

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 413**

51 Int. Cl.:

C07K 14/505 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2004 E 04760995 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **15.02.2006 EP 1625156**

54 Título: **Péptidos que se unen al receptor de eritropoyetina**

30 Prioridad:

12.05.2003 US 470245 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.02.2013

73 Titular/es:

**AFFYMAX, INC. (100.0%)
4001 MIRANDA AVENUE
PALO ALTO, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**HOLMES, CHRISTOPHER, P.;
YIN, QUN;
LALONDE, GUY;
SCHATZ, PETER, J.;
TUMELTY, DAVID;
PALANI, BALU y
ZEMEDE, GENET**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 395 413 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

PÉPTIDOS QUE SE UNEN AL RECEPTOR DE ERITROPOYETINACAMPO DE LA INVENCIÓN

5 **[0001]** La presente invención hace referencia a compuestos de péptidos que son agonistas del receptor de la eritropoyetina (EPO-R) y usos de los mismos para tratar alteraciones asociadas a una producción de glóbulos rojos deficiente o insuficiente. También se proporcionan las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de péptidos de la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 **[0002]** La eritropoyetina (EPO) es una hormona de glicoproteína de 165 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 34 kilodaltones (kD) y lugares de glicosilación preferidos en las posiciones de aminoácido 24, 38, 83, y 126. Se produce inicialmente como una proteína precursora con un péptido señal de 23 aminoácidos. La EPO puede producirse de tres formas: α , β , y asialo. Las formas α y β difieren ligeramente en sus
15 componentes de carbohidratos, pero tienen la misma potencia, actividad biológica, y peso molecular. La forma asialo es una forma α o β con el carbohidrato terminal (ácido siálico) eliminado. Han sido presentadas secuencias de ADN que codifican la EPO [patente estadounidense nº 4.703.008 a Lin].

[0003] La EPO estimula la división mitótica y la diferenciación de las células precursoras de
20 eritrocitos, y garantiza así la producción de eritrocitos. Se produce en el riñón cuando prevalecen condiciones hipóxicas. Durante la diferenciación de células precursoras de eritrocitos inducida por la EPO, se induce la síntesis de la globina; se estimula la síntesis del complejo hemo; y el número de receptores de ferritina aumenta. Estos cambios permiten a la célula tomar más hierro y sintetizar la hemoglobina funcional, que en los
25 eritrocitos maduros se une al oxígeno. Por lo tanto, los eritrocitos y su hemoglobina juegan un papel crucial en el suministro de oxígeno al cuerpo. Estos cambios se inician mediante la interacción de la EPO con un receptor apropiado en la superficie celular de las células precursoras de eritrocitos [Véase, p.ej., Graber y Krantz (1978) *Ann. Rev. Med.* 29:51-66].

[0004] La EPO está presente en concentraciones muy pequeñas en el plasma cuando el
30 cuerpo se encuentra en un estado sano en el que los tejidos reciben una oxigenación suficiente del número existente de eritrocitos. Esta concentración baja normal es suficiente para estimular la sustitución de glóbulos rojos que se pierden normalmente por el envejecimiento.

[0005] La cantidad de EPO en la circulación aumenta en condiciones de hipoxia cuando se
35 reduce el transporte de oxígeno por las células sanguíneas en la circulación. La hipoxia puede causarse, por ejemplo, por una pérdida de sangre sustancial a través de hemorragia,

destrucción de glóbulos rojos por una sobreexposición a la radiación, reducción en la entrada de oxígeno debido a una elevada altitud o inconsciencia prolongada, o diversas formas de anemia. En respuesta a dicho estrés hipóxico, los elevados niveles de EPO aumentan la producción de glóbulos rojos estimulando la proliferación de células progenitoras eritroides. Cuando el número de glóbulos rojos en circulación es mayor que el necesario para las necesidades de oxígeno de los tejidos normales, se disminuyen los niveles de EPO en circulación.

[0006] Puesto que la EPO es esencial en el proceso de formación de glóbulos rojos, esta hormona tiene aplicaciones potencialmente útiles en el diagnóstico y el tratamiento de trastornos sanguíneos caracterizados por una producción de glóbulos rojos baja o deficiente. Estudios recientes han proporcionado una base para la proyección de la eficacia de la terapia de EPO para una variedad de estados patológicos, trastornos, y estados de irregularidad hematológica, incluyendo: beta-talasemia [véase, Vedovato, et al. (1984) *Acta. Haematol.* 71:211-213]; fibrosis cística [véase, Vichinsky, et al. (1984) *J. Pediatric* 105:15-21]; trastornos del embarazo y menstruales [véase, Cotes, et al. (1993) *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 90:304-311]; anemia temprana del prematuro [véase, Haga, et al. (1983) *Acta Pediatr. Scand.* 72; 827-831]; lesión de médula espinal [véase, Claus-Walker, et al. (1984) *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 65:370-374]; vuelos espaciales [véase, Dunn, et al. (1984) *Eur. J. Appl. Physiol.* 52:178-182]; pérdida de sangre aguda [véase, Miller, et al. (1982) *Brit. J. Haematol.* 52:545-590]; envejecimiento [véase, Udupa, et al. (1984) *J. Lab. Clin. Med.* 103:574-580 y 581-588 y Lipschitz, et al. (1983) *Blood* 63:502-509]; diversos estados de enfermedad neoplásica acompañados por eritropoyesis anormal [véase, Dainiak, et al. (1983) *Cancer* 5:1101-1106 y Schwartz, et al. (1983) *Otolaryngol.* 109:269-272]; e insuficiencia renal [véase, Eschbach, et al. (1987) *N. Eng. J. Med.* 316:73-78].

[0007] La EPO homogénea purificada ha sido caracterizada [patente estadounidense nº 4.677.195 a Hewick]. Una secuencia de ADN que codifica la EPO fue purificada, clonada y expresada para producir polipéptidos recombinantes con las mismas propiedades bioquímicas e inmunológicas que la EPO natural. También se ha producido una molécula de EPO recombinante con oligosacáridos idénticos a aquellos en la EPO natural [véase, Sasaki, et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:12059-12076].

[0008] El efecto biológico de la EPO parece estar mediado, en parte, a través de la interacción con un receptor unido a la membrana celular. Estudios iniciales, que utilizan células eritroides inmaduras aisladas del bazo de ratón, sugirieron que las proteínas de la superficie celular de unión a la EPO comprenden dos polipéptidos que tienen pesos moleculares aproximados de 85.000 daltons y 100.000 daltons, respectivamente [Sawyer, et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3690-3694]. El número de sitios de unión a la

EPO se calculó en una media de 800 a 1000 por superficie celular. De estos sitios de unión, aproximadamente 300 se unieron a EPO con una K_D de aproximadamente 90 pM (picomolar), mientras que el resto se unió a la EPO con una afinidad reducida de aproximadamente 570 pM [Sawyer, et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:5554-5562]. Un estudio independiente sugirió que los eritroblastos esplénicos sensibles a la EPO, preparados a partir de ratones a los que se inyectó la cepa anémica (FVA) del virus de la leucemia de Friend, poseen un total de aproximadamente 400 sitios de unión de alta y baja afinidad a EPO con valores de K_D de aproximadamente 100 pM y 800 pM, respectivamente [Landschulz, et al. (1989) *Blood* 73:1476-1486].

5 **[0009]** El trabajo posterior indicó que las dos formas del receptor de EPO (EPO-R) son codificadas por un solo gen. Este gen ha sido clonado [véase, p.ej., Jones, et al. (1990) *Blood* 76, 31-35; Noguchi, et al. (1991) *Blood* 78:2548-2556; Maouche, et al. (1991) *Blood* 78:2557-2563]. Por ejemplo, las secuencias de ADN y secuencias de péptidos codificada para las proteínas de EPO-R humana y murina se describen en la Pub. PCT N° WO 15 90/08822 de D'Andrea, et al. Los modelos actuales sugieren que la unión de EPO a EPO-R resulta en la dimerización y activación de dos moléculas de EPO-R, que resulta en las fases posteriores de transducción de señal [véase, p.ej., Watowich, et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2140-2144].

[0010] La disponibilidad de genes clonados para EPO-R facilita la búsqueda de agonistas y antagonistas de este importante receptor. La disponibilidad de la proteína receptora recombinante permite el estudio de la interacción receptor/ligando en una variedad de sistemas de generación de diversidad de péptidos aleatorios o semialeatorios. Estos sistemas incluyen el sistema de "péptidos en plásmidos" [descrito en la patente estadounidense n° 6.270.170]; el sistema de "péptidos en el fago" [descrito en la patente estadounidense n° 5.432.018 y Cwirla, et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382]; el sistema de "biblioteca codificada de síntesis" (ESL, en inglés) [descrito en la solicitud de patente estadounidense n° de serie 946.239 presentada en Sep. 16, 1992]; y el sistema de "síntesis de polímero inmovilizado a muy gran escala" [descrito en la patente estadounidense n° 5.143.854; Pub. PCT n° 90/15070; Fodor, et al. (1991) *Science* 251:767-773; Dower and Fodor (1991) *Ann. Rep. Med. Chem.* 26:271-180; y patente estadounidense n° 5.424.186].

[0011] Se han identificado y descrito los péptidos que interactúan al menos en cierta medida con el EPO-R, por ejemplo en las patentes estadounidenses n° 5.773.569, 5.830.851 y 5.986.047 de Wrighton, et al.; Pub. PCT n° WO 96/40749 de Wrighton, et al.; patente estadounidense n° 5.767.078 y Pub. PCT n° 96/40772 de Johnson y Zivin; Pub. PCT n° WO 01/38342 de Balu; y WO 01/91780 de Smith-Swintosky, et al. En especial, se

ha identificado un grupo de péptidos que contienen un motivo peptídico, cuyos miembros se unen al EPO-R y estimulan la proliferación celular dependiente de la EPO. Sin embargo, los péptidos identificados hasta ahora que contienen el motivo estimulan la proliferación celular dependiente de la EPO *in vitro* con valores CE50 de aproximadamente entre 20 nanomolar (nM) y 250 nM. Por lo tanto, se requieren concentraciones de péptidos de 20 nM a 250 nM para estimular un 50% de la proliferación celular máxima estimulada por EPO.

[0012] Dado el inmenso potencial de agonistas de EPO-R, tanto para estudios de las actividades biológicas importantes mediadas por este receptor como para el tratamiento de enfermedades, continúa existiendo una necesidad de identificar agonistas peptídicos de EPO-R de potencia y actividad mejorada. La presente invención proporciona dichos compuestos.

[0013] La cita y/o análisis de las referencias mencionadas en esta sección y a lo largo de la especificación se aporta simplemente para aclarar la descripción de la presente invención y no es una admisión de que dichas referencias sean "técnica precedente" de la presente invención".

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0014] La presente invención proporciona péptidos agonistas del EPO-R con una actividad y potencia drásticamente mejorada. Estos agonistas incluyen agonistas péptidos monoméricos de 17 a 40 aminoácidos de longitud que comprenden la secuencia de aminoácidos básica LYACHX₀GPITX₁VCQPLR (SEQ ID NO: 1), donde cada aminoácido se indica mediante una abreviatura de una letra estándar, X₀ es metionina (M) o homoserina metil éter (Hsm), y X₁ es triptófano (W), 1-naftilalanina (1-nal), o 2-naftilalanina (2-nal); así como agonistas péptidos diméricos que comprenden dos monómeros peptídicos, en los que cada monómero peptídico tiene de 17 a 40 aminoácidos de longitud y comprende la secuencia de aminoácidos básica de LYACHX₀GPITX₀VCQPLR (SEQ ID NO:1), donde cada aminoácido se indica por una abreviatura de letra estándar, X₀ es metionina (M) o homoserina metil éter (Hsm), y X₁ es triptófano (W), 1-naftilalanina (1-nal), o 2-naftilalanina (2-nal). La potencia de estos agonistas peptídicos novedosos puede aumentarse en mayor medida mediante una o más modificaciones, incluyendo: acetilación, formación de enlaces de disulfuro intramoleculares, y unión covalente de una o más fracciones de polietilenglicol (PEG). La invención proporciona además composiciones farmacéuticas compuestas de dichos agonistas peptídicos, y usos de dichos péptidos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones:

[0015] Los residuos de aminoácidos en los péptidos se abrevian como sigue: fenilalanina

es Phe o F; Leucina es Leu o L; Isoleucina es Ile o I; Metionina es Met o M; Valina es Val o V; Serina es Ser o S; Prolina es Pro o P; Treonina es Thr o T; Alanina es Ala o A; Tirosina es Tyr o Y; Histidina es His o H; Glutamina es Gln o Q; Asparagina es Asn o N; Lisina es Lys o K; Ácido Aspártico es Asp o D; Ácido Glutámico es Glu o E; Cisteína es Cys o C; 5 Triptófano es Trp o W; Arginina es Arg o R; y Glicina es Gly o G. Los aminoácidos no convencionales en péptidos se abrevian de la siguiente manera: 1-naftilalanina es 1-nal o Np; 2-naftilalanina es 2-nal; N-metilglicina (también conocido como sarcosina) es MeG o Sc; homoserina metil éter es Hsm; y glicina acetilada (N-acetilglicina) es AcG.

