

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 028**

51 Int. Cl.:
C07K 14/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04804204 .8**
96 Fecha de presentación: **22.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1699821**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2006**

54 Título: **Proteína de fusión de Fc-eritropoyetina con farmacocinética mejorada**

30 Prioridad:
31.12.2003 US 533858 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.09.2012

73 Titular/es:
**MERCK PATENT GMBH
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:
**GILLIES, Stephen, D.;
LAUDER, Scott;
MUELLER, Robert;
KRESS, Dorothee y
MAHLER, Hanns-Christian**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 387 028 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteína de fusión de Fc-eritropoyetina con farmacocinética mejorada.

Área de la invención.

5 La presente invención proporciona, en general, novedosas proteínas de fusión altamente sialiladas con farmacocinética mejorada. De manera específica, las proteínas Fc-EPO presentan una vida media en suero prolongada y una potencia in vivo aumentada. Las proteínas de fusión Fc-EPO sintetizadas en células BHK han prolongado su vida media en suero y han aumentado su potencia in vivo de manera espectacular, en comparación con las proteínas de fusión Fc-EPO correspondientes producidas en otras líneas celulares, tales como, por ejemplo, células NS/O. La presente invención hace referencia además a proteínas Fc-EPO, en donde se han realizado una serie de modificaciones en la porción Fc- además de en la porción EPO, a fin de obtener respectivas moléculas con propiedades adicionalmente mejoradas.

Antecedentes.

15 La eritropoyetina es una hormona glicoproteica necesaria para la maduración de células progenitoras en eritrocitos. Se produce en el riñón y es esencial en la regulación de los niveles de glóbulos rojos en la circulación. Las condiciones marcadas por niveles bajos de la señal de oxígeno en los tejidos aumenta la producción de eritropoyetina, lo que a su vez estimula la eritropoyesis. El nivel de eritropoyetina en la circulación es regulado de manera estricta, para asegurar que los glóbulos rojos sean producidos únicamente en respuesta a un déficit de oxígeno prolongado. El 70% de la eritropoyetina se elimina mediante endocitosis mediada por receptor. Cuando la eritropoyetina se une a su receptor, el complejo es endocitado y degradado, limitando de esa forma el grado de señalización. Los restos de eritropoyetina que quedan se eliminan mediante la filtración del riñón por la orina. Como resultado, la eritropoyetina tiene una vida media en suero relativamente corta.

25 La eritropoyetina humana natural o recombinante producida en células de mamíferos contiene tres cadenas de oligosacáridos N-ligadas y una O-ligada. La glicosilación N-ligada tiene lugar en residuos asparagina situados en las posiciones 24, 38 y 83, mientras que la glicosilación O-ligada tiene lugar en un residuo serina situado en la posición 126 (Lai et al., (1986) J. Biol. Chem. 261:3116; Broudy et al., (1988) Arch. Biochem. Biophys. 265:329). Se ha demostrado que las cadenas de oligosacáridos se modifican con residuos terminales de ácido siálico. Las cadenas N-ligadas presentan, de manera habitual, hasta cuatro ácidos siálicos por cadena y las cadenas O-ligadas presentan hasta dos ácidos siálicos. Un polipéptido de eritropoyetina puede, por tanto, alojar un total de hasta 14 ácidos siálicos. Se ha demostrado que se requiere el carbohidrato para la secreción de la eritropoyetina por parte de las células, para aumentar la solubilidad de la eritropoyetina, y para la actividad biológica de la eritropoyetina *in vivo* (Dube et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:17516; DeLorme et al., (1992) Biochemistry 31:9871-9876).

35 La administración de la eritropoyetina humana recombinante ha resultado efectiva en el tratamiento de trastornos o deficiencias hematopoyéticos, tales como, por ejemplo, diferentes formas de anemia, incluyendo aquellas asociadas al fallo renal, a la infección por VIH, la pérdida de sangre y la enfermedad crónica. La eritropoyetina se administra, habitualmente, por inyección intravenosa. Debido a que la eritropoyetina tiene una vida media en suero relativamente corta, se requieren frecuentes inyecciones intravenosas para mantener un nivel de eritropoyetina terapéuticamente efectivo en la circulación. Las composiciones farmacéuticas que contienen eritropoyetina humana natural o recombinante, se administran de manera habitual tres veces por semana en una dosis de aproximadamente 25- 100 Unidades/kg. Esta forma de terapia con eritropoyetina, aunque resulta bastante efectiva, es muy cara e inconveniente ya que la administración intravenosa necesita con frecuencia una visita al doctor o al hospital. En la actualidad, una eritropoyetina humana recombinante hiperglicosilada análoga, la nueva proteína estimuladora de la eritropoyesis (NESP, por sus siglas en inglés), se encuentra disponible bajo la marca comercial Aranesp® (Amgen Inc., Thousand Oaks, California) para el tratamiento de la anemia. Aranesp® puede ser administrada con menor frecuencia que la eritropoyetina habitual para obtener la misma respuesta biológica.

45 Una vía alternativa de administración es la inyección subcutánea. Esta forma de administración puede ser llevada a cabo por los pacientes en casa, y es más compatible con formulaciones de liberación retardada que ofrecen una absorción más lenta desde el sitio de administración, causando por tanto un efecto de liberación controlada. Sin embargo, se alcanzan niveles de circulación considerablemente lentos por la inyección subcutánea y, por tanto, se requieren frecuentes inyecciones para lograr el efecto terapéutico deseado. Más aún, la administración por vía subcutánea de fármacos proteicos resulta, en general, más inmunogénica que la administración por vía intravenosa, ya que la piel, como la mayor barrera a la infección, es un órgano inmune que es rico en células dendríticas y presenta mecanismos sensibles para identificar y responder a abrasiones y a materiales extraños. Casadevall *et al.* ha informado recientemente que pacientes a los que se está administrando eritropoyetina por vía subcutánea desarrollaron anticuerpos anti-eritropoyetina (Casadevall et al. (2002) N Engl. J. Med. 346 (7):469-75).

55 Por consiguiente, existe la necesidad de una terapia con eritropoyetina más eficiente que requiera administraciones menos frecuentes.

Resumen de la invención.

La presente invención proporciona proteínas de fusión de eritropoyetina con farmacocinética mejorada en comparación, en varias realizaciones, con la eritropoyetina natural o de tipo silvestre, con la eritropoyetina recombinante, o con el análogo de la eritropoyetina hiperglicosilada NESP (publicación del PCT WO 00/24893). Por consiguiente, es un objeto de la presente invención simplificar la terapia con eritropoyetina y reducir los costes asociados con el tratamiento para humanos u otros mamíferos con trastornos o deficiencias hematopéyicos u otras indicaciones para la administración de eritropoyetina.

De manera específica, la presente invención proporciona una proteína de fusión biológicamente activa de Fc-eritropoyetina (Fc-EPO) que presenta una vida media en suero prolongada y una potencia *in vivo* aumentada.

“Proteína de fusión Fc-EPO”, tal y como se utiliza en la presente patente, hace referencia a una proteína que comprende un polipéptido con una porción Fc y una porción eritropoyetina. “Porción Fc”, tal y como se utiliza en la presente patente, abarca dominios obtenidos de la región constante de una inmunoglobulina, preferiblemente una inmunoglobulina humana, que incluye un fragmento, análogo, variante, mutante o derivado de la región constante. “Porción eritropoyetina”, tal como se utiliza en la presente patente, abarca eritropoyetina natural o de tipo silvestre de humanos u otras especies, eritropoyetina recombinante, y moléculas similares a la eritropoyetina, incluyendo fragmentos de eritropoyetina biológicamente activos, análogos, variantes, mutantes o derivados de la eritropoyetina.

La presente invención proporciona proteínas Fc-EPO sintetizadas en células BHK. Las proteínas de fusión de Fc-EPO de la invención sintetizadas en células BHK, han demostrado tener vidas medias en suero prolongadas y potencia *in vivo* aumentada en comparación con proteínas de fusión de Fc-EPO correspondientes producidas en otras líneas celulares, tales como, por ejemplo, células NS/0, PerC6, o 293. La presente invención además proporciona una población de proteínas de fusión Fc-EPO altamente sialiladas adecuadas para su administración a un mamífero. Las proteínas de fusión de Fc-EPO altamente sialiladas presentan vidas medias en suero de mayor duración y potencia *in vivo* aumentada en comparación, en varias realizaciones, con eritropoyetina natural o de tipo silvestre, con eritropoyetina recombinante, con el análogo de la eritropoyetina hiperglicosilada NESP, o con las proteínas de fusión Fc-EPO de la misma secuencia de aminoácidos sintetizada en células NS/0, PerC6 o 293. De acuerdo con la presente invención, una proteína de fusión Fc-EPO puede contener modificaciones de los aminoácidos en la porción Fc que, generalmente, extienden la vida media en suero de una proteína de fusión de Fc. Por ejemplo, tales modificaciones de aminoácidos incluyen mutaciones que disminuyen considerablemente o eliminan la actividad de unión al receptor Fc o la fijación de complemento. Además, la proteína de fusión Fc-EPO puede también contener modificaciones de aminoácidos en la porción eritropoyetina que reduzcan la endocitosis de EPO mediada por receptor, o aumenten la actividad biológica de la eritropoyetina. En varias realizaciones, la presente invención combina los beneficios proporcionados por una proteína de fusión de inmunoglobulina, modificaciones de aminoácidos de las porciones Fc y eritropoyetina, y la producción en células BHK (*por ejemplo*, niveles altos de sialilación). Los beneficios combinados presentan efectos aditivos o sinérgicos que dan como resultado una proteína de fusión de Fc-EPO con una vida media en suero sorprendentemente prolongada, y una potencia *in vivo* aumentada.

La célula BHK de la presente invención se encuentra adaptada para su crecimiento en un medio libre de proteínas. Se ha observado que las proteínas de fusión Fc-EPO producidas a partir de células BHK cultivadas en un medio libre de proteínas mostraban una sialilación sorprendentemente aumentada y más homogénea, en comparación con las proteínas de fusión Fc-EPO producidas a partir de células BHK cultivadas en otros medios. El ácido nucleico se mantiene de manera estable en la célula BHK. “Ácido nucleico mantenido de manera estable”, tal y como se utiliza en la presente patente, hace referencia a cualquier ácido nucleico cuya tasa de pérdida de una célula madre a una célula hija sea menor de un tres por ciento en ausencia de presión selectiva, tal como una selección basada en un antibiótico, para mantener el ácido nucleico. Por tanto, cuando las células que mantienen estable el ácido nucleico se dividen, al menos el 97 por ciento (y, más preferentemente, más del 98, más del 99, o más del 99.5 por ciento) de las células resultantes contienen el ácido nucleico. Cuando las células resultantes que contienen el ácido nucleico se dividen, al menos el 97 por ciento de las células resultantes de esa (segunda) división contendrán el ácido nucleico. Más aún, la cantidad de copias por célula del ácido nucleico no se reduce de manera considerable por la repetida división celular. La secuencia del ácido nucleico mantenido de manera estable se integra en un cromosoma de una célula BHK.

La secuencia de ácido nucleico puede codificar la proteína de fusión Fc-EPO en cualquiera de entre varias configuraciones. La secuencia de ácido nucleico codifica una proteína de fusión Fc-EPO que incluye una porción Fc hacia el N-terminal de la proteína de fusión Fc-EPO, y una porción eritropoyetina hacia el C-terminal de la proteína de fusión Fc-EPO. La porción Fc generalmente abarca regiones obtenidas de la región constante de una inmunoglobulina, incluyendo un fragmento, análogo, variante, mutante o derivado de la región constante. La porción Fc se deriva de una cadena pesada de inmunoglobulina humana, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, u otros tipos. La proteína de fusión Fc-EPO no incluye una región variable de una inmunoglobulina. La porción Fc incluye los dominios CH2 y CH3.

La porción Fc contiene una mutación que reduce la afinidad para un receptor Fc o reduce la función efectora de Fc. Por ejemplo, la porción Fc puede contener una mutación que elimina el sitio de glicosilación dentro de la porción Fc de una cadena pesada de la IgG.

5 En algunas realizaciones, la porción Fc contiene un dominio CH2 obtenido de una cadena pesada de la IgG2 humana. De manera preferente, el dominio CH2 contiene una mutación que elimina el sitio de glicosilación dentro del dominio CH2. La mutación modifica la asparagina en la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser dentro del dominio CH2 de la cadena pesada de la IgG2. La mutación modifica tanto la fenilalanina como la asparagina en la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser. La secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser es reemplazada con una secuencia de aminoácidos Gln-Ala-Gln-Ser.

10 La asparagina dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser corresponde a Asn297 de la IgG1. Se ha observado que la mutación de la asparagina en la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser de la IgG2 (*es decir*, la que corresponde a Asn291 de la IgG1) también reduce, de forma sorprendente, la unión de la proteína de fusión Fc-EPO para el receptor de la EPO. Sin la intención de estar sujetos a la teoría, la mutación de la asparagina en la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser de la IgG2 (*es decir*, la que corresponde a Asn297 de la IgG1) puede
15 incluir un cambio conformacional general en la proteína de fusión Fc-EPO, conduciendo a propiedades farmacocinéticas mejoradas de manera espectacular.

La porción Fc incluye un dominio CH2 y al menos una porción de una región bisagra. La región bisagra se deriva de la IgG1 humana. La cisteína en la secuencia de aminoácidos Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys de la región bisagra de la IgG1 se modifica. En particular, la secuencia de aminoácidos Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys se reemplaza con una
20 secuencia de aminoácidos Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Lys. El dominio CH2 se deriva de una cadena pesada de IgG2 humana, mientras que la región bisagra se deriva a partir de una cadena pesada de IgG1 humana modificada.

De acuerdo a la presente invención, la porción Fc se deriva de una secuencia de IgG en la cual la secuencia de aminoácidos Leu-Ser-Leu-Ser cerca del C-terminal de la región constante se modifica para eliminar epítomos de unión de linfocitos T potenciales. En particular, la secuencia de aminoácidos Leu-Ser-Leu-Ser es reemplazada con la
25 secuencia de aminoácidos Ala-Thr-Ala-Thr. Además, la porción Fc se deriva de una secuencia de IgG en la que el residuo lisina C-terminal es reemplazado. En particular, la lisina C-terminal de una secuencia de IgG es reemplazada con un aminoácido que no sea lisina, tal como la alanina, para aumentar más aún la vida media en suero de la proteína de fusión de Fc.

Las combinaciones de mutaciones en la porción Fc, generalmente presentan efectos aditivos o sinérgicos en la vida media en suero prolongada y en la potencia *in vivo* aumentada de la proteína de fusión Fc-EPO. Por tanto, en particular, la porción Fc contiene (i) una región derivada de una secuencia de IgG en la cual la secuencia de aminoácidos Lys-Ser-Lys-Ser es reemplazada con la secuencia de aminoácidos Ala-Thr-Ala-Thr; (ii) un residuo alanina C-terminal en lugar de lisina; (iii) un dominio CH2 y una región bisagra que se derivan a partir de diferentes isotipos de anticuerpos, por ejemplo, un dominio CH2 de la IgG2 y una región bisagra de IgG1 modificada; (iv) una
35 mutación que elimina el sitio de glicosilación dentro del dominio CH2 derivado de la IgG2, que es, una secuencia de aminoácidos Gln-Ala-Gln-Ser en lugar de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser dentro de el dominio CH2 derivado de la IgG2.

La porción eritropoyetina de la proteína de fusión Fc-EPO puede ser una eritropoyetina completa de tipo silvestre o natural, una eritropoyetina recombinante, una molécula similar a la eritropoyetina, tal como un fragmento de eritropoyetina biológicamente activo, un análogo, variante, mutante o derivado de la eritropoyetina. De manera preferente, la porción eritropoyetina se deriva a partir de una eritropoyetina humana. En algunas realizaciones, la porción eritropoyetina puede contener modificaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de unión para el receptor de la EPO o aumentan la actividad biológica de la eritropoyetina. En particular, la porción eritropoyetina contiene además las siguientes sustituciones His₃₂→ Gly, Cys₃₃→ Pro, and Pro₉₀→ Ala.
40

45 La proteína de fusión Fc-EPO puede incluir un conector entre la porción Fc y la porción eritropoyetina. Si se incluye, el conector generalmente contiene entre 1 y 25 aminoácidos y, de manera preferente, no presenta sitio de corte para la proteasa. El conector puede contener un sitio de glicosilación O-ligado o N-ligado para bloquear la proteólisis. Por ejemplo, el conector puede contener una secuencia de aminoácidos Asn-Ala-Thr.

La presente invención además hace referencia a un método para producir una proteína de fusión Fc-EPO. EL método incluye mantener las células BHK conteniendo una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión Fc-EPO, bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión Fc-EPO codificada, y recuperar la proteína de fusión Fc-EPO expresada.
50

Las células BHK se cultivan en un medio libre de proteínas. En general, la proteína de fusión Fc-EPO producida en las células BHK presentan una vida media en suero de mayor duración que una proteína de fusión Fc-EPO correspondiente producida en otras líneas celulares, tales como, por ejemplo, células NS/0, PerC6, o 293.
55

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene la proteína de fusión Fc-EPO producida en células BHK. La proteína de fusión Fc-EPO utilizada en la composición farmacéutica no ha sido tratada para eliminar residuos de ácido siálico. La composición farmacéutica también incluye un soporte farmacéuticamente

aceptable. La presente invención proporciona, además, un método para el tratamiento de un mamífero mediante la administración de la composición farmacéutica a dicho mamífero. En algunas realizaciones, el mamífero tratado presenta un trastorno o deficiencia hematopoyéticos. Debido a que las proteínas de fusión Fc-EPO de la presente invención han aumentado la potencia *in vivo* y prolongado la vida media en suero, las composiciones farmacéuticas que contienen dichas proteínas de fusión Fc-EPO, en general, requieren una administración menos frecuente en comparación con composiciones farmacéuticas que contienen eritropoyetina natural o recombinante o correspondientes proteínas de fusión Fc-EPO producidas en otras células. En un modo de realización preferente, la composición farmacéutica es administrada menos de tres veces por semana (*por ejemplo*, dos veces por semana, una vez por semana, o no más de una vez cada diez días, tal como por ejemplo una vez cada dos semanas, una vez al mes o una vez cada dos meses).

En otro aspecto, la presente invención proporciona una población de proteínas de fusión Fc-EPO purificadas adecuadas para su administración en mamíferos. De acuerdo a la invención, las proteínas de fusión Fc-EPO incluyen una porción Fc hacia el N-terminal de las proteínas de fusión Fc-EPO y una porción eritropoyetina hacia el C-terminal de las proteínas de fusión Fc-EPO. De acuerdo a la invención, las proteínas Fc-EPO purificadas se sintetizan en una célula BHK. La célula BHK se adapta para su crecimiento en un medio libre de proteínas. La población de proteínas de fusión Fc-EPO purificadas altamente sialiladas, proporcionadas mediante la presente invención, presenta una vida media en suero de mayor duración en comparación con la población de proteínas de fusión Fc-EPO correspondientes producidas en células tales como, por ejemplo, células NS/0, PerC6, o 293. De acuerdo con la presente invención, la porción Fc y la porción eritropoyetina de las proteínas de fusión Fc-EPO purificadas pueden contener una o más mutaciones o modificaciones, tal como se ha descrito en la presente patente, proporcionando una vida media en suero prolongada y una potencia *in vivo* aumentada con efectos que son aditivos o sinérgicos con la sialilación aumentada.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que contiene una población de proteínas de fusión Fc-EPO purificadas altamente sialiladas, tal como se ha descrito en la presente patente. Una composición farmacéutica preferida incluye además un soporte farmacéuticamente aceptable. La presente invención proporciona además un método para el tratamiento de mamíferos que incluye la administración al mamífero de la composición farmacéutica que contiene la población altamente sialilada de proteínas de fusión Fc-EPO purificadas. En un modo de realización preferente, la composición farmacéutica es administrada menos de tres veces por semana (*por ejemplo*, dos veces por semana, una vez en semana, o no más de una vez cada diez días, tal como una vez cada dos semanas, una vez al mes o una vez cada dos meses).

• En resumen, la presente invención hace referencia a los siguientes contenidos:

Una proteína de fusión dimérica purificada, que consiste esencialmente en una porción Fc dimérica de la molécula de la IgG humana que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y CH3, y una eritropoyetina humana (EPO), en donde cada cadena de la porción Fc dimérica está ligada a través de su C-terminal directamente, o a través de un péptido conector, al N-terminal de una molécula de EPO, donde dicha proteína de fusión presenta las siguientes propiedades: (i) la molécula se encuentra altamente sialilada al comprender 15-28 residuos de ácido siálico; (ii) el dominio CH2 se deriva de la IgG2 humana y se modifica reemplazando los residuos de aminoácidos Phe y Asn dentro de la formación de secuencia Gln-Phe-Asn-Ser del dominio CH2 con Ala y Asn, formando por tanto la secuencia Gln-Ala-Gln-Ser dentro del dominio CH2, y (iii) la formación de secuencia de aminoácidos Leu-Ser-Leu-Ser cerca del C-terminal del dominio CH3 se reemplaza con Ala-Thr-Ala-Thr.

• Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica respectiva, en donde, de manera adicional, el residuo Lys C-terminal del dominio CH3 es reemplazado con Ala.

• Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica respectiva, en donde la región bisagra se deriva de la IgG1 humana.

• Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica respectiva, en donde dicha región bisagra de la IgG1 se modifica reemplazando el residuo aminoácido Cys dentro de la formación de secuencia Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys de la región bisagra con un residuo Ser, formando por tanto la secuencia Pro-Lys-Ser-Ser-Asp-Lys dentro de la región bisagra.

• Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica respectiva, en donde un residuo aminoácido que no sea Cys se encuentra en una posición 33 de la molécula EPO en lugar del residuo Cys original, y un residuo Cys se encuentra en la posición 88 de la molécula de EPO en lugar del residuo Trp original, permitiendo de esta forma que la porción EPO dentro de la proteína de fusión forme un enlace disulfuro Cys₂₉ – Cys₈₈.

• Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica respectiva, en donde el residuo aminoácido distinto de Cys en la posición 33 es Pro.

• Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica respectiva, en donde el sitio de glicosilación comprende una secuencia de aminoácidos Asn-Ala-Thr.

• Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica respectiva, que comprende de manera adicional un dominio CH1.

- Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica respectiva, en donde la molécula completa de IgG, incluyendo el dominio CH2, CH3 y de manera opcional CH1 se deriva de la IgG2 y la región bisagra se deriva de la IgG1.

- Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica respectiva, en donde la molécula completa de la IgG, incluyendo CH2, CH3 y la región bisagra, y de manera opcional CH1, se deriva de la IgG1.

5 • Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica que comprende la secuencia:

**EPKSSDKTHTCPPCPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGD
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSATATPGAAPPRLICDSRVLERYLL
EAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQA
LLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKL
FRVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:14).**

- Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica que comprende la secuencia:

**EPKSSDKTHTCPPCPAPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGD
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSATATPGAAPPRLICDSRVLERYLL
EAKEAENITTGCAEGPSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQA
LLVNSSQPCEALQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKL
FRVYSNFLRGKLLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:15).**

10 • Una población correspondiente de proteínas de fusión Fc-EPO purificadas, en donde la célula BHK es adaptada para su crecimiento en un medio libre de proteínas.

Breve descripción de los dibujos.

Las Figuras 1A y 1B representan un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de la IgG1, IgG2 y la IgG4 humanas.

15 La Figura 2 representa un experimento de farmacocinética en ratones que muestra una correlación entre la dosis de Fc-EPO y el valor de disminución en las concentraciones de Fc-EPO en suero durante la fase alfa. En este experimento se utilizó una variante de Fc-EPO sub-sialilada sintetizada en células NS/0.

La Figura 3 representa vías potenciales de eliminación de las proteínas de fusión Fc-EPO y modificaciones de la proteína de fusión que modulan potencialmente estas vías.

20 La Figura 4 representa respuestas de hematocrito, a modo de ejemplo, en ratones después de la administración de Fcg2h(FN>AQ)-EPO.

