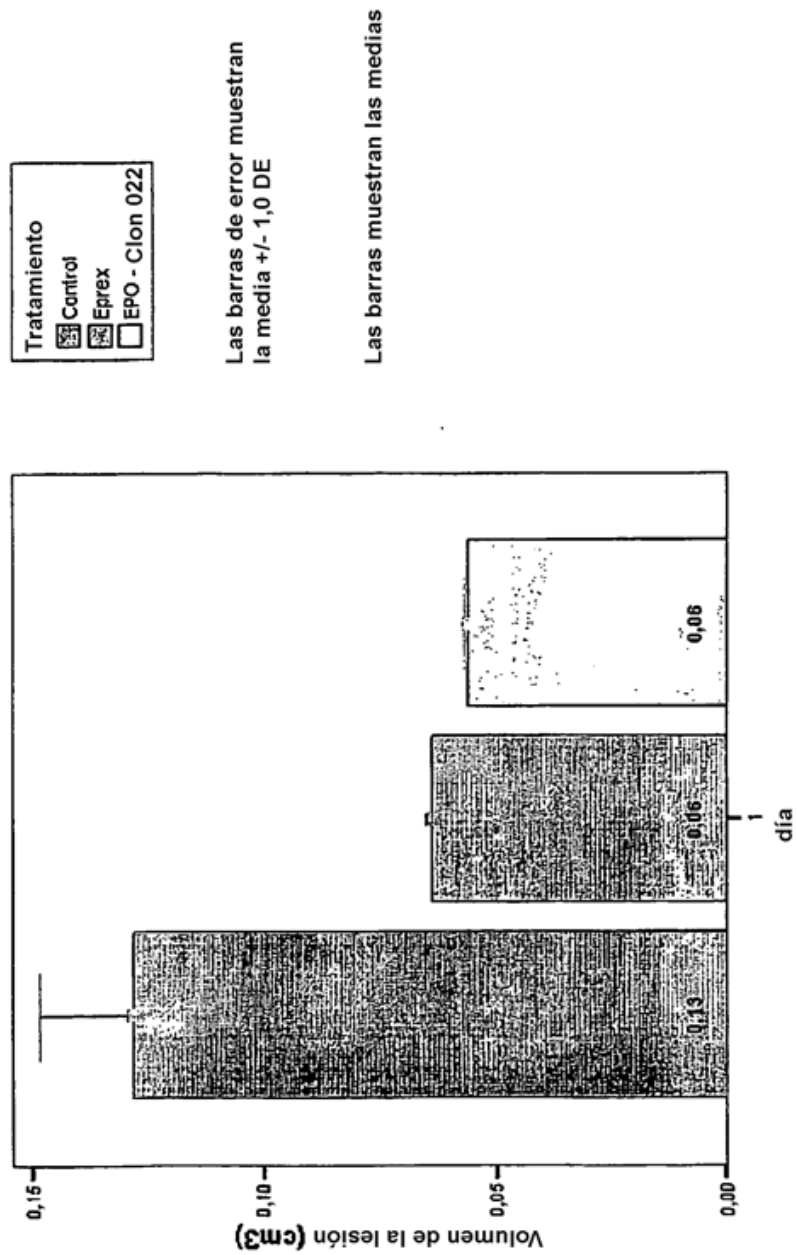


Fig. 7A

Mapas de T2 24 h tras el accidente cerebrovascular

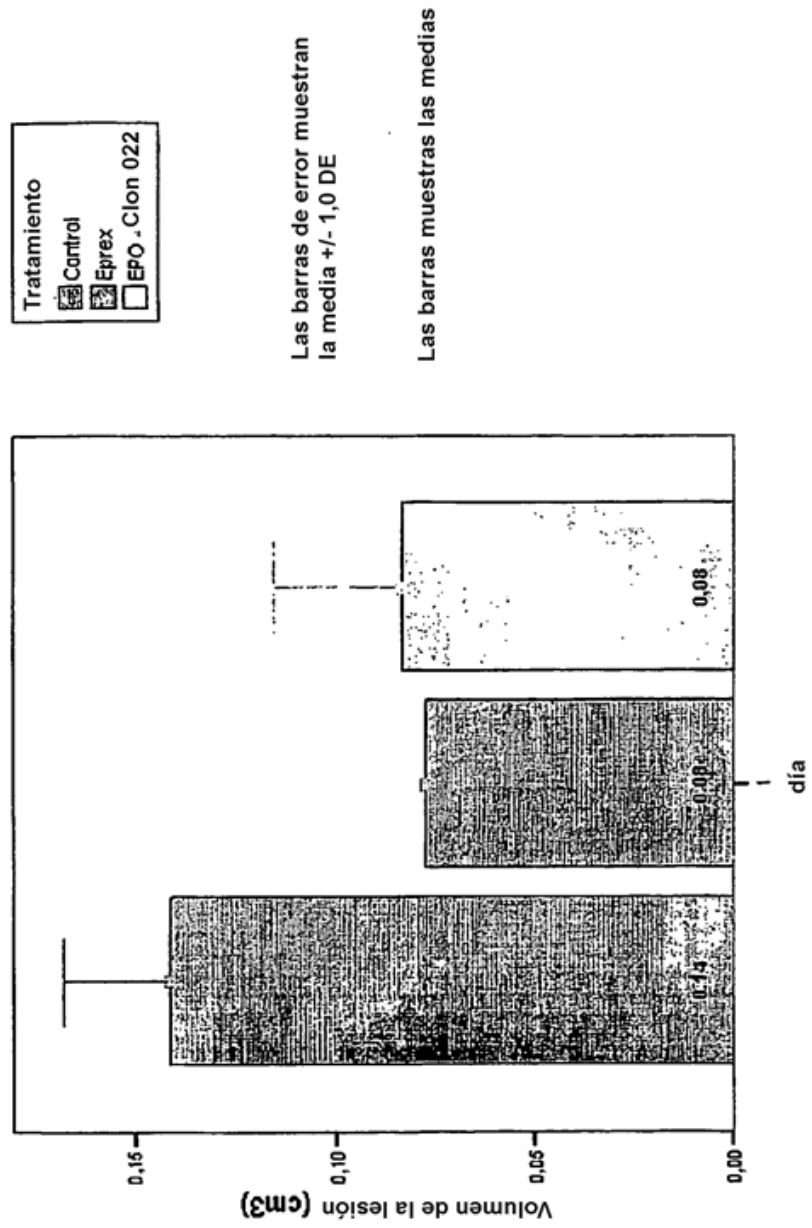


Fig. 7B

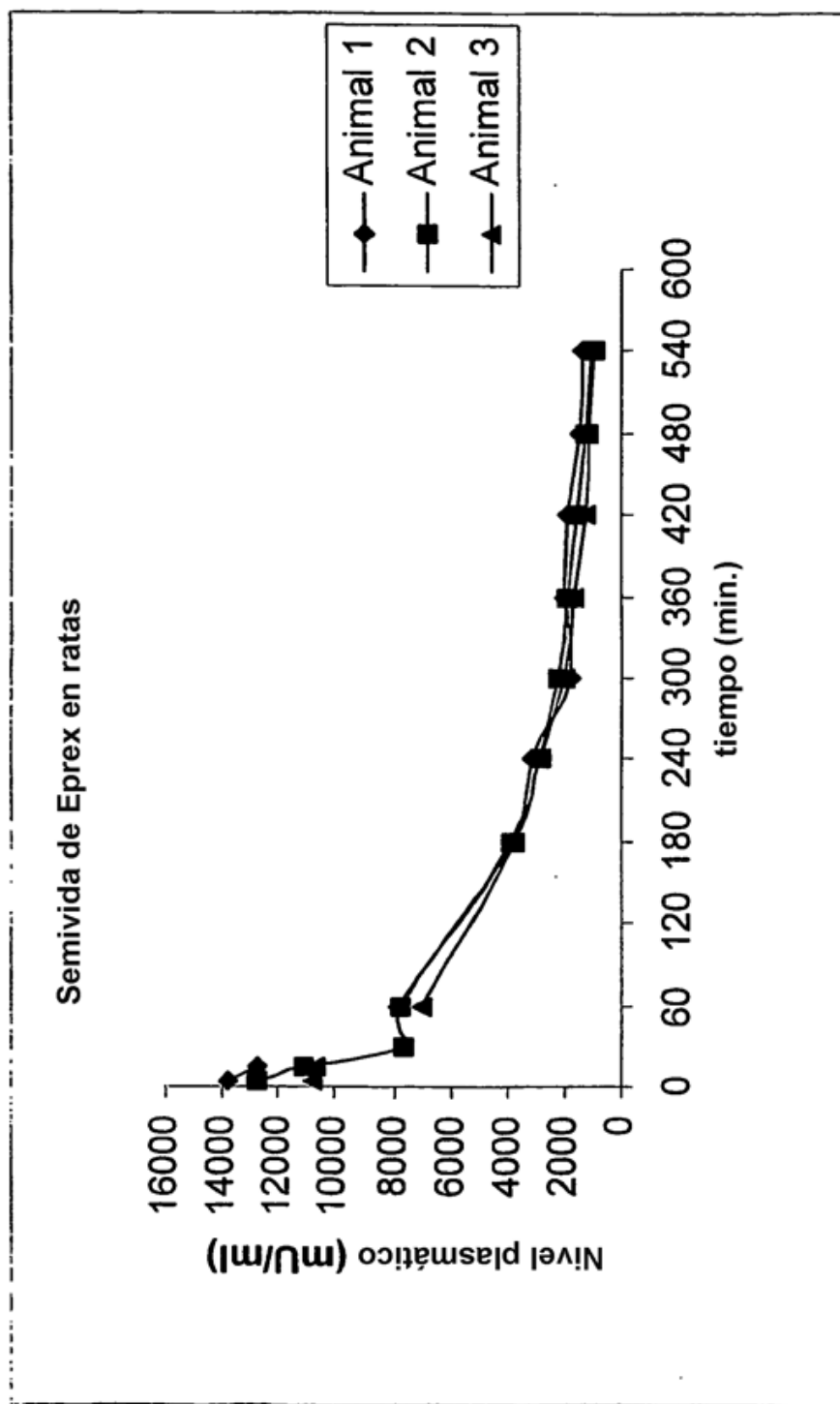


Fig. 8

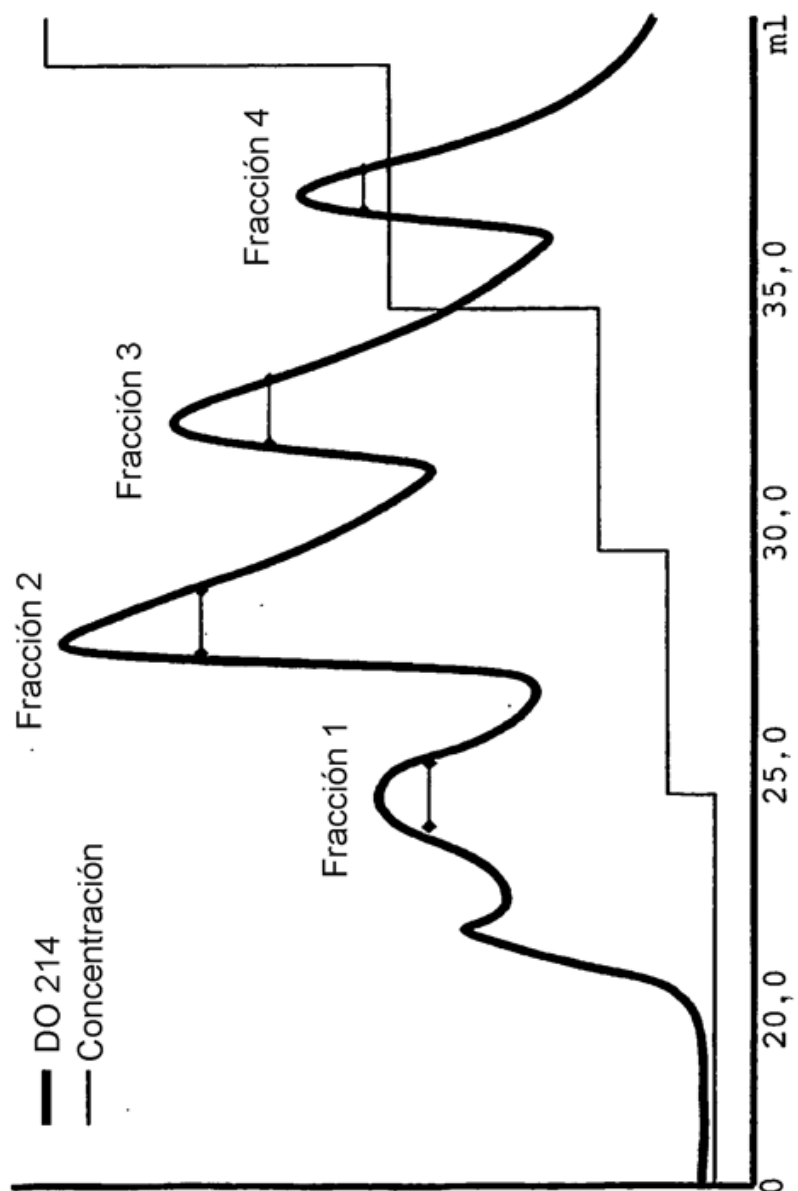


Fig. 9

Fig. 10A

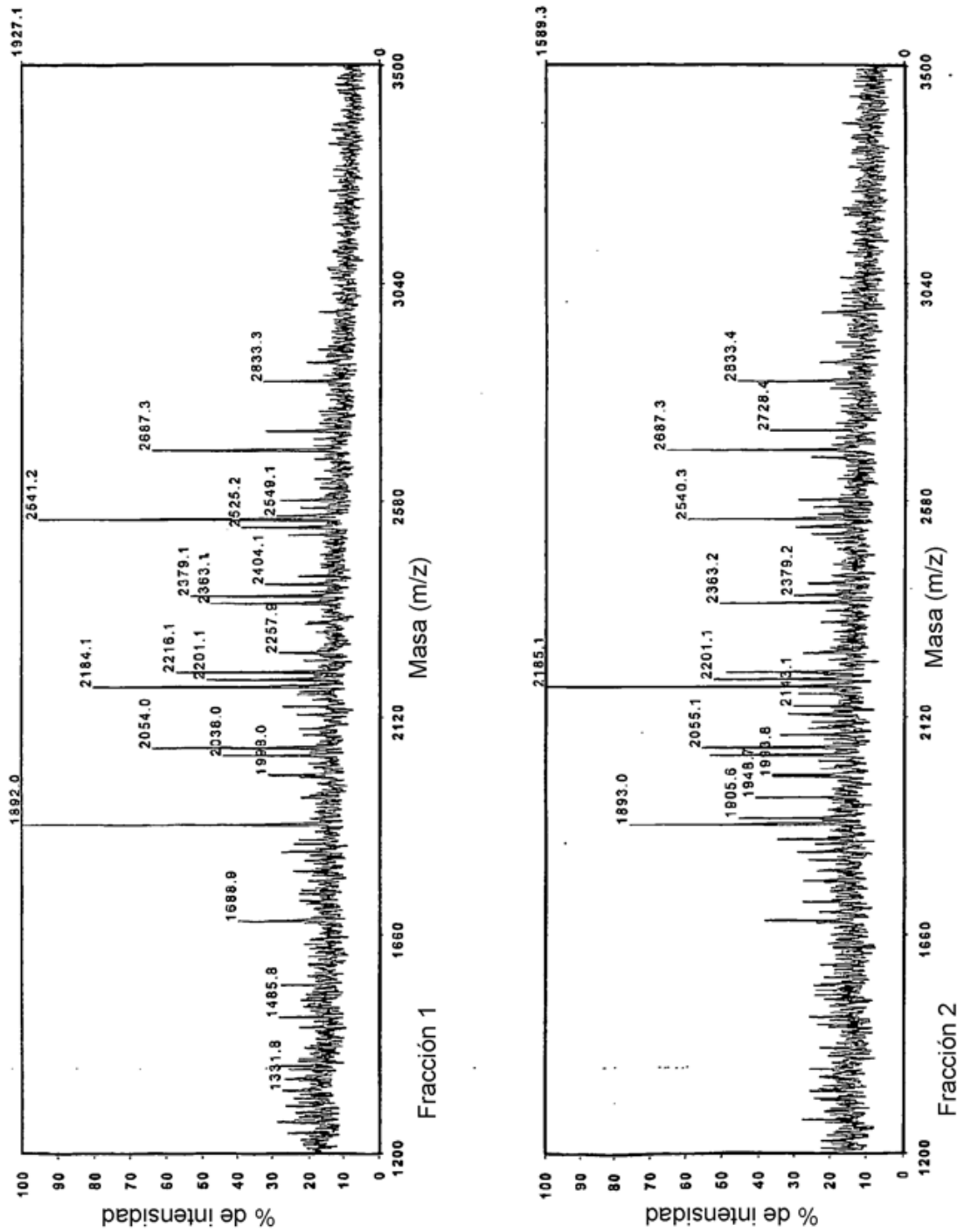
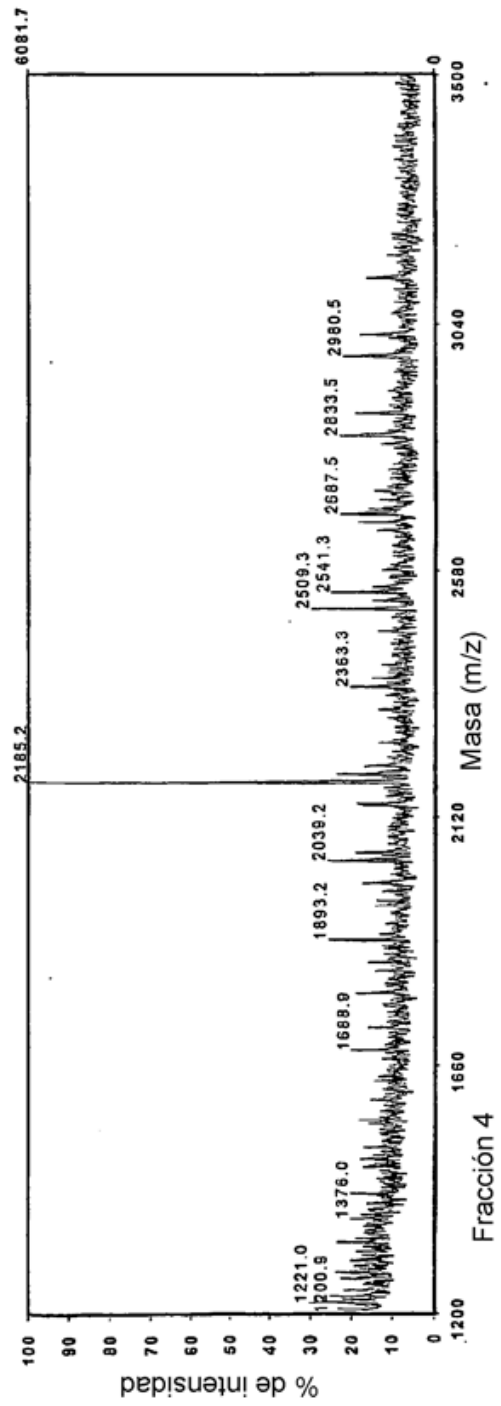
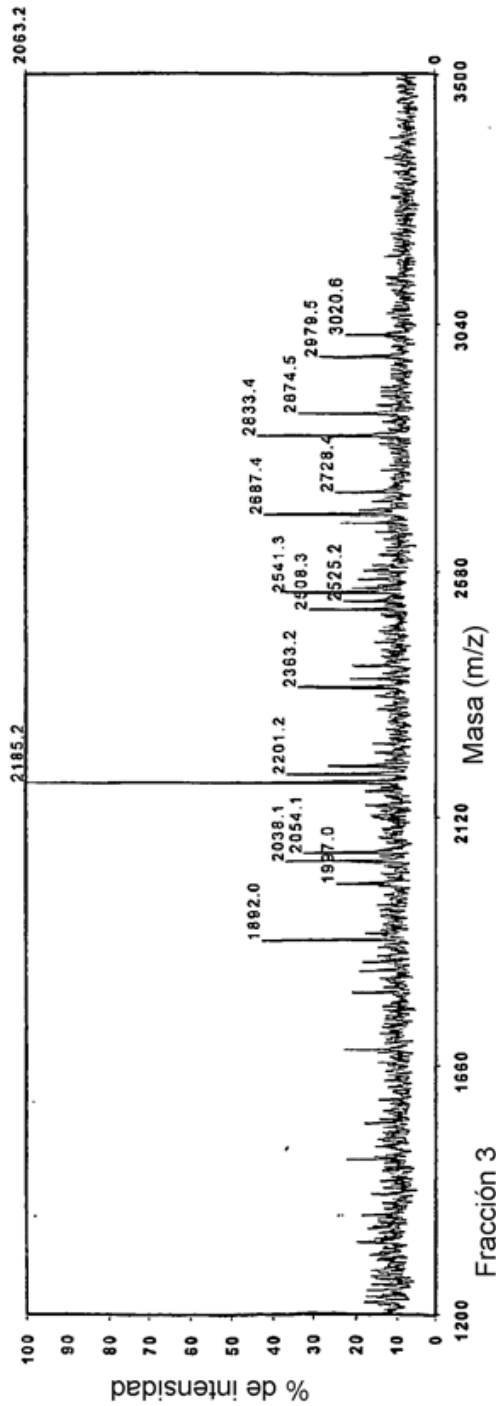


Fig. 10A, cont.