[0016] Según su uso aquí, el término "polipéptido" o "proteína" se refiere a un polímero de 10 monómeros de aminoácidos que son alfa-aminoácidos unidos a través de enlaces amida. Por lo tanto, los polipéptidos son de una longitud de al menos dos residuos de aminoácidos, y normalmente son más largos. Generalmente, el término "péptido" se refiere a un polipéptido que tiene pocos residuos de aminoácidos de longitud. Los péptidos agonistas de EPO-R novedosos de la presente invención son de 17 a 40 residuos de aminoácidos de 15 longitud. Un polipéptido, en contraste con un péptido, puede comprender cualquier número de residuos de aminoácidos. Por tanto, el término polipéptido incluye péptidos así como secuencias más largas de aminoácidos.

[0017] Según su uso aquí, la expresión "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a composiciones y entidades moleculares que son "generalmente consideradas como 20 seguras", p.ej., que son tolerables fisiológicamente y no producen normalmente una reacción alérgica o adversa similar, como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, según su uso aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de algún estado de Estados Unidos o incluido en la Farmacopea de EE. UU u 25 otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más específicamente en seres humanos. El término "portador" hace referencia a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuete, aceite de soja, 30 aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua o soluciones acuosas, las soluciones salinas y las soluciones de glicerol y dextrosa acuosas se emplean preferiblemente como portadores, especialmente para las soluciones inyectables. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "*Remington's Pharmaceutical Sciences*" de E.W. Martin.

[0018] Según su uso aquí, el término "agonista" se refiere a un ligando biológicamente 35 activo que se une a su receptor biológicamente activo complementario y activa a éste último para causar una respuesta biológica en el receptor, o para potenciar la actividad

biológica preexistente del receptor.

Péptidos novedosos que son agonistas del EPO-R

[0019] La presente invención hace referencia a péptidos que son agonistas del EPO-R y muestran una potencia y actividad drásticamente aumentada. Estos agonistas peptídicos son preferiblemente de 17 a 40 aminoácidos de longitud y comprenden la secuencia de aminoácidos básica LYACHX₀GPITX₁VCQPLR (SEQ ID NO: I), donde cada aminoácido se indica mediante una abreviatura de una letra estándar, X₀ es metionina (M) o homoserina metil éter (Hsm), y X₁ es triptófano (W), 1-naftilalanina (1-nal), o 2-naftilalanina (2-nal).

[0020] Los péptidos de esta invención pueden ser monómeros, dímeros, u otros multímeros. Los multímeros péptídicos de la invención pueden ser trímeros, tetrámeros, pentámeros, u otras estructuras de órdenes superiores. Además, dichos dímeros y otros multímeros pueden ser heterodímeros o heteromultímeros. Los monómeros peptídicos de la presente invención pueden ser productos de degradación (p.ej., productos de oxidación de metionina o glutamina desamidada, arginina y amida C-terminal). Dichos productos de degradación puede usarse en, y por tanto considerarse parte de, la presente invención. En los modos de realización preferidos, los heteromultímeros de la invención comprenden múltiples péptidos que son todos péptidos agonistas del EPO-R. En modos de realización altamente preferidos, los multímeros de la invención son homomultímeros: es decir, comprenden múltiples péptidos agonistas del EPO-R de la misma secuencia de aminoácidos.

[0021] Por consiguiente, la presente invención también hace referencia a péptidos diméricos agonistas del EPO-R, que muestran potencia y actividad drásticamente aumentadas. En los modos de realización preferidos, los dímeros de la invención comprenden dos péptidos que son ambos péptidos agonistas del EPO-R. Estos agonistas peptídicos diméricos preferidos comprenden dos monómeros peptídicos, en los que cada monómero peptídico tiene de 17 a 40 aminoácidos de longitud y comprende la secuencia de aminoácidos básica LYACHX₀CPITX₁VCQPLR (SEQ ID NO: 1), donde cada aminoácido se indica mediante una abreviatura de una letra estándar, X₀ es metionina (M) o homoserina metil éter (Hsm), y X₁ es triptófano (W), 1-naftilalanina (1-nal); o 2-naftilalanina (2-nal). En modos de realización especialmente preferidos, los dímeros de la invención comprenden dos péptidos agonistas del EPO-R de la misma secuencia de aminoácidos.

[0022] Según algunos modos de realización de la invención, dos o más, y preferiblemente de dos a seis residuos de aminoácidos, seleccionados de forma independiente de cualquiera de los 20 L-aminoácidos codificados genéticamente o los D-aminoácidos

estereoisoméricos, se unirán a uno o ambos extremos de la secuencia básica descritas arriba. Por ejemplo, la secuencia GG a menudo se agregará a cualquier extremo o ambos extremos de la secuencia básica.

[0023] Los estereoisómeros (p.ej., D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos artificiales como aminoácidos a,a-disustituidos, n-alquil aminoácidos, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales pueden ser componentes adecuados para los compuestos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen, sin carácter limitativo: β-alanina, 3-piridilalanina, 4-hidroxiprolina, O-fosfoserina, N-metilglicina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisina, norleucina y otros aminoácidos e iminoácidos similares.

[0024] También son posibles otras modificaciones, incluyendo la modificación del extremo amino-terminal, modificación del extremo carboxi-terminal, sustitución de uno o más aminoácidos codificados genéticamente de origen natural con un aminoácido no convencional, modificación de la cadena lateral de uno o más residuos de aminoácidos, fosforilación de péptidos y similares. Una modificación del extremo amino-terminal preferida es la acetilación (p.ej., con ácido acético o un ácido acético sustituido con halógeno). En modos de realización preferidos, una glicina N-terminal se acetila a N-acetilglicina (AcG). En modos de realización preferidos, la glicina C-terminal es N-metilglicina (MeG, también llamada sarcosina).

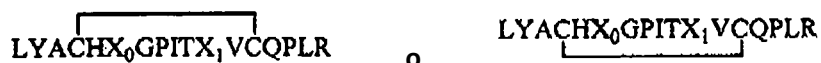
[0025] La presente invención exige la presencia de Ile en el motivo GPXT, para obtener GPIT. Esto no se revela en WO 96/40749A, WO 96/40772A y WO 01/38342A (*supra*). Además, los fragmentos peptídicos antes y después de dicho motivo en la presente invención tampoco se encuentran en la técnica precedente. La ventaja de la presente secuencia es que proporciona una actividad de unión al EPO-R aumentada en comparación con los motivos GPXT de la técnica.

[0026] Los monómeros de los péptidos preferidos de la presente invención incluyen, sin carácter limitativo:

- | | | |
|----|--------------------------------|-----------------|
| | LYACHMGPITWVCQPLR | (SEQ ID NO: 2); |
| 30 | LYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR | (SEQ ID NO: 3); |
| | LYACHMGPIT(2-nal)VCQPLR | (SEQ ID NO: 4); |
| | GGLYACHMGPITWVCQPLRG | (SEQ ID NO: 5); |
| | GGLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRG | (SEQ ID NO: 6); |
| | GGLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLRG | (SEQ ID NO: 7); |
| 35 | (AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG | (SEQ ID NO: 8); |
| | (AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRG | (SEQ ID NO: 9); |

	(AcG)GLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 10);
	GGLYACHMGPITWVCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 11);
	GGLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 12);
	GGLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 13);
5	(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 14);
	(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 15);
	(AcG)GLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 16);
	LYACH(Hsm)GPITWVCQPLR	(SEQ ID NO: 17);
	LYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR	(SEQ ID NO: 18);
10	LYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR	(SEQ ID NO: 19);
	GGLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG	(SEQ ID NO: 20);
	GGLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 21);
	GGLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 22);
	(AcG)GLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG	(SEQ ID NO: 23);
15	(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 24);
	(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 25);
	GGLYACH(Hsm)GPITWVCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 26);
	GGLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 27);
	GGLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 28);
20	(AcG)GLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 29);
	(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 30); y
	(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 31).

[0027] En modos de realización preferidos, los monómeros peptídicos de la invención
 25 contienen un enlace disulfuro intramolecular entre los dos residuos de cisteína de la
 secuencia básica. Dichos monómeros pueden representarse esquemáticamente de la
 siguiente manera:



30 [0028] La presente invención también proporciona conjugados de estos monómeros
 peptídicos. Por lo tanto, según un modo de realización preferido, los péptidos monoméricos
 de la presente invención son dimerizados u oligomerizados, aumentando así la actividad
 agonista de EPO-R.

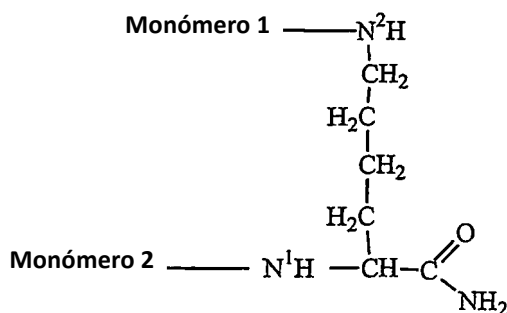
35 [0029] En un modo de realización, los monómeros peptídicos de la invención pueden

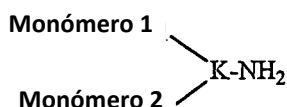
oligomerizarse utilizando el sistema biotina-estreptavidina, los análogos biotinizados de monómeros peptídicos pueden sintetizarse utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, los monómeros peptídicos pueden ser biotinizados de forma C-terminal. Estos monómeros biotinizados se oligomerizan después mediante incubación con estreptavidina [p.ej., a una ratio molar de 4:1 a temperatura ambiente en solución salina fosfatada (PBS) o medio RPMI con tampón de HEPES (Invitrogen) durante 1 hora]. En una variación de este modo de realización, los monómeros peptídicos biotinizados pueden oligomerizarse mediante incubación con cualquiera de una variedad de anticuerpos antibiotina disponibles en el mercado [p.ej., IgG antibiotina de cabra de Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, DC)].

[0030] En modos de realización preferidos, los monómeros peptídicos de la invención son dimerizados mediante unión covalente de al menos una fracción de enlace. La fracción de enlace (L_K) es, preferiblemente, aunque no necesariamente, una fracción de enlace C_{1-12} terminada opcionalmente con uno o dos enlaces -NH- y opcionalmente sustituida en uno o más átomos de carbono disponibles con un sustituyente alquilo inferior. Preferiblemente el enlazador L_K comprende -NH-R-NH- donde R es un alquileo C_{1-6} sustituido con un grupo funcional como un grupo carboxilo o un grupo amino que permite el enlace a otra fracción molecular (p.ej., como puede estar presente en la superficie de un soporte sólido). Más preferiblemente el enlazador es un residuo de lisina o una lisina amida (un residuo de lisina en el que el grupo carboxilo se ha convertido en una fracción amida -CONH₂). En un modo de realización preferido, el enlazador une los extremos C-terminales de dos monómeros peptídicos, mediante unión simultánea del aminoácido C-terminal de cada monómero.

[0031] Por ejemplo, cuando el enlazador C-terminal L_K es una lisina amida el dímero puede ilustrarse estructuralmente como se muestra en la Fórmula I, y resumirse como se muestra en la Fórmula II:

Fórmula I



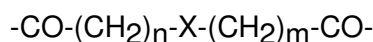
Fórmula II

- 5 **[0032]** En la Fórmula I y Fórmula II, N₂ representa el átomo de nitrógeno del grupo ε-amino de lisina y N' representa el átomo de nitrógeno del grupo α-amino de la lisina. La estructura dimérica puede escribirse como [péptido]₂Lysamida para denotar un péptido unido tanto al grupo α amino como al ε amino de lisina, o [Ac-péptido]₂Lys-amida para denotar un péptido acetilado de forma N-terminal unido tanto al grupo α amino como al ε amino de lisina, o
- 10 [Ac-péptido,disulfuro]₂Lys-amida para denotar un péptido acetilado de forma N-terminal unido tanto al grupo α amino como al ε amino de lisina con cada péptido que contiene un bucle disulfuro intramolecular, o [Ac-péptido,disulfuro]₂Lys-espaciador-PEG para denotar un péptido acetilado de manera N-terminal unido tanto al grupo α amino como al ε amino de
- 15 lisina conteniendo cada péptido un bucle disulfuro intramolecular y una molécula espaciadora que forma un enlace covalente entre el extremo C-terminal de lisina y una fracción de PEG, o [Ac-péptido-Lys*-NH₂]₂Iminodiacético-N-(Boc-βAla) para denotar un homodímero de un péptido acetilado de forma N-terminal portando un residuo lisina amida C-terminal donde el ε amino de lisina está unido a cada uno de los dos grupos carboxilo de ácido iminodiacético y donde Boc-beta-alanina está unido de forma covalente al átomo de
- 20 nitrógeno del ácido iminodiacético mediante un enlace amida.