La Figura 5 representa respuestas de hematocrito, a modo de ejemplo, en ratas después de la administración de las proteínas Fcg2h-EPO, Fcg2h-EPO(NDS), Fcg4h-EPO, y Fcg4h(N>Q)-EPO producidas a partir de células BHK.

25 La Figura 6 representa respuestas de hematocrito, a modo de ejemplo, en ratones después de la administración de Fcg2h-EPO(NDS) producida a partir de células BHK, Fcg2h-EPO(NDS) producida a partir de células NS/0, y NESP (es decir, Aranesp®).

La Figura 7 representa una secuencia de ácido nucleico, a modo de ejemplo, que codifica una proteína Fc-EPO madura.

La Figura 8 representa perfiles farmacocinéticos de Fcg2h(N>Q)-EPO producida a partir de células BHK y Fcg2h(N>Q)-EPO producida a partir de células NS/0 en ratones.

La Figura 9 representa perfiles farmacocinéticos de Fcg2h-EPO(NDS) producido a partir de células BHK y Fcg2h-EPO(NDS) producida a partir de células NS/0 en ratones.

La Figura 10 representa perfiles farmacocinéticos de proteínas Fcg2h-EPO(NDS) producidas en células BHK-21, células PERC6, y células 293 en ratones.

- 5 La Figura 11 representa respuestas de hematocrito en perros Beagle después del tratamiento con proteínas Fcg2h(FN→AQ)-EPO sintetizadas en células BHK.

Descripción detallada de la invención.

10 La presente invención proporciona una proteína de fusión Fc-EPO con farmacocinética mejorada. De manera específica, la proteína Fc-EPO proporcionada por la presente invención presenta una vida media en suero prolongada y una potencia *in vivo* aumentada. La presente invención proporciona una proteína de fusión Fc-EPO sintetizada en células BHK. Las proteínas de fusión Fc-EPO sintetizadas en células BHK han demostrado tener vidas medias en suero prolongadas de forma espectacular y potencia *in vivo* aumentada, en comparación con proteínas Fc-EPO correspondientes producidas en otras líneas celulares, tales como, por ejemplo, células NS/0, PerC6, o 293. En otro aspecto, la presente invención proporciona una población de proteínas de fusión Fc-EPO altamente sialiladas. La población de proteínas de fusión Fc-EPO altamente sialiladas presenta una vida media en suero de mayor duración en comparación con una población de proteínas de fusión Fc-EPO correspondientes con niveles más bajos de sialilación. De acuerdo con la presente invención, una proteína de fusión Fc-EPO puede contener modificaciones de aminoácidos en la porción Fc que extiende la vida media en suero de una proteína de fusión de Fc, de una manera tal como, por ejemplo, mediante la considerable disminución o eliminación de la actividad de unión al receptor Fc, o mediante modificaciones que reducen la actividad de fijación de complemento. Además, la proteína de fusión Fc-EPO puede además contener modificaciones de aminoácidos en la porción eritropoyetina que reducen la endocitosis de la EPO mediada por receptor o aumenta la actividad biológica de la eritropoyetina.

Proteína de fusión Fc-EPO.

25 “Proteína de fusión Fc-EPO”, tal y como se utiliza en la presente patente hace referencia a una proteína que comprende un polipéptido que tiene al menos dos porciones, concretamente, una porción Fc y una porción eritropoyetina, que se encuentran habitualmente presente en el mismo polipéptido. En modos de realización preferentes de la presente invención, los polipéptidos que tienen una porción Fc y una porción eritropoyetina forman homodímeros; por consiguiente, una proteína de fusión Fc-EPO es por lo general una proteína dimerica que se mantiene unida mediante uno o más enlaces disulfuro, donde cada cadena de polipéptidos contiene una porción Fc y una porción eritropoyetina. Sin embargo, una proteína de fusión Fc-EPO de la presente invención puede presentar cualquier configuración que permita que las porciones eritropoyetina se asocien de manera estable con porciones Fc mientras que mantienen la actividad de la eritropoyetina. Por ejemplo, tales configuraciones incluyen, pero no se limitan a, un único polipéptido que contenga dos porciones Fc y dos porciones eritropoyetina, un único polipéptido que contenga dos porciones Fc y una porción eritropoyetina, una proteína heterodimérica que incluya un polipéptido que contenga una porción Fc y una porción eritropoyetina y otro polipéptido que contenga una porción Fc, y otras configuraciones adecuadas.

40 La porción eritropoyetina puede estar directa o indirectamente ligada a la porción Fc en varias configuraciones. En particular, la porción eritropoyetina está directamente ligada a la porción Fc a través de un enlace covalente. La porción eritropoyetina se fusiona directamente a la porción Fc en su N-terminal. En particular, el C-terminal de la porción Fc se fusiona al N-terminal de la porción eritropoyetina, es decir, $N_{\text{term}}\text{-Fc-C}_{\text{term}}\text{-N}_{\text{term}}\text{-EPO-C}_{\text{term}}$. En esta configuración, la porción Fc se encuentra hacia el N-terminal de la proteína de fusión Fc-EPO y la porción eritropoyetina se encuentra hacia el C-terminal.

45 La porción eritropoyetina puede estar indirectamente ligada a la porción Fc. Por ejemplo, la proteína de fusión Fc-EPO puede incluir un conector (L) entre la porción Fc y la porción eritropoyetina. De forma similar a la fusión directa, la porción eritropoyetina se fusiona de manera preferente al C-terminal de la porción Fc a través de un conector, es decir, $N_{\text{term}}\text{-Fc-C}_{\text{term}}\text{-L-N}_{\text{term}}\text{-EPO-C}_{\text{term}}$. Por tanto, la porción Fc se encuentra hacia el N-terminal de la proteína de fusión Fc-EPO y separada mediante un conector de la porción de eritropoyetina hacia el C-terminal.

Porción Fc.

50 Tal como se utiliza en la presente patente, “porción Fc” abarca dominios derivados de la región constante de una inmunoglobulina, preferentemente una inmunoglobulina humana, incluyendo un fragmento, análogo, variante, mutante o derivado de la región constante. Inmunoglobulinas adecuadas incluyen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y otras clases. La región constante de una inmunoglobulina se define como un polipéptido natural o producido sintéticamente homólogo a la región C-terminal de la inmunoglobulina, y puede incluir un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2, un dominio CH3, o un dominio CH4, de forma individual o en combinación. Un alineamiento de secuencias de las regiones constantes de la IgG1, IgG2 y la IgG4 se muestra en las Figuras 1A y 1B. De acuerdo a Paul, en (1999) *Fundamental Immunology* (Inmunología Fundamental), 4ª Ed., Lippincott-Raven, el

dominio CH1 incluye los aminoácidos 118 – 215; la región bisagra incluye los aminoácidos 216 – 230; el dominio CH2 incluye los aminoácidos 231 – 340; y el dominio CH3 incluye aminoácidos 341 – 447 (las posiciones de aminoácidos están basadas en la secuencia de la IgG1). La región bisagra une el dominio CH1 a los dominios CH2 y CH3.

- 5 En la presente invención, la porción Fc incluye habitualmente al menos un dominio CH2. Por ejemplo, la porción Fc puede incluir región bisagra-CH2-Ch3. De manera alternativa, la porción Fc puede incluir la totalidad o una porción de la región bisagra, el dominio CH2 y/o el dominio CH3.

La región constante de una inmunoglobulina es responsable de muchas funciones de anticuerpo importantes que incluyen la unión al receptor Fc (FcR) y la fijación de complemento. Existen cinco clases muy importantes de región constante de cadena pesada, clasificadas como IgA, IgG, IgD, IgE, IgM, cada una con funciones efectoras características designadas mediante isotipo. Por ejemplo, la IgG se divide en cuatro subclases γ : γ 1, γ 2, γ 3, y γ 4, también conocidas como IgG1, IgG2, IgG3, y la IgG4, respectivamente.

Las moléculas de IgG con múltiples clases de receptores celulares, incluyendo tres clases de receptores Fc γ (Fc γ R) específicos para el anticuerpo de clase IgG, concretamente Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII. Se ha informado acerca de que las secuencias importantes para la unión de la IgG a los receptores Fc γ R se encuentran situadas en los dominios CH2 y CH3. La vida media en suero de un anticuerpo se encuentra influenciada por la capacidad de un anticuerpo de unirse a un receptor Fc (FcR). De forma similar, la vida media en suero de las proteínas de fusión de la inmunoglobulina también está influenciada por la capacidad de unirse a dichos receptores (Gillies SD et al., (1999) Cancer Res. 59:2159-66). En comparación con los de la IgG1, los dominios CH2 y CH3 de la IgG2 y la IgG4 presentan una afinidad de unión a los receptores Fc biológicamente indetectable o reducida. Se ha informado de que las proteínas de fusión de la inmunoglobulina que contienen dominios CH2 y CH3 de la IgG2 o la IgG4 presentaban vidas medias en suero de mayor duración, en comparación con las proteínas de fusión correspondientes que contienen dominios CH2 y CH3 de la IgG1 (U.S. Patent No. 5,541,087; Lo et al., (1998) Protein Engineering, 11:495-500) U.S. Patent No. 5,541,087; Lo et al., (1998) Protein Engineering (Ingeniería de proteínas), 11:495-500). Por consiguiente, los dominios CH2 y CH3 para la presente invención se derivan de un isotipo de anticuerpo con una afinidad de uniones al receptor y funciones efectoras reducidas, tales como, la IgG2. En particular, los dominios CH2 y CH3 se derivan de la IgG2.

La región bisagra se encuentra situada habitualmente en la zona C-terminal hacia el dominio CH1 de la región constante de cadena pesada. En los isotipos de IgG, los enlaces disulfuro tienen lugar de manera habitual dentro de esta región bisagra, permitiendo que las moléculas tetraméricas finales se formen. Esta región está dominada por prolinas, serinas y treoninas. Cuando se incluye en la presente invención, la región bisagra es, habitualmente, al menos homóloga a la región de la inmunoglobulina natural que incluye los residuos cisteína para formar enlaces de disulfuro que ligan las dos fracciones Fc. Pueden encontrarse secuencias representativas de las regiones bisagra para inmunoglobulinas humanas y de ratones en Borrebaeck, C.A.K., ed., (1992) ANTIBODY ENGINEERING. A PRACTICAL GUIDE (Ingeniería de anticuerpos. Una guía práctica), W.H. Freeman y Co. Regiones bisagra adecuadas para la presente invención se derivan de la IgG1. La región bisagra de la IgG1 tiene tres cisteínas, dos de las cuales están implicadas en los enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas de la inmunoglobulina. Estas mismas cisteínas permiten la formación de enlaces disulfuro eficiente y consistente entre las porciones Fc. Por lo tanto, una región bisagra de la presente invención se deriva de la IgG1, en particular de la IgG1 humana. La primera cisteína dentro de la región bisagra de la IgG1 humana se muta a otro aminoácido, de manera preferente serina.

De acuerdo con la presente invención, la porción Fc puede contener dominios CH2 y/o CH3 y una región bisagra que se derivan de diferentes isotipos de anticuerpos, es decir, una porción Fc híbrida. En particular, la porción Fc contiene dominios CH2 y/o CH3 derivados de la IgG2 y una región bisagra mutante derivada de la IgG1.

En algunos modos de realización, la porción Fc contiene modificaciones de aminoácidos que en general extienden la vida media en suero de una proteína de fusión de Fc. Tales modificaciones de aminoácidos incluyen mutaciones que disminuyen considerablemente o eliminan la actividad de unión al receptor Fc o de fijación de complemento. Por ejemplo, el sitio de glicosilación dentro de la porción Fc de la cadena pesada de una inmunoglobulina puede ser eliminado. Por ejemplo, en la IgG2, el sitio de glicosilación es la asparagina dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser. En la IgG2, una mutación de la asparagina en la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser elimina el sitio de glicosilación en una porción Fc derivada de la cadena pesada de la IgG2. En particular, la fenilalanina dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser es adicionalmente mutada para eliminar un epítipo de linfocitos T no propio que se obtiene como resultado de la mutación de la asparagina. La secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser dentro de la cadena pesada de la IgG2 puede ser reemplazada con una secuencia de aminoácidos Gln-Ala-Gln-Ser.

Se ha observado también que la modificación de aminoácidos cerca de la unión de la porción Fc y la porción que no es Fc, puede aumentar de forma espectacular la vida media en suero de la proteína de fusión de Fc (publicación de la PCT WO 01/58957, la revelación de la cual se incorpora a la presente patente a modo de referencia). Por consiguiente, la región de unión de la proteína de fusión Fc-EPO de la presente invención puede contener modificaciones que, en relación a las secuencias naturales de la cadena pesada de una inmunoglobulina y eritropoyetina, se encuentran, de manera preferente, dentro de aproximadamente 10 aminoácidos del punto de

unión. Estos cambios de aminoácidos pueden causar un aumento en la hidrofobicidad cambiando, por ejemplo, la lisina C-terminal de la porción Fc por un aminoácido hidrofóbico tal como la alanina o leucina.

De acuerdo a la invención, la porción Fc contiene modificaciones de aminoácidos del segmento Leu-Ser-Leu-Ser cerca del C-terminal de la porción Fc de la cadena pesada de una inmunoglobulina. Las sustituciones de aminoácidos del segmento Leu-Ser-Leu-Ser eliminan los epítomos de unión de linfocitos T potenciales. En particular, la secuencia de aminoácidos Leu-Ser-Leu-Ser cerca del C-terminal de la porción Fc es reemplazada con la secuencia de aminoácidos Ala-Thr-Ala-Thr. Los aminoácidos dentro del segmento Leu-Ser-Leu-Ser son reemplazados con otros aminoácidos tales como la glicina o prolina. Métodos detallados para generar las sustituciones de aminoácidos del segmento Leu-Ser-Leu-Ser cerca del C-terminal de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, u otra clase de molécula de inmunoglobulina han sido descritos en la Publicación de Patente estadounidense N° 20030166877 (es decir, solicitud de patente U.S. N° 10/112,582).

Porción eritropoyetina.

Tal como se utiliza en la presente patente, "porción eritropoyetina" abarca la eritropoyetina natural o de tipo silvestre humana y de otras especies, eritropoyetina recombinante, y moléculas similares a la eritropoyetina, incluyendo fragmentos de eritropoyetina biológicamente activos, análogos, variantes, mutantes o derivados de la eritropoyetina.

La eritropoyetina natural o de tipo silvestre es una hormona glicoproteica 34 KD que estimula el crecimiento y el desarrollo de los glóbulos rojos a partir de células precursoras eritropoyética. La eritropoyetina de tipo silvestre o natural se produce en el riñón en respuesta a la hipoxia (*por ejemplo*, pérdida de glóbulos rojos debido a la anemia), y regula el crecimiento de glóbulos rojos y la diferenciación a través de la interacción con su receptor celular afin. La eritropoyetina de tipo silvestre o natural puede ser aislada y purificada de la sangre (Miyake T., et al., (1977) J. Biol. Chem., 252:5558-5564), o del plasma (Goldwasser, E., et al., (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68:697-698), o de la orina.

La eritropoyetina recombinante o sintetizada químicamente puede ser producida utilizando técnicas que son bien conocidas para aquellos expertos en el arte. Dos formas de eritropoyetina humana (rHuEPO) se encuentran comercialmente disponibles: EPOGEN® de Amgen y PROCRIT® de Johnson & Johnson.

Tal como se utiliza en la presente patente, la actividad biológica de la eritropoyetina se define como la capacidad para estimular la proliferación celular a través de la interacción con el receptor de la eritropoyetina. El ensayo funcional de la eritropoyetina puede ser llevado a cabo *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, la actividad *in vitro* de la eritropoyetina puede ser probado en un ensayo basado en células. De manera específica, la actividad de la eritropoyetina puede ser determinada en base a un ensayo de proliferación celular de TF-1. Las células TF-1 expresan receptores de EPO. La proliferación de las células TF-1, que está determinada por la incorporación de timidina tritiada, es una función de la actividad de la eritropoyetina (Hammerling et al., (1996) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis (Análisis farmacéutico y Biomédico), 14:1455; Kitamura et al., (1989) J. Cellular Physiol., 140:323). El ensayo *in vitro* basado en células se describe en más detalle en el Ejemplo 6. Los ensayos *in vivo* se llevan a cabo en modelos animales, tales como, por ejemplo, ratones y ratas. Ejemplos de ensayos *in vivo* incluyen, pero no se limitan a, ensayos de hematocrito (HCT) y ensayos de reticulocitos. Los ensayos de HCT miden el volumen de glóbulos rojos de una muestra de sangre tomada de un animal tratado con eritropoyetina, y se realizan mediante la centrifugación de sangre en tubos capilares y la medición de la fracción del volumen total ocupado por glóbulos rojos sedimentados. El ensayo *in vivo* de HCT se describe en más detalle en el Ejemplo 8. Los ensayos de reticulocitos miden nuevos glóbulos rojos, también conocidos como reticulocitos, que se han diferenciado recientemente de las células precursoras y tienen aún remanentes de ácidos nucleicos característicos de las células precursoras. Los reticulocitos se miden clasificando los glóbulos rojos en un citómetro de flujo después de la tinción con un colorante de tinción de ácido nucleico, tal como el naranja de acridina o naranja de tiazol, y contando la fracción de reticulocitos teñidas positivamente.

Una molécula similar a la eritropoyetina funcionalmente activa o biológicamente activa comparte de manera habitual una identidad o similitud considerable de secuencia de aminoácidos (*por ejemplo*, al menos aproximadamente un 55%, aproximadamente un 65%, aproximadamente un 75% de identidad, de manera habitual aproximadamente un 80% y de manera más habitual aproximadamente un 90-95% de identidad), con las correspondientes secuencias de eritropoyetina de tipo silvestre, o natural, y posee una o más de las funciones de la eritropoyetina de tipo silvestre de la misma.

Por tanto, se entiende que la eritropoyetina de la presente invención incluye específicamente polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos análogas a la secuencia de la eritropoyetina de tipo silvestre. Tales proteínas se encuentran definidas en la presente patente como análogos de la eritropoyetina. Un "análogo" se encuentra definido en la presente patente con el significado de una secuencia de aminoácidos con la suficiente similitud con la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina de tipo silvestre para poseer la actividad biológica de la proteína. Por ejemplo, un análogo de la eritropoyetina puede contener uno o más cambios de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina de tipo silvestre, y aun así poseer, *por ejemplo*, la capacidad de estimular la producción o maduración de glóbulos rojos. Ejemplos de tales cambios de aminoácidos incluyen adiciones, deleciones o sustituciones de residuos aminoácidos. La eritropoyetina de la presente invención, también abarca

proteínas mutantes que muestran mayor o menor actividad biológica que la eritropoyetina de tipo silvestre, tal como se encuentra descrito en la Patente estadounidense N° 5,614,184.

Variaciones en la secuencia de la eritropoyetina.

5 Las modificaciones de aminoácidos pueden ser introducidas en la porción eritropoyetina de la presente invención para reducir la afinidad de unión al receptor de la EPO; para aumentar la estabilidad de la proteína; para aumentar la adopción de una conformación activa y correcta; para mejorar las propiedades farmacocinéticas; para mejorar la síntesis; o para proporcionar otras características ventajosas. Por ejemplo, la endocitosis de la EPO mediada por receptor se determina mediante la afinidad de unión entre la eritropoyetina y el receptor de la EPO. La estructura tridimensional de un complejo de eritropoyetina humana y el receptor de EPO, demuestra que la unión de la eritropoyetina a su receptor está dominada por cargas positivas en la superficie de la eritropoyetina, y cargas negativas en el receptor de EPO. Syed et al., (1998) Nature, 395:511. Para reducir la constante de afinidad de la unión, pueden introducirse mutaciones para remplazar los aminoácidos cargados positivamente que se encuentran cerca de la superficie de contacto del receptor de EPO-eritropoyetina. Por ejemplo, en un modo de realización, uno de entre el Arg131 y Arg139, o ambos, de la eritropoyetina humana pueden ser reemplazados (donde la numeración de aminoácidos de las secuencias de EPO está basada en EPO madura humana). De manera preferente, Arg131 y Arg139 son reemplazados con ácido glutámico, ácido aspártico, y otros aminoácidos con carga no positiva. Las mutaciones pueden introducirse en la eritropoyetina de otras especies para remplazar aminoácidos correspondientes a Arg131 y a Arg139 de la eritropoyetina humana. Sin embargo, para preservar la actividad biológica de la EPO, aquellos residuos que se encuentran en el centro de la interacción EPO-receptor de EPO deberían evitarse cuando se realizan modificaciones en la secuencia de aminoácidos de la EPO.

De manera alternativa, puede determinarse empíricamente aquellas regiones o posiciones que podrían tolerar sustituciones de aminoácidos mediante mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham et al., (1989) Science, 244, 1081-1085). En este método, los residuos aminoácidos seleccionados se sustituyen individualmente con un aminoácido neutral (*por ejemplo*, alanina) a fin de determinar los efectos sobre la actividad biológica.

25 La eritropoyetina huma natural, que parece ser única entre las eritropoyetinas mamíferas, tiene exactamente cuatro cisteínas en las posiciones 7, 29, 33, y 161 que forman dos enlaces disulfuros. Uno o más de estos residuos cisteínas de la porción de la eritropoyetina pueden ser modificados. Para generar un enlace disulfuro modificado, un residuo cisteína es mutado en un aminoácido estructuralmente compatible, tal como alanina o serina, y un segundo aminoácido que se encuentra cercano en su estructura tridimensional es mutado en cisteína. Por ejemplo, uno de los aminoácidos Gln₈₆, Pro₈₇, Trp₈₈, Glu₈₉, y Leu₉₁ pueden ser reemplazados por Cys. Si el Trp₈₈ es reemplazado por Cys y Cys₃₃ es reemplazado con otro aminoácido, la porción eritropoyetina formará un enlace disulfuro Cys₂₉-Cys₈₈ que no se encuentra en la EPO humana. Este enlace da como resultado una proteína de fusión que presenta una actividad mayor que una proteína de fusión con un enlace disulfuro Cys₃₃-Cys₂₉ típico. Además, la proteína de fusión Cys₂₉-Cys₈₈ muestra un aumento pronunciado en la actividad, en comparación con la proteína de fusión Cys₃₃-Cys₂₉, en presencia de otras mutaciones en la porción eritropoyetina de la proteína de fusión.

Se conocen bien en el arte los métodos para introducir mutaciones en la eritropoyetina. Por ejemplo, las mutaciones pueden ser introducidas mediante técnicas de mutagénesis dirigida al sitio. Es importante señalar que una amplia variedad de técnicas de mutagénesis dirigida al sitio se encuentran disponibles y pueden ser utilizadas para lograr resultados similares. Otras técnicas incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis aleatoria o semi-aleatoria.

40 *Conector*

Las proteínas de fusión Fc-EPO de acuerdo a la presente invención pueden incluir una molécula conectora, preferentemente un conector péptido, entre la porción Fc y la porción eritropoyetina. Una proteína de fusión con un conector puede presentar propiedades mejoradas, tales como actividad biológica aumentada. Un conector, generalmente, contiene entre 1 y 25 aminoácidos (*por ejemplo*, entre 5 y 25 o entre 10 y 20 aminoácidos). El conector puede estar diseñado para no incluir ningún sitio de corte para la proteasa. Más aún, el conector puede contener un sitio de glicosilación O-ligado o N-ligado para inhibir la proteólisis estéricamente. Por consiguiente, el conector puede contener una secuencia de aminoácidos Asn-Ala-Thr.

Conectores adecuados adicionales se revelan en Robinson et al., (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 95, 5929; y en U.S. la Solicitud estadounidense con N° de serie 09/708,506 (Application Serial No. 09/708,506).