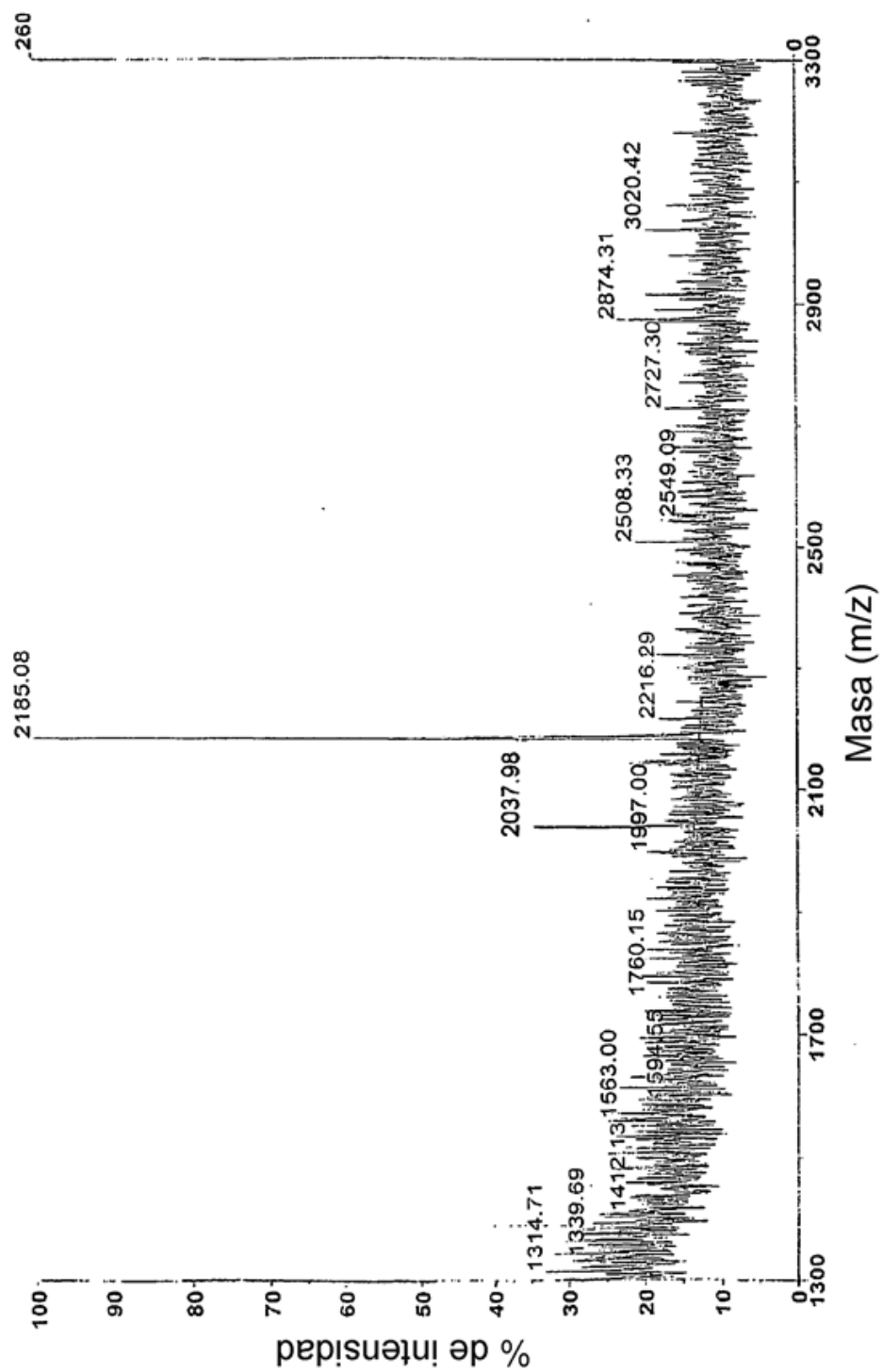


Fig. 10B

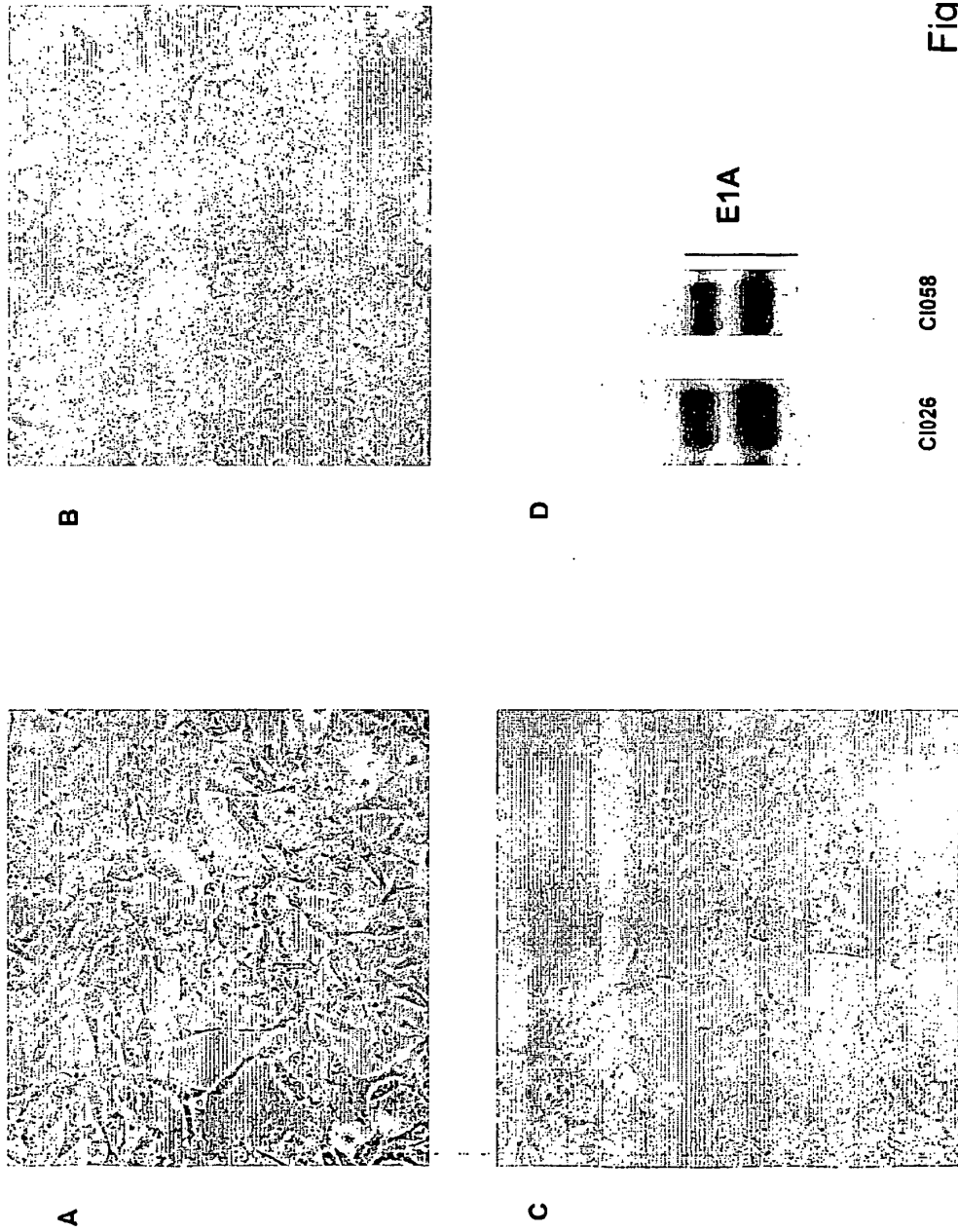


Fig. 11

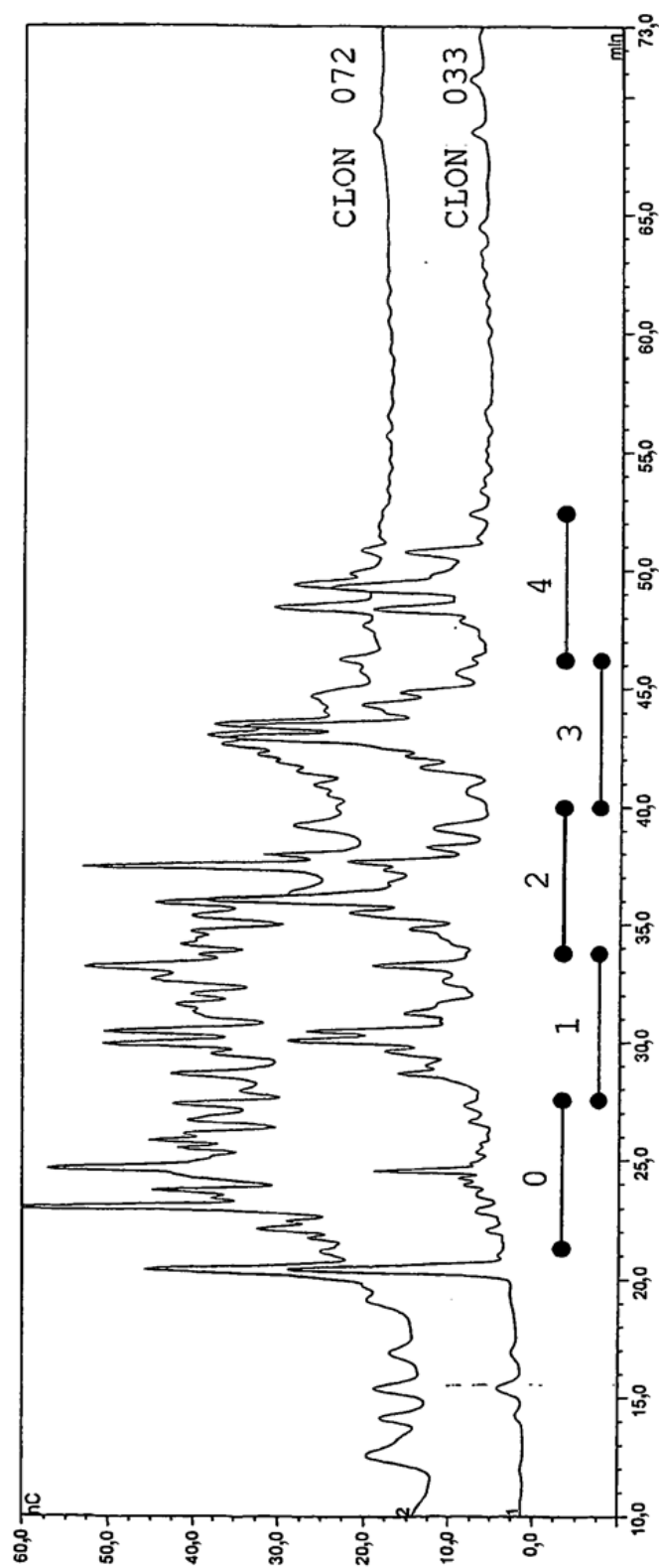


Fig. 12

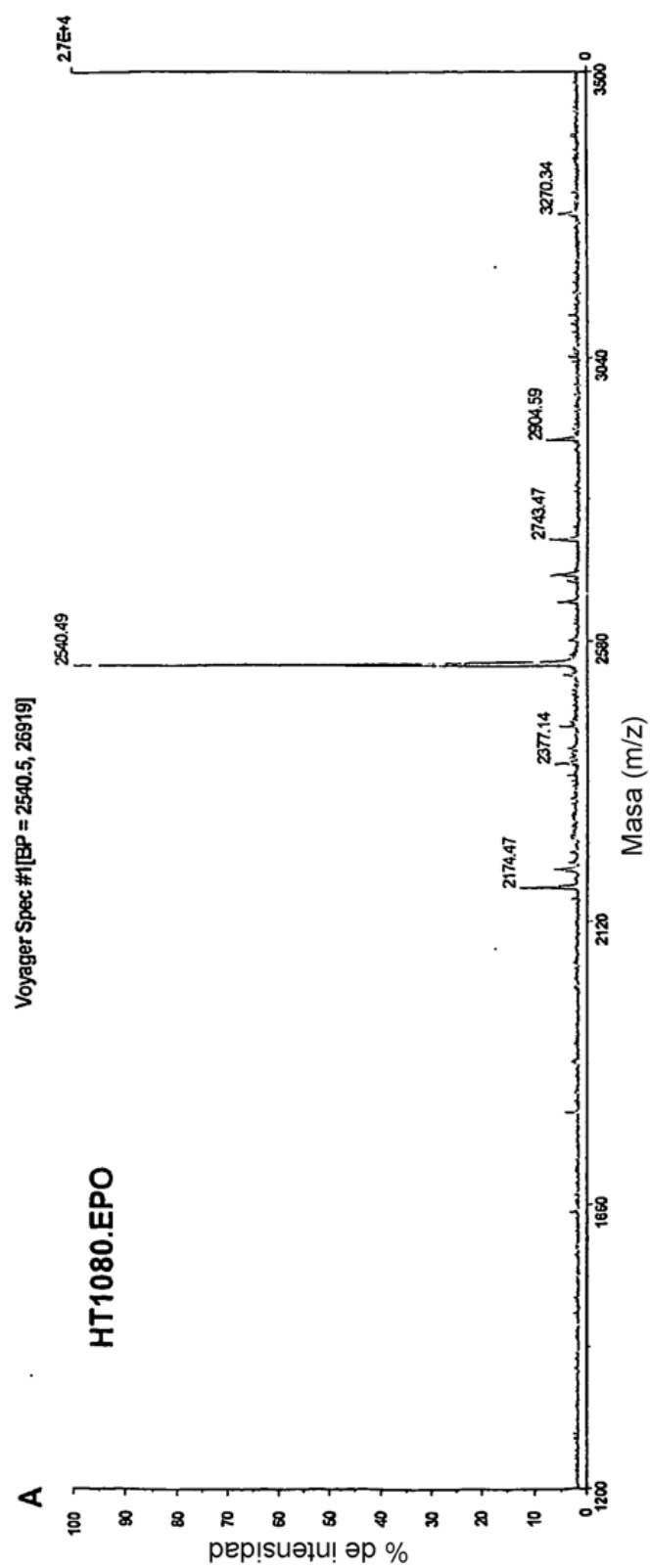


Fig. 13, cont.