[0033] En un modo de realización adicional, el polietilenglicol (PEG) puede actuar como el enlazador L_K que dimeriza dos monómeros peptídicos: por ejemplo, una sola fracción de PEG puede unirse simultáneamente a los extremos N-terminales de ambas cadenas peptídicas de un dímero peptídico.

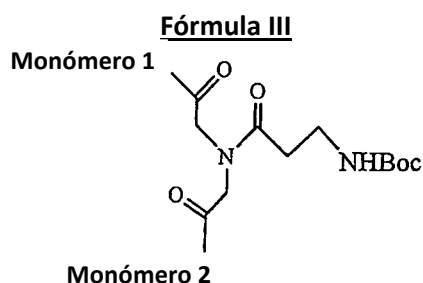
- 25 **[0034]** En otro modo de realización adicional, la fracción enlazadora (L_K) es preferiblemente, pero no necesariamente, una molécula que contiene dos ácidos carboxílicos y opcionalmente sustituida en uno o más átomos disponibles con un grupo funcional adicional como una amina capaz de unirse a una o más moléculas de PEG. Dicha molécula puede representarse como:

30

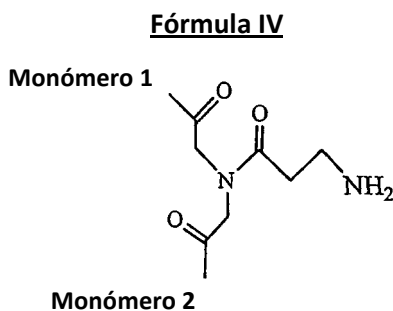


donde n es un entero de 0 a 10, m es un entero de 1 a 10, X se elige entre O, S, $N(CH_2)_pNR_1$, $NCO(CH_2)_pNR_1$, y $CHNR_1$, R_1 se elige entre H, Boc, Cbz, etc., y p es un entero de 1 a 10.

[0035] En modos de realización preferidos, un grupo amino de cada uno de los péptidos forma un enlace amida con el enlazador L_K . En modos de realización especialmente preferidos, el grupo amino del péptido unido al enlazador L_K es la épsilon-amina de un residuo de lisina o la alfa-amina del residuo N-terminal, o un grupo amino de la molécula espaciadora opcional. En modos de realización preferidos, tanto n como m son uno, X es $NCO(CH_2)_pNR_1$, p es dos, y R_1 es Boc. Un péptido de EPO dimérico que contiene dicho enlazador preferido puede ilustrarse estructuralmente como se muestra en la Fórmula III.



Opcionalmente, el grupo Boc puede eliminarse para liberar un grupo amina reactivo capaz de formar un enlace covalente con una especie de polímero soluble en agua activado de manera adecuada, por ejemplo, una especie de PEG como mPEG-para-nitrofenil carbonato (mPEG-NPC), mPEG-succinimidil propionato (mPEG-SPA), y N-hidroxisuccinimida-PEG (NHS-PEG)(véase, p.ej., patente estadounidense nº 5.672.662). Un péptido de EPO dimérico que contiene dicho enlazador preferido puede ilustrarse estructuralmente como se muestra en la Fórmula IV.

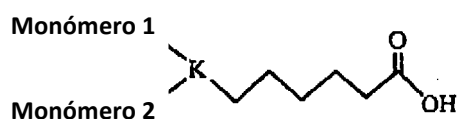


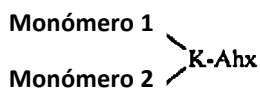
[0036] Generalmente, aunque no de forma necesaria, los dímeros de péptidos contendrán también uno o más enlaces disulfuro intramoleculares entre los residuos de cisteína de los monómeros peptídicos. Preferiblemente, los dos monómeros contienen al menos un enlace disulfuro intramolecular. Más preferiblemente, ambos monómeros de un dímero peptídico contiene un enlace disulfuro intramolecular, de forma que cada monómero contiene un grupo cíclico.

[0037] Un monómero o dímero peptídico puede comprender también una o más fracciones espaciadoras. Dichas fracciones espaciadoras pueden unirse a un monómero peptídico o a un dímero peptídico. Preferiblemente, dichas fracciones espaciadoras están unidas a la fracción enlazadora L κ que conecta los monómeros de un dímero peptídico. Por ejemplo, dichas fracciones espaciadoras pueden unirse a un dímero peptídico mediante el carbono carbonilo de un enlazador de lisina, o mediante el átomo de nitrógeno de un enlazador de ácido iminodiacético. Por ejemplo, dicho espaciador puede conectar el enlazador de un dímero peptídico a una fracción de polímero soluble en agua unida o un grupo de protección. En otro ejemplo, dicho espaciador puede conectar un monómero peptídico a una fracción de polímero soluble en agua unida.

[0038] En un modo de realización, la fracción espaciadora es una fracción de enlace C₁₋₁₂ terminada opcionalmente con enlaces -NH- o grupos carboxilo (-COOH), y sustituidos opcionalmente en uno o más átomos de carbono disponibles con un sustituyente de alquilo inferior. En un modo de realización, el espaciador es R-COOH en el que R es un alqueno C₁₋₆ sustituido opcionalmente con un grupo funcional como un grupo carboxilo o un grupo amino que permite la unión a otra fracción molecular. Por ejemplo, el espaciador puede ser un residuo de glicina (G), o un ácido aminohexanoico. En modos de realización preferidos, el ácido aminohexanoico es ácido 6-aminohexanoico (Ahx). Por ejemplo, cuando el espaciador de ácido 6-aminohexanoico (Ahx) está unido al extremo N-terminal de un péptido, el grupo amina terminal del péptido puede estar unido al grupo carboxilo de Ahx mediante un enlace amida estándar. En otro ejemplo, cuando Ahx está unido al extremo C-terminal de un péptido, la amina de Ahx puede unirse al grupo carboxilo del aminoácido terminal mediante un enlace amida estándar. La estructura de dicho péptido puede representarse como se muestra en la Fórmula V, y resumirse como se muestra en la Fórmula VI.

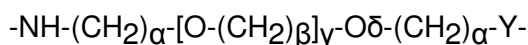
Fórmula V



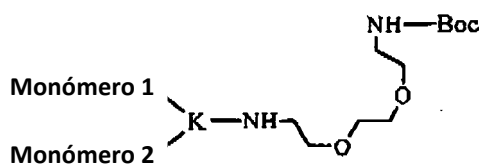
Fórmula VI

[0039] En otros modos de realización, el espaciador es -NH-R-NH- en el que R es un alquileo C_{1-6} sustituido con un grupo funcional como un grupo carboxilo o un grupo amino que permite la unión a otra fracción molecular. Por ejemplo, el espaciador puede ser un residuo de lisina (K) o una lisina amida (K-NH₂, un residuo de lisina en el que el grupo carboxilo se ha convertido en una fracción amida -CONH₂).

[0040] En modos de realización preferidos, la fracción espaciadora tiene la siguiente estructura:



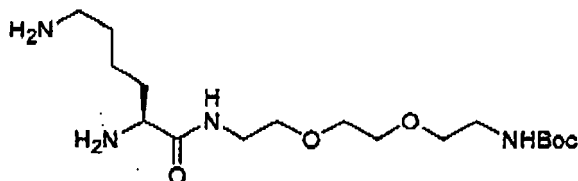
donde α , β , γ , δ , y ϵ son todos números enteros cuyos valores se seleccionan de forma independiente. En modos de realización preferidos, α , β , y ϵ son todos enteros cuyos valores se seleccionan de forma independiente del 1 al seis aproximadamente, δ es cero o uno, γ es un entero seleccionado del cero al diez aproximadamente, salvo que cuando γ es mayor que uno, β es dos, y Y se selecciona de NH o CO. En modos de realización especialmente preferidos, α , β , y ϵ son iguales a dos, ambos γ y δ son iguales a 1, y Y es NH. Por ejemplo, un dímero peptídico que contiene dicho espaciador se ilustra esquemáticamente en la Fórmula VII, donde el enlazador es una lisina y el espaciador une el enlazador a un grupo protector BOC.

Fórmula VII

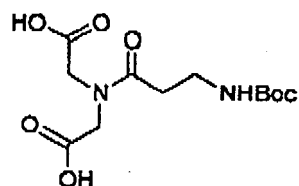
En otro modo de realización especialmente preferido, γ y δ son cero, α y ϵ juntos son igual a cinco, y Y es CO.

[0041] En modos de realización especialmente preferidos, el enlazador más la fracción espaciadora tienen la estructura mostrada en la Fórmula VIII o la Fórmula IX.

Fórmula VIII



Fórmula IX



5

[0042] Los monómeros, dímeros o multímeros peptídicos de la presente invención pueden comprender además una o más fracciones de polímero soluble en agua. Preferiblemente, estos polímeros están unidos de forma covalente a los compuestos peptídicos de la invención. Preferiblemente, para el uso terapéutico de la preparación del producto final el polímero será farmacéuticamente aceptable. Una persona con experiencia en la técnica podrá seleccionar el polímero deseado basándose en consideraciones como si el conjugado polímero-péptido se usará terapéuticamente, y en caso afirmativo, la dosis deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis, y otras consideraciones. El polímero soluble en agua puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli(n-vinilpirrolidona), polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, y polioles polioxietilados. Un polímero soluble en agua preferido es PEG.

[0043] El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. Un PEG preferido para su uso en la presente invención comprende un PEG lineal no ramificado que tiene un peso molecular superior a 10 kilodaltons (kD) y más preferiblemente de entre 20 y 60 kD de peso molecular. Aún más preferiblemente, la fracción de PEG lineal no ramificada debería tener un peso molecular de entre 20 y 40 kD, siendo especialmente preferido el PEG de 20 kD. Se entiende que en una preparación de PEG dada, los pesos moleculares variarán normalmente entre las moléculas individuales. Algunas moléculas pesarán más, y algunas menos, del peso molecular indicado.

[0044] El número de moléculas de polímero unidas puede variar; por ejemplo, una, dos, tres o más polímeros solubles en agua pueden unirse a un péptido agonista del EPO-R de la invención. Los múltiples polímeros unidos pueden ser fracciones químicas iguales o diferentes (p.ej., PEGs de diferente peso molecular). Por lo tanto, en un modo de realización preferido la invención contempla péptidos agonistas del EPO-R que tienen dos o

35

más fracciones de PEG unidas a los mismos. Preferiblemente, ambas fracciones de PEG son PEG lineal no ramificado con un peso molecular de preferiblemente entre 10 y 60 kD. Más preferiblemente, cada fracción de PEG lineal no ramificada tiene un peso molecular que se encuentra entre 20 y 40 kD, y aún más preferiblemente entre 20 y 30 kD, siendo especialmente preferido un peso molecular de 20 kD para cada fracción de PEG lineal. Sin embargo, también se contemplan otros pesos moleculares de PEG en dichos modos de realización. Por ejemplo, la invención contempla y abarca péptidos agonistas del EPO-R que tienen dos o más fracciones de PEG lineales no ramificadas unidas a los mismos, al menos una o ambas de las cuales tienen un peso molecular de entre 20 y 40 kD o entre 20 y 30 kD. En otros modos de realización, la invención contempla y abarca péptidos agonistas del EPO-R que tienen dos o más fracciones de PEG lineales no ramificadas unidas a los mismos, al menos una de las cuales tiene un peso molecular de entre 40 y 60 kD.

[0045] En un modo de realización, el PEG puede actuar como enlazador que dimeriza dos monómeros peptídicos. En un modo de realización, el PEG está unido a al menos un extremo terminal (N-terminal o C-terminal) de un monómero o dímero peptídico. En otro modo de realización, el PEG está unido a una fracción espaciadora de un monómero o dímero peptídico. En un modo de realización preferido, el PEG está unido a la fracción enlazadora de un dímero peptídico. En un modo de realización altamente preferido, el PEG está unido a una fracción espaciadora, donde dicha fracción espaciadora se une a la fracción enlazadora L_K que conecta los monómeros de un dímero peptídico. En modos de realización especialmente preferidos, el PEG está unido a una fracción espaciadora, donde dicha fracción espaciadora se une a un dímero peptídico mediante el carbono carbonilo de un enlazador de lisina, o el nitrógeno de la amida de un enlazador de lisina amida.