50 *Glicosilación.*

La eritropoyetina humana natural y la eritropoyetina recombinante expresada en células de mamíferos contienen tres cadenas de oligosacáridos O-ligadas y N-ligadas. La glicosilación N-ligada tiene lugar en los residuos asparagina situados en las posiciones 24, 38 y 83, mientras que la glicosilación O-ligada tiene lugar en un residuo serina situado en la posición 126 (Lai et al.,(1986) J. Biol. Chem., 261:3116; Broudy et al., (1988) Arch. Biochem. Biophys., 265:329). Las cadenas de oligosacáridos han demostrado que se modificaban con residuos de ácido siálico terminales. Las cadenas N-ligadas presentan, de manera habitual, hasta cuatro ácidos siálicos por cadena y las

cadena O-ligadas presentan hasta dos ácidos siálicos. Un polipéptido de eritropoyetina puede por lo tanto alojar hasta un total de 14 ácidos siálicos.

El ácido siálico es el azúcar terminal en los oligosacáridos O-ligados o N-ligados. El grado de sialilación es variable de sitio a sitio, proteína a proteína, y puede depender de las condiciones del cultivo de células, tipos de células, y clones de células en particular que se utilicen. Se ha observado que la proteína de fusión Fc-EPO de la presente invención sintetizada en células BHK está altamente sialilada. También se ha observado que el grado de sialilación de la proteína de fusión Fc-EPO puede ser aumentado de forma adicional adaptando las células BHK para su crecimiento en medios libres de proteínas. Algunas otras líneas celulares utilizadas comúnmente, tales como células NS/0, PerC6 o 293, no producen una proteína de fusión Fc-EPO altamente sialilada bajo condiciones de cultivo estándar. El grado de sialilación de la proteína de fusión Fc-EPO producida a partir de diferentes líneas celulares puede ser determinado mediante electroforesis en gel por isoelectroenfoque (IEF), en virtud de sus residuos de ácido siálico con una gran carga negativa; los detalles de la electroforesis en gel por IEF se describen en el Ejemplo 5B. El grado de sialilación de la proteína de fusión Fc-EPO producida en diferentes líneas celulares puede también confirmarse cualitativamente mediante estudios de unión de lectinas, utilizando métodos familiares a aquellos expertos en el arte. Un ejemplo de un ensayo de unión de lectinas se describe en el Ejemplo 5B.

De manera habitual, una población altamente sialilada de proteínas de fusión Fc-EPO purificadas de la presente invención, tiene una media de 11- 28 residuos de ácido siálico por proteína de fusión Fc-EPO purificada. Poblaciones de proteínas de fusión Fc-EPO altamente sialiladas preferentes presentan una media de 13-28, 15-28, 17-28, 19-28, o 21-28 residuos de ácido siálico por proteína de fusión Fc-EPO purificada. Por ejemplo, una población de proteínas de fusión Fc-EPO altamente sialiladas presenta una media de 20 a 22 residuos de ácido siálico por proteína de fusión Fc-EPO purificada. Otra población de proteínas de fusión Fc-EPO presenta una media de 23-28 residuos de ácido siálico por proteína de fusión Fc-EPO purificada.

Farmacocinética de la proteína de fusión Fc-EPO sialilada.

Uno de los más importantes factores que determinan la actividad *in vivo* de los agentes estimuladores de la eritropoyesis es la duración del tiempo que la concentración en suero de la proteína permanece por encima de un umbral necesario para la eritropoyesis, lo que se determina mediante la farmacocinética de los agentes estimuladores de la eritropoyesis. El perfil de la farmacocinética de la proteína de fusión Fc-EPO altamente sialilada es distinta de aquella de la eritropoyetina recombinante o natural. La diferencia más importante es que la proteína de fusión Fc-EPO altamente sialilada presenta una vida media en suero de una duración mucho mayor y una eliminación más lenta que lleva a una potencia biológica *in vivo* aumentada. Sin la intención de estar sujetos a la teoría, se cree que los residuos de ácido siálico aumentan las cargas negativas en una molécula de eritropoyetina, lo que da como resultado una constante de afinidad de unión al receptor de EPO con carga negativa disminuida y una endocitosis de la EPO mediada por receptor reducida, alargando la vida media en suero. Más aún, los ácidos siálicos también evitan que las proteínas de eritropoyetina sean endocitadas por receptores de la asialoglicoproteína que se unen a glicoproteínas con residuos de galactosa expuestos.

En general, la mayoría de los perfiles farmacocinéticos de una molécula terapéutica tal como la eritropoyetina muestran una caída inicial en su concentración en suero (una fase alfa), seguida de una disminución más gradual (una fase beta) después de la administración.

Factores que ejercen una influencia en la fase alfa.

De acuerdo a la teoría de la farmacocinética de moléculas pequeñas, la fase alfa define un volumen de distribución que describe cómo una molécula se divide en compartimentos fuera de la sangre. La caída observada en al fase alfa varía ampliamente para diferentes proteínas de fusión Fc-EPO sintetizadas en diferentes líneas celulares. En teoría, la diferencia podría ser debida a la variación en el volumen de distribución, o debido a variaciones en el tráfico entre compartimentos. Sin embargo, se ha observado que existe una correlación entre el grado de sialilación y el comportamiento farmacocinético de las proteínas Fc-EPO en ratones. Por ejemplo, las proteínas de fusión Fc-EPO sintetizadas en células BHK están altamente sialiladas y muestran el mejor perfil farmacocinético. Las proteínas de fusión Fc-EPO sintetizadas en células NS/0 están en cierto modo sialiladas y tienen un perfil farmacocinético intermedio. Las proteínas de fusión Fc-EPO sintetizadas en células 293 y en células PerC6 presentan poca o ninguna sialilación y tienen un perfil farmacocinético pobre caracterizado por una caída de aproximadamente 100 veces en la concentración en suero en los primeros 30 minutos. Por lo tanto, un factor clave que ejerce una influencia en la fase alfa de una proteína de fusión Fc-EPO en particular es la distribución de los tipos de glicosilación el nivel de sialilación. Las proteínas de fusión Fc-EPO que se encuentran sub-sialiladas desaparecen rápidamente.

Además, tal como se muestra en la Figura 2, el grado de la caída en las concentraciones en suero de la Fc-EPO durante la fase alfa varía de acuerdo a la dosis, indicando que este comportamiento es saturable y muy probablemente mediado por receptor. Es posible que el receptor que se encuentra mediando en la caída en la fase alfa no es ni el receptor de EPO ni el receptor Fc, sino otro receptor tal como el receptor de asialoglicoproteína. Arasnep® ha reducido la afinidad de unión a los receptores de EPO en comparación con una eritropoyetina humana normal porque Arasnep® ha aumentado las cargas negativas como resultado de sitios adicionales de glicosilación N-ligada. Sin embargo, Arasnep® y la eritropoyetina humana normal muestran caídas similares durante las fases

alfa. Además, ya que por lo general la cantidad de receptores de la EPO en la superficie de una célula eritroide progenitora es sólo aproximadamente 200, estos receptores podrían ser completamente saturados en dosis mucho más bajas de eritropoyetina que aquellos utilizados en la Figura 2. Los receptores Fc no son quizás susceptibles de mediar en la caída espectacular en la fase alfa porque las proteínas de fusión Fc-EPO con una mutación que elimine el sitio de glicosilación, *por ejemplo*, una mutación de aminoácidos correspondiente a Asn297 de la IgG1, pueden aún mostrar una caída pronunciada en la fase alfa. Además, aunque las regiones IgG2 CH2, cuando no están agregadas, generalmente no se unen a los receptores Fc, las proteínas de fusión Fc-EPO que contienen regiones IgG2 CH2 todavía muestran una caída significativa durante la fase alfa.

Sin la intención de estar sujetos a la teoría, la caída de la concentración en suero de una proteína de fusión Fc-EPO durante la fase alfa puede estar mediada por receptores de asialoglicoproteína mediante endocitosis mediada por receptores de asialoglicoproteína. Las proteínas de fusión Fc-EPO sub-sialiladas contienen residuos de galactosa expuestos a los que puede unirse el receptor de asialoglicoproteína dando como resultado la endocitosis mediada por receptor asialoglicoproteína. Como resultado, las proteínas de fusión Fc-EPO sub-sialiladas pueden desaparecer rápidamente.

Factores que ejercen una influencia en la fase beta.

La caída de las concentraciones en suero de las proteínas de fusión Fc-EPO en la fase beta es menos pronunciada en comparación con la caída en la fase alfa. Por ejemplo, en ratones, entre 8 y 24 horas después de la administración, se observó una caída de 2 a 3 veces en las concentraciones en suero de las proteínas de fusión Fc-EPO. La diferencia en la caída durante la fase beta es también menos drástica entre diferentes proteínas Fc-EPO sintetizadas en diferentes líneas celulares. Sin embargo, al igual que en la fase alfa, el grado de sialilación se correlaciona con el comportamiento farmacocinético en la fase beta. Por ejemplo, las proteínas de fusión Fc-EPO sintetizadas en células BHK presentan una fase beta mejorada de forma significativa en comparación a proteínas Fc-EPO idénticas de otra manera sintetizadas en células NS/0. La endocitosis de la EPO mediada por receptor parece ser al menos en parte responsable de la caída en la concentración en suero de las proteínas de fusión Fc-EPO durante la fase beta. El Arasnep®, que ha reducido la afinidad de unión para los receptores de EPO en comparación con la eritropoyetina humana normal, ha mejorado de manera significativa la fase beta en comparación con la eritropoyetina humana normal, a pesar de los perfiles similares de la fase alfa.

Las proteínas de fusión Fc-EPO de la invención generalmente muestran una fase beta mejorada en comparación con la eritropoyetina recombinante o natural, indicando que la adición de la porción Fc ralentiza de manera significativa la disminución de la concentración en suero durante la fase beta. Se ha observado también que ciertas modificaciones de aminoácidos en la porción Fc o en la porción eritropoyetina pueden mejorar de forma significativa la fase beta. Por ejemplo, las mutaciones que eliminan el sitio de glicosilación en la porción Fc mejoran la fase beta de las proteínas de fusión Fc-EPO. Las mutaciones que aumentan la estabilidad de la porción eritropoyetina, *por ejemplo*, las mutaciones que modifican los enlaces disulfuro (por ejemplo, mutaciones NDS) en la porción eritropoyetina, mejoran de manera significativa la fase beta de la proteína de fusión Fc-EPO. Generalmente, una fase beta mejorada extiende la vida media en suero terminal de una proteína de fusión Fc-EPO.

Vías de eliminación de las proteínas de fusión Fc-EPO.

Existen varias vías posibles de eliminación de una molécula de proteína de eritropoyetina del cuerpo. Una molécula de proteína de eritropoyetina natural o de tipo silvestre puede ser eliminada del cuerpo mediante filtración del riñón y mediante endocitosis mediada por receptor. La eritropoyetina endocitada es degradada de forma eficiente. Tal como se representa en la Figura 3, se pretende que la adición de una porción Fc a la porción eritropoyetina suprima de manera esencial la excreción de la proteína de fusión Fc-EPO a través del riñón. Como resultado, la endocitosis mediada por receptor es la vía más importante de eliminación de una proteína de fusión Fc-EPO. Más aún, la adición de una porción Fc a la porción eritropoyetina también se pretende que reduzca la degradación después de la internalización, ya que se pretende que los receptores endosomales FcRn reciclen la proteína de fusión de vuelta al exterior de la célula.

En principio, al menos tres tipos de receptores pueden mediar en la eliminación de la proteína de fusión Fc-EPO, concretamente, el receptor Fc, receptor de EPO, y el receptor de asialoglicoproteína. La eliminación de la proteína de fusión Fc-EPO a través del receptor Fc debería reducirse de forma significativa mediante el uso de un dominio CH2 derivado de la IgG2 en lugar de uno CH2 derivado de la IgG1 en la porción Fc. Los dominios CH2 derivados de la IgG2 presentan aproximadamente una afinidad 100 veces menor para FcγRI, que presenta la afinidad más alta para las IgGs, en comparación con los dominios CH2 derivados de la IgG1. La interacción entre CH2 derivado de IgG2 y FcγRI es indetectable en la mayoría de los ensayos de unión. Sin embargo, la actividad residual de unión a FcγR del dominio CH2 derivado de IgG2 puede aún jugar un papel en la eliminación de la proteína de fusión Fc-EPO ya que la mutación de asparagina que elimina el sitio de glicosilación en el dominio CH2 reduce aún más la unión del receptor Fc y mejora la farmacocinética de la proteína de fusión Fc-EPO.

Las mutaciones NDS tienen el efecto de estabilizar la estructura de la eritropoyetina y, como resultado, se pretende que reduzcan la degradación de la proteína de fusión Fc-EPO después de la internalización. Las proteínas de fusión

Fc-EPO que contienen las mutaciones NDS han mejorado las propiedades farmacocinéticas y aumentan la vida media en suero.

La sialilación aumenta las cargas negativas de las proteínas de fusión Fc-EPO, reduciendo la afinidad de unión de la proteína de fusión Fc-EPO para el receptor de EPO. La sialilación también reduce la cantidad de residuos de galactosa en la proteína de fusión Fc-EPO, reduciendo la afinidad de unión de las proteínas de fusión Fc-EPO para los receptores de asialoglicoproteína. Por consiguiente, tal como se representa en la Figura 3, la sialilación reduce tanto la endocitosis de EPO mediada por receptor como la endocitosis mediada por receptor asialoglicoproteína. Las proteínas de fusión Fc-EPO altamente sialiladas por tanto presentan tasas de eliminación ralentizadas de manera espectacular dando como resultado vidas medias en suero aumentadas de manera significativa.

La adición de una porción Fc, las modificaciones de las porciones eritropoyetina y Fc, y la sialilación cada una reducen la eliminación de las proteínas de fusión Fc-EPO. Los efectos combinados en la eliminación y en la vida media en suero son aditivos o multiplicativos.

Actividad in vitro y potencia in vivo de la proteína de fusión Fc-EPO.

La actividad de las proteínas Fc-EPO pueden ser probadas en un ensayo basado en células. De manera específica, la interacción entre el receptor de EPO y Fc-EPO puede ser determinada en base al ensayo de proliferación de células TF-1. Las células TF-1 expresan los receptores de EPO, por lo tanto, la proliferación de células TF-1, que está determinada por la incorporación de timidina tritiada, es una función de la actividad de la eritropoyetina (Hammerling et *in vitro* al., (1996) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis (Análisis farmacéutico y biomédico), 14:1455; Kitamura et al., (1989) J. Cellular Physiol., 140:323). En la presente invención, la proliferación de células TF-1 es una función de la interacción entre la porción eritropoyetina y los receptores de EPO. De manera específica, si una porción de eritropoyetina de una proteína de fusión Fc-EPO tiene una constante de afinidad reducida para el receptor de EPO, la proteína Fc-EPO generalmente presenta una actividad reducida en un ensayo basado en células (marcada por un valor ED50 aumentado).

Los datos de ensayos basados en células, que son relativamente fáciles de obtener, en general se correlacionan con la farmacocinética y con la potencia *in vivo* de la proteína Fc-EPO. La actividad *in vitro* reducida, que indica una constante de afinidad reducida para el receptor de EPO, generalmente se correlaciona con propiedades farmacocinéticas mejoradas y potencia *in vivo* aumentada. Por el contrario, la actividad *in vitro* aumentada (marcada por un valor ED50 disminuido), que indica una constante de afinidad aumentada para el receptor de EPO, en general se correlaciona con propiedades farmacocinéticas pobres y con una potencia *in vivo* reducida.

Las actividades biológicas *in vivo* de las proteínas de fusión Fc-EPO pueden ser medidas mediante ensayos llevados a cabo en modelos animales, tales como, por ejemplo, ratones y ratas. Ejemplos de ensayos *in vivo* incluyen, pero no se limitan a, ensayos de hematocrito (HCT) y ensayos de reticulocitos. Los ensayos de HCT miden el volumen de sangre ocupado por los glóbulos rojos (RBC, por sus siglas en inglés), y están realizados simplemente mediante centrifugación de sangre en tubos capilares y medición de la fracción del volumen total ocupado por glóbulos rojos sedimentados. Los reticulocitos son nuevos glóbulos rojos que han sido recientemente diferenciados de las células precursoras y caracterizados por contener ácidos nucleicos remanentes de las células precursoras. Los reticulocitos se miden clasificando glóbulos rojos en un citómetro de flujo después de la tinción con un colorante de tinción, tal como, por ejemplo, el naranja de acridina o naranja de tiazol, y contando la fracción teñida. Habitualmente, los hematocritos y reticulocitos se miden dos veces por semana.

Los datos de reticulocitos son, en un sentido, una primera derivada de los datos de hematocritos. Los recuentos de reticulocitos son una medición de la tasa de producción de los glóbulos rojos, mientras que los hematocritos miden los glóbulos rojos totales. En un experimento típico, los hematocritos de animales administrados con proteínas de fusión Fc-EPO aumentarán y entonces regresarán a la base de referencia. Cuando los hematocritos son altos y las proteínas Fc-EPO administradas han desaparecido del sistema circulatorio del animal, el recuento de reticulocitos baja de la base de referencia porque se suprime la eritropoyesis.

Los reticulocitos normalmente emergen de la médula ósea 4 días después de los precursores comprometidos con los destinos celulares de los glóbulos rojos. Sin embargo, en presencia de niveles altos de eritropoyetina, los reticulocitos dejarán la médula ósea a menudo después de 1-3 días tras la administración.

En respuesta a una inyección de proteínas Fc-EPO, las lecturas de hematocrito aumentan, permanecen constantes, y entonces regresan a la base de referencia en un animal. Ejemplos de tales respuestas de hematocrito se muestran en las Figuras 4-6. La tasa máxima de disminución es de aproximadamente un 7% de volumen de sangre por semana en ratones, lo que corresponde a un ciclo de vida de los glóbulos rojos de aproximadamente 45 días en un ratón, y aproximadamente un 5% de volumen de sangre por semana en ratas, lo que corresponde a un ciclo de vida de los glóbulos rojos de aproximadamente 65 días en una rata. La tasa máxima de disminución representa presumiblemente la destrucción de glóbulos rojos en ausencia de una nueva síntesis. Si las proteínas Fc-EPO biológicamente activas permanecen en el sistema en una concentración por encima del umbral para la eritropoyesis, el nivel de hematocrito permanecerá alto y no caerá, incluso si el nivel de Fc-EPO biológicamente activa no es detectable en experimentos de farmacocinética.

5 Se ha observado que las propiedades farmacocinéticas de una proteína Fc-EPO se correlaciona con la potencia *in vivo* de la proteína. Todas las características de la presente invención que aumentan la farmacocinética de una proteína de fusión Fc-EPO, tal como se ha expuesto previamente, también aumentan la potencia *in vivo* en los experimentos con animales. Como se muestra en la tabla 1, tales características incluyen, por ejemplo, la adición de la porción Fc, la eliminación del sitio de glicosilación en la porción Fc (*por ejemplo*, sustitución N→Q en una posición correspondiente a Asn297 de la IgG1), introducción de las mutaciones NSD en la porción eritropoyetina, y altos niveles de sialilación mediante la sintetización de la proteína Fc-EPO en las células BHK.

Tabla 1

| Factores que ejercen una influencia en la actividad farmacocinética y biológica de las proteínas Fc-EPO | | | |
|---|--|---------------------------------|--|
| Características | Efecto sobre la potencia <i>in vitro</i> | Efecto sobre la farmacocinética | Efecto sobre la actividad <i>in vivo</i> |
| Síntesis en células BHK (<i>vs. células NS/O</i>) | Reducción | Aumento | Aumento |
| Adición de Fc | Pequeño aumento | Aumento | Aumento |
| Mutaciones NDS | Ninguno | Aumento | Aumento |
| N→Q | Ninguno | Aumento | Aumento |
| g2h (<i>vs. g4h</i>) | Aumento | Aumento | Aumento |

10 Se ha observado que, por porción de eritropoyetina, Fcg2h(FN→AQ)-Epo y Fcg2h-EPO(NDS) realizadas a partir de células BHK muestran las mejor actividad farmacocinética y la más potente actividad biológica *in vivo*. Cada una de las Fcg2h(FN→AQ)-Epo y Fcg2h-EPO(NDS) tiene una vida media en suero de mayor duración y una actividad *in vivo* por porción de eritropoyetina que el Arasnep®.

Síntesis de las proteínas de fusión Fc-EPO.

15 La proteína de fusión Fc-EPO de la presente invención puede ser producida en células adecuadas o en líneas celulares tales como líneas celulares humanas o de otros mamíferos. Líneas celulares adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células de riñón de crías de hámster (BHK, por sus siglas en inglés), células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), (incluyendo células deficientes en (DHFR) – dihidrofolato reductasa), y células COS. En un modo de realización preferente, se utilizan células BHK.

20 Para expresar la proteína de fusión Fc-EPO en células hospedadoras adecuadas (*por ejemplo*, células BHK), las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína de fusión Fc-EPO se introducen en primer lugar en un vector de expresión utilizando técnicas moleculares recombinantes estándar familiares para aquellos comúnmente expertos en el arte. La secuencia que codifica la porción eritropoyetina es, preferentemente, optimizada para codones para un nivel alto de expresión. La eritropoyetina optimizada para codones fue descrita en la publicación de la PCT WO
 25 01/366489 (es decir, solicitud estadounidense N° 09/708,506). Una secuencia de un ácido nucleico a modo de ejemplo que codifica una porción de eritropoyetina se proporciona en la SEQ ID NO:1:

**GCCCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTGCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGC
 CGAGAATATCACGACCGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAACATCACCGTGCCTGACA
 CCAAAGTGAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTTGGCCAGCAGGCCGTAGAAGTGTGGCAG
 GGCCTGGCCCTGCTGTGCGGAAGCTGTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCC
 GTGGGAGCCCCTGCAACTGCATGTGGATAAAGCCGTGAGTGGCCTTCGCAGCCTCACCACTCTGC
 TTCGGGCTCTGGGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCCCTC
 CGCACAATCACTGCTGACACTTTCCGAAACTCTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCTCCGGGAAA
 GCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCCGGACAGGGGACAGATGA (SEQ ID NO:1)**

Las secuencias de ácido nucleico a modo de ejemplo que codifican una porción Fc preferente, por ejemplo, una porción Fc que incluya un dominio CH2 derivado de la IgG2 y una región bisagra derivada de la IgG1, fue descrita en la Publicación de Patente estadounidense N° 20030044423 (es *decir*, la solicitud estadounidense N° 10/093,958).

5 Generalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión Fc-EPO incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal (una secuencia líder). La secuencia líder se corta durante el proceso de secreción. Una secuencia de ácido nucleico a modo de ejemplo (SEQ ID NO:2), que codifica una proteína Fc-EPO madura sin una secuencia líder, se muestra en la Figura 7.

10 Vectores adecuados incluyen aquellos adecuados para la expresión en una célula hospedadora de mamíferos. Los vectores pueden ser, por ejemplo, plásmidos o virus. El vector contendrá habitualmente los siguientes elementos: promotores y otros elementos reguladores "upstream", origen de replicación, sitio de unión de ribosoma, sitio de terminación de transcripción, sitio policonector, y marcador seleccionable que sean compatibles con su uso en una célula hospedadora de mamíferos. Los vectores pueden además contener elementos que permiten la propagación y mantenimiento también en células hospedadoras procarióticas. Vectores adecuados para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, pDCs-Fc-X y vectores derivados a partir del mismo, y pHc10-Fc-X y vectores 15 derivados a partir del mismo.

Los vectores que codifican las proteínas Fc-EPO se introducen en células hospedadoras mediante técnicas de biología celular estándar, que incluyen la transfección y técnicas virales. Por transfección se entiende la transferencia de información genética a una célula utilizando ADN, ARN, o un polímero de nucleótido sintético. Métodos de transfección adecuados incluyen, pero no se limitan a, co-precipitación mediada por fosfato cálcico (Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio), 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press), lipofección (por ejemplo, Lipofectamina Plus de Life Technologies de Rockville, Maryland), técnicas de transfección mediadas por DEAE-dextrano, fusión de lisosomas o fusión de eritrocitos, raspado, captación directa, choque osmótico o de sucrosa, microinyección directa, microinyección indirecta tal como a través de técnicas mediadas por eritrocitos, fusión de protoplastos, o sometiendo a las células 20 hospedadoras a corrientes eléctricas (*por ejemplo*, electroporación), por nombrar unas pocas. La lista anterior de métodos de transfección no se considera exhaustiva, ya que otros procedimientos para la introducción de información genética en células serán sin duda desarrollados.