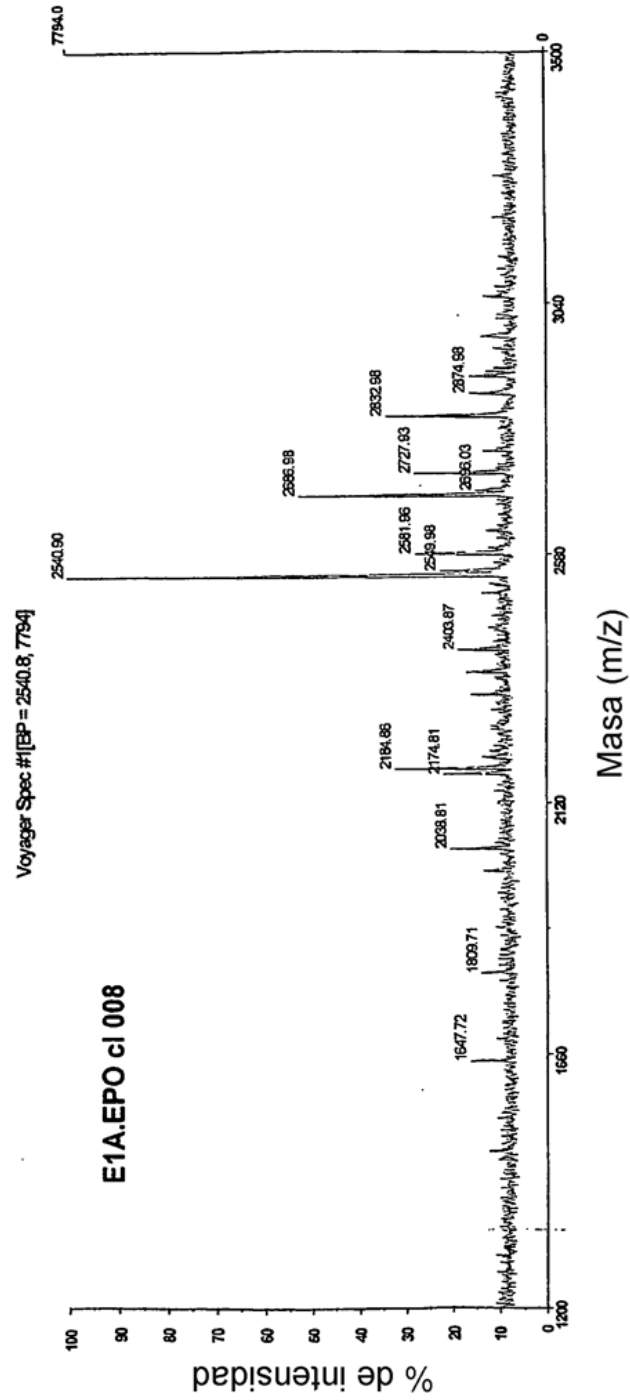


Fig. 13, cont.