[0046] Los dímeros peptídicos preferidos de la presente invención incluyen, sin carácter limitativo:

5

10

15

20

25

Denominación del compuesto	Dímero peptídico
AF33065	
AF34602	
AF34395	
AF34601	
AF32579	
AF33068	
AF33131	

5

10

15

20

25

30

Denominación del compuesto	Dímero peptídico
AF34351	$\begin{array}{c} \boxed{\text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG}} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{K-Abx-Abx} \\ \boxed{\text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG}} \end{array}$
AF34350	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{PEG}_{5k}-\text{O}-\text{I}-\text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG} \\ \text{O} \\ \parallel \\ \text{PEG}_{5k}-\text{O}-\text{I}-\text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{K-NH}_2 \end{array}$
AF34753	$\begin{array}{c} \boxed{(\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG}} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{K-Abx-Abx} \\ \boxed{(\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG}} \end{array}$
AF34757	$\begin{array}{c} \boxed{(\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG}} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{K-Abx-Abx-PEG}_{5k} \\ \boxed{(\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG}} \end{array}$
AF35062	$\begin{array}{c} \boxed{(\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG}} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{K-Abx-Abx-PEG}_{20k} \\ \boxed{(\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG}} \end{array}$
AF35218	$\begin{array}{c} \boxed{(\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRGGKG}} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{K-NH}_2 \\ \boxed{(\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRGGKG}} \end{array}$
AF35462	$\begin{array}{c} \boxed{(\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG}} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{KGG} \\ \boxed{(\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG}} \end{array}$

5

10

15

20

25

30

Denominación del compuesto	Dímero peptídico
AF35464	$\begin{array}{c} \text{(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG} \\ \text{(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG} \end{array} \text{KK-NH}_2$
AF33197	$\begin{array}{c} \text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLRG} \\ \text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLRG} \end{array} \text{K-NH}_2$
AF34994	$\begin{array}{c} \text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)} \\ \text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)} \end{array} \text{K-NH}_2$
AF35083	$\begin{array}{c} \text{PEG}_{20\text{K}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}-\text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)} \\ \text{PEG}_{20\text{K}}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}-\text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)} \end{array} \text{K-NH}_2$
AF35525	$\begin{array}{c} \text{(AcG)GLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)} \\ \text{(AcG)GLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)} \end{array} \text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
AF35526	$\begin{array}{c} \text{(AcG)GLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)} \\ \text{(AcG)GLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)} \end{array} \text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{PEG}_{20\text{K}}$

5

10

15

20

25

30

Denominación del compuesto	Dímero peptídico
AF35563	
AF35575	
AF35592	
AF35593	

5
10
15
20
25
30

Denominación del compuesto	Dímero peptídico
AF35594	<p>(AcG)GLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLR(MeG)→NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLR(MeG)→HN</p>
AF35219	<p>(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRGG→NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRGG→HN</p>
AF32876	<p>GGLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG</p> <p>GGLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG</p>
AF32881	<p>GGLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG</p> <p>GGLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG</p>
AF35179	<p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG</p> <p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG</p>

5

10

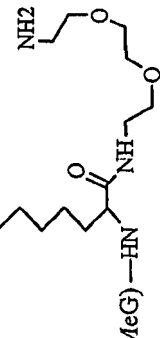
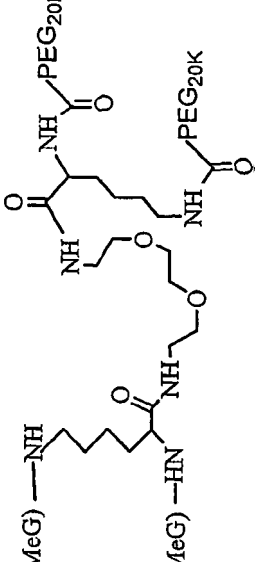
15

20

25

30

35

Denominación del compuesto	Dímero peptídico
AF35180	$\begin{array}{c} \text{(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG} \\ \text{(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{K-Abx-Abx-PEG}_{20\text{K}}$
AF35463	$\begin{array}{c} \text{(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)} \\ \text{(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{KGG}$
AF35090	$\begin{array}{c} \text{GGLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG(MeG)} \\ \text{GGLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG(MeG)} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{K-NH}_2$
AF35148	$\begin{array}{c} \text{PEG}_{20\text{K}}-\text{O}-(\text{AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)} \\ \text{PEG}_{20\text{K}}-\text{O}-(\text{AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{K-NH}_2$
AF35149	$\begin{array}{c} \text{(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)} \\ \text{(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{NH} \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{---} \end{array}$ 
AF35168	$\begin{array}{c} \text{(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)} \\ \text{(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)} \end{array} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{NH} \begin{array}{c} \text{NH} \text{---} \text{PEG}_{20\text{K}} \\ \\ \text{---} \end{array}$ 

5

10

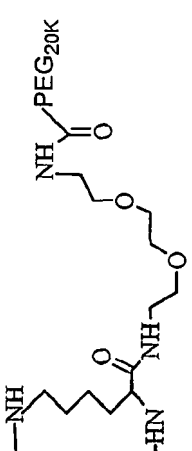
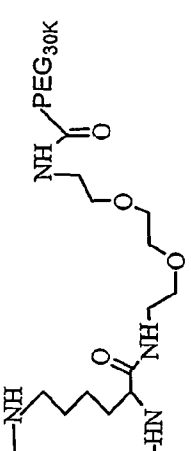
15

20

25

30

35

Denominación del compuesto	Dímero peptídico
AF35361	<p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR(MeG) — KK-NH₂</p> <p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR(MeG)</p>
AF35595	<p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR(MeG) — NH</p> <p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR(MeG) — HN</p> 
AF35564	<p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR(MeG) — NH</p> <p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR(MeG) — HN</p> 

79	Ac	R	N	D	L	A	Y	S	C	R	M	G	P	L	T	W	V	C	S	S	R	G	T	Q	K	NH ₂		Monómero
80	Ac	P	D	L	A	Y	S	C	R	M	G	P	L	T	W	V	C	A	P	N	R	K	NH ₂					Monómero
81	Ac	L	G	R	R	Y	S	C	H	F	G	P	L	T	W	V	C	Q	P	A	R	R	D	K	NH ₂		Monómero	
82	Ac	L	L	R	G	Y	E	C	Y	M	G	P	L	T	W	V	C	R	S	S	R	P	R	K	NH ₂		Monómero	
83	Ac	M	R	T	R	Y	C	Y	M	G	P	L	T	W	V	C	E	G	S	R	L	K	NH ₂				Monómero	
84	Ac	H	L	G	R	Y	D	C	S	F	G	P	L	T	W	V	C	P	R	S	R	S	L	K	NH ₂		Monómero	
85	Ac	I	R	G	R	N	R	C	R	F	G	P	L	T	W	V	C	P	D	S	Y	E	F	K	NH ₂		Monómero	
86	Ac	R	P	R	P	Y	S	C	T	M	G	P	L	T	W	V	C	G	G	V	R	A	G	K	NH ₂		Monómero	
87	Ac	V	L	P	L	Y	R	C	R	M	G	R	E	T	W	E	C	M	R	A	A	G	V	T	K	NH ₂		Monómero
88	Ac	P	G	N	S	Y	R	C	M	G	P	L	T	W	V	C	G	R	D	R	H	L	K	NH ₂			Monómero	
89	[Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M(x)	G	P	I	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	K	NH ₂	J2		IDA	
90	[Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M(x)	G	P	I	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	K	NH ₂	J2		Monosulfóxido	
91	[Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	I	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	K	NH ₂	J2		IDA	
92	[Ac	G	G	L	Y	A	C	H	m	G	P	I	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	K	NH ₂	J2		IDA	
93	[Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	I	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	K	NH ₂	J2		IDA	
94	[Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	I	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	K	NH ₂	J2		IDA	
95	[Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	I	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	K	NH ₂	J2		IDA	
96	[Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	I	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	K	NH ₂	J2		IDA	
97	[Ac	E	Y	L	C	R	M	G	P	I	T	W	V	C	E	R	Y	K	NH ₂	J2						IDA + Boc	
98	[Ac	T	Y	S	C	H	F	G	P	L	T	W	V	C	R	P	Q	NH ₂	J2							IDA + Boc	
99	[Ac	D	Y	H	C	R	M	G	P	L	T	W	V	C	R	P	L	K	NH ₂	J2						IDA + Boc	
100	[Ac	L	Y	E	C	R	M	G	P	L	T	W	V	C	R	P	G	K	NH ₂	J2						IDA + Boc	
101	[Ac	L	Y	L	C	R	M	G	P	L	T	W	V	C	Q	P	R	K	NH ₂	J2						IDA + Boc	
102	[Ac	D	Y	N	C	R	F	G	P	L	T	W	V	C	R	P	S	K	NH ₂	J2						IDA + Boc	
103	[Ac	S	Y	L	C	R	M	G	P	L	T	W	V	C	T	A	Q	K	NH ₂	J2						IDA	
104	[Ac	E	Y	S	C	R	M	G	P	L	T	W	V	C	S	P	T	K	NH ₂	J2						IDA	
105	[Ac	L	Y	L	C	R	F	G	P	L	T	W	V	C	G	Y	NH ₂	J2								IDA	
106	[Ac	I	Y	R	C	L	M	G	P	L	T	W	V	C	T	P	D	K	NH ₂	J2						IDA	
107	[Ac	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				IDA	
108	[Ac	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				D Leu	
109	[Ac	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				Dimer N-terminal	
110	[Ac	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				Disulfuro paralelo	
111	[Ac	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				D Pro	
112	[Ac	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				D His	
113	[Ac	G	L	Y	A	Cox	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	Cox	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				D Ala	
114	[Ac	G	L	Y	A	C(Acmt)	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				1/2 disulfuro cruzado	
115	[Ac	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				1/2 disulfuro paralelo	
116	[Ac	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				Dimer N-terminal	
117	[Ac	G	L	Y	A	CSH	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	CSH	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				Disulfuro cruzado	
118	[Ac	G	L	Y	A	C(Ac)	H	M	G	P	L	T	1Nal	V	C(Ac)	Q	P	L	R	Sar	NH ₂	J2				Disulfuro reducido	
119	[Ac	R	T	R	E	Y	S	C	Q	M	G	P	L	T	W	T	C	V	P	R	S	NH ₂	J2			Cisteina protegida, no SS	
120	[Ac	S	R	A	R	Y	M	C	H	M	G	P	L	T	W	V	C	R	P	E	V	K	NH ₂	J2			IDA + Boc
121	[Ac	G	G	R	A	Y	M	C	R	L	G	P	V	T	W	V	C	S	P	R	I	R	I	NH ₂	J2		IDA + Boc
122	[Ac	T	I	A	Q	Y	I	C	Y	M	G	P	E	T	W	E	C	R	P	S	P	R	A	NH ₂	J2		IDA + Boc
123	[Ac	N	G	R	T	Y	S	C	Q	L	G	P	V	T	W	V	C	S	R	G	V	R	R	NH ₂	J2		IDA + Boc