Para facilitar la selección de células hospedadoras que contienen el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión Fc-EPO, el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión Fc-EPO se introduce habitualmente con un marcador de selección. El marcador de selección puede ser codificado por una secuencia de ácido nucleico presente en el mismo vector de expresión que codifica la proteína de fusión Fc-EPO. De manera alternativa, el marcador de selección puede ser codificado por una secuencia de ácido nucleico presente en un vector diferente. En el último caso, los dos vectores pueden ser introducidos conjuntamente en las células hospedadoras mediante o bien co-transfección o co-transducción. Marcadores de selección adecuados incluyen, por ejemplo, Higromicina B (Hyg B) y dihidrofolato 25 reductasa (DHFR).

La expresión transiente es útil para la producción de proteínas a pequeña escala y para un análisis rápido de la proteína de fusión Fc-EPO. Las células hospedadoras que contienen la secuencia de ácidos nucleico que codifica la proteína de fusión Fc-EPO se mantienen bajo las condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión Fc-EPO codificada. Métodos de cultivo de células, condiciones y medios estandarizados pueden ser utilizados para 30 mantener las células hospedadoras que expresan la proteína de fusión Fc-EPO.

Las células transfectadas de manera estable se prefieren a menudo para la producción a gran escala, la expresión a un nivel alto, y para otros propósitos. El ácido nucleico mantenido estable puede estar presente en cualquiera de varias configuraciones en la célula hospedadora. Por ejemplo, en un modo de realización, la secuencia de ácido nucleico mantenida estable se integra en un cromosoma de una célula hospedadora. En otros modos de realización, la secuencia de ácido nucleico mantenida estable puede estar presente como un conjunto extracromosómico, como un cromosoma artificial, o en otra configuración adecuada. 35

En un modo de realización, las células BHK se utilizan para sintetizar la proteína de fusión Fc-EPO. Para obtener una célula BHK, una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión y una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección se introducen en las células BHK, de manera preferente mediante electroporación, fusión de protoplastos o métodos de lipofección. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión y la secuencia que codifica un marcador de selección pueden estar presentes en el mismo vector de expresión. De manera alternativa, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión y la secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección pueden estar presentes en diferentes vectores de expresión. El marcador de selección preferente para establecer una célula BHK estable es HygB. Otros marcadores 40 de selección, tales como DHFR, pueden también utilizarse. Los clones transfectados de manera estable se aíslan y propagan mediante su cultivo en presencia de Hyg B en una concentración adecuada (por ejemplo, 200, 250, o 300 microgramos/ml), en un medio de cultivo de tejido estándar, tal como, por ejemplo, un medio MEM+FBS, DMEM/F-12, o VP-SFM disponible en Life Technologies, y otros medios adecuados. Los niveles de expresión de la proteína de fusión Fc-EPO pueden ser monitoreados mediante ensayos de detección de proteínas estándar, tales como, por 45

ejemplo, ensayo ELISA, Western Blot, dot blot, u otros ensayos apropiados, en muestras a partir de sobrenadantes y medios de cultivo. Clones de alta expresión se seleccionan y propagan a gran escala.

Habitualmente, la célula BHK es una línea celular adherente y cultivada comúnmente en medios que contienen suero, tal como MEM + 10% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) inactivado por calor. Sin embargo, las células BHK pueden ser adaptadas para su cultivo en suspensión y en un medio libre de suero, tal como, por ejemplo, VP-SFM (Invitrogen Corp., cat # 11681-020) o Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp., cat # 12309). Un proceso de adaptación a modo de ejemplo se describe en la Figura 3. Las células BHK adaptadas para su cultivo en un medio libre de suero pueden adaptarse adicionalmente para su cultivo en un medio libre de proteínas, tal como, por ejemplo, DMEM/F-12 (Invitrogen Corp., cat # 11039-021). Un procedimiento de adaptación a modo de ejemplo se describe en el Ejemplo 3. De manera preferente, DMEM/F-12 es complementado con aminoácidos adecuados y otros componentes, tales como, por ejemplo, Glutamina, hidrolizados de proteínas tales como HyPep 4601 (Quest International, cat # 5Z10419) y HyPep 1510 (Quest International, cat # 5X59053), Etanolamina (Sigma, cat# E0135), y Tropolona (Sigma, cat # T7387). Concentraciones adecuadas de cada complemento pueden ser determinadas empíricamente por aquellos expertos en el arte con experimentación de rutina.

Las proteínas de fusión Fc-EPO sintetizadas en células BHK cultivadas en un medio libre de proteínas están sialiladas en un mayor grado y muestran una sialilación más homogénea que la correspondiente proteína sintetizada en células cultivadas en un medio que contiene suero (*por ejemplo*, MEM + FBS) o un medio libre de suero pero no libre de proteína (*por ejemplo*, VP-SFM). Además, la proteína Fc-EPO obtenida de esta manera es sustancialmente no agregada, es decir, aproximadamente un 98% de la producción total es no-agregada. La producción de proteínas a partir de células BHK cultivadas en un medio libre de proteínas es similar a aquella a partir de células BHK cultivadas en medios que contienen suero, es decir, por encima de 10 microgramos/mililitro (mcg/ml). Por tanto, el cultivo en suspensión y/o en un medio libre de proteínas ofrece una serie de ventajas, que incluyen 1) la mejora de la farmacocinética de la proteína de fusión Fc-EPO que fue el resultado de la sialilación aumentada; y 2) facilitar los procesos de purificación downstream ya que las proteínas pueden ser purificadas a partir de células cultivadas en un medio de suspensión o en un medio vacío de proteínas.

Purificación.

La purificación de la Fc-EPO se realiza siguiendo procedimientos GMP estándar conocidos por aquellas personas expertas en el arte. La proteína es generalmente purificada hasta la homogeneidad o cerca de la homogeneidad. Las purificaciones cromatográficas, tales como aquellas que implican cromatografía en columna, son en general preferentes. En general, un esquema de purificación para una proteína de fusión Fc-EPO puede incluir, pero no se limita a, un paso inicial de captura de la proteína; un paso de inactivación viral; uno o más pasos de limpieza; un paso de eliminación viral; y un paso de formulación y/o concentración de la proteína. Por ejemplo, materiales de resina cromatográfica que se unen a la porción Fc de la proteína de fusión pueden utilizarse para capturar las proteínas Fc-EPO. Materiales de resina apropiados incluyen, pero no se limitan a, resinas acopladas a la Proteína A. Pueden ser incluidas etapas de limpieza para eliminar componentes contaminantes. Por ejemplo, la cromatografía con hidroxipatita, cromatografía en Sefarosa Q, cromatografía de exclusión por tamaños, o cromatografía de interacción hidrofóbica pueden ser utilizadas para eliminar contaminantes. Un método de purificación que utiliza una cromatografía en columna basada en Proteína A para unirse a la porción Fc y purificar la proteína de fusión Fc-EPO se describe en el Ejemplo 12, ya que es un método opcional para la inactivación y eliminación del virus. Las proteínas purificadas en general se concentran a una concentración deseada utilizando ultrafiltración; son diafiltradas en un tampón de formulación apropiada; esterilizadas con filtros; y distribuidas en viales.

Administración.

Composiciones farmacéuticas y vías de administración.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen la proteína Fc-EPO producida de acuerdo a la presente invención. Estas composiciones farmacéuticas pueden ser utilizadas para estimular la producción de glóbulos rojos y prevenir y tratar la anemia. Entre las condiciones tratables por la presente invención se incluyen la anemia asociada con una disminución o pérdida de la función renal (fallo renal crónico), anemia asociada a la terapia mielosupresora, como por ejemplo fármacos antivirales o quimioterapéuticos (tales como AZT), anemia asociada a la progresión del cáncer no-mieloide, anemia asociada a infecciones víricas (tales como el VIH), y la anemia de enfermedad crónica. También son tratables condiciones que pueden conducir a la anemia en un individuo de otro modo sano, tal como la pérdida prevista de sangre durante la cirugía. En general, cualquier condición tratable con rHuEPO puede también ser tratada con la proteína de fusión Fc-EPO de la invención.

Formulaciones que contienen proteínas Fc-EPO.

Generalmente, una formulación contiene una proteína Fc-EPO, un tampón y un surfactante en forma líquida o sólida. Las formulaciones sólidas incluyen además, pero no se limitan a, formulaciones liofilizadas, secadas por liofilización-atomización o secadas por atomización. Las formulaciones líquidas se basan preferentemente en agua, pero pueden

contener otros complementos, tales como, por ejemplo, etanol, propanol, propanediol o glicerol, por nombrar algunos.

5 Las proteínas Fc-EPO están formuladas en soluciones acuosas siguiendo procedimientos estándar GMP conocidos para aquellas personas expertas en el arte. En general, una formulación se genera mezclando volúmenes definidos de soluciones acuosas que comprenden constituyentes apropiados en concentraciones adecuadas. Por ejemplo, una formulación habitualmente contiene la proteína Fc-EPO en una concentración de 0.1 a 200 mg/ml, preferentemente de 0.2 a 10 mg/ml, más preferentemente de 0.5 a 6 mg/ml.

10 Componentes tampón incluyen cualquier sustancia fisiológicamente compatible que sean capaces de regular el pH, tales como, por ejemplo, sales de citrato, sales de acetato, sales de histidina, sales de succinato, sales de maleatos, sales de fosfato, sales de lactato, sus respectivos ácidos o bases o mezclas de las mismas. Los componentes tampón utilizados comúnmente son sales de citrato y/o su ácido libre. Una formulación contiene habitualmente un componente tampón en una concentración de 10 a 100 mmol/l, preferentemente de 2 a 20 mmol/l, más preferentemente 10 mmol/l.

15 Surfactantes para las formulaciones Fc-EPO pueden ser cualquier excipiente utilizado como surfactante en composiciones farmacéuticas, preferentemente ésteres de polietilen-sorbitán (Tweens®), tales como, monolaurato de sorbitano polioxietileno (20), monopalmitato de sorbitán polioxietileno (20), monoestearato de sorbitán polioxietileno (20), y copolímeros de polioxipropileno-polioxietileno. Una formulación habitualmente contiene un surfactante a una concentración de 0.001 a 1.0% p/v, más preferentemente de 0.01 a 0.5% p/v.

20 Una formulación puede también contener uno o más aminoácidos. Aminoácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, arginina, histidina, ornitina, lisina, glicina, metionina, isoleucina, leucina, alanina, fenilalanina, tirosina, y triptófano. En un modo de realización, una formulación de la Fc-EPO contiene glicina. Preferentemente, los aminoácidos se utilizan en forma de sales, por ejemplo, una sal de clorhidrato. Las concentraciones de aminoácidos aplicables se encuentran en un rango de 2 a 200 mmol/L, o de 50 a 250 mmol/L.

25 De manera adicional, una formulación puede contener azúcares tales como sacarosa, trehalosa, sorbitol; antioxidantes tales como ácido ascórbico o glutatión; conservantes tales como fenol, m-cresol, metil-propilparabeno; clorobutanol; tiomersal; cloruro de benzalconio; polietilenglicoles; ciclodextrinas y otros componentes adecuados.

30 Resulta deseable que la formulación Fc-EPO sea isotónica. Por ejemplo, la osmolalidad de una formulación puede encontrarse en un rango de 150 a 450 mOsmol/kg. Las formulaciones farmacéuticas deben ser estables para la vida de almacenamiento deseada a la temperatura de almacenamiento deseada, tal como e 2-8°C, o a temperatura ambiente. Una formulación útil que contiene una proteína Fc-EPO se tolera bien fisiológicamente, es fácil de producir, puede dosificarse de forma precisa, y es estable durante su almacenaje a 2°C – 8°C o 25°C, durante múltiples ciclos de congelación-descongelación y esfuerzo mecánico, además de otros esfuerzos tales como el almacenaje durante al menos 3 meses a 40°C. La estabilidad de las formulaciones de Fc-EPO puede ser evaluada en una prueba de
35 estrés. Una prueba de estrés se describe en el Ejemplo 13.

Administración.

Las composiciones terapéuticas que contienen las proteínas de fusión Fc-EPO producidas de acuerdo a la presente invención pueden ser administradas a un anfitrión mamífero mediante cualquier vía. Por tanto, según resulte apropiado, la administración puede realizarse por vía oral o parenteral (*por ejemplo, i.v., i.a., s.c., i.m.*), incluyendo
40 las vías de administración intravenosa e intraperitoneal. Además, la administración puede realizarse mediante inyecciones periódicas de un bolo del agente terapéutico o puede realizarse de forma más continua por administración intravenosa o intraperitoneal desde un depósito que sea externo (*por ejemplo, un contenedor de líquido intravenoso*). En ciertos modos de realización, el agente terapéutico de la presente invención puede ser de grado farmacéutico. Es decir, ciertas realizaciones cumplen con el estándar de pureza y control de calidad que se
45 requiere para su administración a humanos. Las aplicaciones veterinarias también se encuentran dentro del sentido deseado, tal como se utiliza en la presente patente.

Las formulaciones, tanto para uso médico veterinario como para su uso médico humano, del agente terapéutico de acuerdo a la presente invención incluye, habitualmente, dicho agente terapéutico en asociación con un soporte farmacéuticamente aceptable y de manera opcional otro(s) ingrediente(s). El soporte(s) puede ser "aceptable" en el
50 sentido de ser compatible con los otros ingredientes de las formulaciones y no nocivo para el receptor del mismo. Los soportes farmacéuticamente aceptables, a este respecto, están pensados para incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con su administración farmacéutica. El uso de tales medios o agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en el arte. Excepto en la medida en que
55 cualquier medio o agente sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones. Compuestos activos suplementarios pueden también ser incorporados a las composiciones. Las formulaciones pueden ser presentadas convenientemente en forma de unidades de dosificación y puede ser preparada mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en el arte de la farmacia/ microbiología. En general,

algunas formulaciones se preparan produciendo el agente terapéutico en asociación con un soporte líquido o un soporte sólido finamente dividido o ambos, y entonces, si fuera necesario, conformando el producto con la formulación deseada.

5 Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con la vía de administración por la que se va a administrar. Ejemplos de vías de administración incluyen la vía oral o parenteral, *por ejemplo*, vía intravenosa, intradérmica, inhalación (*por ejemplo*, tras la nebulización), transdérmica (vía tópica), transmucosa, nasal, bucal, y administración por vía rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea, pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como el ácido ascórbico o el bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como el cloruro sódico o la dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases, tales como el ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

15 Un método preferente de administración para los productos de proteína Fc-EPO de la invención es mediante vías parenterales (por ejemplo, IV, IM, SC, o IP) y las composiciones administradas incluirían de manera habitual cantidades terapéuticamente efectivas del producto en combinación con diluyentes aceptables, soportes y/o adyuvantes. Se espera que las dosis efectivas varíen sustancialmente dependiendo de la condición tratada, pero actualmente se pretende que las dosis terapéuticas se encuentren en un rango de 0.2 a 2 mcg/kg de peso corporal del material activo. Diluyentes estándar tales como la seroalbúmina humana se contemplan para las composiciones farmacéuticas de la invención, ya que son soportes estándar tales como el suero fisiológico. Los materiales adyuvantes adecuados para su uso en las composiciones de la invención incluyen compuestos observados de manera independiente por sus efectos estimuladores eritropoyéticos, tales como testosteronas, estimuladores de células progenitoras, factor de crecimiento similar a la insulina, prostaglandinas, serotonina, AMP cíclico, prolactina y triyodotironina, además de agentes en general utilizados en el tratamiento de la anemia aplásica, tal como metelonona, estanozolol y nandrolona. *Ver, por ejemplo*, Resegotti, et al. (1981), Panminerva Medics, 23, 243-248; McGonigle, et al., (1984) *Kidney Int.*, 25(2), 437-444; Pavlovic-Kantera, et al., (1980) *Expt. Hematol.*, 8(Supp. 8), 283-291; y Kurtz, (1982) *FEBS Letters*, 14a(1), 105-108.

20 También se contemplan como adyuvantes las sustancias de las que se sabe que aumentan los efectos de, o sinergizan con, FC-EPO, tales como los agonistas adrenérgicos, hormonas tiroideas, andrógenos y BPA además de los tipos de compuestos denominados "factores eritropoyéticos hepáticos" (ver Naughton et al., (1983) *Acta. Haemat.*, 69, 171-179) y "eritrotropinas" tal como se describe en Congote et al. en Abstract 364, Proceedings 7th International Congress of Endocrinology (7º Congreso Internacional de Endocrinología), ciudad de Quebec, Quebec, Jul. 1-7, 1984; Congote (1983), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 115(2), 447-483; y Congote, (1984), *Anal. Biochem.*, 140, 428-433, y "eritrogeninas", tal como se describe en Rothman, et al., (1982), *J. Surg. Oncol.*, 20, 105-108.

35 Soluciones útiles para la administración oral o parenteral pueden ser preparadas mediante cualquier método que sea bien conocido en el arte farmacéutico, descrito, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Ciencias Farmacéuticas), (Gennaro, A., ed.), Mack Pub., 1990. Las formulaciones para la administración parenteral pueden también incluir glicocolato para la administración oral, metoxisalicilato para la administración por vía rectal, o ácido cítrico para la administración por vía vaginal. La preparación parenteral puede ser incluida en ampollas, jeringas desechables o múltiples viales de dosificación realizados en plástico o cristal. También pueden prepararse supositorios para su administración por vía rectal mezclando el fármaco con un excipiente no irritante tal como la manteca de cacao, otros glicéridos, u otras composiciones que se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente y en estado líquido a temperatura corporal. Las formulaciones también pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados, y similares. Las formulaciones para la administración directa pueden incluir glicerol y otras composiciones de alta viscosidad. Otros soportes parenterales potencialmente útiles para estos agentes terapéuticos incluyen partículas del copolímero de etilen-vinil acetato, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para la administración por inhalación pueden contener como excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contengan, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y deoxicolato, o soluciones aceitosas para su administración en forma de gotas nasales, o como un gel para ser aplicado intranasalmente. Los enemas de retención también pueden utilizarse para la administración por vía rectal.

40 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (en el caso de que sean hidrosolubles) o dispersiones y polvo estéril para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los soportes adecuados incluyen suero fisiológico, agua bacteriostática, Cremofor EL TM (BASF, Parsippany NJ) o tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). En todos los casos, la composición puede encontrarse estéril y puede estar fluida hasta el grado de que exista de jeringabilidad. Puede mantenerse estable bajo la condiciones de elaboración y almacenaje y puede preservarse de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El soporte puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas apropiadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de

partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser ocasionada incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monostearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización por filtrado. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo que en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los que se han enumerado anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de las soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización lo que produce un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente deseado, de una solución del mismo previamente esterilizada por filtrado.

En un modo de realización, los agentes terapéuticos se preparan con soportes que protegerán de la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como etileno-vinilo acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones resultarán evidentes para aquellos expertos en el arte. Los materiales también pueden ser obtenidos comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden utilizarse suspensiones liposomales como soportes farmacéuticamente aceptables. Éstas pueden prepararse de acuerdo a métodos conocidos por aquellos expertos en el arte, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense U.S. Patent No. 4,522,811. También pueden utilizarse microsomas y micropartículas.

Las composiciones por vía oral o parenteral pueden ser formuladas en forma de unidades de dosificación para facilitar su administración. La forma de unidad de dosificación hace referencia a unidades físicamente separadas adaptadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a ser tratado; donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte farmacéutico requerido. La especificación de las formas de las unidades de dosificación de la invención vienen dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico en particular que se quiere lograr, y a las limitaciones inherentes al arte de la composición de un compuesto activo de esas características para el tratamiento de individuos.

Determinar la cantidad terapéuticamente efectiva de Fc-EPO y la frecuencia de dosificación.

En general, el agente terapéutico que contiene las proteínas de fusión Fc-EPO producidas de acuerdo a la presente invención puede ser formulados para su administración oral o parenteral a humanos u otros mamíferos, por ejemplo, en cantidades terapéuticamente efectivas, es decir, cantidades que proporcionan concentraciones apropiadas del fármaco a un tejido diana durante el tiempo suficiente para inducir el efecto deseado. De manera más específica, tal como se utiliza en la presente patente, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" hace referencia a una cantidad de proteínas de fusión Fc-EPO que proporcionan un aumento en el hematocrito hasta un hematocrito diana, o hasta un rango diana de hematocritos que proporciona beneficio a un paciente o, de manera alternativa, mantiene un paciente en un hematocrito diana, o dentro de un rango diana de hematocritos. La cantidad variará de un individuo a otro y dependerá de una serie de factores, que incluyen la condición física general del paciente, la gravedad y la causa subyacente de la anemia y el hematocrito diana final para el paciente individual. Un hematocrito diana se encuentra habitualmente en al menos un 30%, o en un rango de 30%-38%, preferentemente por encima de 38% y más preferentemente 40%-45%. Guías generales en relación a los rangos diana de hematocritos para rHuEpo se encuentran también en el paquete de EPOGEN® con fecha insertada de 23/12/1996 y se encuentran entre 30%-36%, o de manera alternativa 32%-38% como consta expuesto en el mismo. Se entiende que dichas dianas variaran de un individuo a otro de tal manera que el criterio del médico puede resultar apropiado para determinar un hematocrito diana real para cualquier paciente dado. Sin embargo, determinar un hematocrito diana está enmarcado dentro del nivel de experiencia en el arte.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína Fc-EPO puede ser fácilmente determinada por un experto en el arte. El ejemplo 15 establece un protocolo clínico que tiene como objetivo determinar una cantidad terapéuticamente efectiva de una Fc-EPO en dosis de una vez por semana, una vez cada dos semanas, y una vez al mes. Por ejemplo, el rango de la dosis para una administración para una vez al mes o para dos veces al mes va desde aproximadamente 0.075 hasta aproximadamente 4.5 mcg de Fc-EPO por Kg por dosis. El rango de la dosis para una administración para una vez al mes es de 0.45 a 4.5 mcg de Fc-EPO por Kg por dosis.

La concentración efectiva de la proteína de fusión Fc-EPO de la invención que va a administrarse en una composición terapéutica variará dependiendo de una serie de factores, que incluyen la dosificación final deseada del fármaco que se va a administrar y de la vía de administración. La dosificación preferente a ser administrada es posible que además dependa de tales variables como el tipo y el grado de enfermedad o indicación a ser tratada, el estado general de salud del paciente en particular, la eficacia biológica relativa (por ejemplo, nivel de sialilación) de

el agente terapéutico administrado, la formulación del agente terapéutico, la presencia y el tipo de excipientes en la formulación, y la vía de administración. En algunos modos de realización, el agente terapéutico de la presente invención, puede proporcionarse a un individuo utilizando unidades de dosificación habituales deducidas a partir de estudios en mamíferos, utilizando primates no humanos y roedores. Tal y como se describe en la presente patente, una unidad de dosificación hace referencia a una dosis unitaria que puede administrarse a un paciente, y que puede ser manipulada y envasada fácilmente, permaneciendo como una unidad de dosificación biológicamente estable que comprende o bien el agente terapéutico como tal, o una mezcla del mismo con diluyentes o soportes farmacéuticos sólidos o líquidos.

La frecuencia de dosificación para un agente terapéutico que contiene la proteína Fc-EPO variará dependiendo de la condición a ser tratada y el hematocrito diana, pero en general será menor de tres veces por semana. La frecuencia de dosificación puede ser de aproximadamente una o dos veces por semana. La frecuencia de dosificación puede ser menor de aproximadamente una vez por semana, por ejemplo aproximadamente una vez cada dos semanas (aproximadamente una vez cada 14 días), una vez por mes o una vez cada dos meses. Se entiende que las frecuencias de dosificación utilizadas realmente pueden variar de alguna manera de las frecuencias reveladas en la presente patente, debido a las variaciones en las respuestas de diferentes individuos a la eritropoyetina y sus análogos; el término "aproximadamente" pretende reflejar dichas variaciones.