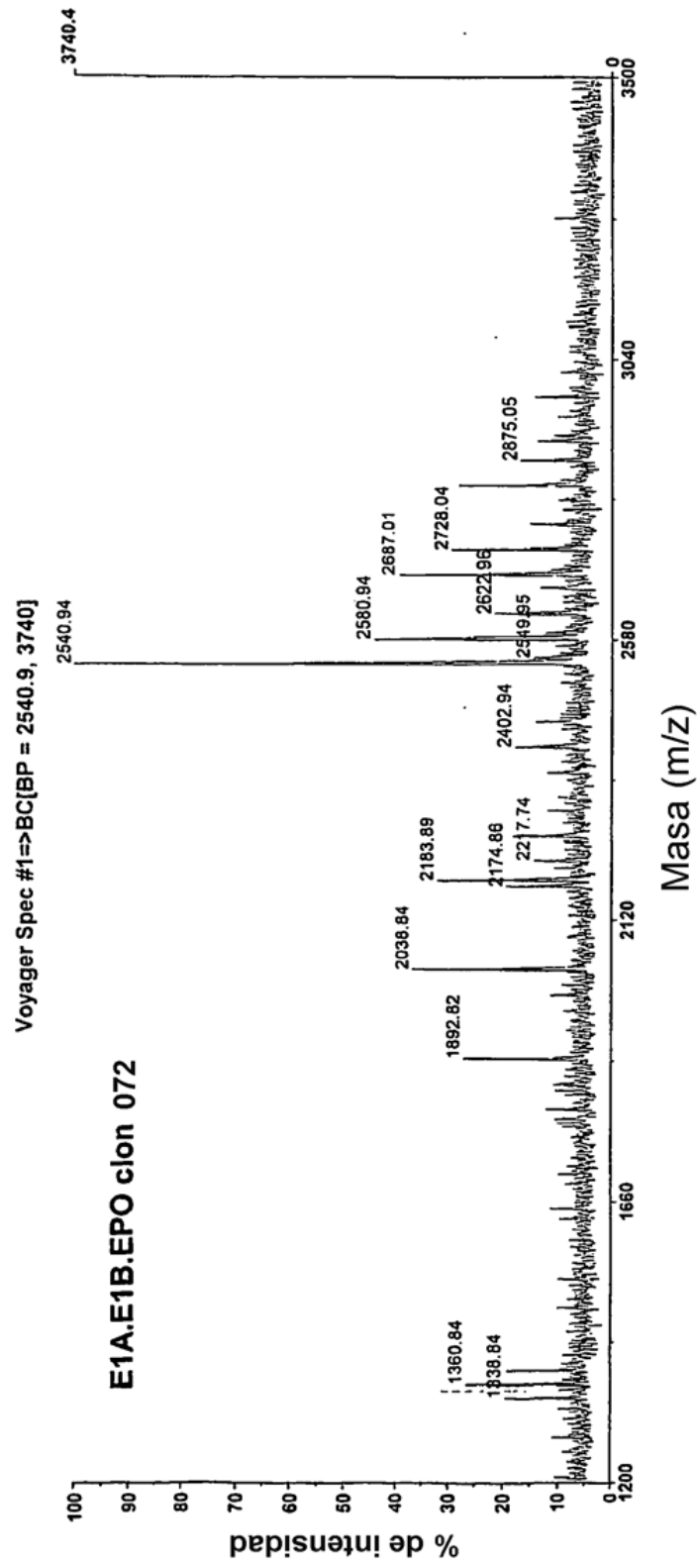


Fig. 13, cont

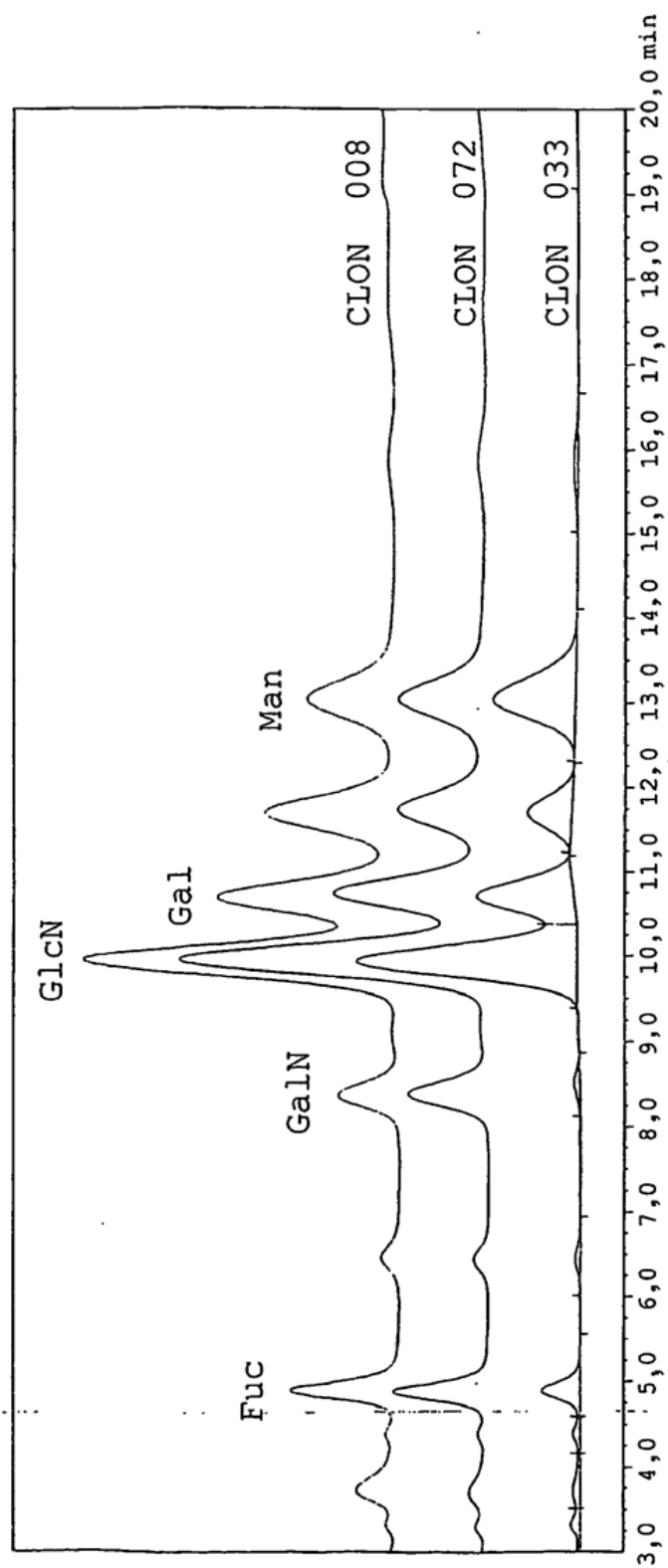


Fig. 14

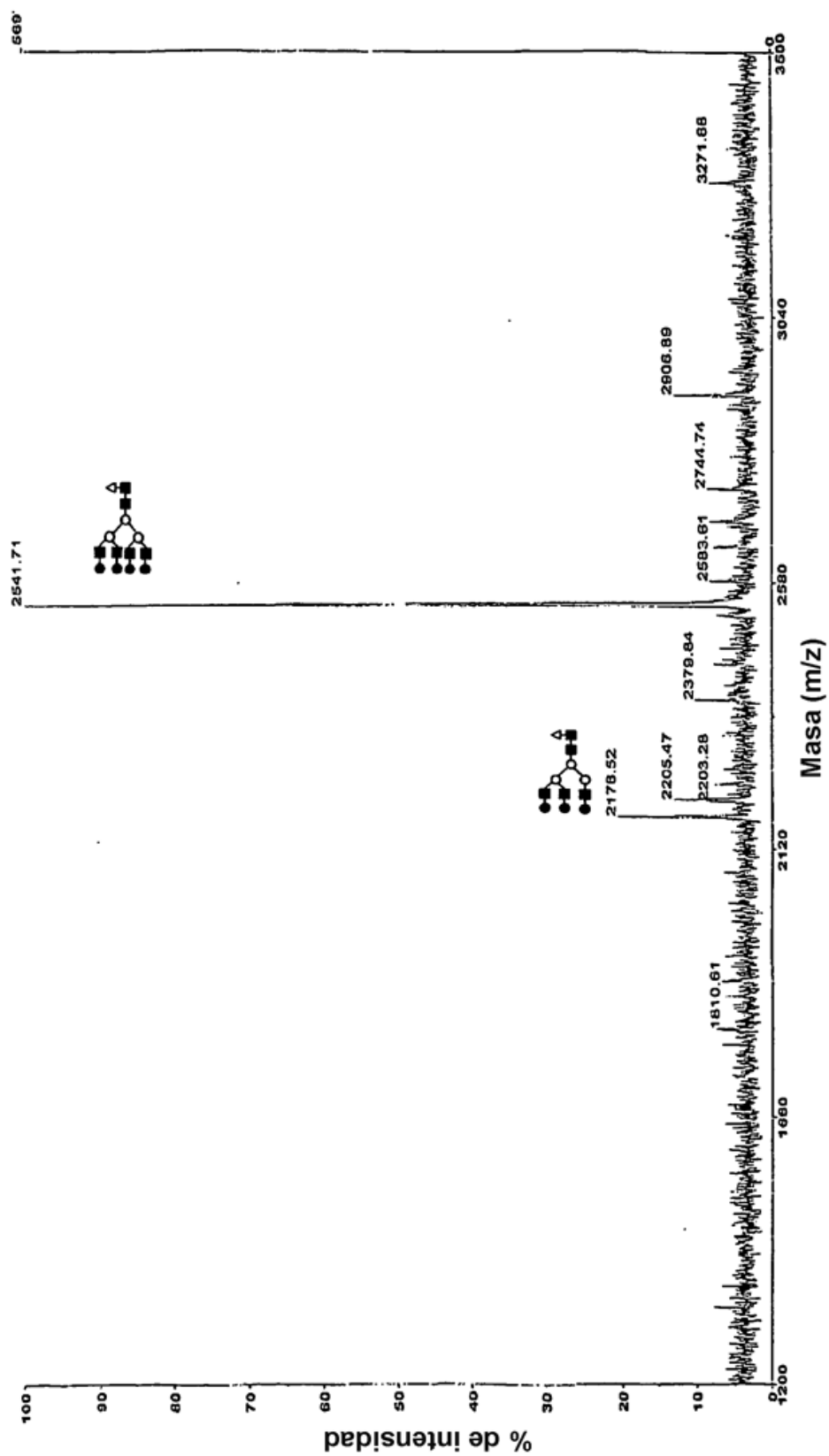


Fig. 15A

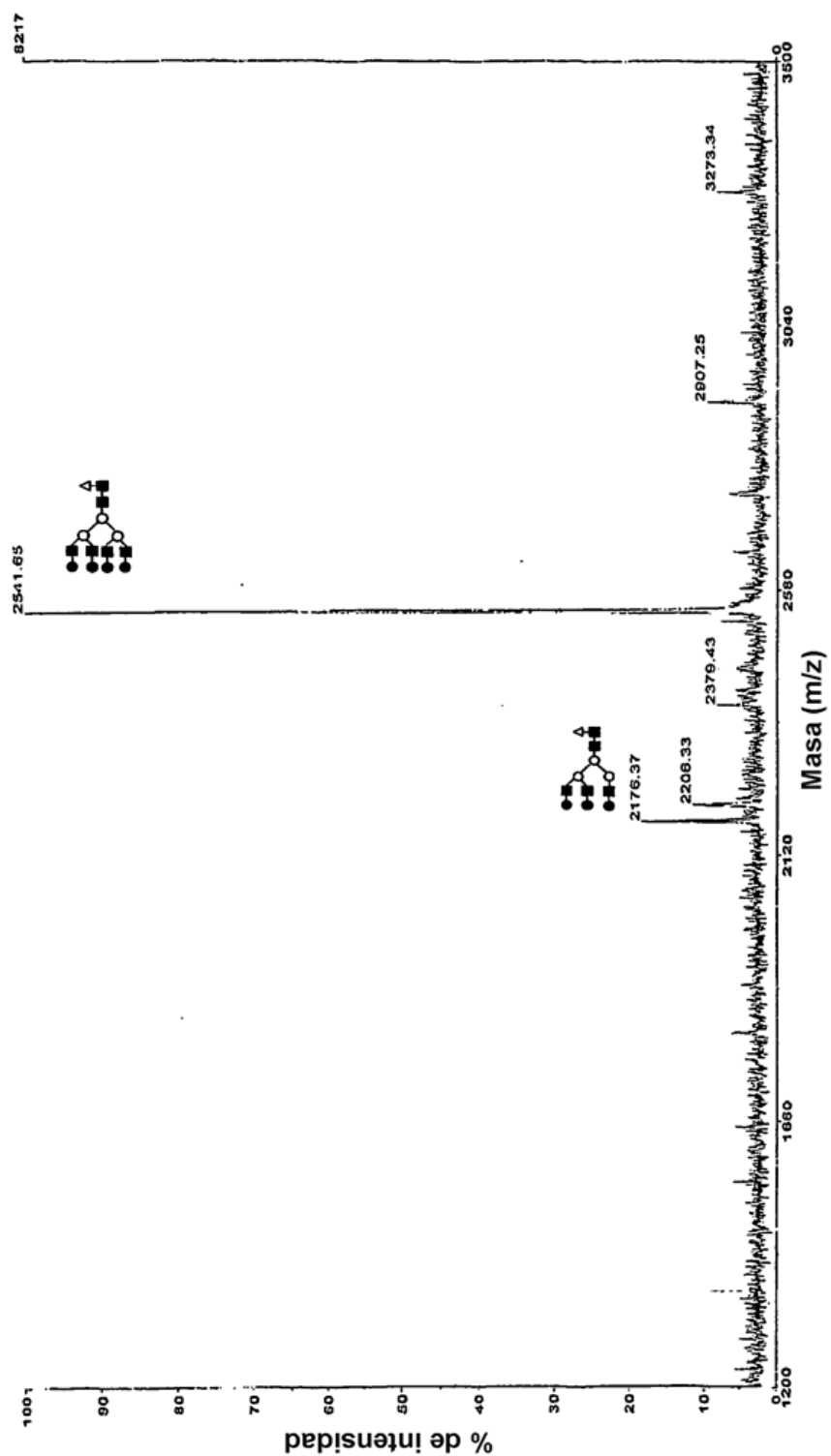