5

10

15

20

25

30

35

122	I	Ac	T	I	A	Q	Y	I	C	Y	M	G	P	E	T	W	E	C	R	P	S	P	R	A	NH ₂ J2	IDA + Boc
123	I	Ac	N	G	R	T	Y	S	C	Q	L	G	P	V	T	W	V	C	S	R	G	V	R	R	NH ₂ J2	IDA + Boc
124	I	Ac	M	R	T	R	Y	R	C	Y	M	G	P	L	T	W	V	C	E	G	S	R	L	NH ₂ J2	IDA + Boc	
125	I	Ac	S	R	T	R	Y	R	C	E	M	G	P	L	T	W	V	C	E	R	W	NH ₂ J2			IDA + Boc	
126	I	Ac	G	S	R	T	Y	S	C	Q	L	G	P	V	T	W	V	C	G	R	R	R	R	NH ₂ J2	IDA + Boc	
127	I	Ac	R	P	R	P	Y	S	C	T	M	G	P	R	T	W	V	C	G	V	R	A	G	NH ₂ J2	IDA + Boc	
128	I	Ac	G	G	T	Y	S	C	H	F	G	P	L	T	W	V	C	C	R	P	Q	G	G	NH ₂ J2	IDA + Boc	
129	I	Ac	G	G	D	Y	H	C	R	M	G	P	L	T	W	V	C	C	R	P	L	G	G	NH ₂ J2	IDA + Boc	
130	I	Ac	G	G	V	Y	A	C	R	M	G	P	L	T	W	V	C	C	S	P	L	G	G	NH ₂ J2	IDA	
131	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	E	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	Desamidaada	
132	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	E	P	L	R	Sar	OH J2	Bis-deamidaada	
133	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA	
134	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA	
135	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA	
136	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA	
137	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA	
138	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA	
139	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA	
140	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA	
141	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA	
142	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA	
143	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA	
144	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA
145	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	IDA
146	I	Ac	N	Y	T	C	R	F	G	R	F	G	P	L	T	W	E	C	T	P	Q	NH ₂ J2		IDA-Boc		
147	I	Ac	S	W	D	C	R	I	G	R	I	G	P	L	T	W	V	C	R	W	S	NH ₂ J2		IDA-Boc		
148	I	Ac	N	Y	M	C	H	F	G	R	F	G	P	L	T	W	V	C	R	P	G	NH ₂ J2		IDA-Boc		
149	I	Ac	L	Y	L	C	R	M	G	P	Q	P	L	T	W	M	C	C	Q	P	G	NH ₂ J2		IDA-Boc		
150	I	Ac	W	Y	S	C	L	M	G	P	M	T	W	V	C	R	A	H	R	A	H	NH ₂ J2		IDA-Boc		
151	I	Ac	E	Y	F	C	R	M	G	P	I	T	W	V	C	Q	R	S	NH ₂ J2						IDA-Boc	
152	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	Insersion Gly	
153	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	Insersion Ile	
154	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	Insersion Tyr	
155	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	Insersion Val	
156	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	Insersion Gln	
157	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	Insersion Pro	
158	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	Insersion Leu	
159	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	Insersion Arg	
160	I	Ac	G	G	L	Y	A	C	H	M	G	P	L	T	Y	1Nal	V	C	Q	P	L	R	Sar	NH ₂ J2	Insersion Sar	
El aminoácido que ramifica al enlazador aparece sombreado																										
IDA es ácido imino diacético (conjugado BetaAla)																										

[0048] Las secuencias de péptidos de la presente invención pueden presentarse solas o en conjunción con extensiones N-terminales y/o C-terminales de la cadena peptídica. Dichas extensiones pueden ser secuencias peptídicas codificadas de manera natural o opcionalmente con o sustancialmente sin secuencias de origen no natural. Las extensiones pueden incluir cualquier adición, delección, mutación puntual, u otras modificaciones o combinaciones de secuencias como se desee por aquellos con experiencia en la técnica. Por ejemplo, y sin carácter limitativo, las secuencias de origen natural pueden ser de longitud completa o parcial y pueden incluir sustituciones de aminoácidos para proporcionar un sitio de unión de carbohidrato, PEG, otro polímero, o similares mediante conjugación de la cadena lateral. En una variación, la sustitución de aminoácidos resulta en la humanización de una secuencia para hacerla compatible con el sistema inmunitario humano. Se proporcionan proteínas de fusión de todos los tipos, incluyendo secuencias de inmunoglobulina adyacentes a o cercanas a las secuencias que activan el EPO-R de la presente invención con o sin una secuencia espaciadora de no-inmunoglobulina. Un tipo de modo de realización es una cadena de inmunoglobulina que tiene la secuencia de activación del EPO-R en lugar de la región variable (V) de la cadena pesada y/o ligera.

Preparación de los compuestos peptídicos de la invención:

Síntesis de péptidos

[0049] Los péptidos de la invención pueden prepararse mediante los métodos clásicos conocidos en la técnica. Estos métodos estándares incluyen síntesis en fase sólida exclusiva, métodos de síntesis en fase sólida parcial, condensación de fragmentos, síntesis en solución clásica, y tecnología de ADN recombinante [Véase, p.ej., Merrifield J. Am. Chem. Soc. 1963 85:2149].

[0050] En un modo de realización, los monómeros peptídicos de un dímero peptídico son sintetizados individualmente y dimerizados tras la síntesis. En modos de realización preferidos, los monómeros peptídicos de un dímero tienen la misma secuencia de aminoácidos.

[0051] En modos de realización especialmente preferidos, los monómeros peptídicos de un dímero están unidos mediante sus extremos C-terminales por una fracción enlazadora L_K que tiene dos grupos funcionales capaces de servir como sitios de iniciación para la síntesis de péptidos y un tercer grupo funcional (p.ej., un grupo carboxilo o un grupo amino) que permite el enlace a otra fracción molecular (p.ej., como puede estar presente en la superficie de un soporte sólido). En este caso, los dos monómeros peptídicos pueden sintetizarse directamente en los dos grupos de nitrógeno reactivos de la fracción enlazadora L_K en una variación de la técnica de síntesis en fase sólida. Dicha síntesis puede ser secuencial o simultánea.

- [0052]** Cuando se va a llevar a cabo la síntesis secuencial de las cadenas peptídicas de un dímero en un enlazador, se protegen dos grupos amina funcionales en la molécula enlazadora con dos grupos protectores de amina extraíbles de manera ortogonal diferentes. En modos de realización preferidos, la diamina protegida es una lisina protegida. El enlazador protegido se acopla a un soporte sólido mediante el tercer grupo funcional del enlazador. El primer grupo protector de amina se elimina, y se sintetiza el primer péptido del dímero en la primera fracción de amina desprotegida. Después, el segundo grupo protector de amina se elimina, y se sintetiza el segundo péptido del dímero en la segunda fracción de amina desprotegida. Por ejemplo, la primera fracción amino del enlazador puede protegerse con Alloc, y la segunda con Fmoc. En este caso, el grupo Fmoc (pero no el grupo Alloc) puede eliminarse mediante tratamiento con una base suave [p.ej., 20% piperidina en dimetilformamida (DMF)], y la primera cadena de péptidos puede sintetizarse. Tras esto, el grupo Alloc puede eliminarse con un reactivo adecuado [p.ej., Pd(PPh₃)/4-metil morfolina y cloroformo], y la segunda cadena de péptidos puede sintetizarse. Esta técnica puede usarse para generar dímeros en los que las secuencias de las dos cadenas de péptidos sean idénticas o diferentes. Obsérvese que cuando se van a usar grupos protectores de tiol diferentes para cisteína para controlar la formación de enlaces disulfuro (como se analiza a continuación) esta técnica debe usarse incluso cuando las secuencias de aminoácidos finales de las cadenas peptídicas de un dímero son idénticas.
- [0053]** Cuando se va a llevar a cabo la síntesis simultánea de las cadenas peptídicas de un dímero en un enlazador, se protegen dos grupos funcionales de amina de la molécula enlazadora con el mismo grupo protector de amina extraíble. En modos de realización preferidos, la diamina protegida es una lisina protegida. El enlazador protegido se une a un soporte sólido mediante el tercer grupo funcional del enlazador. En este caso los dos grupos funcionales protegidos de la molécula enlazadora son desprotegidos simultáneamente, y las dos cadenas peptídicas sintetizan simultáneamente en las aminas desprotegidas. Obsérvese que utilizando esta técnica, las secuencias de las cadenas peptídicas del dímero serán idénticas, y los grupos protectores de tiol para los residuos de cisteína son todos iguales.
- [0054]** Un método preferido para la síntesis de péptidos es la síntesis en fase sólida. Los procedimientos de síntesis de los péptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica [véase, p.ej., *Stewart Solid Phase Peptide Syntheses* (Freeman and Co.: San Francisco) 1969; 2002/2003 General Catalog from Novabiochem Corp, San Diego, USA; *Goodman Synthesis of Peptides and Peptido-mimetics* (Houben-Weyl, Stuttgart) 2002]. En la síntesis en fase sólida, la síntesis se comienza normalmente a partir del extremo C-terminal del péptido usando resina α -amino protegida. Se puede preparar un material de partida

adecuado, por ejemplo, uniendo el α -aminoácido requerido a una resina clorometilada, una resina de hidroximetilo, una resina de poliestireno, una resina de bencidrilamina, o similares. Una de dichas resinas clorometilada se vende con el nombre comercial BIO-BEADS SX-1 por Bio Rad Laboratories (Richmond, CA). La preparación de la resina de hidroximetilo ha sido descrita [Bodonszky , et al. (1966) *Chem. Ind.* London 38:1597]. Se ha descrito la resina de bencidrilamina (BHA) [Pietta y Marshall (1970) *Chem. Commun.* 650], y la forma de clorhidrato se puede adquirir en el mercado a través de Beckman Instruments, Inc. (Palo Alto, CA). Por ejemplo, un aminoácido α -amino protegido puede acoplarse a una resina clorometilada con la ayuda de un catalizador de bicarbonato de cesio, según el método descrito por Gisin (1973) *Helv. Chim. Acta* 56:1467.

[0055] Tras el acoplamiento inicial, el grupo protector α -amino se elimina, por ejemplo, utilizando soluciones de ácido trifluoroacético (TFA) o ácido clorhídrico (HCL) en solventes orgánicos a temperatura ambiente. Después, los aminoácidos α -amino protegidos se acoplan sucesivamente a una cadena peptídica creciente unida a un soporte. Los grupos α -amino protegidos son aquellos conocidos por su utilidad en la técnica de síntesis de péptidos paso a paso, incluyendo: grupos protectores de tipo acilo (p.ej., formilo, trifluoroacetilo, acetilo), grupos protectores de tipo uretano aromático [p.ej., benciloxicarboilo (Cbz) y Cbz sustituido], grupos protectores de uretano alifático [p.ej., t-butiloxicarbonilo (Boc), isopropiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo], y grupos protectores de tipo alquilo (p.ej., bencilo, trifenilmetilo), fluorenilmetil oxicarbonilo (Fmoc), aliloxicarbonilo (Alloc), y 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxiclohex-1-ilideno)etil (Dde).

[0056] Los grupos protectores de cadena lateral (típicamente éteres, ésteres, tritilo, PMC, y similares) permanecen intactos durante el acoplamiento y no se separan durante la desprotección del grupo protector de extremo terminal amino o durante el acoplamiento. El grupo protector de cadena lateral debe eliminarse al completar la síntesis del péptido final y en condiciones de reacción que no alteren el péptido objetivo. Los grupos protectores de cadena lateral para Tyr incluyen tetrahidropiranilo, terc-butilo, tritilo, bencilo, Cbz, Z-Br-Cbz, y 2,5-diclorobencilo. Los grupos protectores de cadena lateral para Asp incluyen bencilo, 2,6-diclorobencilo, metilo, etilo y ciclohexilo. Los grupos protectores de cadena lateral para Thr y Ser incluyen acetilo, benzoilo, tritilo, tetrahidropiranilo, bencilo, 2,6-diclorobencilo, y Cbz. Los grupos protectores de cadena lateral para Arg incluyen nitro, tosilo (Tos), Cbz, adamantiloxicarbonil mesitoilsulfonilo (Mts). 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo (Pbf), 4-metoxi-2,3,6-trimetil-benzenosulfonilo (Mtr), o Boc. Los grupos protectores de cadena lateral para Lys incluyen Cbz, 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Cbz), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Cbz), Tos o Boc.

[0057] Tras la eliminación del grupo protector α -amino, los aminoácidos protegidos

restantes son acoplados paso a paso en el orden deseado. Cada aminoácido protegido se reacciona generalmente en un exceso aproximadamente de 3 veces utilizando un activador del grupo carboxilo apropiado como hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametiluronio (HBTU) o dicitclohexilcarbodimida (DCC) en solución, por ejemplo, en 5 cloruro de metileno (CH_2Cl_2), N-metil pirrolidona, dimetilformamida (DMF), o mezclas de los mismos.

[0058] Tras completar la secuencia de aminoácidos deseada, el péptido deseado de 10 desacopla del soporte de resina mediante tratamiento con un reactivo, como ácido trifluoroacético (TFA) o fluoruro de hidrógeno (HF), que no solo escinde el péptido de la resina, sino que también escinde todos los grupos protectores de cadena lateral restantes. Cuando se usa una resina clorometilada, el tratamiento con fluoruro de hidrógeno resulta en la formación de ácidos peptídicos libres. Cuando se usa la resina de bencidrilamina, el 15 tratamiento de fluoruro de hidrógeno resulta directamente en el péptido amida libre. Alternativamente, cuando se usa la resina clorometilada, el péptido protegido de cadena lateral puede desacoplarse mediante tratamiento de la resina peptídica con amoniac para 20 dar la amida protegida de cadena lateral deseada o con una alquilamina para dar una alquilamida o dialquilamida protegida de cadena lateral. La protección de cadena lateral se elimina después de forma convencional mediante tratamiento con fluoruro de hidrógeno para dar las amidas, alquilamidadas o dialquilamidadas libres. En la preparación de los ésteres de la invención, se emplean las resinas usadas para preparar los ácidos peptídicos, y el péptido protegido por cadena lateral es escindido con base y el alcohol apropiado (p.ej., metanol). Los grupos protectores de la cadena lateral se eliminan después de forma convencional mediante tratamiento con fluoruro de hidrógeno para obtener el éster deseado.