La invención además prevé la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de hierro a fin de mantener una eritropoyesis aumentada durante la terapia. La cantidad que se va a dar puede ser fácilmente determinada por una persona experta en el arte en base a la terapia con rHuEPO. De manera adicional, el agente terapéutico de la presente invención puede ser administrado en solitario o en combinación con otras moléculas que se conoce que tienen un efecto beneficioso en la enfermedad o indicación en particular de interés. A modo de ejemplo únicamente, cofactores útiles incluyen cofactores de alivio de síntomas, incluyendo agentes antisépticos, antibióticos, antivirales y antifúngicos, y analgésicos y anestésicos.

Profármaco.

Los agentes terapéuticos de la invención también incluyen los derivados "profármacos". El término profármaco hace referencia a un derivado farmacológicamente inactivo (o parcialmente inactivo) de una molécula parental que requiere biotransformación, ya sea espontánea o enzimática, dentro del organismo para liberar o activar el componente activo. Los profármacos son variaciones o derivados de los agentes terapéuticos que presentan grupos que se pueden dividir bajo condiciones metabólicas. Los profármacos se convierten en agentes terapéuticos de la invención que son farmacéuticamente activos *in vivo*, cuando se someten a solvolisis bajo condiciones fisiológicas o se someten a degradación enzimática. Un profármaco de la presente invención puede denominarse sencillo, doble, triple, y así sucesivamente, dependiendo de la cantidad de pasos de biotransformación requerida para liberar o activar el componente activo del fármaco dentro del organismo, y indicando la cantidad de funcionalidades presentes en una forma de tipo precursor. Las formas profármaco ofrecen a menudo ventajas de solubilidad, compatibilidad de tejidos, o liberación retrasada en el organismo de mamíferos (ver, Bundgard, (1985) Design of Prodrugs (Diseño de Profármacos), pp. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam; Silverman, (1992) The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action (La Química Orgánica del Diseño de Fármacos y de la Acción de Fármacos), pp. 352-401, Academic Press, San Diego, Calif.). Más aún, los derivados profármacos de acuerdo a la presente invención pueden ser combinados con otras características para aumentar la biodisponibilidad.

Expresión in vivo.

La proteína de fusión Fc-EPO de la presente invención puede ser proporcionada mediante métodos de expresión *in vivo*. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión Fc-EPO puede ser proporcionado de manera ventajosa directamente a un paciente que sufre de trastornos o deficiencia hematopoyéticos, o puede ser proporcionado a una célula *ex vivo*, seguido de la administración de la célula viva al paciente. Los métodos de terapia génica *in vivo* conocidos en el arte incluyen proporcionar ADN purificado (por ejemplo, como en un plásmido), proporcionando el ADN en un vector viral, o proporcionando el ADN en un liposoma u otra vesícula (ver, por ejemplo, la patente estadounidense U.S. Patent No. 5,827,703, que revela soportes lípidos para su uso en terapia génica, y la patente estadounidense U.S. Patent No. 6,281,010, que proporciona vectores adenovirales útiles en la terapia génica).

Se conocen además métodos para el tratamiento de la enfermedad mediante implantación de una célula que ha sido modificada para expresar una proteína recombinante. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense U.S. Patent No. 5,399,346, que revela métodos para introducir un ácido nucleico en una célula humana primaria para su introducción en un humano.

Los métodos de expresión *in vivo* resultan particularmente útiles para administrar una proteína directamente a los tejidos o compartimentos celulares diana sin purificación. En la presente invención, la terapia génica que utiliza la secuencia que codifica la Fc-EPO puede tener su uso en una variedad de estados de enfermedades, trastornos y estados de irregularidad hematológica incluyendo la anemia, en particular la corrección de la anemia del tipo asociado con fallo renal crónico y similares. Una secuencia de ácido nucleico para una proteína de fusión Fc-EPO puede ser insertada en un casete de expresión o transcripción apropiado, e introducido en un huésped mamífero tal

como ADN desnudo o en complejo con un soporte apropiado. La monitorización de la producción de la proteína Fc-EPO activa puede ser llevada a cabo mediante hibridación del ácido nucleico, ELISA, hibridación western, y otros métodos adecuados conocidos para expertos habituales en el arte.

5 Se ha observado que una pluralidad de tejidos pueden ser transformados después de la administración sistémica de transgenes. La expresión del ADN exógeno a continuación de la inyección intravenosa de un complejo soporte lípido catiónico/ADN exógeno en un huésped mamífero se ha mostrado en múltiples tejidos, incluyendo linfocitos T, sistema reticuloendotelial, células cardíacas endoteliales, células pulmonares y células de la médula ósea, *por ejemplo*, células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea.

10 La tecnología de la administración de la terapia génica *in vivo* tal como se describe en la patente estadounidense U.S. Patent No. 6,627,615, no es tóxica en animales y se ha demostrado que la expresión transgénica dura al menos 60 días después de una única administración. El transgen no parece integrarse en el ADN de la célula hospedadora en niveles *in vivo* detectables según se ha medido mediante análisis Southern, lo que sugiere que esta técnica para la terapia génica no causará problemas para el mamífero huésped mediante la modificación de la expresión de genes de células normales que activan los oncogenes que causan cáncer, o neutralizando los genes supresores de tumores que previenen el cáncer.

Ejemplos.

Algunos de los ejemplos describen modos de realización que son apropiados como compuestos de referencia para las realizaciones según se reivindican.

Ejemplo 1. Constructos que codifican proteínas de fusión Fc-EPO.

20 El plásmido pHc10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-BPO que codifica una proteína de fusión Fc-EPO que contiene una porción de eritropoyetina normal, y el plásmido pHc10-Feg2h(FN→AQ)-M1-EPO(NDS) que codifica una proteína de fusión Fc-BPO con mutaciones NDS se construyeron como sigue a continuación.

25 La secuencia de ácido nucleico que codifica una eritropoyetina fue optimizada con codón para una expresión alta en células de mamíferos. Por ejemplo, SEQ ID NO:3 muestra un ejemplo de secuencias de codificación de eritropoyetina madura humana con codones modificados para optimizar la traducción. La secuencia del extremo 5' fue también modificada para incluir un sitio Sma I para facilitar la subclonación.

SEQ ID NO:3

**CCCCGGGtGCCCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTgCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCA
 AGGAGGCCGAGAATATCACGACcGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAAcATCACcGTg
 CCTGACACCAAAGTgAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTtGGcCAGCAGGCCGTAGAAGT
 gTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTCGGAAGCTGTCTCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTT
 CCCAGCCGTGGGAGCCCCCTGCAaCTGCATGTGGATAAAGCCGTgAGTGGCCTTCGCAGCCTCACC
 ACTCTGCTTCGGGCTCTGgGAGCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGC
 TCCcCTCCGcACAATCACTGCTGACACTTCCGCAAACCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCC
 GGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCTgCcGGACAGGGGACAGATGActcgag**

30 (Las letras minúsculas indican diferencias de base de la secuencia de codificación de la eritropoyetina humana del tipo silvestre. Se prevé que los cambios aumentan el nivel de expresión en células de mamíferos pero no cambian la secuencia de la proteína expresada).

35 Las mutaciones NDS se introdujeron en la porción eritropoyetina mediante mutagénesis dirigida al sitio, tal como se describe en la publicación de la PCT WO 01/36489. Por ejemplo, se utilizó un fragmento de ADN Xma 1-who I que contiene una forma de la secuencia de codificación de la eritropoyetina humana con mutaciones que dan como resultado las sustituciones de aminoácidos His32Gly, Cys33Pro, Trp88Cys, y Pro90Ala, tal como se revela en WO01/36489. La secuencia de proteína correspondiente se muestra en SEQ ID NO:4.

**APPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEGPSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQ
 GLALLSEAVLRGQALLVNSSQPCEGLQLHVDKAVSGLRSLTLLRRLGAQKEAISPDAASAAPL
 RTITADTFRKLFVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:4)**

Una porción Fc híbrida, que incluye un dominio CH2 derivado de la IgG2 y una región bisagra derivada de la IgG1, se construyó tal como se describe en la patente estadounidense U.S. Patent Publication No. 20020147311 y, por ejemplo, en WO 01/058957.

- 5 El fragmento de ADN Xma I-Xho I que codifica una forma de eritropoyetina fue insertada en un vector plásmido, por ejemplo, pdCs-Fc-X, que codifica una región bisagra modificada de la IgG1 y una región CH2 y CH3 de la IgG2, a excepción de que hubiera dos conjuntos de mutaciones (a las que se hace referencia en la presente patente como mutaciones M1) que dieron como resultado sustituciones de aminoácidos en la región del C-terminal de CH3, de tal manera que la secuencia en la unión del C-terminal de CH3 y el N-terminal de EPO sea como sigue a continuación:

.... TQKSATATPGA-APPRLI(SEQ ID NO:5)

- 10 El primer conjunto de mutaciones, que cambian la secuencia KSLSLSPG (SEQ ID NO:6) de la región CH3 de la IgG2 a KSATATPG (SEQ ID NO:7), se revela en WO 02/079232. El efecto de la sustitución de Leu-Ser-Leu-Ser (posición 3 a posición 6 de SEQ ID NO:6) con Ala-Thr-Ala-Thr (posición 3 a posición 6 de SEQ ID NO:7) es eliminar epítomos de linfocitos T no propios potenciales que pueden surgir porque la unión entre la eritropoyetina humana y la Fc humana contiene secuencias de péptidos no propios. El segundo conjunto que consiste en una única sustitución de aminoácidos de K a A en el aminoácido C-terminal de la región CH3, se revela en WO 01/58957.

- 15 El vector de expresión pdCs-Fc-X para la expresión de las proteínas de fusión Fc fue descrito por Lo et al., Protein Engineering (Ingeniería de Proteínas) 11:495. EL plásmido pH10-Fc-X fue construido a partir de pdCs-Fc-X reemplazando la región de codificación del gen dihidrofolato reductasa (DHFR) que confiere resistencia al metotrexato con el gen que confiere resistencia a la Higromicina B. Un fragmento de ADN de Higromicina B Nhe I/Nsi se obtuvo mediante amplificación PCR del gen de la Higromicina B a partir del plásmido modelo pCEP4 (Invitrogen), utilizando los cebadores 5'-GCTAGCTTGGTGCCCTCATGAAAAAGCCTGAAGTC-3' (SEQ ID NO:8) y 5' -ATGCATTAGCTTAGCTCCCATC-3' (SEQ ID NO:9). El fragmento PCR se clonó en el vector de clonación TA pCR2.1 (Invitrogen), y su secuencia confirmada.

- 25 El plásmido pH10-Fcg2h-M1-EPO(NDS) se generó mediante ligamiento triple de los fragmentos de ADN Nhe I/Afl I y Afl II/Nsi I a partir de pdCs-Fcg2h-M1-EPO(NDS) y del fragmento de Higromicina B Nhe I/Nse I.

- De manera adicional, una mutación que conduce a una sustitución doble de aminoácidos, "FN>AQ", dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser dentro del dominio CH2 de la cadena pesada de la IgG2 que elimina un epítipo potencial de linfocitos T, y la glicosilación N-ligada en la porción Fc fue introducida mediante mutagénesis por PCR. Los cebadores mutagénicos 5'-AGCAGGCCAGAGCAGTTCGGTGTGGT-3' (SEQ ID NO:10) y 5'-GAACGTGCTCTGGGCCTGCTCCTCCCGT-3' (SEQ ID NO:11) se emparejaron respectivamente con un cebador downstream que contiene un sitio Sac II 5'-CCCGCGGGTCCCACCTTTGG-3' (SEQ ID NO:12) y un cebador upstream que contiene un sitio Pvu II 5'-CCCAGCTGGGTGCTGACACGT-3' (SEQ ID NO:13), y dos fragmentos de ADN que se solapan fueron amplificados a partir del ADN modelo pdC10-Fcg2h-M1-EPO(NDS). En una segunda ronda de amplificación, un fragmento Pvu II/Sac II que contiene la mutación (FN→AQ) fue amplificada utilizando el cebador upstream (SEQ ID NO:13) y el cebador downstream (SEQ ID NO:12) a partir de los productos de PCR de la primera ronda de amplificación. El fragmento Pvu II/Sac II fue clonado en un vector TA pCR2.1 (Invitrogen), y su secuencia verificada. El constructo pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO(NDS) fue generado a partir de un ligamiento triple del fragmento Pvu II/Sac II, un fragmento Xho I/Sac II pdC10-Fcg2h-M1-EPO, y un fragmento Xho I/Pvu II de pdC10-Fcg2h-M1-EPO(NDS).

- 40 Para introducir la mutación FN>AQ en el plásmido pH10-Fcg2h-M1-EPO, los fragmentos apropiados de ADN de pH10-Fcg2h-M1-EPO y de pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO se combinaron. Los constructos pH10-Fcg2h-M1-EPO y pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO fueron digeridos con Xho I y Xba I, y el fragmento 5.7 kb Xho I/Xba I pH10-Fcg2h-M1-EPO(NDS) fue ligado con el fragmento 1.9 kb pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO, generando pH10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO.

- 45 Para introducir la mutación FN>AQ en el plásmido pH10-Fcg2h-M1-EPO(NDS), los dos fragmentos apropiados Xho I/Sma I digeridos de pH10-Fcg2h-M1-EPO(NDS) y de pH10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO fueron ligados entre sí, generando pH10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO(NDS).

La secuencia de aminoácidos de la Fc-EPO codificada por pdC10-huFcg2h(FN→AQ)-M1-EPO se muestra en SEQ ID NO:14.

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLT
VDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSATATPGAAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTCG
AEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAQAVEVWQGLALLSEAVLRGOALLVNSSQPWEPLQLH
VDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVRVYSNFLRGKCLKLYTGE
ACRTGDR (SEQ ID NO:14)

La secuencia de aminoácidos de FC-EPO(NDS) codificada por pdC10-huFcg2h(FN→AQ)-M1-EPO(NDS) se muestra en SEQ ID NO:15.

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQAQSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGDGSFFLYSKLT
VDKSRWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSATATPGAAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTCG
AEGPSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAQAVEVWQGLALLSEAVLRGOALLVNSSQPCEALQLH
VDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFVRVYSNFLRGKCLKLYTGE
ACRTGDR (SEQ ID NO:15)

- 5 La formación de secuencia subrayada representa la porción EPO, la secuencia con doble subrayado representa la región bisagra de la IgG, y la secuencia no subrayada representa el dominio CH2 y CH3 de la cadena de IgG modificada, en donde la secuencia escrita en cursiva representa el dominio CH3.

Ejemplo 2. Expresión de Fc-EPO en varias líneas celulares.

10 Para un rápido análisis de la proteína de fusión, un plásmido, phC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO(NDS) o phC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO, se introdujo en células de cultivo de tejido adecuadas, mediante métodos de transfección estándar, tales como, por ejemplo, mediante coprecipitación de ADN mediada por fosfato cálcico (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press), o mediante lipofección utilizando Lipofectamina Plus (Life Technologies), según el protocolo del fabricante.

15 Para obtener células BHK-21 transfectadas de manera estable, un plásmido, phC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO(NDS) o phC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-BPO, se introdujo en las células BHK-21 por electroporación. Para una electroporación de alta eficiencia, las células BHK-21, cultivadas en un medio MEM (complementado con aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio tal como es recomendado por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés), se lavaron una vez con PBS (Tampón de fosfato salino, PBS por sus siglas en inglés); y aproximadamente 5×10^6 células fueron resuspendidas en 0.5 ml de PBS e incubadas con 10 µg de ADN plasmídico linearizado en una cubeta Gene Pulser™, con una separación de las puntas del electrodo de 0.4 cm (BioRad, Hercules, CA), en hielo durante 10 min. La electroporación se llevó a cabo utilizando un Gene Pulser™ (BioRad, Hercules, CA) con configuraciones a 0.25 V y 500 µF. Se permitió que las células se recuperaran durante 10 minutos en hielo, fueron re-suspendidas en un medio de cultivo, y se colocaron en dos placas de 96 pocillos. La higromicina B (Hyg B) se añadió al medio de cultivo dos días después de la transfección en una concentración de 300 microgramos/ml. Las células se alimentaron cada 3 días dos a tres veces más, y los clones estables resistentes a la Hyg B aparecieron en 2 a 3 semanas.

20 Para identificar clones estables que producen altos niveles de la proteína de fusión Fc-EPO, los sobrenadantes de clones fueron sometidos a ensayo mediante ELISA con anticuerpos anti-Fc. Los clones de alta producción se aislaron y propagaron en un medio de cultivo que contiene 300 microgramos/ml de Hyg B. Con fines de producción de proteínas, las células BHK-21 se cultivaron de forma rutinaria en un medio complementado con DMEM/F-12, o en otro medio adecuado tal como VP-SFM (Life Technologies). La proteína de fusión Fc-EPO se cosecharon a partir del medio condicionado mediante filtración de flujo normal estándar, y el material clarificado se almacenó a 4 grados Celsius hasta una purificación mayor. Habitualmente, en un modo de producción en frascos rotativos, se obtuvieron producciones de 6 – 12 mcg/ml de proteínas Fc-EPO a partir de células BHK-21.

También, las proteínas de fusión Fc-BPO se expresaron en y recuperaron de células NS/0. Los clones de NS/0 que mantienen estable el plásmido pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO o pdC10-Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO(NDS) fueron establecidos mediante métodos previamente descritos en la publicación de la PCT WO 01/36489. Habitualmente, se obtuvieron producciones de 50 – 100 mcg/ml de proteína Fc-EPO a partir de células NS/0.

5 **Ejemplo 3. Adaptación de células BHK para su cultivo en una suspensión y/o en un medio libre de proteínas.**

10 BHK es una línea celular adherente, cultivada comúnmente en medios que contienen suero, tales como, por ejemplo, MEM + 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor. Para mantener y expandir las células BHK, éstas son periódicamente (*por ejemplo*, en intervalos de 4 días) separadas de su sustrato, de manera habitual mediante la acción de una solución de tripsina-EDTA, diluidas en medios frescos y sembradas nuevamente en recipientes apropiados. Sin embargo, las células BHK pueden ser adaptadas para su cultivo en una suspensión y en medios libres de proteína y/o suero mediante los siguientes procedimientos.

15 En un proceso de adaptación habitual, las células BHK se cultivaron primero en una mezcla a 75:25 (v/v) de MEM+FBS: medio diana hasta la fase exponencial, y posteriormente subcultivadas a una densidad de células apropiada en 50:50 (v/v), 25:75 (v/v), y finalmente 0:100 (v/v) de medio original: medio diana. Durante el proceso de adaptación el crecimiento de células BHK fue monitorizado mediante inspección visual. Se evaluaron para su adaptación los siguientes medios libres de suero: 293 SFM II (Invitrogen Corp., cat # 11686-929), CHO-S-SFM II (Invitrogen Corp., cat # 12052-098), VP-SFM (Invitrogen Corp., cat # 11681-020), Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp., cat # 12309), CD Hibridoma (Invitrogen Corp., cat # 11279-023), y H-SFM (Invitrogen Corp., cat # 12045-076).

20 Para cambiar células BHK de una línea celular adherente a una línea celular en suspensión durante el proceso de adaptación, la mezcla del cultivo se dejó asentar antes de cada pasaje, y el 25% de la parte superior de la suspensión celular fue extraída y diluida en un medio fresco. Debido a que las células que se agregan se establecen en la parte inferior de los recipientes de cultivo más rápidamente que las células sencillas y dobles, el 25% de la parte superior de la suspensión celular generalmente contiene aquellas células que muestran la menor cantidad de agregación. Por tanto, cada pasaje expande y enriquece las células BHK menos propensa a la agregación, y las líneas celulares en suspensión de clones de BHK que expresan proteínas Fc-EPO fueron establecidas mediante este método.

25 Se observó que las células BHK que expresan las proteínas Fc-EPO podrían ser adaptadas para su cultivo en medios libres de suero VP-SFM o Opti-PRO SFM, y se obtuvo cultivos en suspensión. Las células BHK que expresan las proteínas de fusión Fc-EPO no pudieron cultivarse en los siguientes medios libres de suero: 293 SFM II, CHO-S-SFM II, CD Hibridoma, y H-SFM.

30 Las células BHK adaptadas al medio libre de suero, VP-SFM, fueron adaptadas adicionalmente para cultivarse en un medio libre de proteínas, *por ejemplo*, DMEM/F-12 (Invitrogen Corp., cat # 11039-021) mediante el cultivo secuencial de las células BHK, a una densidad celular apropiada, en una mezcla a 75:25 (v/v), 50:50 (v/v), 25:75 (v/v), y finalmente 0:100 (v/v) de VP-SFM : DMEM/F-12. El medio libre de proteína DMEM/F-12 fue complementado con Glutamina (6 mM final), 2 g/l HyPep 4601 (Quest International, Chicago, IL, cat # 5Z10419), 2 g/l HyPep 1510 (Quest International, Chicago, IL, cat # 5X59053), 10 PI/I (v/v) Etanolamina (Sigma, cat# E0135), and 5 PM Tropolona (Sigma, cat # T7387). Una línea celular que expresa de manera estable la proteína de fusión Fc-EPO aceptable para cultivarse en DMEM/F-12, se obtuvo mediante este método y se mantuvo en un nivel alto de viabilidad celular.

40 **Ejemplo 4. Purificación y caracterización del estado de agregación de proteínas.**

Para su análisis, las proteínas de fusión Fc-EPO fueron purificadas a partir de sobrenadantes de cultivo celular por cromatografía con Proteína A, en base a la afinidad de la porción Fc para la Proteína A. El sobrenadante condicionado a partir de células que expresan las proteínas Fc-EPO, se cargaron en una columna de flujo rápido de Proteína A – Sefarosa equilibrada previamente. La columna se lavó ampliamente con un tampón de fosfato de sodio (150 mM de fosfato de sodio, 100 mM de NaCl en pH neutro). La proteína enlazada se eluyó mediante un tampón de fosfato de sodio (composición como figura anteriormente) de pH bajo (pH 2.5 – 3) y las fracciones eluidas fueron inmediatamente neutralizadas.

50 Para valorar el estado de agregación de las proteínas de fusión Fc-EPO producidas mediante diferentes líneas celulares, las muestras de Proteína A purificadas fueron analizadas por cromatografía analítica de exclusión por tamaños (SEC, por sus siglas en inglés). Las muestras fueron fraccionadas mediante HPLC-SEC (*por ejemplo*, Super 3000 SW, TosoHaas, Montgomeryville, PA), en un periodo de 15 minutos a una tasa de flujo de 0.35 ml/min. Una porción sustancial de las proteínas Fc-EPO (*por ejemplo*, hasta un 90% a 100% de la producción total) producidas a partir de células BHK no fueron agregadas. Más aún, las muestras de proteínas de fusión Fc-EPO analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) de reducción (en geles premoldeados de NuPAGE 4% - 12%, NuPAGE, Novex) revelaron sustancialmente una banda única, lo que indica que los productos eran resistentes a la degradación bajo procedimientos operativos estándar.

Las proteínas de fusión Fc-EPO purificadas a partir de células BHK cultivadas en suspensión, en medios libres de suero, y/o libres de proteínas fueron caracterizadas además mediante SDS-PAGE y SEC analítico, tal como se ha descrito con anterioridad. Se observó que las proteínas fueron sustancialmente no agregadas y no degradadas, al igual que las proteínas sintetizadas en células BHK cultivadas en medios que contienen suero.

5 Ejemplo 5A. Caracterización de los patrones de glicosilación.

La serina 126 en la eritropoyetina humana se encuentra en una secuencia compatible con la O-glicosilación, y se conserva en todas las proteínas de eritropoyetina de mamíferos. Sin embargo, la serina 126 se encuentra en un "lazo flexible" que no se compacta con fuerza al resto de la proteína, En la ausencia de la O-glicosilación, esta región de la eritropoyetina podría ser particularmente sensible a la proteólisis.