Fig. 15B

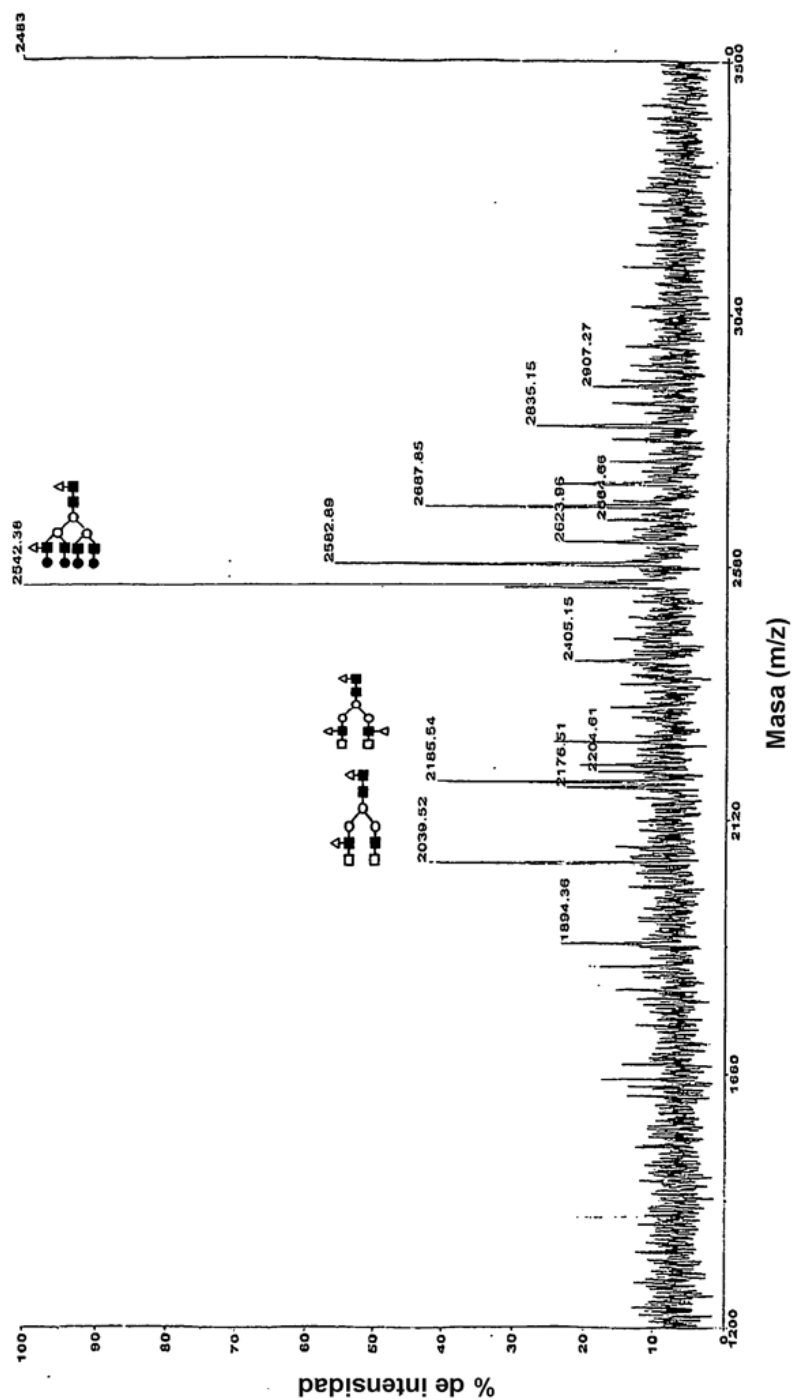


Fig. 15C

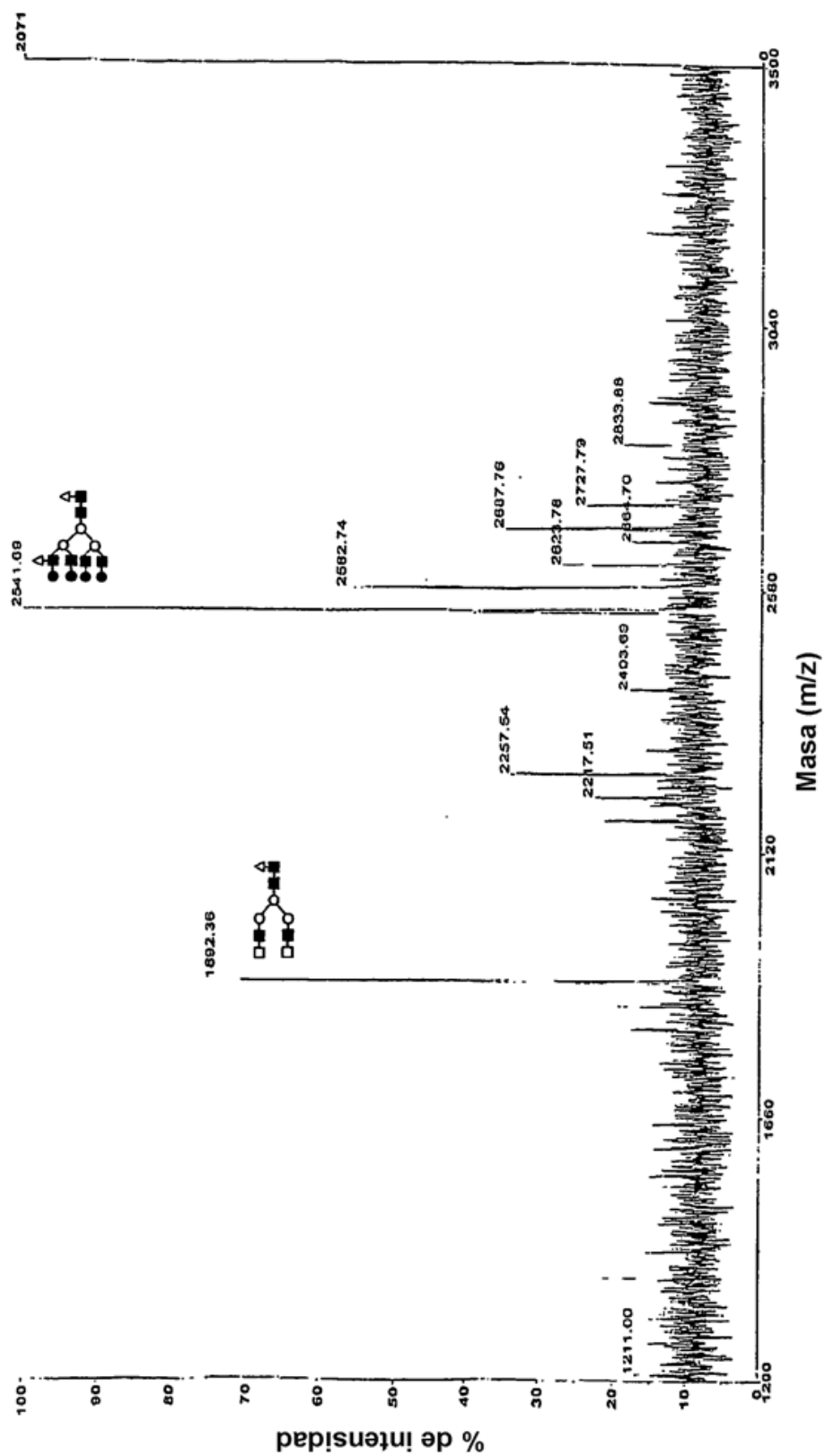


Fig. 15D

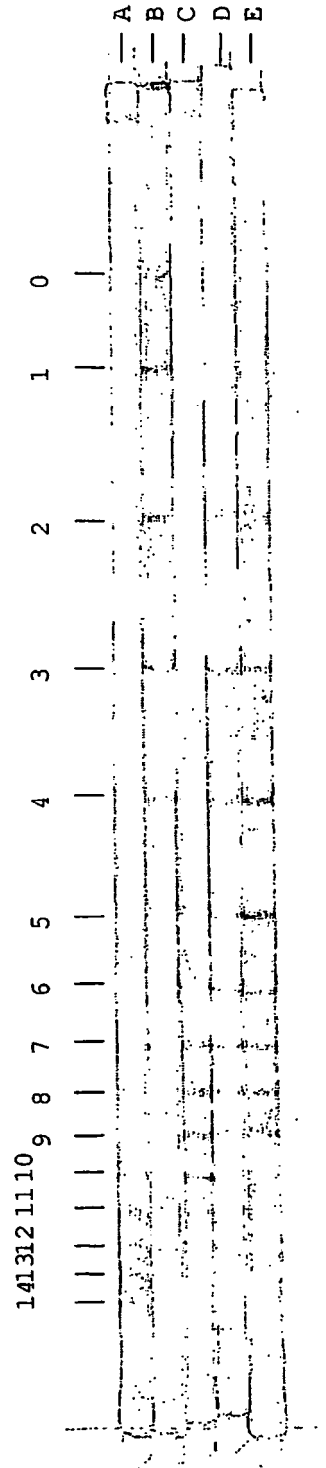


Fig. 16

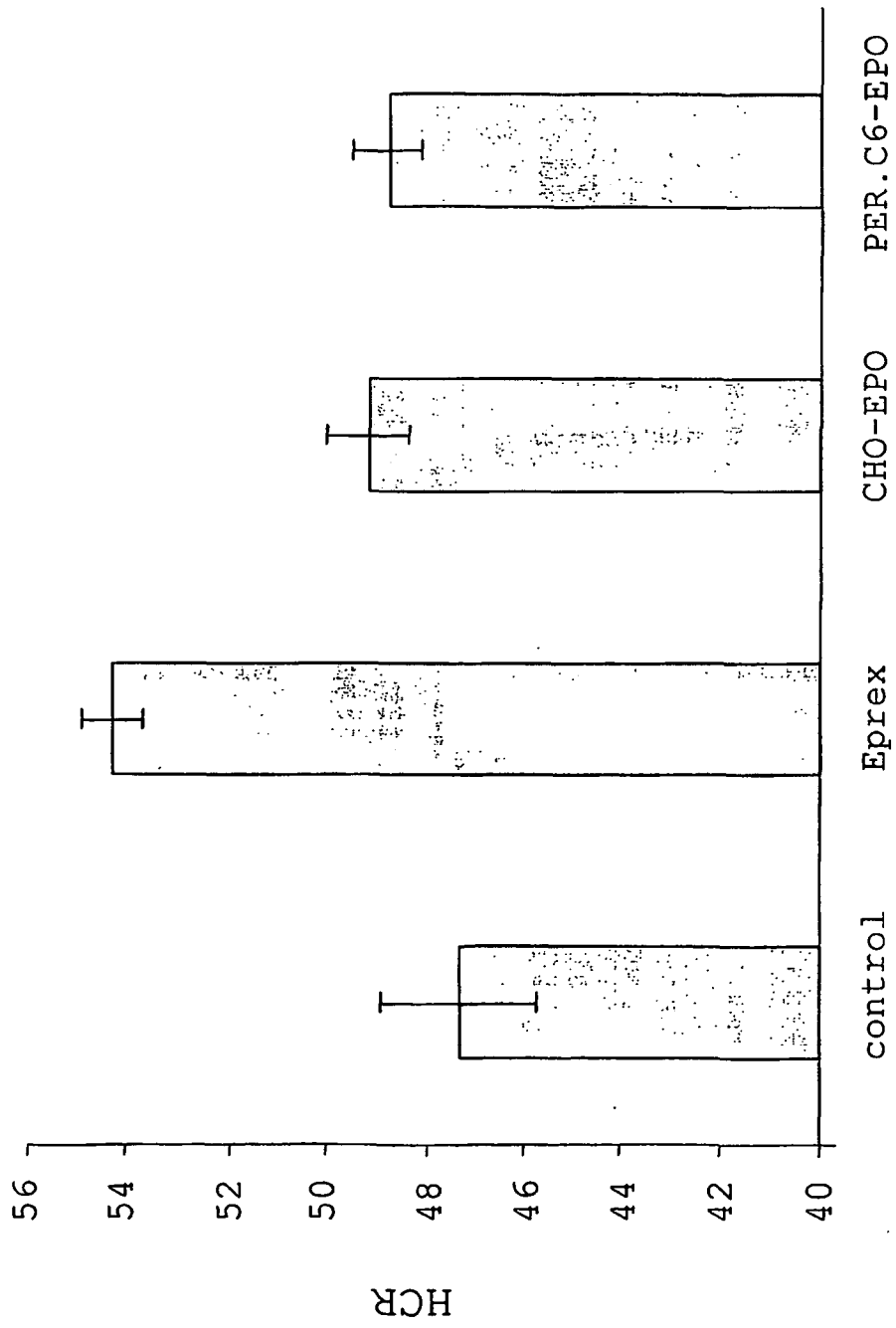