25 **[0059]** Estos procedimientos pueden usarse también para sintetizar péptidos en los que aminoácidos diferentes de los 20 aminoácidos de origen natural codificados genéticamente son sustituidos en una, dos o más posiciones de cualquiera de los compuestos de la invención. Los aminoácidos sintéticos que pueden sustituirse en los péptidos de la presente invención incluyen, sin carácter limitativo, N-metilo, L-hidroxiopilo, L-3, 4- 30 dihidroxifenilalanilo, δ aminoácidos como L- δ -hidroxilisilo y D- δ -metilalanilo, L- α -metilalanilo, β aminoácidos, y isoquinolina. También puede incorporarse D-aminoácidos y aminoácidos sintéticos de origen no natural en los péptidos de la presente invención.

Modificaciones de péptidos

[0060] También se pueden modificar los extremos amino-terminal y carboxi-terminal de los 35 compuestos peptídicos de la invención para producir otros compuestos de la invención. Las modificaciones del extremo amino-terminal incluyen la metilación (p.ej., $-\text{NHCH}_3$ o --

N(CH₃)₂), acetilación (p.ej., con ácido acético o un derivado halogenado del mismo como un ácido α-cloroacético, ácido α-bromoacético, o ácido α-iodoacético), adición de un grupo benciloxicarbonilo (Cbz), o bloqueo del extremo amino-terminal con cualquier grupo bloqueador que contenga una función de carboxilato definida por RCOO⁻ o función de sulfonilo definida por R-SO₂⁻, donde R se selecciona entre alquilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, y parecidos y grupos similares. Se puede incorporar también un ácido desamino en el extremo N-terminal (de forma que no hay grupo amino N-terminal) para disminuir la susceptibilidad a las proteasas o para limitar la conformación del compuesto peptídico. En modos de realización preferidos, el extremo N-terminal es acetilado. En modos de realización especialmente preferidos, una glicina N-terminal se acetila para dar N-acetilglicina (AcG).

[0061] Las modificaciones del extremo carboxi-terminal incluyen sustituir el ácido libre con un grupo carboxiamida o formar un lactamo cíclico en el extremo carboxi-terminal para introducir limitaciones estructurales. También se puede ciclar los péptidos de la invención, o incorporar un residuo desaminado o descarboxilado en el extremo terminal del péptido, de forma que no haya grupo amino o carboxilo terminal, para aumentar la susceptibilidad a las proteasas o para limitar la conformación del péptido. Los grupos funcionales C-terminales de los compuestos de la presente invención incluyen amida, amida alquilo inferior, amida dialquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, y carboxi, y los derivados de ésteres inferiores de los mismos, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

[0062] Pueden sustituirse las cadenas laterales de origen natural de los 20 aminoácidos codificados genéticamente (o los aminoácidos D estereoisoméricos) con otras cadenas laterales, por ejemplo con grupos como alquilo, alquilo inferior, alquilo cíclico de 4, 5, 6 a 7 miembros, amida, amida alquilo inferior, amida dialquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi y los derivados de ésteres inferiores de los mismos, y con heterocíclicos de 4, 5, 6 hasta 7 miembros. En especial, pueden emplearse los análogos de la prolina en los que el tamaño del anillo del residuo de prolina cambia de 5 miembros a 4, 6, o 7 miembros. Los grupos cíclicos pueden ser saturados o insaturados, y si son insaturados, pueden ser aromáticos o no aromáticos. Los grupos heterocíclicos contienen preferiblemente uno o más heteroátomos de azufre, nitrógeno y/o oxígeno. Los ejemplos de dichos grupos incluyen el furazanilo, furilo, imidazolidinilo, imidazolilo, imidazolinilo, isotiazolilo, isoxazolilo, morfolinilo (p.ej., morfolino), oxazolilo, piperazinilo (p.ej., 1-piperazinilo), piperidilo (p.ej., 1-piperidilo, piperidino), piranilo, pirazinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolidinilo (p.ej., 1-pirrolidinilo), pirrolinilo, pirrolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, tiomorfolinilo (p.ej., tiomorfolino), y triazolilo. Estos grupos heterocíclicos pueden ser sustituidos o no sustituidos. Cuando un grupo es sustituido, el sustituyente puede ser

alquilo, alcoxi, halógeno, oxígeno o fenilo sustituido o no sustituido.

[0063] También pueden modificarse fácilmente péptidos mediante fosforilación, y otros métodos [p.ej., como describe Hruby, et al. (1990) *Biochem J.* 268:249-262].

[0064] Los compuestos peptídicos de la invención también sirven como modelos
5 estructurales para compuestos no peptídicos con similar actividad biológica. Aquellos con experiencia en la técnica reconocen que existe una variedad de técnicas disponibles para formar compuestos con la misma o similar actividad biológica deseada que el compuesto peptídico modelo, pero con una actividad más favorable que el modelo con respecto a la solubilidad, estabilidad, y susceptibilidad a la hidrólisis y proteólisis [véase, Morgan y Gainor
10 (1989) *Ann. Rep. Med. Chem.* 24:243-252]. Estas técnicas incluyen sustituir la cadena principal (o "backbone") de péptidos con una cadena principal compuesta de fosfonatos, amidatos, carbamatos, sulfonamidas, aminas secundarias, y ácidos N-metilamino.

Formación de enlaces disulfuro

[0065] Los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más enlaces
15 disulfuro intramoleculares. En un modo de realización, un monómero o dímero peptídico comprende al menos un enlace disulfuro intramolecular. En modos de realización preferidos, un dímero peptídico comprende dos enlaces disulfuro intramoleculares.

[0066] Dichos enlaces disulfuro pueden formarse por oxidación de los residuos de cisteína de la secuencia básica de péptidos. En un modo de realización, el control de la formación
20 del enlace de cisteína se realiza eligiendo el agente oxidante del tipo y concentración efectiva para optimizar la formación del isómero deseado. Por ejemplo, la oxidación de un dímero peptídico para formar dos enlaces disulfuro intramoleculares (uno en cada cadena peptídica) se logra de manera preferente (con la formación de los enlaces disulfuro intermoleculares) cuando el agente oxidante es DMSO.

[0067] En modos de realización preferidos, la formación de enlaces de cisteína se controla mediante el uso selectivo de grupo protectores de tiol durante la síntesis de péptidos. Por ejemplo, cuando se desea un dímero con dos enlaces disulfuro intramoleculares, se sintetiza la cadena peptídica del primer monómero con los dos residuos de cisteína de la secuencia básica protegida con un primer grupo portector de tiol [p.ej., tritilo (Trt),
30 aliloxicarbonilo (Alloc), y 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)etil (Dde) o similares], después se sintetiza el segundo monómero peptídico con los dos residuos de cisteína de la secuencia básica protegida con un segundo grupo protector de tiol diferente del primer grupo protector de tiol [p.ej., acetamidometilo (Acm), t-butilo (tBu), o similares]. A continuación, se eliminan los primeros grupos protectores de tiol realizando ciclación del
35 bisulfuro del primer monómero, y después se eliminan los segundos grupos protectores de tiol realizando una ciclación del bisulfuro del segundo monómero.

[0068] Otros modos de realización de esta invención proporcionan análogos de estos derivados de disulfuro en los cuales uno de los azufres ha sido sustituido por un grupo CH₂ u otro isómero para el azufre. Estos análogos pueden prepararse a partir de los compuestos de la presente invención, en los que cada secuencia básica contiene al menos un residuo C u homocisteína y ácido α -amino- γ -butírico en el lugar del segundo residuo C, mediante desplazamiento intramolecular o intermolecular, utilizando los métodos conocidos en la técnica [véase, p.ej., Barker, et al. (1992) *J. Med. Chem.* 35:2040-2048 y Or, et al. (1991) *J. Org. Chem.* 56:3146-3149]. Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán fácilmente que este desplazamiento puede suceder también utilizando otros homólogos de ácido α -amino- γ -butírico y homocisteína.

[0069] Además de las estrategias de ciclación anteriores, pueden emplearse otras estrategias de ciclación de péptidos sin disulfuro. Dichas estrategias de ciclación alternativas incluyen, por ejemplo, estrategias de ciclación de amidas, así como aquellas que implican la formación de enlaces de tio-éter. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención pueden existir en una forma ciclada con un enlace amida intramolecular o un enlace tio-éter intramolecular. Por ejemplo, puede sintetizarse un péptido en el que una cisteína de la secuencia básica sea sustituida con lisina y la segunda cisteína sea sustituida con ácido glutámico. Después, puede formarse un monómero cíclico a través del enlace amida entre las cadenas laterales de estos dos residuos. Alternativamente, puede sintetizarse un péptido en el que una cisteína de la secuencia básica se sustituye con lisina. Después, un monómero cíclico puede ser formado a través de enlace tio-éter entre las cadenas laterales del residuo de lisina y el segundo residuo de cisteína de la secuencia básica. De este modo, además de las estrategias de ciclación de disulfuro, pueden usarse fácilmente estrategias de ciclación de amidas y tio-éter para ciclar los compuestos de la presente invención. Alternativamente, el extremo amino-terminal del péptido puede ser taponado con un ácido acético α -sustituido, en el que el α -sustituyente es un grupo saliente, como un ácido α -haloacético, por ejemplo, ácido α -cloroacético, ácido α -bromoacético o ácido α -iodoacético.

Adición de enlazadores

[0070] En los modos de realización en los que se dimeriza un dímero peptídico mediante una fracción enlazadora L_K, dicho enlazador puede incorporarse en el péptido durante la síntesis del péptido. Por ejemplo, cuando una fracción enlazadora L_K contiene dos grupos funcionales capaces de servir como sitios de iniciación para la síntesis de péptidos y un tercer grupo funcional (p.ej., un grupo carboxilo o un grupo amino) que permite la unión a otra fracción molecular, el enlazador puede conjugarse a un soporte sólido. A partir de entonces, los dos monómeros peptídicos pueden sintetizarse directamente en los dos

grupos de nitrógeno reactivos de la fracción enlazadora Lk en una variación de la técnica de síntesis en fase sólida.

5 **[0071]** En modos de realización alternativos cuando un dímero peptídico se dimeriza por una fracción enlazadora Lk, dicho enlazador puede conjugarse a los dos monómeros peptídicos de un dímero peptídico tras la síntesis de péptidos. Dicha conjugación puede lograrse mediante métodos bien establecidos en la técnica. En un modo de realización, el enlazador contiene al menos dos grupos funcionales adecuados para la unión al grupo funcional objetivo de los monómeros peptídicos sintetizados. Por ejemplo, un enlazador con dos grupos amina libres puede reaccionarse con los grupos carboxilo del extremo C-
10 terminal de cada uno de los dos monómeros peptídicos. En otro ejemplo, los enlazadores que contienen dos grupos carboxilo, bien preactivados o en la presencia de un reactivo de acoplamiento adecuado, pueden reaccionarse con los grupos amina de la cadena lateral o del extremo N-terminal, o amidas de lisina C-terminal, de cada uno de los dos monómeros peptídicos.

15 *Adición de espaciadores*

[0072] En modos de realización en los que los compuestos peptídicos contienen una fracción espaciadora, dicho espaciador puede incorporarse en el péptido durante la síntesis de péptidos. Por ejemplo, cuando un espaciador contiene un grupo amino libre y un segundo grupo funcional (p.ej., un grupo carboxilo o un grupo amino) que permite la unión
20 a otra fracción molecular, el espaciador puede conjugarse al soporte sólido. A partir de entonces, puede sintetizarse el péptido directamente en el grupo amino libre del espaciador mediante técnicas de fase sólida estándares.

[0073] En un modo de realización preferido, un espaciador que contiene dos grupos funcionales se acopla primero al soporte sólido mediante un primer grupo funcional. A
25 continuación, una fracción enlazadora Lk que tiene dos grupos funcionales capaces de servir como sitios de iniciación para la síntesis de péptidos y un tercer grupo funcional (p.ej., un grupo carboxilo o un grupo amino) que permite la unión a otra fracción molecular es conjugada al espaciador a través del segundo grupo funcional del espaciador y el tercer grupo funcional del enlazador. Después, los dos monómeros peptídicos pueden sintetizarse
30 directamente en los dos grupos nitrógeno reactivos de la fracción enlazadora Lk en una variación de la técnica de síntesis en fase sólida. Por ejemplo, un espaciador acoplado a un soporte sólido con un grupo amina libre puede reaccionarse con un enlazador de lisina por medio del grupo carboxilo libre del enlazador.