10 El estado de O-glicosilación en Ser126 en las proteínas Fc-EPO producidas en diferentes líneas celulares fue examinada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) en fase reversa. Las muestras fueron desnaturalizadas y reducidas, diluidas en 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), e inyectada en una columna HPLC en fase reversa HPLC (*por ejemplo*, una columna Vydac C4, Grace Vydac). Se aplicó un gradiente en 0.085% de TFA en acetonitrilo y se registraron los tiempos de retención de las muestras de proteínas. Se observó
15 que Fc-EPO y Fc-g2h (FN→AQ)-EPO sintetizadas en células BHK-21 producidas dos picos principales que se solapan parcialmente (Pico #1 y Pico #2). Las fracciones pico fueron analizadas en más detalle mediante mapeo de péptidos. Se observó que el Pico #1 correspondía a una forma de Fc-EPO que fue glicosilada en Ser126, tal como se indicaba por la ausencia de la firma de un péptido (Péptido #36), mientras que el Pico #2 correspondía a una forma de Fc-EPO que no fue glicosilada en Ser126, como indicaba la presencia de la firma del péptido (Péptido #36). Se observó que Ser126 es modificado por la O-glicosilación en aproximadamente un 60% de las moléculas Fc-EPO producidas a partir de células BHK, lo cual es coherente con lo que se ha informado sobre la EPO natural. Más aún, el cultivo de células BHK en un medio DMEM/F-12 complementado tuvo un efecto positivo en la frecuencia de la O-glicosilación.

Ejemplo 5B. Caracterización de patrones de sialilación.

25 El grado de sialilación de las proteínas de fusión Fc-EPO sintetizadas en células NS/0; BHK; 293, y PerC6 se comparó mediante electroforesis en gel por electroenfoque (IEF, por sus siglas en inglés). Brevemente, las muestras, concentradas en 2mg/ml y desaladas si fuera necesario, fueron añadidas en igual volumen del tampón de muestra IEF Sample Buffer pH 3-7, y se sometió a sistema vertical en gel Novex pH 3-7 IEFI (Novex, cat# EC6655B/B2) durante 2.5 horas, la primera hora a 100V, la segunda hora a 200V y los últimos 30 minutos a 500V.
30 El gel fue a continuación fijado, teñido y desteñido.

En un experimento en particular, las siguientes muestras se compararon (las muestras se derivaron a partir de células cultivadas en medios que contienen suero):

1. Fcg2h-EPO(NDS) a partir de NS/0
2. Fcg2h-EPO(NDS) a partir de BHK-21
- 35 3. Fcg2h-EPO a partir de BHK-21
4. Fcg2h("Delta Lys")-EPO a partir de BHK-21
5. Fcg4h(FN→AQ "Delta Lys")-EPO a partir de BHK-21
6. Fcg4h("Delta Lys")-EPO a partir de BHK-21

40 En este grupo, "Delta Lys" hace referencia a una delección de la lisina en el C-terminal del dominio Fc (muestras 4-6). Las muestras 1-3 presentan mutaciones de esta lisina C-terminal a alanina. Por lo tanto, esta lisina C-terminal es ausente en todas las muestras y no hay diferencias de carga resultantes entre las muestras. Todas las células fueron cultivadas como células adherentes en medios que contienen suero.

Las muestras se cargaron en gel pH 3-7 IEF y se compararon con estándares que se focalizaron en pH 3.5, 4.2, 4.5, 5.2, 6.0, y 6.9 (Serva Electrophoresis, Alemania). La primer muestra, Fcg2h-EPO(NDS) de NS/0, se desplazó como una distribución de bandas con puntos isoeléctricos entre aproximadamente pH 5.3 y 6.5; las bandas más intensas estaban presentes en el pH 6.0-6.1. La segunda muestra, Fcg2h-EPO(NDS) de BHK-21, funcionó como una distribución de bandas intensas con puntos isoeléctricos en aproximadamente pH 4.6 a pH 5.0, con bandas más difuminadas del pH 5.0 hasta aproximadamente pH 6.0; las bandas más intensas estaban presentes en pH 4.8-4.9. Las muestras tercera y cuarta, Fcg2h-EPO de BHK-21 y Fcg2h("Delta Lys")-EPO de BHK-21, respectivamente, tenían ambas una distribución de bandas de aproximadamente un pH 4.7 a 6.0 con las bandas más intensas focalizadas en aproximadamente pH 5.3. Las muestras quinta y sexta, Fcg4h(FN→AQ "Delta Lys")-EPO de BHK-21 y Fcg4h("Delta Lys")-EPO de BHK-21, respectivamente, presentaban un patrón de enfoque similar al de la segunda muestra, *es decir*, funciona como una distribución de bandas intensas con puntos isoeléctricos en aproximadamente en pH 4.6 a pH 5.0, con bandas más difuminadas del pH 5.0 a aproximadamente el pH 6.0. Estos resultados indican

que la síntesis de las proteínas de fusión Fc-EPO en células BHK en general dieron como resultado un producto significativamente más ácido que productos idénticos o similares sintetizados en células NS/0.

5 En otros en otros experimentos, las muestras de Fcg2h-M1-EPO(NDS) de células BHK fueron tratadas con neuraminidasa, la cual elimina el ácido siálico de los oligosacáridos. Las muestras resultantes tratadas con neuraminidasa se sometieron a IEF en gel y se observó que se focalizaban como unas pocas bandas en un pH 6.9 y superior. Cuando los patrones de bandas de las muestras de células BHK con o sin tratamiento de neuraminidasa y de las muestras de células NS/0 fueron comparados, se identificaron unas 27 especies sialiladas distintas. Las 27 especies se corresponden bien con las 28 especies diferentes previstas que podían resultar de la variación de los grados de sialilación de una proteína de fusión Fc-EPO en configuración homodimérica. De acuerdo con este análisis, Fcg2h-EPO con 4-5 residuos de ácido siálico se focalizó con el marcador de pH 6.9, y Fcg2h-EPO con 11-12 residuos de ácido siálico se focalizó con el marcador de pH 6.0. Se observó que una población de proteínas Fcg2h-EPO sintetizadas en células BHK parecían tener una media de 21 residuos de ácido siálico por molécula de proteína. En contraste, una población de proteínas Fc(g2h)-EPO sintetizadas en células NS/0 parecían tener una media de aproximadamente 10 residuos de ácido siálico por molécula de proteína.

15 En experimentos posteriores, las células BHK que expresan las proteínas Fc-EPO fueron adaptadas a condiciones de cultivo libres de suero y condiciones apropiadas para la producción a gran escala, *por ejemplo*, condiciones de suspensión. Las proteínas Fc-EPO producidas a partir de células BHK cultivadas libres de suero y en suspensión fueron analizadas mediante electroforesis en gel por IEF, tal como se ha descrito con anterioridad. Estas modificaciones en las condiciones de cultivo dieron como resultados cambios de, como máximo, solamente 0.1 a 0.3 unidades de pH en el punto isoeléctrico de la banda más intensa.

Las muestras de las proteínas de fusión Fc-EPO sintetizadas en medios DMEM/F-12 libres de proteínas complementados, fueron caracterizado de manera similar mediante electroforesis en gel por IEF. Se observó que el producto proteico estaba sialilado en un grado mayor y mostraba más sialilación homogénea que el correspondiente producto obtenido a partir de células cultivadas en medios libres de suero tales como VP-SFM.

25 El grado de sialilación de las proteínas Fc-EPO producidas en diferentes líneas celulares fue también confirmado cualitativamente mediante estudios de unión a lecitina. Por ejemplo, las proteínas de fusión Fc-EPO fueron separadas en primer lugar mediante electroforesis en gel SDS estándar y transferidas, luego se hibridaron con lecitinas modificadas que reconocen distintas fracciones de carbohidratos (por ejemplo, comercialmente disponibles en Roche Applied Science, Indianapolis, IN), y pueden visualizarse lecitinas enlazadas. Lecitinas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, aglutinina de Sambucus nigra (SNA, por sus siglas en inglés) o aglutinina de Maackia amurensis (MAA, por sus siglas en inglés), que reconocen ácidos siálicos con ligamientos específicos, y aglutinina de Datura stramonium (DAA, por sus siglas en inglés), aglutinina de cacahuete (PNA, por sus siglas en inglés) y jacalina, que reconocen otras regiones de la fracción de carbohidratos tal como el O-glicano central. Basándose en ensayos de unión a la lecitina, los niveles de sialilación de las proteínas de fusión Fc-EPO producidas en diferentes líneas celulares podrían determinarse.

Ejemplo 6. Actividad biológica *in vitro* de las proteínas Fc-EPO.

Las actividades *in vitro* de las diferentes proteínas Fc-EPO se evaluaron en un ensayo basado en células. La línea celular TF-1 expresa receptores de EPO, y por consiguiente, bajo las condiciones adecuadas, su incorporación de timidina tritiada es en función de la actividad de EPO o de proteínas similares a EPO (Hammerling et al., (1996) J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis (Análisis Farmacéutico y Biomédico), 14:1455; Kitamura et al., (1989) J. Cellular Physiol., 140:323). De manera específica, las células TF-1 en la fase logarítmica activa se lavaron dos veces en un medio sin EPO, y se colocaron en placas en aproximadamente 10^4 células/pocillo en placas microtiter. Las células se incubaron entonces en un medio con una serie de diluciones tituladas de variantes de Fc-EPO durante 48 horas. Se añadieron 0.3 μCi de ^3H -timidina a los pocillos diea horas antes del ensayo de la proliferación celular. Como control, se incubaron células TF-1 en presencia de EPO recombinante humana, y el análogo de EPO hiperglicosilado Aranesp®. La incorporación de timidina radiactiva se midió como conteos de TCA precipitable. Tal como se muestra en la tabla 2, las actividades de las moléculas Fcg2h-M1-EPO son comparables con las de la EPO recombinante humana.

Se pueden obtener algunas conclusiones de estos datos. Consistente con los resultados de los que se ha informado previamente, la EPO producida a partir de células de CHO tiene un ED50 de aproximadamente 0.7 ng/ml; esto incluye el estándar NIBSC EPO, EPO de R&D Systems, y Procrit® de uso comercial. Aranesp® es significativamente menos activo *in vitro*, presumiblemente reflejando su reducida constante de afinidad debido a sus cargas negativas aumentadas. De forma similar, la Fc-EPO producida a partir de células BHK es menos activa que la Fc-EPO producida a partir de células NS/0, lo cual es consistente con la observación de que las proteínas de Fc-EPO producidas a partir de células BHK se encuentran altamente sialiladas, dando como resultado unas cargas negativas aumentadas en las proteínas.

Tabla 2

| Proteína | ED50 (ng/ml) | S.D: | N |
|---------------------|--------------|------|----|
| EPO (NIBSC) | 0.77 | 0.35 | 22 |
| EPO (R&D Systems) | 0.6 | 0.26 | 26 |
| EPO (Procrit®) | 0.68 | 0.15 | 6 |
| EPO (Procrit®) | 2.4 | 0.96 | 10 |
| Fcg2h-M1-EPO (NS/0) | 0.35 | 0.15 | 14 |
| Fcg2h-M1-EPO (BHK) | 0.94 | 0.34 | 5 |

Ejemplo 7. Análisis farmacocinético de las variantes de Fc-EPO.

Los perfiles farmacocinéticos de las diferentes proteínas Fc-EPO sintetizadas en varias líneas celulares fueron caracterizadas en base a los siguientes experimentos *in vivo*. En un modo de realización, tal como se muestra en la Figura 8, aproximadamente 14 mcg de proteína la Fcg2h(N→Q)-EPO sintetizada en células NS/0 y en células BHK se administraron por vía intravenosa a ratones blancos Swiss-Webster. En varios puntos de tiempo tras la administración (por ejemplo, T=0, ½, 1, 2, 4, 8, y 24 horas después de la administración), las muestras de sangre se recogieron y se preparó suero por centrifugación. Tal como se muestra en la Figura 8, 24 horas después de la administración, una concentración en suero un 10% mayor que la inicial de la Fc-EPO derivada de BHK permaneció en el suero, mientras que menos del 0.1% de la concentración inicial en suero de la Fc-EPO derivada de NS/0 permaneció en el suero.

Se realizó un experimento similar con proteínas Fcg2h-EPO(NDS) sintetizadas en células NS/0 y en células BHK. Aproximadamente 14 mcg de la proteína Fcg2h-EPO(NDS) sintetizada en células NS/0 y en células BHK fueron administrados por vía intravenosa a ratones blancos Swiss-Webster. Las muestras de sangre se recogieron en T=0, ½, 1, 2, 3, 4, 8, 24, y 36 horas después de su administración y las concentraciones de Fcg2h-EPO(NDS) en suero se midieron mediante ELISA anti-Fc. Tal como se muestra en la Figura 9, 24 horas después de la administración, una concentración en suero un 10% mayor que la inicial de Fcg2h-EPO(NDS) derivada de BHK permaneció en el suero, mientras que menos del 0.1% de la concentración inicial en suero de Fcg2h-EPO(NDS) derivada de NS/0 permaneció en el suero.

Los perfiles farmacocinéticos de la Fcg2h-EPO(NDS) producida en células BHK-21, células PERC6, y células 293 fueron también comparadas. De manera específica, un plásmido que expresa Fcg2h-EPO(NDS) fue transfectada de forma transitoria en células BHK, 293, y PERC6. Las proteínas de fusión Fcg2h-EPO(NDS) expresadas, fueron purificadas de diferentes líneas celulares y se inyectaron por vía intravenosa en ratones blancos Swiss-Webster, en una concentración de 1.7 microgramos por ratón. Se tomaron muestras de sangre en T=0, ½, 1, 2, 4, 8, 24, 48, y 72 horas, y la concentración de Fcg2h-tpo(NDS) en suero se midió mediante ELISA anti-Fc. Tal como se muestra en la Figura 10, 24 horas después de la administración, una concentración en suero un 10% mayor que la inicial de Fcg2h-EPO(NDS) derivada de BHK permaneció en el suero, mientras que menos de un 1% de la concentración inicial en suero de Fcg2h-EPO(NDS) derivada de células 293 permaneció en el suero, y la Fcg2h-EPO(NDS) derivada de células PerC6 fue casi indetectable en el suero. Se obtuvieron resultados similares con las proteínas Fcg2h(N→Q)-EPO producidas en células BHK, PerC6, y 293.

Experimentos similares se llevaron a cabo en ratones para comparar los perfiles farmacocinéticos de Fcg2h(N→Q)-EPO, Fcg2h-EPO(NDS), Fcg2h-EPO, y Aranesp® (es decir, NESP). Las variantes de Fc-EPO utilizadas en la presente patente fueron sintetizadas a partir de células BHK. Se observó que, 48 horas después de la administración, menos del 10% de la concentración inicial en suero de Aranesp® permaneció en suero, mientras que una concentración en suero un 10% mayor que la inicial tanto de Fcg2h(N→Q)-EPO como de Fcg2h-EPO(NDS) permaneció en suero. Estos resultados indican que las proteínas Fcg2h(N→Q)-EPO y Fcg2h-EPO(NDS) producidas a partir de células BHK-21 presentan una vida media en suero de mayor duración que la de Aranesp®.

Ejemplo 8. Potencia *in vivo* de las variantes Fc-EPO.

Las actividades *in vivo* de las diferentes variantes de Fc-EPO se midieron mediante ensayos de hematocrito (HCT) y ensayos de reticulocitos en ratones y ratas.

En un experimento HCT, se inyectó a ratones CD1 por vía intraperitoneal proteínas Fcg2h(FN→AQ)-EPO sintetizadas en células BHK en dosis de 20 mcg/kg y 10 mcg/kg. Se tomaron muestras de sangre de los ratones en los días 4, 7, 11, y 14, y se centrifugaron en tubos capilares. Las cantidades de glóbulos rojos sedimentados se midieron como fracciones del volumen total. Tal como se ilustra en la Figura 4, en respuesta a la inyección de

proteínas Fcg2h(FN>AQ)-EPO, los hematocritos aumentaron de manera espectacular en primer lugar, luego permanecieron estables, para finalmente disminuir.

En otro experimento, se inyectaron ratas Sprague-Dawley por vía intraperitoneal con las siguientes proteínas sintetizadas en células BHK. A todos los animales se les administró una dosis de 42.5 mcg/kg.

- 5 1. Fcg2h-EPO
2. Fcg2h-EPO(NDS)
3. Fcg4h-EPO
4. Fcg4h(N>Q)-EPO

10 Los ensayos HCT se realizaron con muestras de sangre tomadas de los ratones inyectados tal como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 5, en respuesta a Fcg2h-EPO(NDS) y Fcg2h-EPO, la cantidad de hematocritos en las ratas inyectadas permaneció estable durante un periodo de tiempo prolongado, indicando que las proteínas Fcg2h-EPO(NDS) y Fcg2h-EPO presentan vidas medias en suero prolongadas y una potente actividad *in vivo*. También se observó que, tal como se muestra en la Figura 5, Fcg4h-EPO y Fcg4h(N→Q)-EPO mostraron un periodo estable más corto y una disminución más rápida de la concentración en suero en comparación con las

15 proteínas Fcg2h-EPO(NDS) y Fcg2h-EPO.

En otro experimento, se administraron a ratones CD1 por vía intraperitoneal las siguientes muestras:

1. Fcg2h-EPO(NDS) de células BHK en dosis de 85 mcg/kg, 42.5 mcg/kg, y 21.25 mcg/kg.
2. Fcg2h-EPO(NDS) de células NS/0 en dosis de 85 mcg/kg, 42.5 mcg/kg, y 21.25 mcg/kg.
3. Aranesp® (es decir, NESP) en dosis de 50 mcg/kg, 25 mcg/kg, y 12.5 mcg/kg.

20 Las cantidades de proteína se calcularon en base al peso molecular de la proteína sin carbohidratos. En este experimento, el peso molecular de la proteína Fcg2h-EPO(NDS) está basado en un polipéptido monómero. Por consiguiente, la relación de los pesos moleculares de Fcg2h-EPO(NDS) con respecto a NESP es de aproximadamente 1.71 a 1. Por lo tanto, los rangos de las dosis con cada proteína en este experimento fueron aproximadamente iguales.

25 Tal como se muestra en la Figura 6, las proteínas Fcg2h-EPO(NDS) sintetizadas en células BHK mostraron el mejor perfil de hematocrito en términos de potencia y duración del efecto, indicando que las proteínas Fcg2h-EPO(NDS) de células BHK presentan vidas en suero de mayor duración y actividades en *in vivo* más potentes en comparación tanto con Fcg2h-EPO(NDS) de células NS/0 como con NESP. Los perfiles de hematocrito de Fcg2h-EPO(NDS) de células NS/0 y NESP son comparables.

30 **Ejemplo 9. Los efectos de la eliminación del sitio de glicosilación en la porción Fc.**

Se realizaron experimentos para evaluar los efectos de la eliminación del sitio de glicosilación en la porción Fc sobre al actividad *in vitro*, la farmacocinética, y la potencia *in vivo*. En particular, se evaluaron las proteínas de fusión Fc-EPO que contienen dominios CH2 y CH3 derivados de la IgG2 o dominios CH2 y CH3 derivados de la IgG4. La asparagina dentro de la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser de la IgG2 o IgG4, que corresponde al Asn297

35 de la IgG1, fue reemplazada con una glutamina. En la mayoría de los experimentos, la fenilalanina con la secuencia de aminoácidos Gln-Phe-Asn-Ser fue reemplazada con alanina para eliminar posibles epítomos de linfocitos T que pueden resultar de la mutación de la asparagina. Tal como se muestra en la Tabla 6, en los ensayos *in vitro* basados en células, los valores de ED50 de las proteínas Fc-EPO, con la mutación FN>AQ que elimina el sitio de glicosilación N-ligado en la porción Fc, son generalmente 5 veces menores que los de las proteínas Fc-EPO sin la

40 mutación, indicando que la eliminación del sitio de glicosilación N-ligado dio como resultado una actividad *in vitro* reducida en ensayos basados en células.

Se realizaron experimentos para evaluar los efectos de la eliminación de la glicosilación N-ligada en la farmacocinética y la potencia *in vivo*. Se trataron ratones CD1 con proteínas Fcg2h-M1-EPO, Fcg2h-M1-EPO(NDS), y Fcg2h(N>Q)-M1-EPO sintetizadas en células BHK en dosis de 42 mcg/kg cada una. Se observó que la proteína

45 Fcg2h(N→Q)-M1-EPO mostró un mejor perfil farmacocinético que la proteína correspondiente sin la mutación N→Q. Por lo tanto, la mutación N>Q, que elimina la glicosilación N-ligada en la porción Fc derivada de la IgG2, dio como resultado una farmacocinética mejorada (*por ejemplo*, una vida media en suero extendida). La vida media en suero no puede explicarse por un efecto en la unión a los receptores Fc, ya que los dominios CH2 y CH3 derivados de la IgG2 ya presentan una unión al receptor Fc básicamente indetectable.

50 Tabla 6: Eliminación del sitio de glicosilación en la porción Fc reduce la actividad *in vitro* basada en células de las proteínas de fusión Fc-EPO.

ES 2 387 028 T3

| Proteínas de fusión Fc-EPO | ED50 (ng de EPO/ml) | S.D. | Nº de Experimentos |
|--|---------------------|------|--------------------|
| Fcg2h-EPO BHK Preparación 1 | 0.84 | 0.28 | 4 |
| Fcg2h-EPO BHK Preparación 2 | 0.95 | 0.32 | 7 |
| Fcg2h-EPO BHK Preparación 3 | 0.72 | 0.27 | 3 |
| Fcg2h-EPO BHK Preparación 4 | 0.95 | 0.17 | 3 |
| Fcg2h-EPO BHK Preparación 5 | 0.43 | 0.18 | 2 |
| Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK Preparación 1 | 6.75 | 2.57 | 9 |
| Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK Preparación 2 | 7.38 | 1.48 | 4 |
| Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK Preparación 3 | 7.01 | 4.64 | 9 |
| Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK Preparación 4 | 3.02 | 0.88 | 5 |
| Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK Preparación 5 | 2.77 | 1.75 | 5 |
| Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK Preparación 6 | 5.07 | 1.64 | 4 |
| Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK Preparación 7 | 2.53 | 0.53 | 5 |
| Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK Preparación 8 | 2.92 | 0.52 | 5 |
| Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK Preparación 9 | 1.55 | 0.66 | 5 |
| Fcg2h(FN>AQ)-EPO BHK Preparación 10 | 2.37 | 1.78 | 8 |

Estos efectos son inesperados y sorprendentes, ya que los efectos causados por la eliminación de la glicosilación N-ligada en las porciones Fc derivadas de la IgG2 son más consistentes con la constante de afinidad para el receptor de la eritropoyetina. Sin la intención de estar sujetos a la teoría, la eliminación de la glicosilación N-ligada en las porciones Fc derivadas de la IgG2 pueden causar un cambio conformacional general en la proteína de fusión Fc-EPO.

Ejemplo 10. Tratamiento de perros Beagle con las proteínas de fusión Fc-EPO sintetizadas a partir de células BHK.

Las proteínas de fusión Fc-EPO se administraron a perros Beagle para evaluar sus efectos en los hematocritos, conteo de reticulocitos y otros parámetros sanguíneos. De manera específica, las proteínas Fcg2h(FN→AQ)-EPO fueron purificadas a partir de dos líneas celulares BHK transfectadas de manera estable independientemente, clon 65 y clon 187, y se administraron a perros Beagle por vía intravenosa. Se inyectó a un perro Beagle macho y a una hembra con cada preparación de acuerdo al siguiente esquema:

Día 0: 3 microgramos/kg

Día 16: 10 microgramos/kg

Día 23: 100 microgramos/kg

En varios puntos de tiempo después de la administración, aproximadamente 2 ml de sangre se recogieron, y se midieron parámetros sanguíneos, tales como, hematocritos, recuentos de reticulocitos, y otros parámetros sanguíneos.