Fig. 17

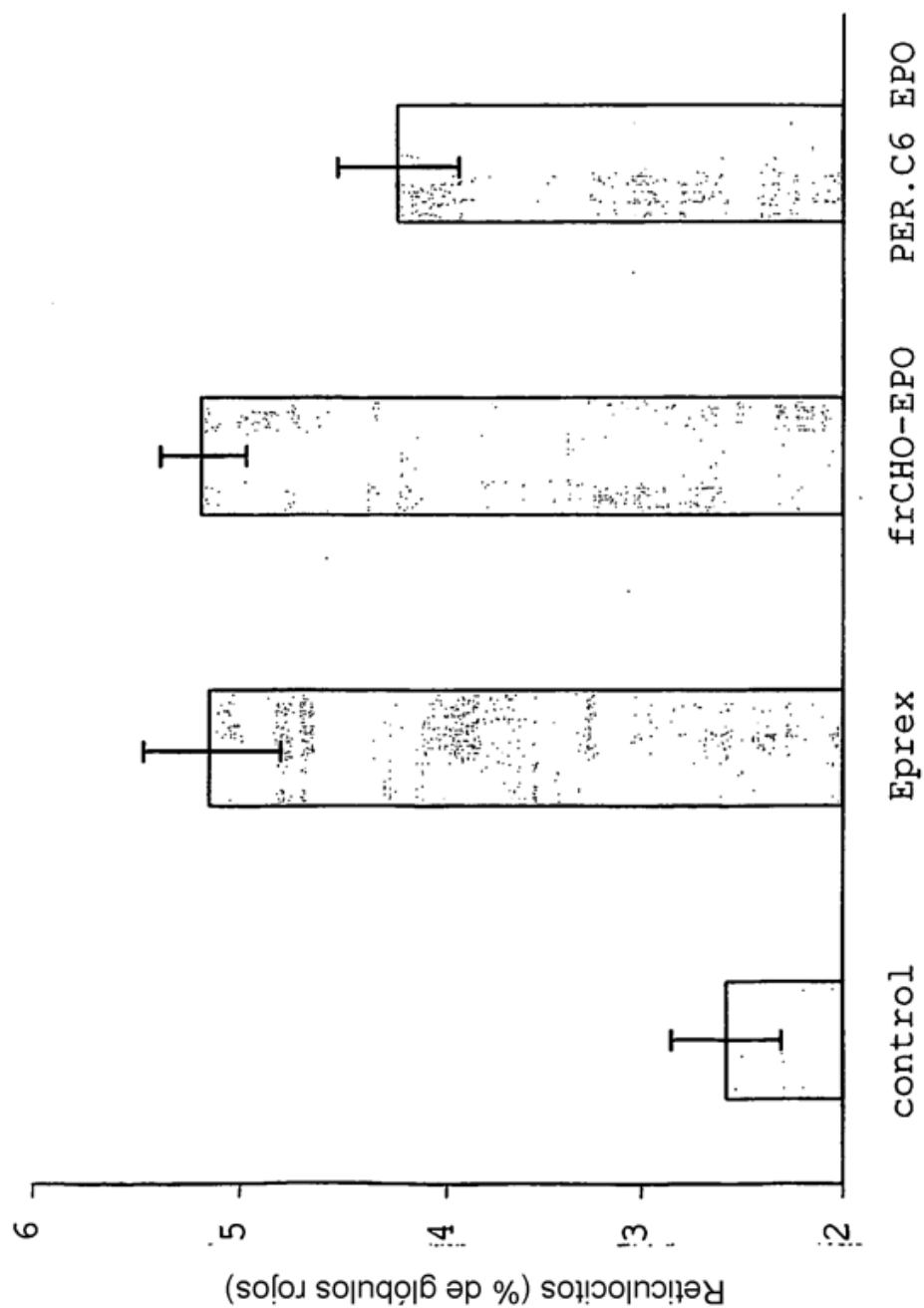


Fig. 18

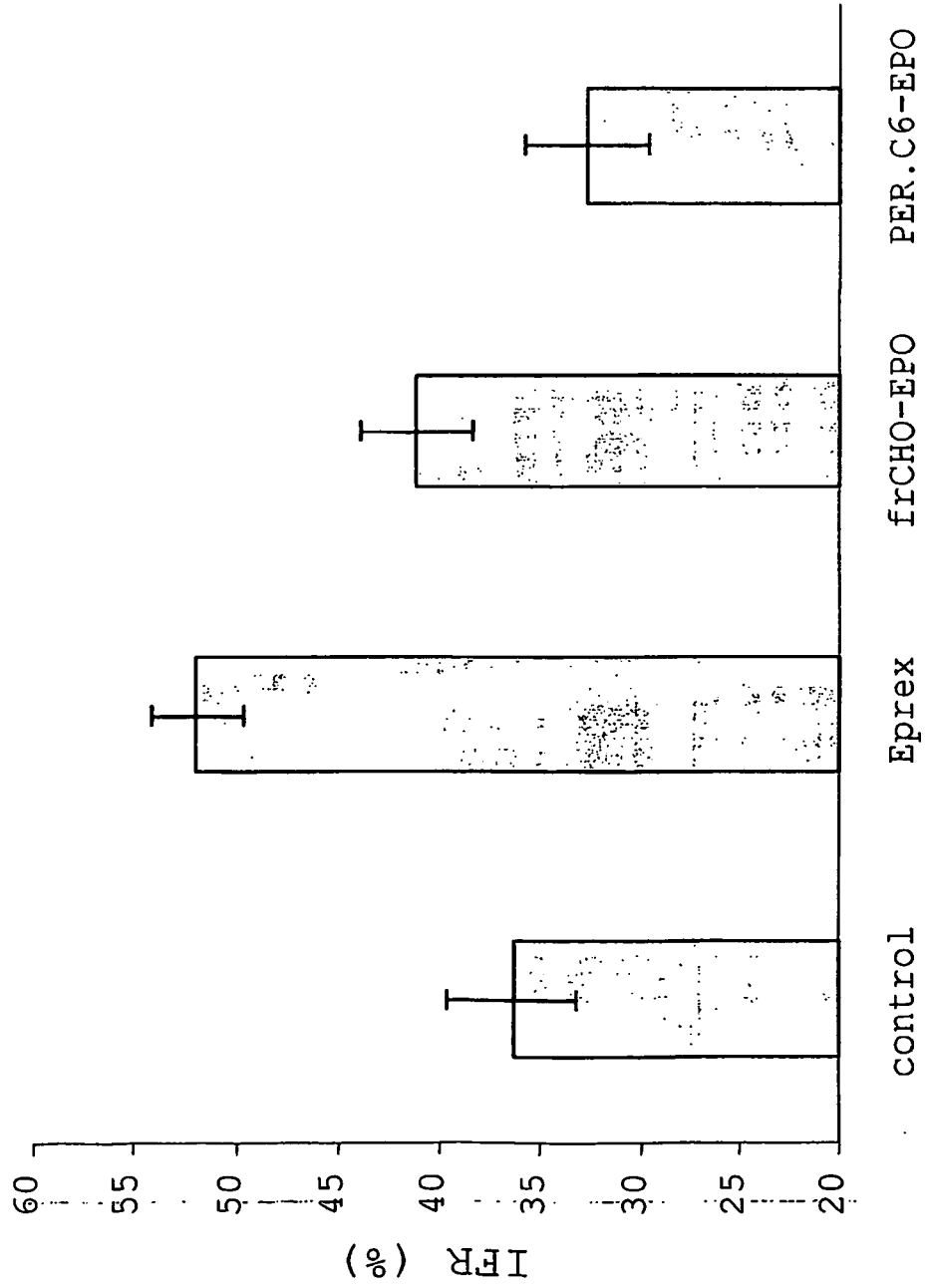


Fig. 19

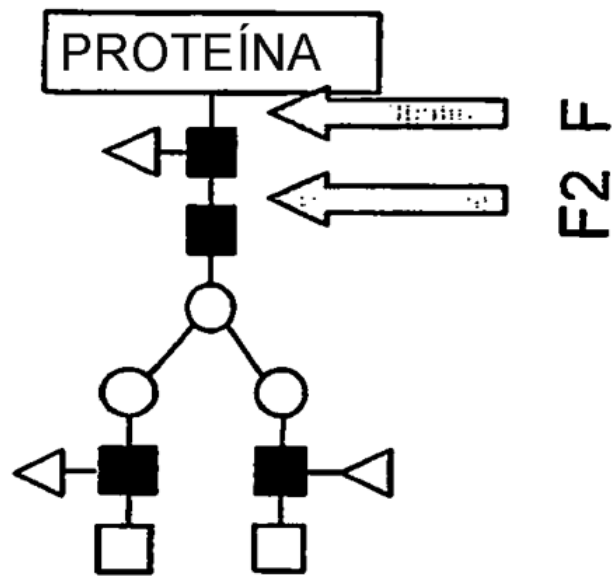


Fig. 20

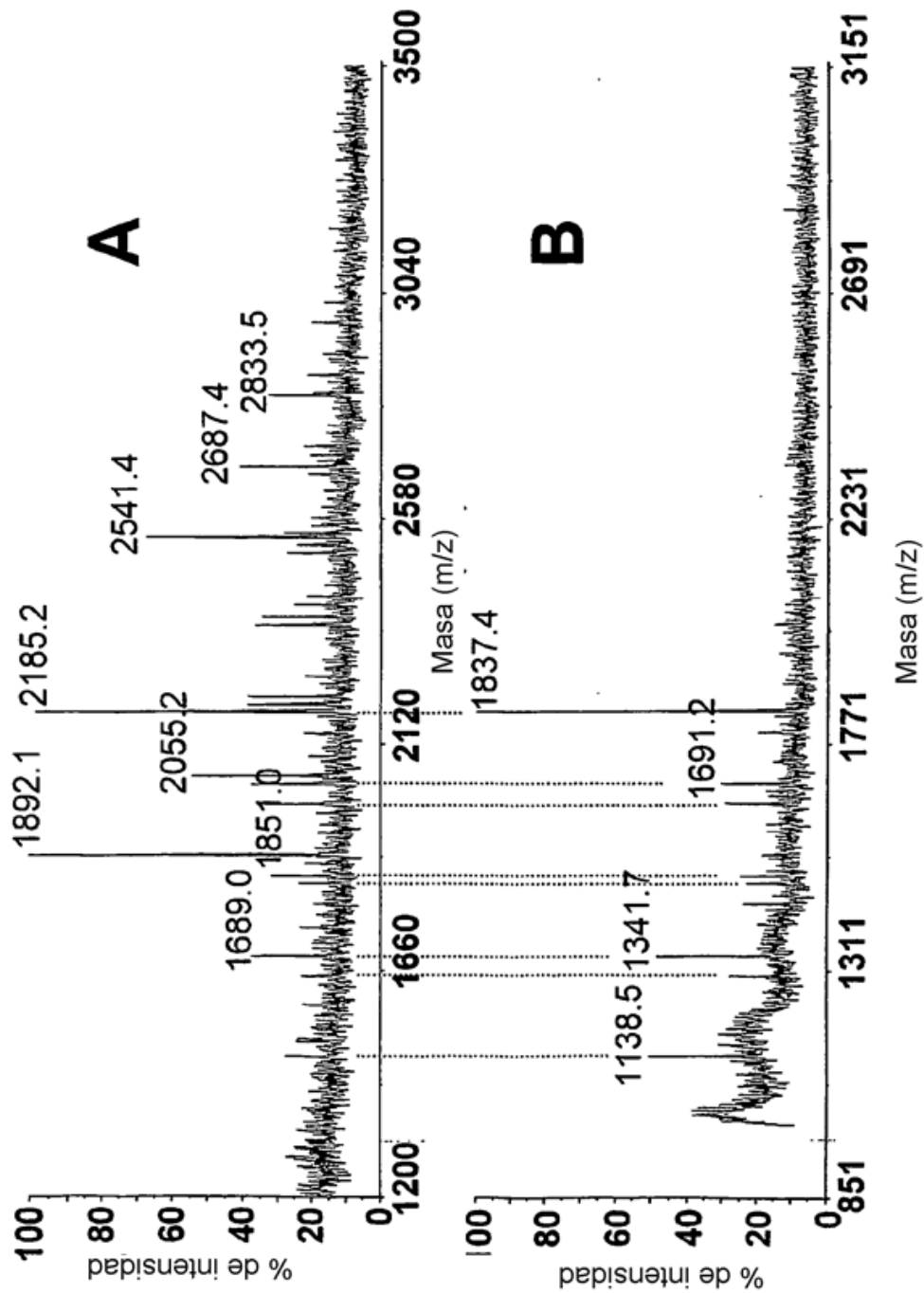