[0074] En modos de realización alternativos en los que los compuestos peptídicos
35 contienen una fracción espaciadora, dicho espaciador puede incorporarse en el péptido durante la síntesis de péptidos. Dicha conjugación puede lograrse mediante métodos bien

establecidos en la técnica. En un modo de realización, el enlazador contiene al menos un grupo funcional adecuado para la unión al grupo funcional objetivo del grupo del péptido sintetizado. Por ejemplo, un espaciador con un grupo amina libre puede reaccionarse con un grupo carboxilo C-terminal de un péptido. En otro ejemplo, un enlazador con un grupo carboxilo libre puede hacerse reaccionar con el grupo amina libre de un extremo N-terminal de un péptido o de un residuo de lisina. En otro ejemplo más, un espaciador que contiene un grupo sulfhidrilo libre puede conjugarse a un residuo de cisteína de un péptido mediante oxidación para formar un enlace disulfuro.

Unión de polímeros solubles en agua

10 **[0075]** En los últimos años, los polímeros solubles en agua, como polietilenglicol (PEG), han sido usados para la modificación covalente de péptidos de importancia terapéutica y diagnóstica. Se cree que la unión de dichos polímeros potencia la actividad biológica, prolonga el tiempo de circulación sanguínea, reduce la inmunogenicidad, aumenta la solubilidad acuosa, y potencia la resistencia a la digestión de proteasas. Por ejemplo, se ha
15 informado de que la unión covalente de PEG a polipéptidos terapéuticos como interleucinas [Knauf, et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263; 15064; Tsutsumi, et al. (1995) *J. Controlled Release* 33:447), interferones (Kita, et al. (1990) *Drug Des. Delivery* 6:157), catalasa (Abuchowski, et al. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:582), superóxido dismutasa (Beauchamp, et al. (1983) *Anal. Biochem.* 131:25), y adenosina deaminasa (Chen, et al. (1981) *Biochim.*
20 *Biophys. Acta* 660:293), extiende su vida media *in vivo*, y/o reduce su inmunogenicidad y antigenicidad.

[0076] Los compuestos peptídicos de la invención pueden comprender además una o más fracciones de polímero soluble en agua. Preferiblemente, estos polímeros están unidos de forma covalente a los compuestos peptídicos. El polímero soluble en agua puede ser, por
25 ejemplo, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (sean homopolímeros o copolímeros al azar), poli(n-vinilpirrolidona), polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, y
30 polioles polioxiethylados. Un polímero soluble en agua preferido es PEG.

[0077] Los péptidos, dímeros peptídicos y otras moléculas basadas en péptidos de la invención pueden unirse a polímeros solubles en agua (p.ej., PEG) usando cualquiera de una variedad de elementos químicos para enlazar el polímero o polímeros solubles en agua a la parte de la molécula de enlace al receptor (p.ej., péptido + espaciador). Un modo de
35 realización típico utiliza un solo punto de unión para el acoplamiento covalente del polímero o polímeros solubles en agua a la parte de enlace al receptor. Sin embargo, en modos de

realización alternativos pueden usarse múltiples puntos de unión de acoplamiento, incluyendo otras variaciones en la que se acoplan diferentes especies de polímero soluble en agua a la parte de enlace al receptor en distintos puntos de unión, que pueden incluir punto(s) de unión covalente al espaciador y/o a una o ambas cadenas peptídicas. En algunos modos de realización, el dímero o multímero de orden superior comprenderá distintas especies de cadena peptídica (es decir, un heterodímero u otro heteromultímero). A modo de ejemplo y no limitativo, un dímero puede comprender una primera cadena peptídica con un punto de unión de PEG y la segunda cadena peptídica puede carecer de un punto de unión de PEG o utilizar una química de enlace diferente a la de la primera cadena peptídica y en algunas variaciones el espaciador puede contener o carecer de un punto de unión de PEG y dicho espaciador, si está pegilado, puede utilizar química de enlace diferente a la de la primera y/o segunda cadena peptídica. Un modo de realización alternativo utiliza un PEG acoplado a la parte del espaciador de la parte de unión al receptor y un polímero soluble en agua diferente (p.ej., un carbohidrato) conjugado a una cadena lateral de uno de los aminoácidos de la parte de péptidos de la molécula.

[0078] Puede usarse una amplia variedad de especies de polietilenglicol (PEG) para la pegilación de la parte de enlace al receptor (péptidos + espaciador). Básicamente puede usarse cualquier reactivo PEG adecuado. En modos de realización preferidos, el reactivo PEG resultará en la formación de un enlace amida o carbamato en la conjugación a la parte de enlace al receptor. Las especies de reactivos de PEG adecuados incluyen, sin carácter limitativo, aquellos que están disponibles a la venta en el catálogo *Drug Delivery Systems* (2003) de NOF Corporation (Yebisu Garden Place Tower, 20-3 Ebisu 4-chome, Shibuya-ku, Tokyo 150-6019) y el catálogo *Molecular Engineering* (2003) de Nektar Therapeutics (490 Discovery Drive, Huntsville, Alabama 35806). Por ejemplo, y sin carácter limitativo, los siguientes reactivos PEG a menudo son preferidos en diversos modos de realización: mPEG2-NHS, mPEG2-ALD, PEG multibrazo, mPEG(MAL)2, mPEG2(MAL), mPEG-NH2, mPEG-SPA, mPEG-SBA, mPEG-tioésteres, mPEG-ésteres dobles, mPEG-BTC, mPEG-ButyrALD, mPEG-ACET, PEGs heterofuncionales(NH2- PEG-COOH, Boc-PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, NHS-PEG-VS, NHS-PEG-MAL), acrilatos de PEG (ACRL-PEG-NHS), PEG-fosfolípidos (e.g., mPEG-DSPE), PEGs multibrazos de la serie SUNBRITE incluyendo la serie GL de PEGs basados en glicerina activados por una sustancia química elegida por aquellos con experiencia en la técnica, cualquier de los PEGs activados de SUNBRITE (incluyendo, sin carácter limitativo, PEGs-carboxilo, p-NP-PBGs, Tresil-PEGs, PEG aldehído, acetal-PEGs, PEGs-amino, PEGs-tiol, PEGs-malcimido, hidroxil-PEG-amina, amino-PEG-COOH, hidroxil-PEG-aldehído, PEG tipo anhídrido carboxílico, PEG-fosfolípido funcionalizado, y otros reactivos PEG similares y/o adecuados seleccionados por aquellos

con experiencia en la técnica para su uso y aplicación concreta.

5 **[0079]** El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. Un PEG preferido para su uso en la presente invención comprende un PEG lineal no ramificado que tiene un peso molecular de 20 kilodaltons (kD) a 40 kD (en preparaciones de PEG, algunas moléculas pesarán mas, algunas menos, que el peso molecular afirmado). Más preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular de 30 kD a 40 kD. Se pueden usar otros tamaños, según el perfil terapéutico deseado (p.ej., duración de liberación sostenida deseada; efectos, si los hay, en la actividad biológica; facilidad de manejo; grado o falta de antigenicidad; y otros efectos conocidos de PEG en un péptido terapéutico).

10 **[0080]** El número de moléculas de polímero unidas puede variar; por ejemplo, una, dos, tres o más polímeros solubles en agua pueden unirse a un péptido agonista del EPO-R de la invención. Los múltiples polímeros unidos pueden ser fracciones químicas iguales o diferentes (p.ej., PEGs de diferente peso molecular). En algunos casos, el grado de unión del polímero (el número de fracciones de polímero unidas a un péptido y/o el número total de péptidos a los que se una un polímero) puede verse influenciado por la proporción de moléculas de polímero frente a moléculas de péptido en una reacción de acoplamiento, así como por la concentración total de cada uno en la mezcla de reacción. En general, la relación de polímero frente a péptido óptima (en términos de eficacia de reacción para no obtener un exceso de fracciones de péptido y/o polímero sin reaccionar) se determinará mediante factores como el grado deseado de acoplamiento del polímero (p.ej., mono, di-, tri-, etc.), el peso molecular del polímero seleccionado, si el polímero está ramificado o no, y las condiciones de reacción para un método de unión concreto.

25 **[0081]** En modos de realización preferidos, el polímero soluble en agua unido de forma covalente es PEG. Para fines ilustrativos, se describen a continuación ejemplos de métodos de unión covalente de PEG (pegilación). Estas descripciones ilustrativas no pretenden ser limitativas. Una persona de habilidad ordinaria en la técnica apreciará que hay establecida una variedad de métodos para la unión covalente de una amplia gama de polímeros solubles en agua en la técnica. Así, la presente invención abarca los compuestos peptídicos a los que se han unido una variedad de polímeros solubles en agua conocidos en la técnica por cualquiera de un número de métodos de unión conocidos en la técnica.

30 **[0082]** En un modo de realización, el PEG puede servir de enlazador que dimeriza dos monómeros peptídicos. En un modo de realización, el PEG está unido a al menos un extremo terminal (N-terminal o C-terminal) de un monómero o dímero peptídico. En otro modo de realización, el PEG está unido a una fracción espaciadora de un monómero o dímero peptídico. En un modo de realización preferido, el PEG está unido a la fracción

enlazadora de un dímero peptídico. En un modo de realización altamente preferido, el PEG está unido a una fracción espaciadora, donde dicha fracción espaciadora se une a la fracción enlazadora L_K que conecta los monómeros de un dímero peptídico. Más preferiblemente, el PEG está unido a una fracción espaciadora, donde dicha fracción espaciadora se une a un dímero peptídico mediante el carbono carbonilo de un enlazador de lisina, o el nitrógeno de la amida de un enlazador de lisina amida.

[0083] Existe un número de métodos de unión de PEG disponibles para aquellos con experiencia en la técnica [véase, p.ej., Goodson, et al. (1990) *Bio/Technology* 8:343 (Pegilación de interleucina-2 en su sitio de glicosilación tras mutagénesis dirigida); EP 0 401 384 (unión de PEG a G-CSF); Malik, et al., (1992) *Exp. Hematol.* 20:1028-1035 (Pegilación de GM-CSF utilizando cloruro de tresilo); Pub. PCT N° WO 90/12874 (Pegilación de eritropoyetina que contiene un residuo de cisteína introducido de manera recombinante usando un derivado de mPEG específico de la cisteína); Pat. estadounidense n° 5.757.078 (Pegilación de péptidos de EPO); y pat. estadounidense n° 6.077.939 (Pegilación de α -carbono N-terminal de un péptido)].

[0084] Por ejemplo, el PEG puede unirse de forma covalente a residuos de aminoácidos mediante un grupo reactivo. Los grupos reactivos son aquellos a los que puede unirse una molécula de PEG activada (p.ej., un grupo amino o carboxilo libre). Por ejemplo, los residuos de lisina (K) y los residuos de aminoácido N-terminales tienen un grupo amino libre; y los residuos de aminoácidos C-terminales tienen un grupo carboxilo libre. Los grupos sulfhidrilo (p.ej., como se encuentran en los residuos de cisteína) pueden usarse también como grupo reactivo para unir PEG. Además, se han descrito métodos ayudados por enzimas para introducir grupos activados (p. ej., hidrazida, aldehído, y grupos amino aromáticos) específicamente en el extremo C-terminal de un polipéptido [Schwarz, et al. (1990) *Methods Enzymol.* 184:160; Rose, et al. (1991) *Bioconjugate Chem.* 2:154; Gaertner, et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:7224].

[0085] Por ejemplo, las moléculas de PEG pueden unirse a los grupos amino del péptido utilizando PEG metoxilado ("mPEG") que tienen diferentes fracciones reactivas. Dichos polímeros incluyen mPEG-succinimidil succinato, mPEG-succinimidil carbonato, mPEG-imidato, mPEG-4-nitrofenil carbonato y mPEG-cloruro cianúrico. Del mismo modo, las moléculas de PEG pueden unirse a grupos carboxilo de péptidos utilizando PEG metoxilado con un grupo amina libre (mPEG-NH₂).

[0086] Cuando la unión del PEG es no específica y se desea un péptido con una unión de PEG específica, el compuesto pegilado deseado puede purificarse a partir de la mezcla de compuestos pegilados. Por ejemplo, si se desea un péptido pegilado de forma N-terminal, la forma pegilada de manera N-terminal puede purificarse a partir de una población de

péptidos pegilados al azar (es decir, separando esta fracción de otras fracciones monopegiladas).