Las respuestas de hematocrito después del tratamiento se muestran en la Figura 11. Después de la dosificación con 3 mcg/kg de proteínas de fusión Fc-EPO, los parámetros sanguíneos no aumentaron con respecto al rango normal. En el marco de una semana posterior a la dosificación con 10 mcg/kg, los conteos de reticulocitos aumentaron por encima de un 3% del volumen total de sangre en tres de los cuatro animales, y los hematocritos aumentaron en un animal. Otros parámetros sanguíneos no aumentaron sobre el rango normal. Después de dosificar con 100 mcg/kg, los conteos de hematocrito se elevaron rápidamente, alcanzando niveles pico de 57 a 62 y permaneciendo por encima del rango normal durante cinco o seis semanas. El conteo de reticulocitos permaneció elevado durante dos o tres semanas.

Para cada animal, la cantidad de glóbulos rojos por microlitro de sangre y la hemoglobina, media en gramos por decilitro, fueron proporcionales a la cantidad de hematocritos. Estos resultados indicaron que las proteínas Fc-EPO estimulan la producción de glóbulos rojos de tamaño normal con contenido normal de hemoglobina.

Ejemplo 11. Purificación de proteínas Fc-EPO para su uso clínico.

Las proteínas Fc-EPO se purificaron siguiendo procedimientos estándar GRIP conocidos para las personas expertas en el arte. Se cultivan células BHK-21, procedentes de una producción de clones almacenados, en un medio DMEM/F-12 (Invitrogen) complementado con 2.5 mM de L-glutamina (Invitrogen), 2 g/l de cada HyPep 1501 y HyPep 4601 (Quest International, Chicago, IL), 10 µl/l de etanolamina (Sigma), y 5 µM de Tropolona (Sigma) durante 7 -10 días en cultivos discontinuo a la vez que se mantiene alta viabilidad celular (por ejemplo, por encima del 80%). El medio condicionado se cosecha y clarifica mediante filtración de flujo normal, y se cargaron en una columna de flujo rápido de Proteína A – Sefarosa equilibrada previamente (Pharmacia), que captura la proteína de fusión en base a la afinidad de la Proteína A para la porción Fc. La columna se lava ampliamente con 15 volúmenes de columna de un tampón de fosfato de sodio que contiene 150 mM de fosfato de sodio y 100 mM de NaCl a un pH neutro. La proteína enlazada en eluía a un pH bajo con 15 volúmenes de columna adicionales de un tampón de fosfato de sodio ácido de pH 2.5 – 3, pero que además contiene 150 mM de fosfato de sodio y 100 mM de NaCl.

Para la inactivación viral, el pH de las fracciones pico agrupadas se ajustan a un pH 3.8 y se incuban durante 30 minutos más a temperatura ambiente. Después de 30 minutos de incubación, las fracciones agrupadas se neutralizan y se esterilizan con filtros, y entonces se aplican a una columna de intercambio aniónico de flujo rápido en Q-sefarosa (Pharmacia), que aprovecha el pH ácido de la proteína Fc-EPO como resultado de su amplia sialilación para eliminar, de manera efectiva, los contaminantes potenciales co-eluidos con proteínas Fc-EPO. De manera específica, las fracciones neutralizadas se cargan en una columna de intercambio aniónico de flujo rápido en Q-sefarosa (Pharmacia) a un pH 5.0 y se eluyen con una solución de gradiente de NaCl. Las fracciones de Fc-EPO se recogen entonces y se agrupan para su posterior análisis y para un proceso adicional de purificación. Por ejemplo, a la banda elevada de sal de la columna en Q-sefarosa se aplica una columna de cromatografía en fase reversa para eliminar el exceso de NaCl. Al eluyente diluido de la columna en fase reversa se aplica adicionalmente una segunda columna de flujo rápido en Q-sefarosa (Pharmacia, 3 cm X 9 cm).

Las partículas de virus potenciales se extraen del lote mediante nanofiltración (por ejemplo, Viresolve por Millipore). De manera opcional, pueden utilizarse pasos de purificación adicionales, tales como una columna de hidroxipatita o

una columna de fenil-boronato (se une a cis-diols). Finalmente, las proteínas purificadas se concentran a una concentración deseada utilizando ultrafiltración y a entonces son diafiltradas en un tampón de formulación apropiada. El material se esteriliza con filtros finalmente, y se distribuye en viales a un volumen determinado previamente.

5 **Ejemplo 12. Prueba de estrés para determinar la estabilidad de las formulaciones de proteínas Fc-EPO.**

Los viales que contienen una muestra de un ejemplo de la formulación Fc-EPO o una formulación de Fc-EPO de referencia se almacenan a 40 °C y a 75% de humedad atmosférica relativa, y durante tiempos de almacenaje definidos (*por ejemplo*, 0 semanas, 4 semanas, 8 semanas, *etc.*). Una muestra alícuota se toma de cada vial después de cierto tiempo de almacenaje y se analiza. Las muestras se evalúan visualmente bajo iluminación directa con una fuente de luz fría para la turbidez. La turbidez se determina adicionalmente midiendo la absorción a 350 nm y 550 nm. Además, la condición de la proteína Fc-EPO en las muestras y la presencia de productos de degradación de la proteína se analizan mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaños (HPLC-SEC). Se observa que la formulación que contiene 0.5 mg/ml de Fc-EPO, 10mM de Citrato a un pH6.2, 100 mM de Glicina, 100 mM de NaCl, 0.01% p/v de polisorbato 20, había aumentado la estabilidad en comparación con una solución de referencia.

15 **Ejemplo 13. Un estudio de fase I de la proteína de fusión Fcg2h(FN>AQ)-M1-EPO en humanos.**

Se realizó un ensayo en fase I de la proteína de fusión Fcg2h(FN>AQ)-M1-EPO en humanos como sigue a continuación. Los parámetros farmacocinéticos están determinados esencialmente tal como se ha descrito para el Aranesp® por MacDougall et al. (1999) J. Am. Soc. Nephrol. 10:2392-2395, cuyos contenidos se incorporan al presente documento a modo de referencia. Se observa que la vida media terminal en suero de la proteína de fusión Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO, inyectada por vía intravenosa (en dosis de 1 mcg/kg), se encuentra entre aproximadamente 20 a 30 horas. Por tanto, una dosis de 1 mcg/kg, o aproximadamente 70 mcg en un paciente anémico adulto, da como resultado una concentración inicial en suero de aproximadamente 10 ng/ml. Debido a que la concentración de eritropoyetina humana normal es de aproximadamente 0.04 a 0.25 ng/ml (Cazzola et al., (1998) Blood 91:2139-2145), los niveles farmacológicamente activos de la proteína Fc-EPO permanecen en el sistema del paciente durante al menos 5-10 días.

20 **Ejemplo 14. Un estudio de fase II de determinación de dosis y de programación de dosis de las proteínas de fusión Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO.**

Se iniciaron estudios multicéntricos, aleatorios, de progresión secuencial de las dosis para investigar la dosis óptima y el esquema de dosificación para la proteína de fusión Fcg2h(FN>AQ)-M1-EPO al administrarla mediante inyección intravenosa o subcutánea a pacientes con fallo renal crónico (CRF, por sus siglas en inglés) que están recibiendo diálisis.

En la práctica clínica, resulta generalmente conveniente adaptar la administración de la proteína de fusión Fcg2h(FN->AQ)-M1-EPO a un paciente anémico individual de acuerdo a las siguientes directrices. Se administra una dosis inicial y se monitorizan los parámetros sanguíneos tales como hematocrito, hemoglobina, conteos de reticulocitos, y conteos de plaquetas. La dosis inicial se encuentra habitualmente entre 0.3 y 3 mcg/kg. Una dosis inicial conveniente es 1 mcg/kg. Si el aumento en el hematocrito es menor a un 5 a 6 por ciento del volumen de sangre después de 8 semanas de terapia, la dosis debería aumentarse. Si el aumento en el hematocrito es mayor del 4 por ciento del volumen de sangre en un periodo de 2 semanas, o si el hematocrito se encuentra acercándose al 36%, la dosis debería reducirse.

40 Una programación de dosificación a modo de ejemplo es la que sigue a continuación.

Dosificación para una vez por semana: dosis de 0.075, 0.225, 0.45, 0.75, 1.5 y 4.5 mcg/kg.

Dosificación para una vez cada dos semanas: dosis de 0.075, 0.225, 0.45, 0.75, 1.5 y 4.5 mcg/kg/.

Dosificación para una vez al mes: dosis de 0.45, 0.75, 1.5 y 4.5 mcg/kg.

Los estudios se llevan a cabo en dos partes. La primera parte es un estudio de progresión de la dosis designada para evaluar la dosis de la proteína de fusión Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO que se da bien una vez por semana, una vez cada dos semanas, o una vez al mes, que aumenta la hemoglobina a una tasa óptima en cuatro semanas (mayor a o igual a 1 g/dL pero menor que 3 g(dL)). La segunda parte de cada estudio se designa para determinar las dosis requeridas (cuando se administra una vez por semana, una vez cada dos semanas, o una vez al mes mediante vías de administración subcutánea o intravenosa para mantener el hematocrito en al nivel terapéutico deseado.

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión dimérica purificada que consiste, esencialmente, en una porción Fc dimérica de una molécula de IgG humana, que comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y eritropoyetina humana (EPO), en donde cada cadena de la porción Fc dimérica está ligada por su C-terminal al N-terminal de una molécula de EPO,
- en donde dicha proteína de fusión Fc-EPO es producida en células BHK-21 en un medio libre de proteínas, y es seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO como se muestra mediante SEQ ID No. 14; y
- (ii) Fcg2h(FN→AQ)-M1-EPO(NDS) como se muestra mediante SEQ ID No. 15.
- 10 2. Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica purificada de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión se produce en un medio DMEM/F-12.
3. Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión se produce en un medio DMEM/F-12 que está complementado con aminoácidos, hidrolizados de proteínas, etanolamina, y tropolona.
- 15 4. Una composición farmacéutica que comprende en una cantidad efectiva una proteína de fusión Fc-EPO tal como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3, de manera opcional junto con un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. Una proteína de fusión Fc-EPO dimérica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3, o una composición farmacéutica de la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de trastornos o deficiencias hematopoyéticos en un mamífero.