Fig. 21

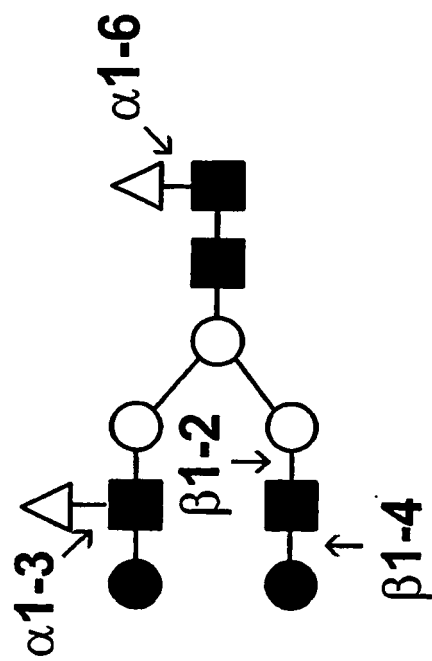


Fig. 22

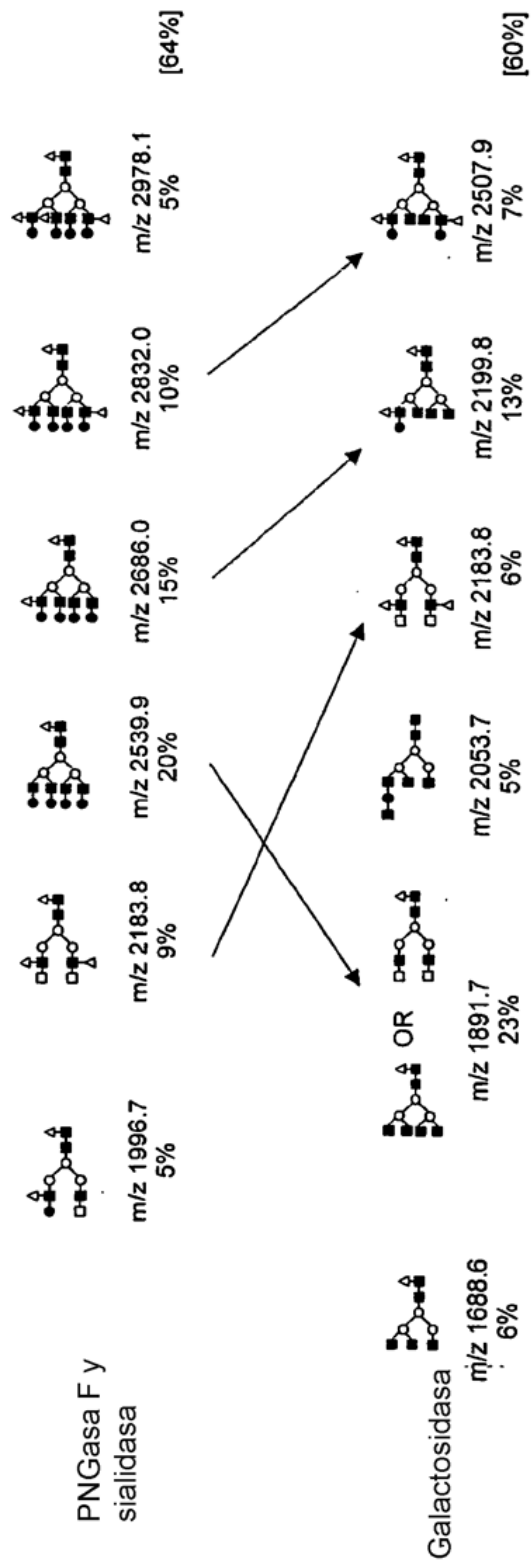


Fig. 23

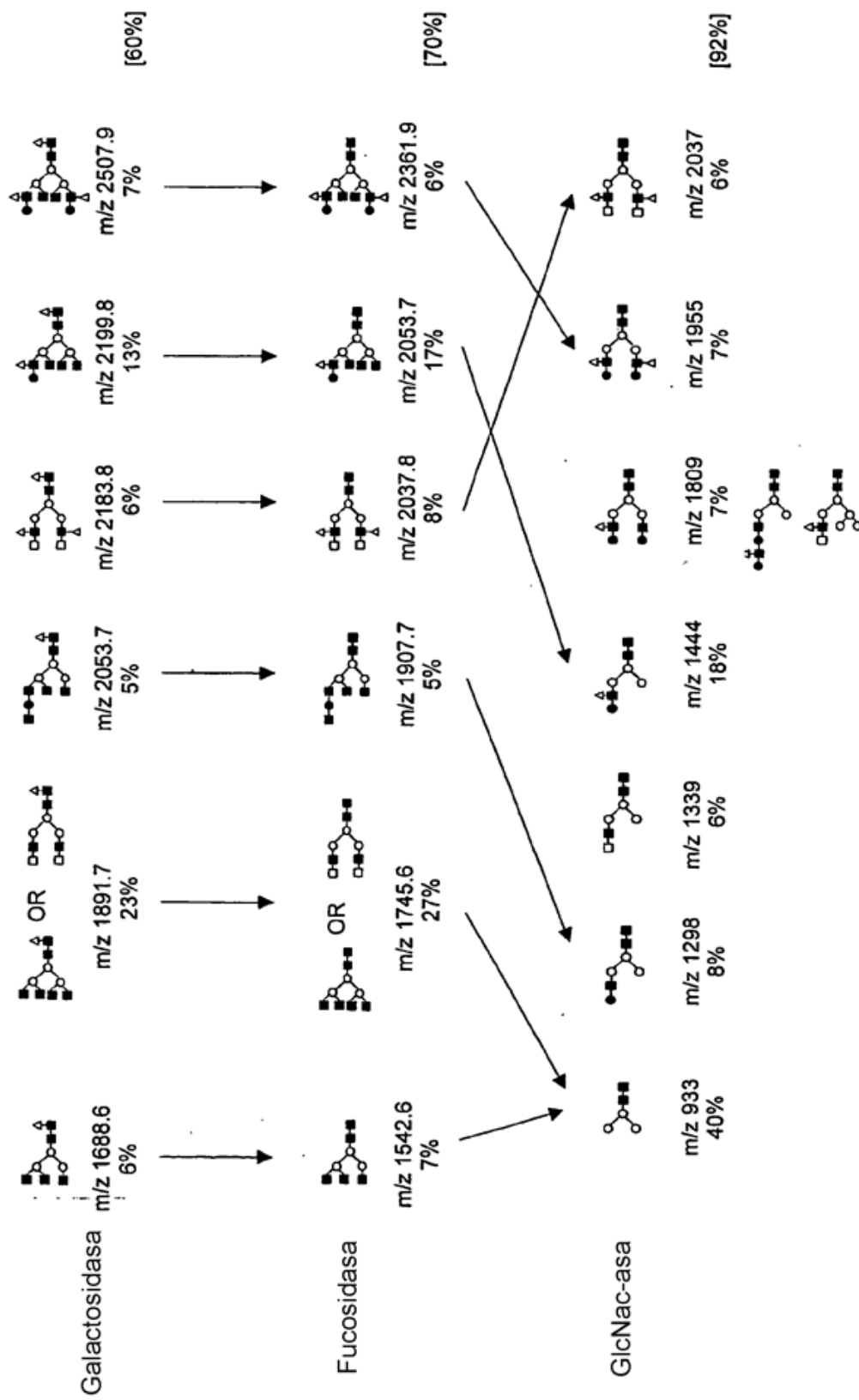


Fig. 24