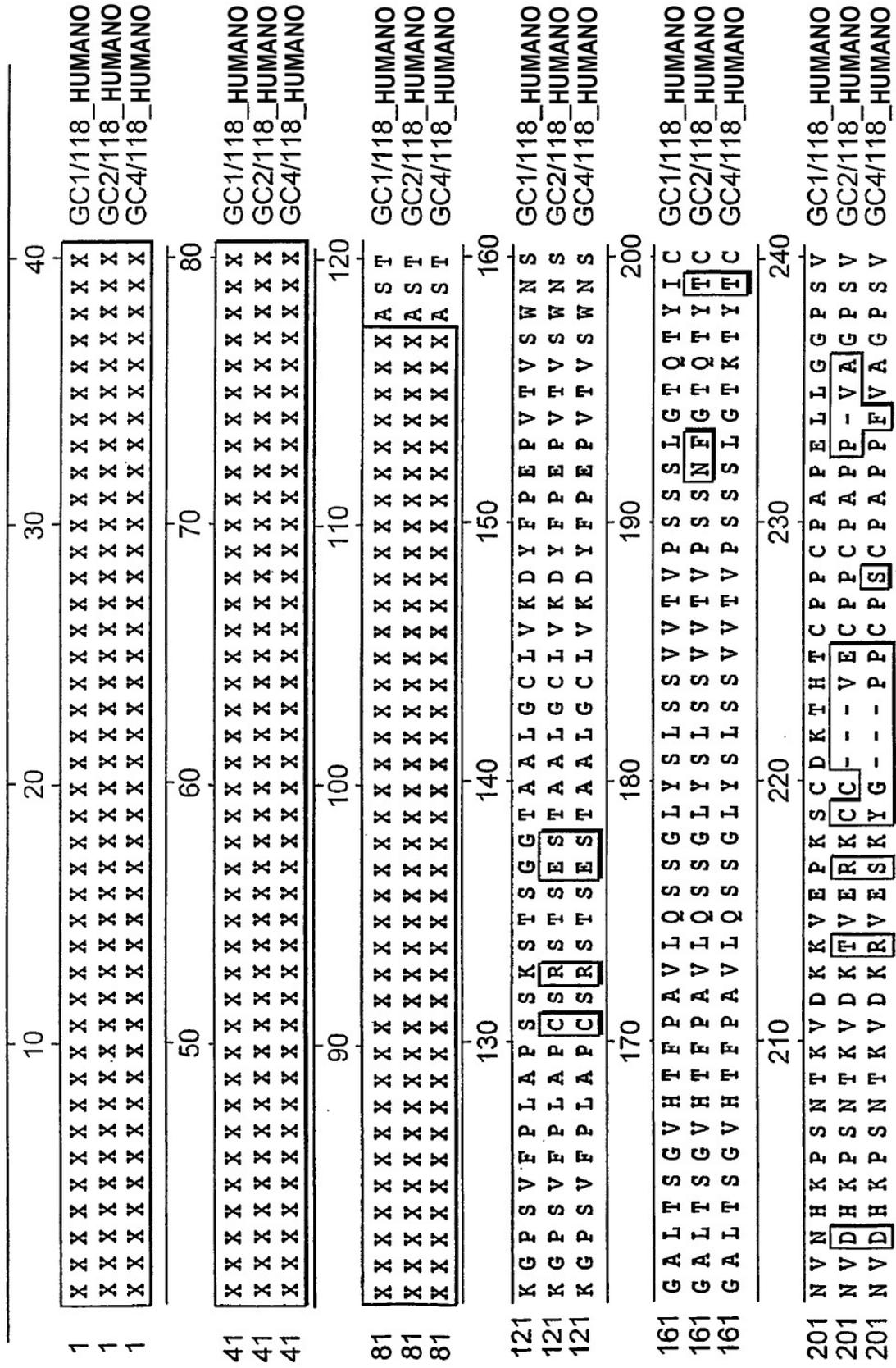


FIG. 1A

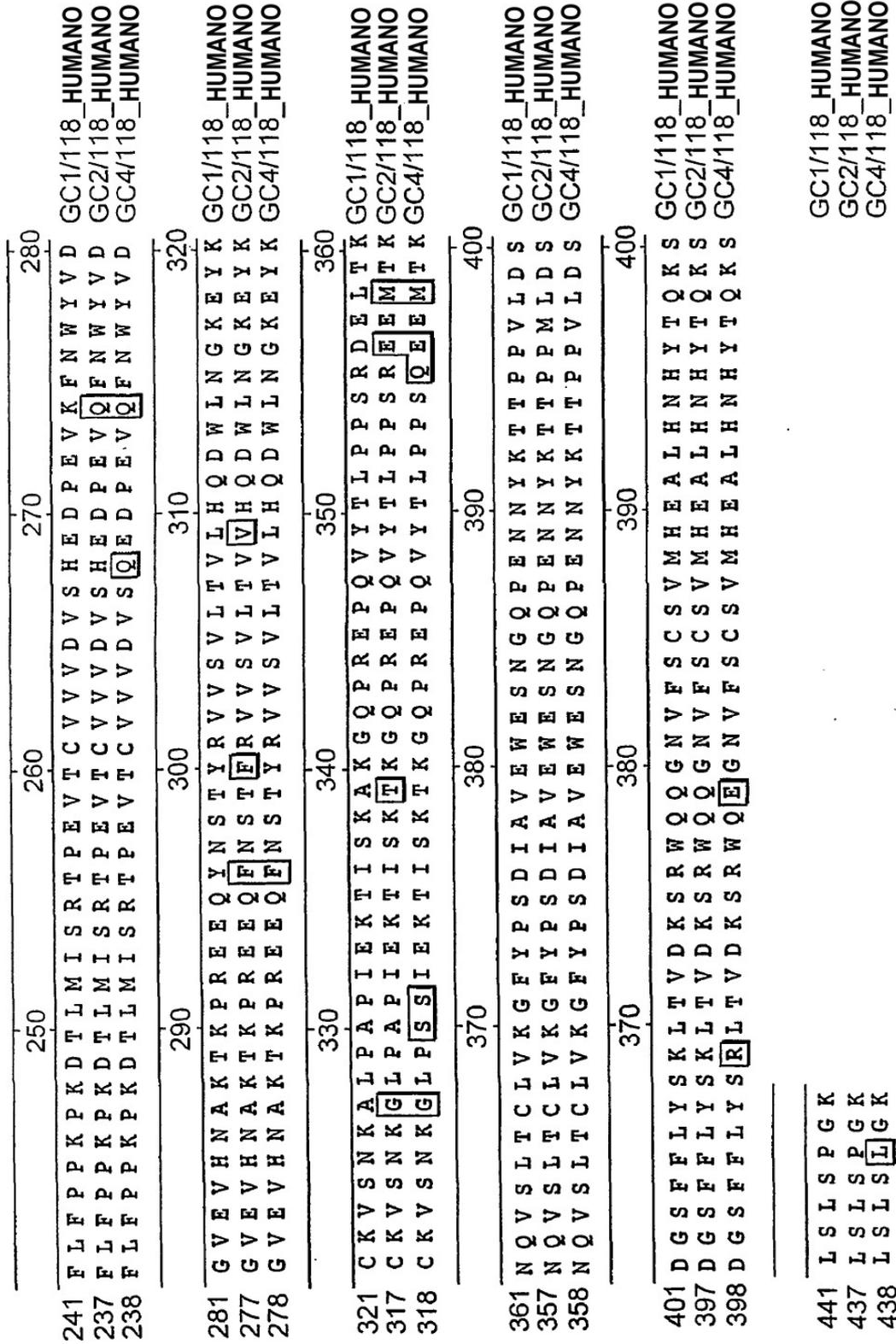


FIG. 1B

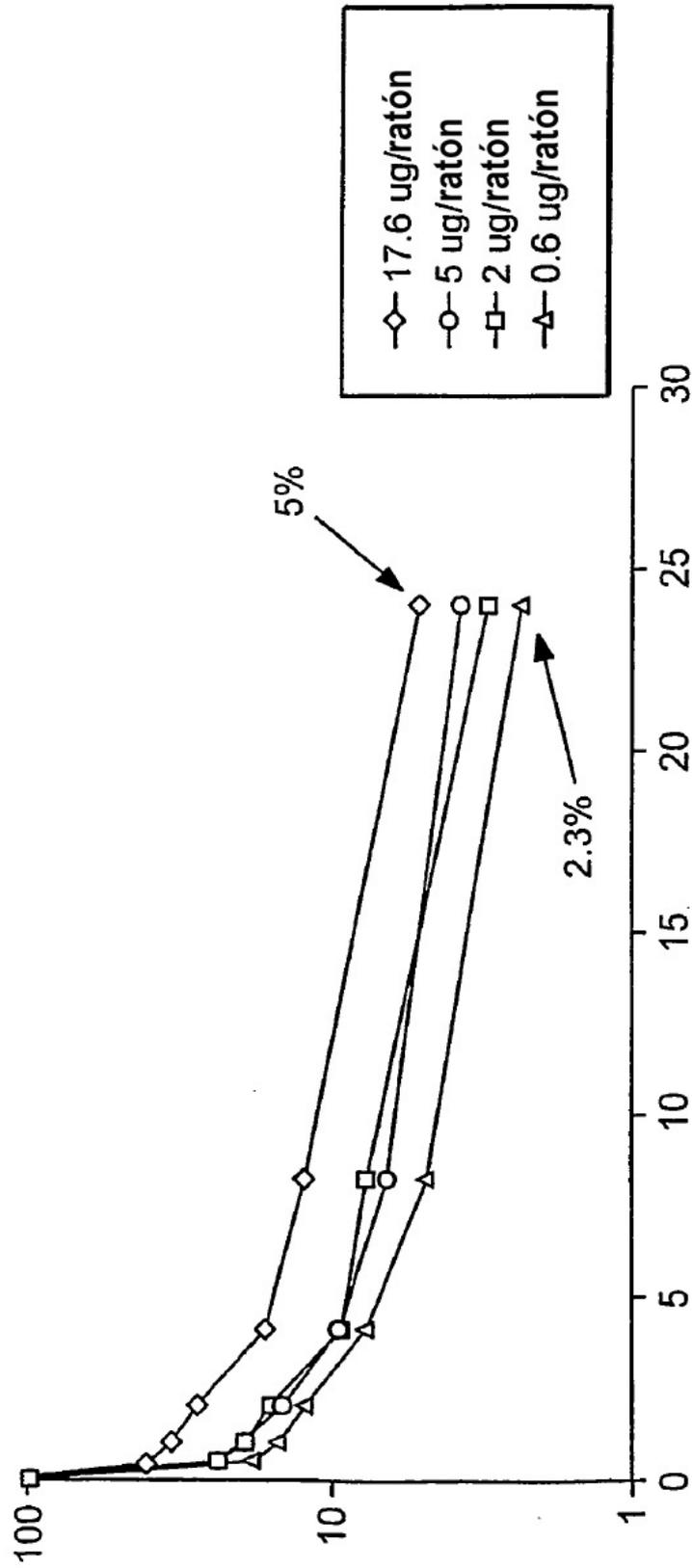


FIG. 2

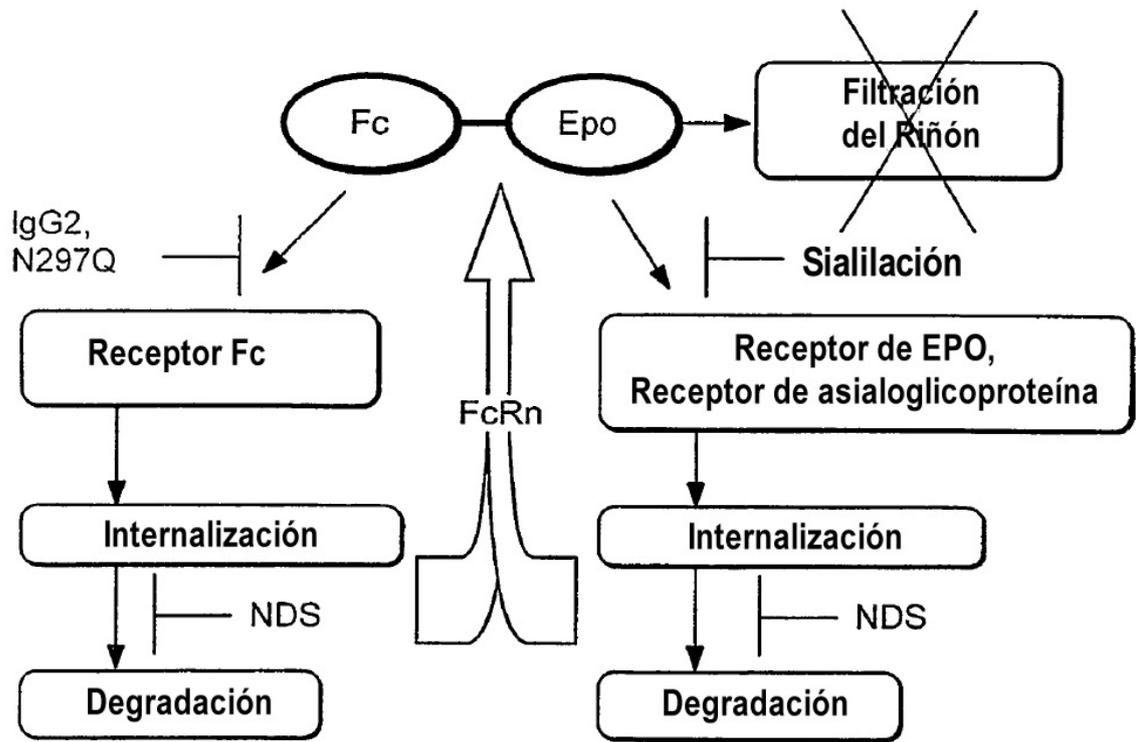


FIG. 3

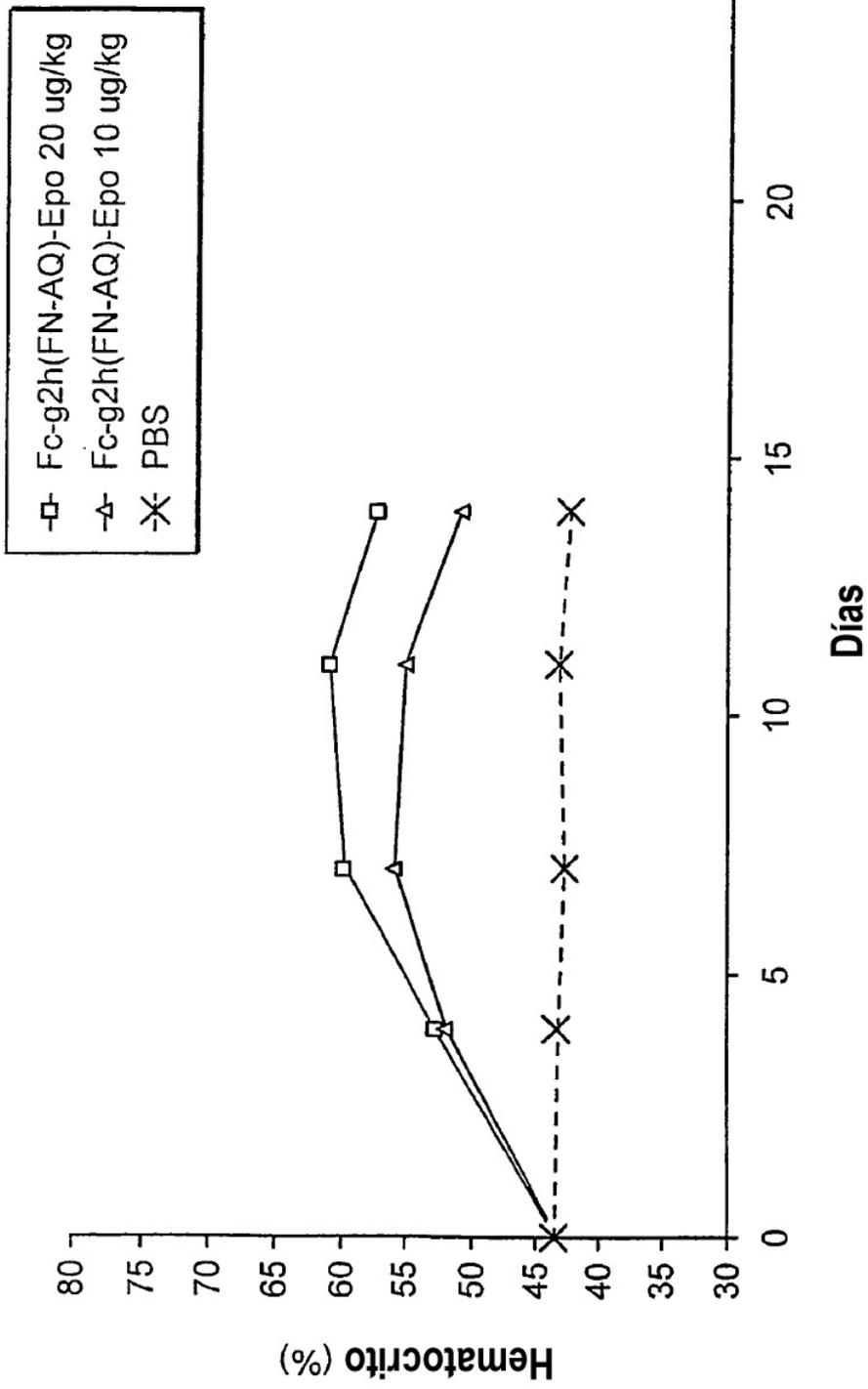


FIG. 4

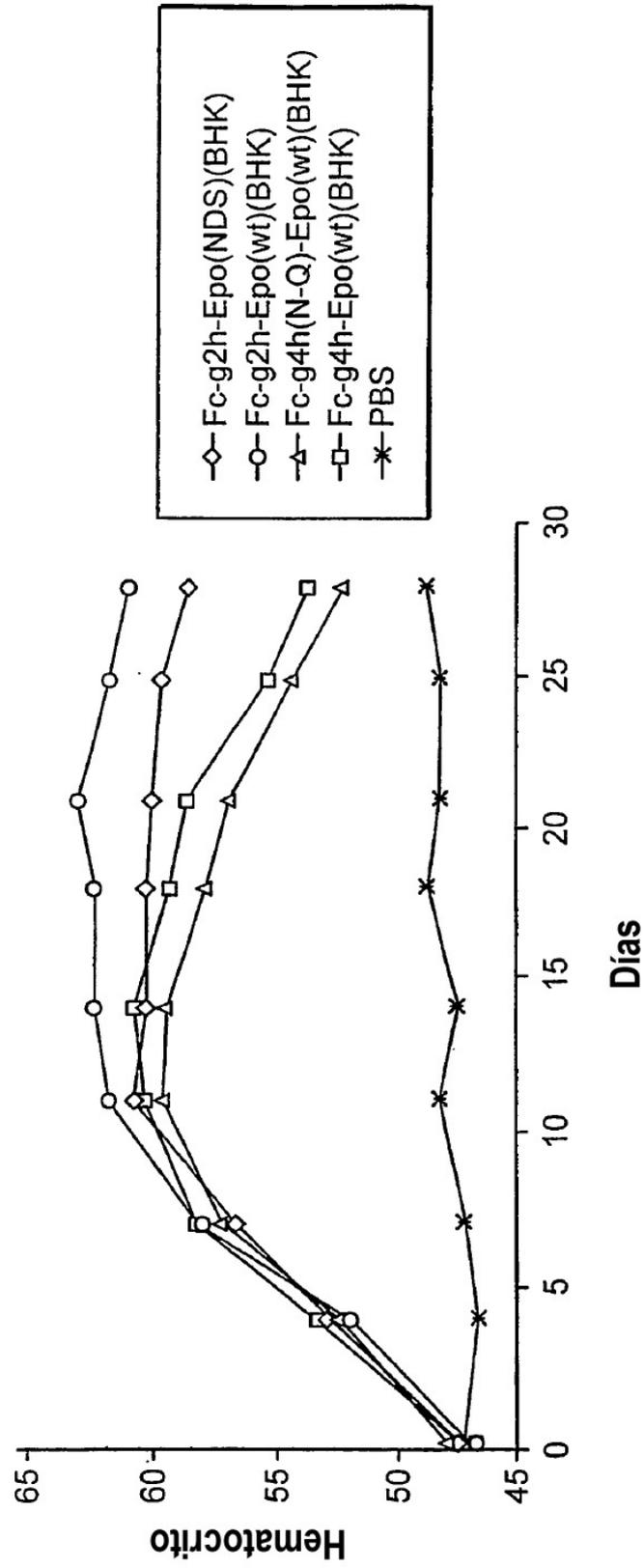


FIG. 5

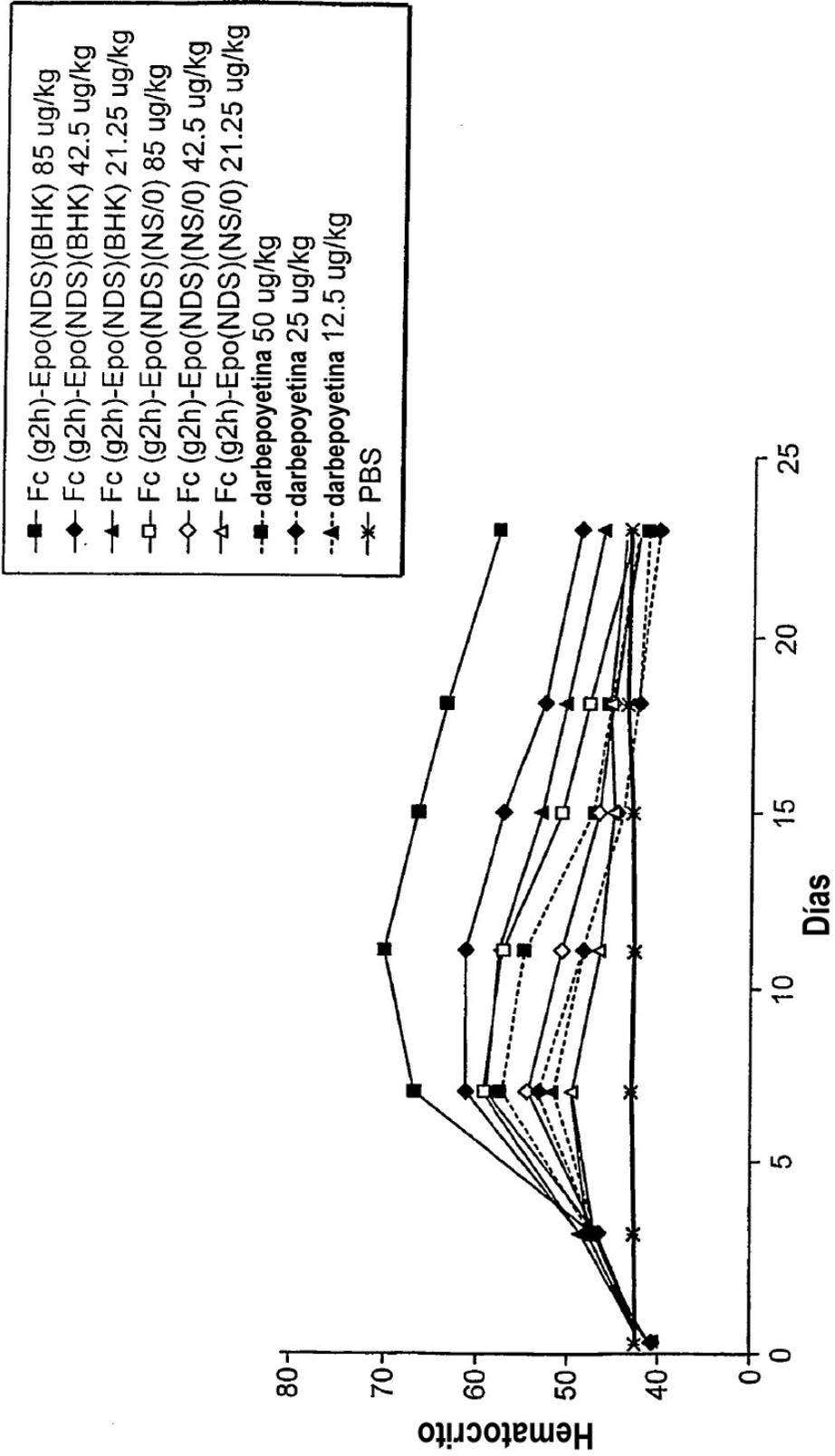


FIG. 6

Secuencia de ácido nucleico que codifica huFc-EPO madura:
huFc-g2h(FN>AQ)-MI-EPO

GAGCCAAATCTTCTGACAAACTCACACATGCCCCACCCGTGCCCCAGGTAAGCCAGCCAGGCCCTCGCCCTC
 CAGCTAAGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCTGGGTGCTGACACG
 TCCACCTCCATCTCTCCAGCACCCCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCTCCAAACCCCAA
 GGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAAGACCCCG
 AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAG
 GCCCAGAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA
 CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAATAAAGGTGGGA
 CCGCGGGGTATGAGGGCCACATGGACAGAGCGCGCTCGGCCACCCCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGT
 GCCAACCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACACACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCACGGGAGGAGA
 TGACCAAGAACAGGTACGCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCACAGGCACATCGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGCAGCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
 CCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGAGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGC
 ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCGCCACCGGACCCCGGGCGCCCCACCCACGCCCTC
 ATCTGTGACAGCCGAGTGTGGAGAGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAAATATCACGACCCGGCTG
 TGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAACATCACCGTGCCTGACACCAAGTGAATTTCTATGCCTGGAAGA
 GGATGGAGGTTGGCCAGCAGGCCGTAGAAGTGTGGCAGGGCTGGCCCTGCTGTGGAAAGCTGTCTGCGG
 GGCCAGGCCCTGTGGTCAACTCTTCCAGCCGTGGGAGCCCTGCCAACTGCATGTGGATAAAGCCGTGAG
 TGGCCTTCGCAGCCTCACCACTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCACGAAAGCCATCTCCCTCCAGATG
 CGGCTCAGCTGCTCCCTCCGCACAATCACTGCTGACACTTTCGGCAAACTCTTCCGAGTCTACTCCAAT
 TTCCCTCCGGGAAAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCCCTGCCCGGACAGGGGACAGATGA

FIG. 7

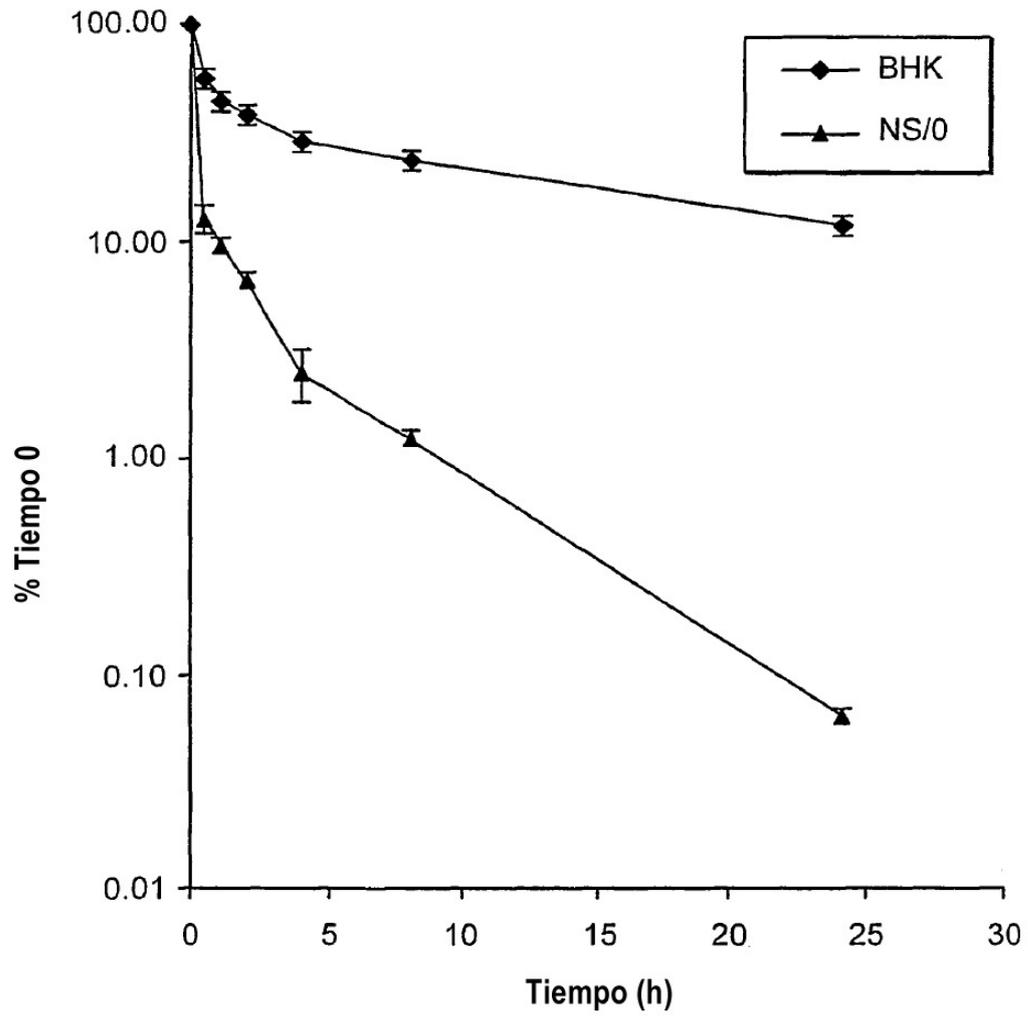


FIG. 8

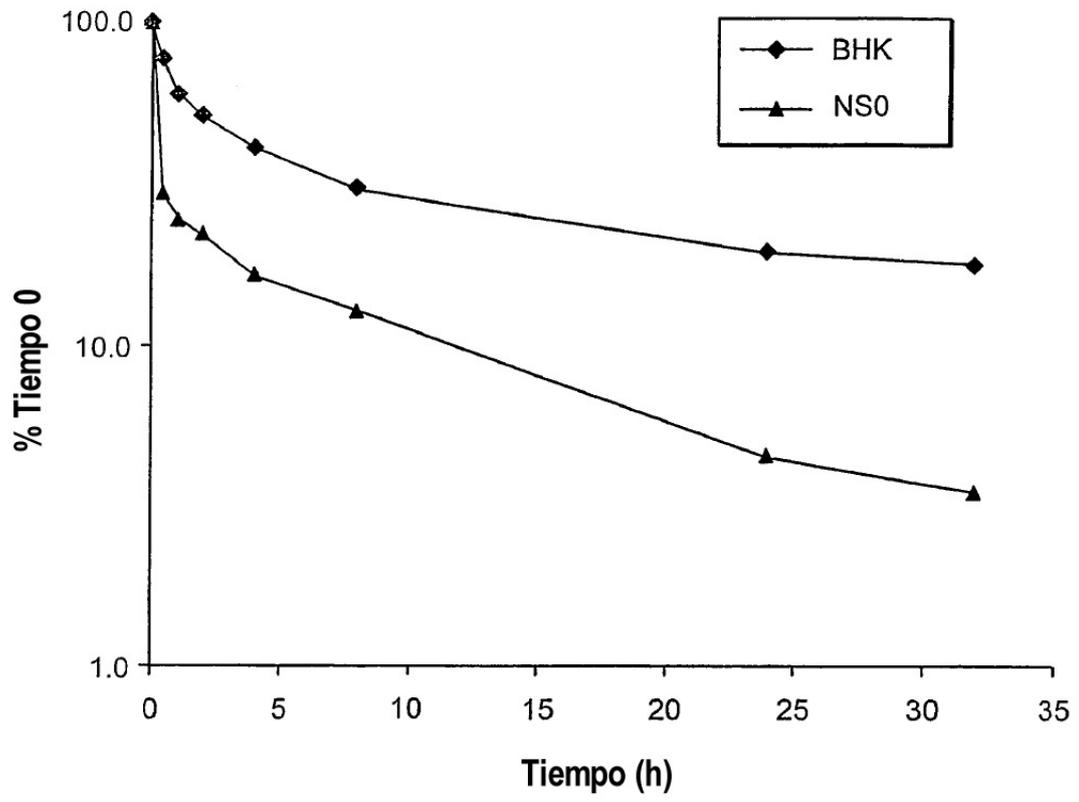


FIG. 9

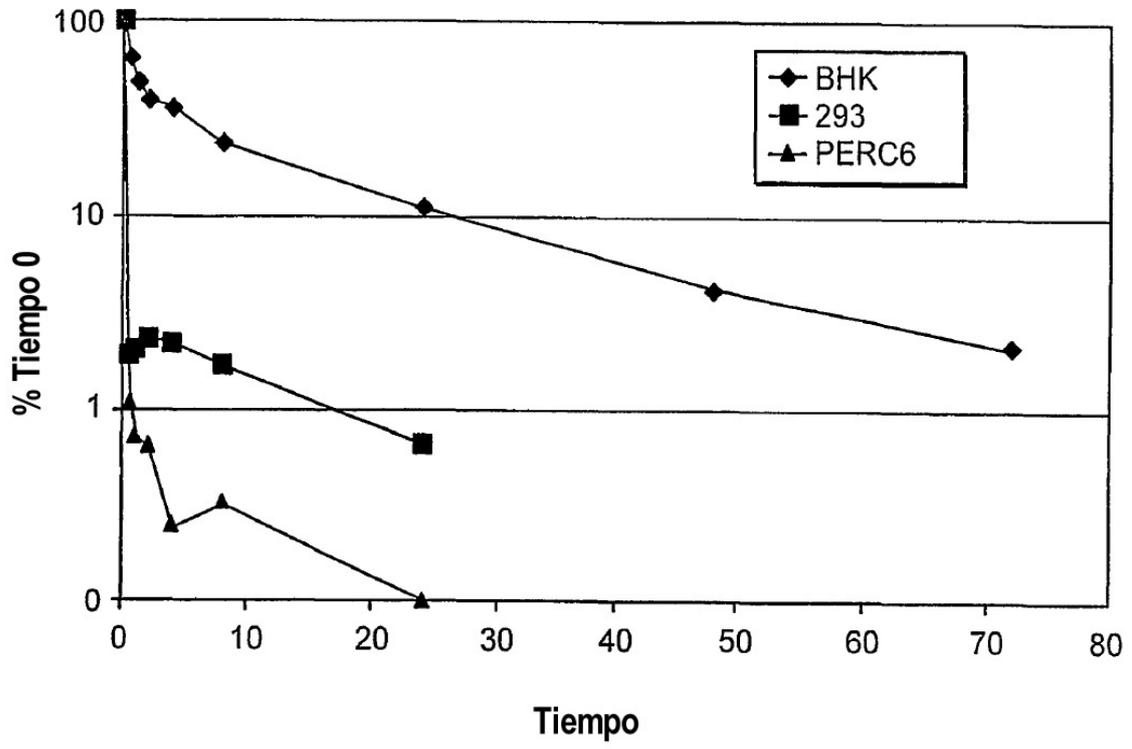


FIG. 10

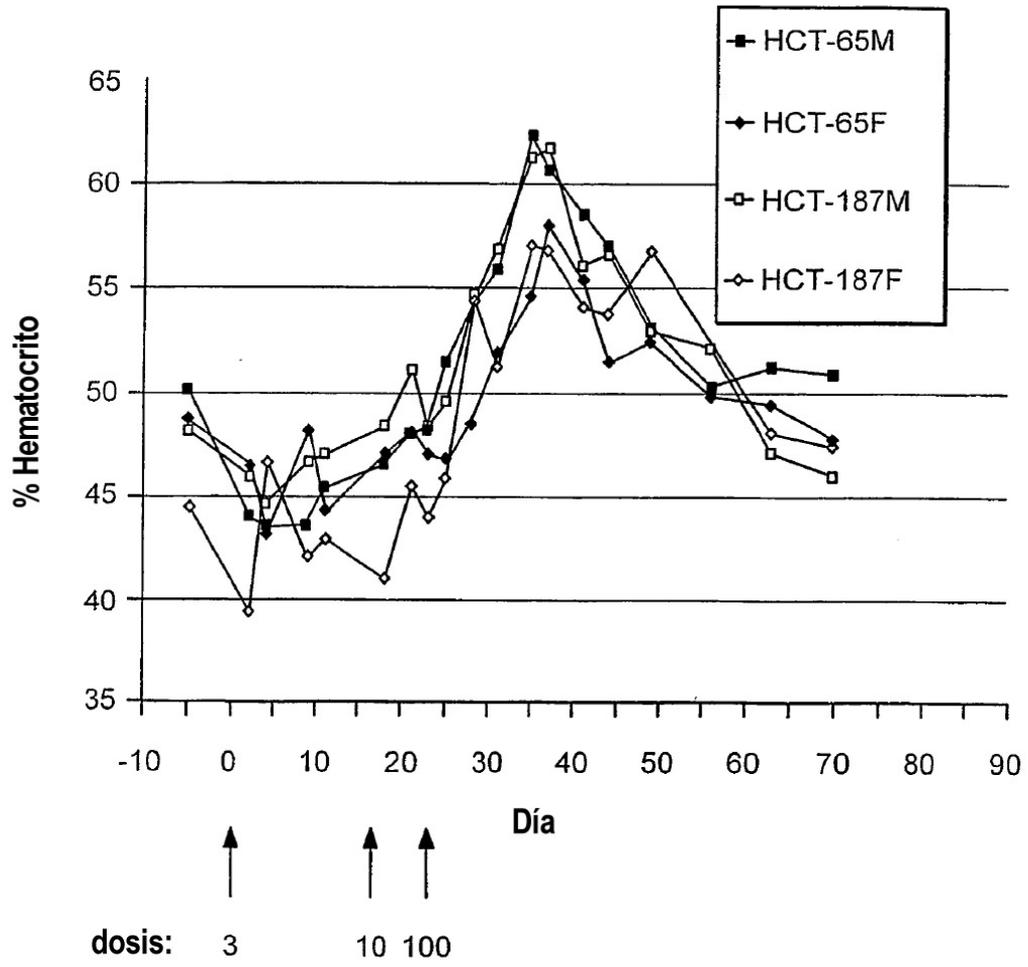


FIG. 11