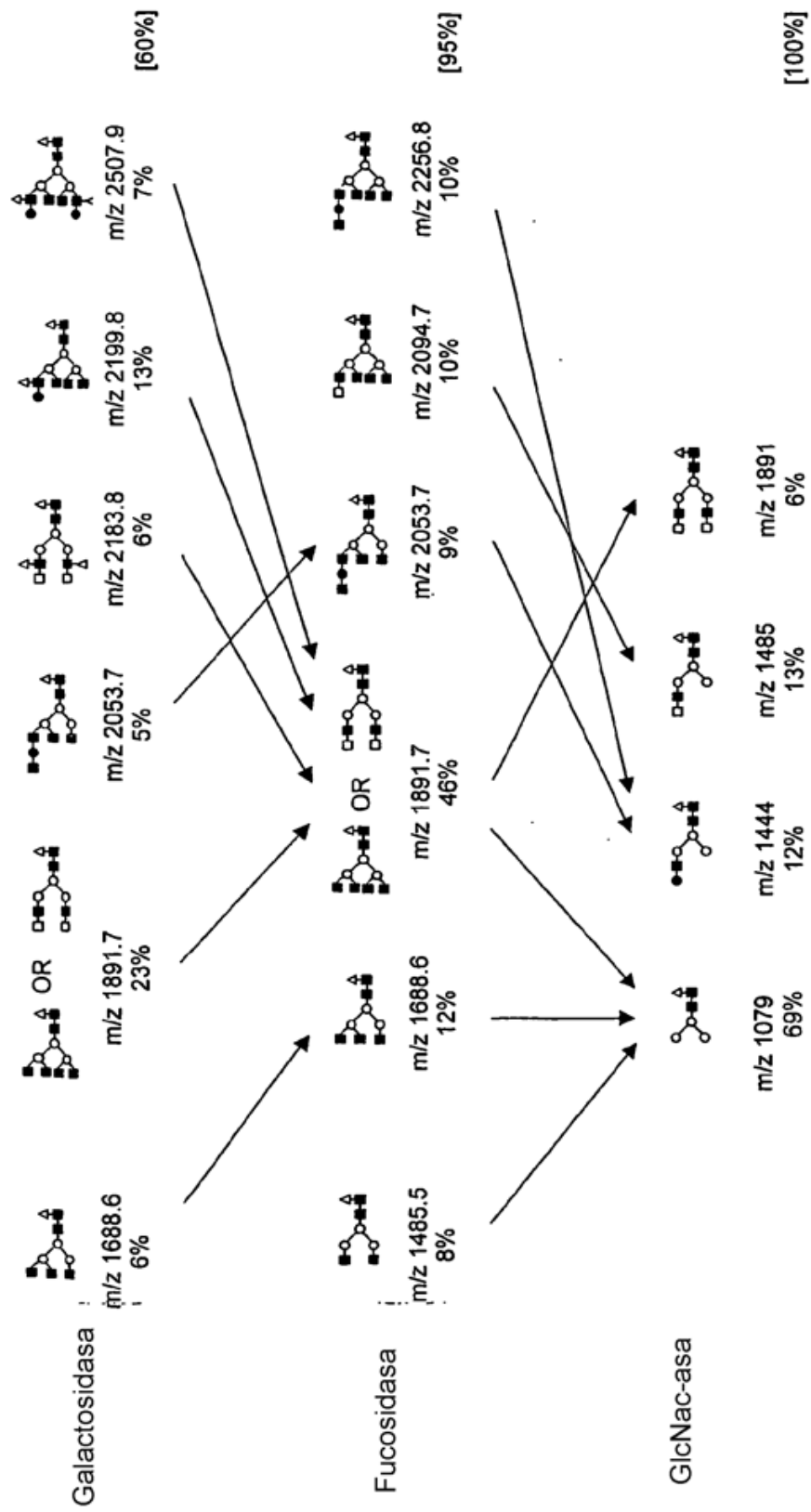


Fig. 25

Fig. 26

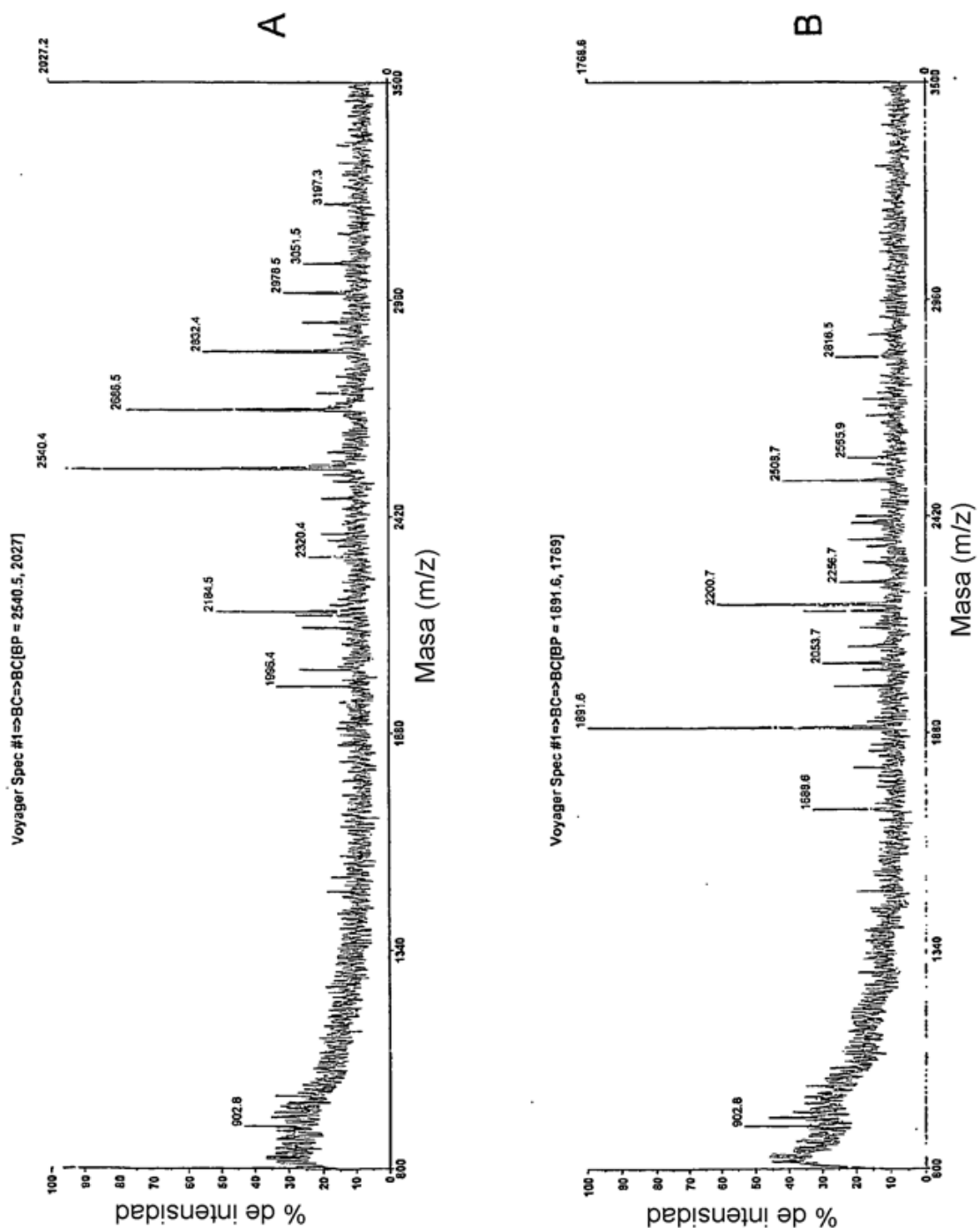


Fig. 26, cont.

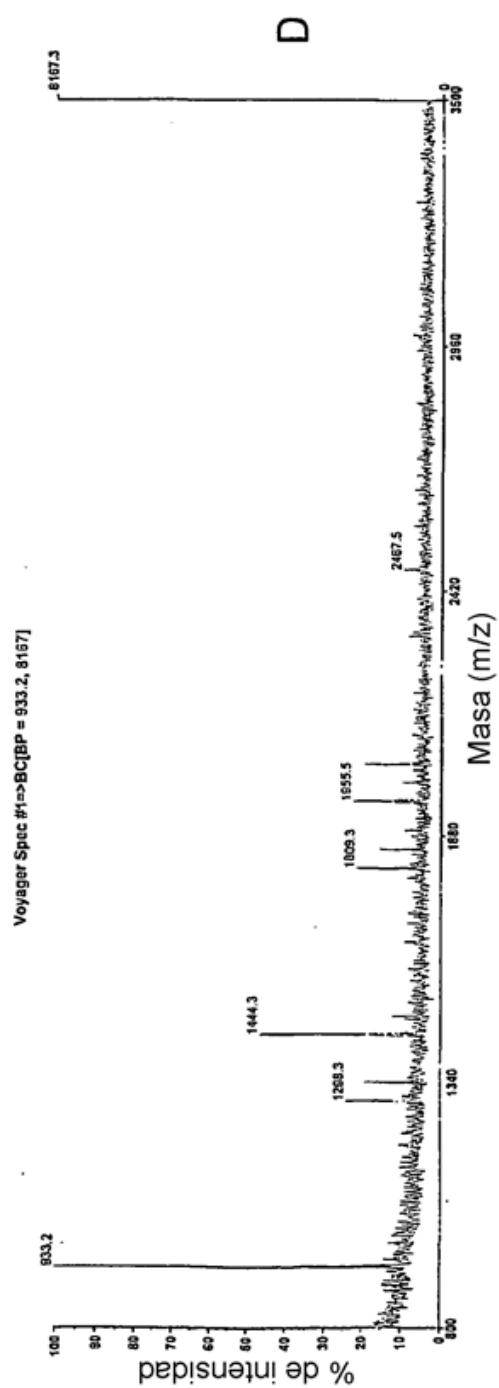
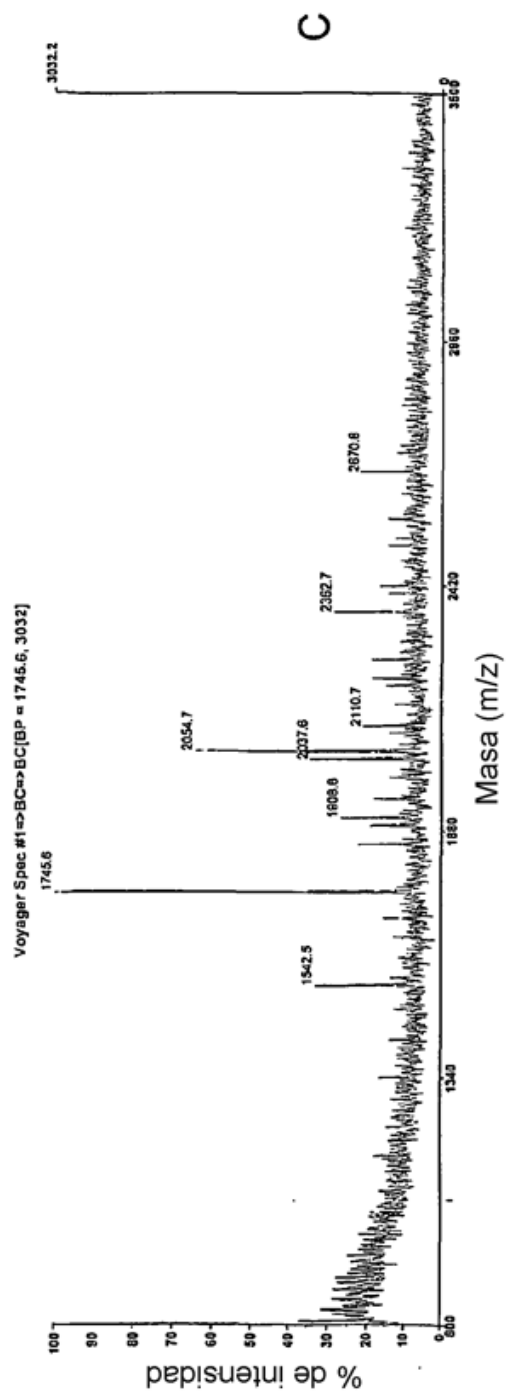


Fig. 26, cont.