5 **[0087]** En modos de realización preferidos, el PEG se une de forma específica a un sitio de un péptido. La pegilación de sitio específico en el extremo N-terminal, cadena lateral, y extremo C-terminal de un análogo potente de factor liberador de hormona del crecimiento ha sido llevada a cabo mediante síntesis en fase sólida [Felix, et al. (1995) *Int. J. Peptide Protein Res.* 46:253]. Otro método de sitio específico implica unir un péptido a las extremidades de cadenas de PEG injertadas en la superficie liposomal de forma específica al sitio mediante un grupo aldehído reactivo en el extremo N-terminal generado mediante oxidación con periodato de sodio de treonina N-terminal [Zalipsky, et al. (1995) *Bioconj. Chem.* 6:705]. Sin embargo, este método se limita a polipéptidos con residuos de serina o treonina N-terminales. Otro método de sitio específico para la pegilación N-terminal de un péptido mediante un enlace hidrazona, hidrazona reducida, oxima, u oxima reducida se describe en la pat. estadounidense nº 6,077,939 de Wei, et al.

15 **[0088]** En un método, la pegilación N-terminal selectiva puede lograrse mediante alquilación reductiva que aprovecha la reactividad diferencial de diferentes tipo de grupos amino primarios (lisina frente al N-terminal) disponibles para la derivatización en una proteína específica. En las condiciones de reacción apropiadas, un grupo carbonilo que contiene PEG se une de forma selectiva al extremo N-terminal de un péptido. Por ejemplo, se puede pegar de forma selectiva y N-terminal la proteína llevando a cabo la reacción a un pH que aproveche las diferencias de pK_a entre los grupos ϵ -amino de un residuo de lisina y el grupo α - amino de residuo N-terminal del péptido. Mediante dicha unión selectiva, la pegilación tiene lugar principalmente en el extremo N-terminal de la proteína, sin modificación significativa de otros grupos reactivos (p.ej., grupos amino de la cadena lateral de lisina). Utilizando la alquilación reductiva, el PEG debería tener un solo aldehído reactivo para su unión a la proteína (p.ej., puede usarse propionaldehído de PEG).

25 **[0089]** La mutagénesis de sitio dirigido es otro método que puede usarse para preparar péptidos para la unión de polímero de sitio dirigido. Mediante este método, la secuencia de aminoácidos de un péptido se diseña de forma que incorpore un grupo reactivo apropiado en la posición deseada en el péptido. Por ejemplo, WO 90/12874 describe la pegilación de sitio dirigido de proteínas modificadas mediante la inserción de residuos de cisteína o la sustitución de otros residuos por residuos de cisteína. Esta publicación también describe la preparación de mPEG-eritripoyetina ("mPEG-EPO") haciendo reaccionar un derivado de mPEG específico de la cisteína con un residuo de cisteína introducido de forma recombinante en EPO.

35 **[0090]** Cuando PEG se une a una fracción espaciadora o enlazadora, pueden usarse

métodos de unión similares. En este caso, el enlazador o espaciador contiene un grupo reactivo y se utiliza una molécula de PEG activada que contiene el grupo reactivo complementario adecuado para efectuar la unión covalente. En modos de realización preferidos, el grupo reactivo del enlazador o espaciador contiene un grupo amino terminal (es decir, situado en el extremo del enlazador o espaciador) que se hace reaccionar con una molécula de PEG activada de forma adecuada para crear una unión covalente estable como una amida o un carbamato. Las especies de PEG activadas adecuadas incluyen, sin carácter limitativo, mPEG-para-nitrofenilcarbonato (mPEG-NPC), mPEG-succinimidil carbonato (mPEG-SC), y mPEG-succinimidil propionato (mPEG-SPA). En otros modos de realización preferidos, el grupo reactivo del enlazador o espaciador contiene un grupo carboxilo capaz de activarse para formar una unión covalente con una molécula de PEG que contiene amina en condiciones de reacción adecuadas. Las moléculas de PEG adecuadas incluyen mPEG-NH₂ y las condiciones de reacción adecuadas incluyen formación de amidas mediada por carbodiimidas o similares.

15 Ensayos de la actividad de agonistas de EPO-R:

Ensayos funcionales in vitro

[0091] Los ensayos de enlace competitivo *in vitro* cuantifican la capacidad de un péptido de prueba de competir con EPO por el enlace a EPO-R. Por ejemplo, (véase, p.ej., como se describe en la patente estadounidense 5.773.569), la región extracelular del EPO-R humano (proteína de enlace a la EPO, EBP) puede producirse de manera recombinante en *E. coli* y la proteína recombinante puede unirse a un soporte sólido, como un plato de microtitulación o una perla sintética [p.ej., perlas Sulfolink de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)]. A continuación, la EBP inmovilizada es incubada con EPO recombinante marcada, o con EPO recombinante marcada y un péptido de prueba. Se emplean diluciones seriadas de péptido de prueba para dichos experimentos. Los puntos de ensayo sin péptido de prueba añadido definen la unión total de EPO a EBP. Para las reacciones que contienen el péptido de prueba, la cantidad de EPO unida se cuantifica y expresa como un porcentaje de unión del control (total= 100%). Estos valores se trazan frente a la concentración de péptidos. El valor CI50 se define como la concentración del péptido de prueba que reduce la unión de EPO a EBP en un 50% (es decir, una inhibición del 50% del enlace de EPO).

[0092] Un ensayo de enlace competitivo *in vitro* diferente mide la señal de luz generada en función de la proximidad de dos perlas: una perla conjugada a EPO y una perla conjugada a EPO-R. La proximidad de las perlas es generada por el enlace de EPO a EPO-R. Un péptido de prueba que compite con la EPO por unirse a la EPO-R evitará este enlace, provocando una disminución en la emisión de luz. La concentración del péptido de prueba

que resulta en una disminución del 50% en la emisión de luz se define como el valor CI50.

[0093] Los péptidos de la presente invención compiten de forma muy eficiente con la EPO para unirse al EPO-R. Esta función potenciada se representa por su capacidad de inhibir el enlace de EPO en concentraciones sustancialmente más bajas de péptido (es decir, tienen valores de CI50 muy bajos).

[0094] La actividad y la potencia biológica de los agonistas de EPO-R péptidos diméricos y monoméricos de la invención, que se enlazan específicamente al receptor de EPO, puede medirse utilizando ensayos funcionales basados en células *in vitro*.

[0095] Un ensayo se basa en una línea celular pre-B murina que expresa el EPO-R humano y transfectada con una construcción de gen indicador de luciferasa promovido por el promotor fos. Con la exposición a EPO u otro agonista del EPO-R, dichas células responden sintetizando luciferasa. La luciferasa provoca la emisión de luz con la adición de su sustrato luciferina. Por tanto, el nivel de activación de EPO-R en dichas células puede cuantificarse mediante la medición de la actividad de la luciferasa. La actividad de un péptido de prueba se mide mediante la adición de diluciones seriadas del péptido de prueba a las células, las cuales se incuban a continuación durante 4 horas. Tras la incubación, el sustrato de luciferina se añade a las células, se mide la emisión de luz. La concentración del péptido de prueba que resulta en la mitad de la emisión máxima de luz se registra como la CE50.

[0096] Los péptidos de la presente invención muestran un aumento drástico en la capacidad de promover la expresión de luciferasa dependiente de la señalización de EPO-R en este ensayo. Esta función potenciada se representa por su capacidad de provocar la mitad de la actividad de la luciferasa máxima en concentraciones sustancialmente inferiores de péptido (es decir, tienen valores de CE50 muy bajos). Este ensayo es un método preferido para estimar la potencia y actividad de un péptido agonista de EPO-R de la invención.

[0097] Otro ensayo puede llevarse a cabo utilizando células FDC-P1/ER [Dexter, et al. (1980) *J. Exp. Med.* 152:1036-1047], una línea celular derivada de médula ósea murina no transformada y bien caracterizada en la que se ha transfectado EPO-R de forma estable. Estas células presentan proliferación dependiente de EPO.

[0098] En uno de dichos ensayos, las células se cultivan hasta la mitad de la densidad estacionaria en presencia de los factores de crecimiento necesarios (véase, p.ej., lo descrito en la patente estadounidense 5.773.569). Después se lavan las células en PBS y se privaron de nutrientes durante 16-24 horas en medio completo sin factores de crecimiento. Tras determinar la viabilidad de las células (p.ej., mediante tinción con azul tripán), se crean soluciones madre (en medio completo sin factores de crecimiento) de

modo que den aproximadamente 10^5 células por 50 μL . Las diluciones seriadas de los compuestos agonistas del EPO-R peptídicos (normalmente el péptido en fase de solución libre en oposición a un péptido unido al fago u otra unión o inmovilizado) a probar se producen en placas de cultivo tisular de 96 pocillos para un volumen final de 50 μL por pocillo. Se añaden las células (50 μL) a cada pocillo y se incuban las células durante 24-48 horas, punto en el cual los controles negativos deberían morir o estar inactivas. A continuación, se mide la proliferación celular mediante métodos conocidos en la técnica, como un ensayo MTT que mide la incorporación de H^3 -timidina como indicación de la proliferación celular [véase, Mosmann (1983) *J. Immunol. Methods* 65:55-63]. Los péptidos se evalúan en la línea celular de expresión de EPO-R y en una línea celular parental de no expresión. La concentración de péptido de prueba necesaria para producir la mitad de la proliferación celular máxima se registra como la CE50.

[0099] Los péptidos de la presente invención muestran un aumento drástico en la capacidad de fomentar el crecimiento celular dependiente de EPO en este ensayo. Esta función potenciada se representa por su capacidad de provocar la mitad de la actividad de estimulación de la proliferación celular máxima en concentraciones sustancialmente inferiores de péptido (es decir, tienen valores de CE50 muy bajos). Este ensayo es un método preferido para estimar la potencia y actividad de un péptido agonista de EPO-R de la invención.

[0100] En otro ensayo, las células se cultivan en fase estacionaria en medio complementado con EPO, son recogidas y después cultivadas durante 18 h adicionales en medio sin EPO. Las células se dividen en tres grupos de igual densidad celular: un grupo sin factor añadido (control negativo), un grupo con EPO (control positivo), y un grupo experimental con el péptido de prueba. A continuación, se recogen las células cultivadas en diversos momentos temporales, se fijan, y se tiñen con un tinte fluorescente de enlace al ADN (p.ej., yoduro de propidio o tinte Hoescht, disponibles los dos en Sigma). Después, se mide la fluorescencia, por ejemplo, utilizando un citómetro de flujo FACS Scan. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular puede determinarse entonces, por ejemplo, utilizando el modelo SOBR del programa informático CellFIT (Becton Dickinson). Las células tratadas con EPO o un péptido activo mostrarán mayor proporción de células en fase S (determinado por el aumento de fluorescencia como indicador del aumento del contenido de ADN) en relación con el grupo de control negativo.

[0101] Pueden llevarse a cabo ensayos similares utilizando líneas celulares FDCEP-1 [véase, p.ej., Dexter, et al. (1980) *J. Exp. Med.* 152:1036-1047] o TF-1 [Kitamura, et al. (1989) *Blood* 73:375-380]. FDCEP-1 es una línea celular progenitora hematopoyética primitiva multipotencial murina dependiente de factores de crecimiento que puede proliferar,

pero no diferenciarse, cuando se complementa con medio acondicionado de WEHI-3 (un medio que contiene IL-3, número ATCC TIB-68). Para tales experimentos, la línea celular FDCP-1 se transfecta con la EPO-R humana o murina para producir líneas celulares FDCP-1-hEPO-R o FDCP-1-mEPO-R, respectivamente, que pueden proliferar, pero no diferenciarse, en presencia de EPO. También puede usarse TF-1, una línea celular dependiente de EPO, para medir los efectos de los agonistas de EPO-R peptídicos en la proliferación celular.

[0102] En otro ensayo más, el procedimiento explicado en Krystal (1983) *Exp. Hematol* 11:649-660 para un microensayo basado en la incorporación de H³-timidina a células esplénicas puede utilizarse para determinar la capacidad de los compuestos de la presente invención para actuar como agonistas de EPO. En resumen, se inyecta a ratones B6C3F₁ diariamente durante dos días fenilhidrazina (60 mg/kg). El tercer día, las células esplénicas se sacan y se determina su capacidad de proliferar en un periodo de 24 horas utilizando un ensayo MTT.

[0103] El enlace de EPO a EPO-R en una línea celular que responde a la eritropoyetina induce la fosforilación de tirosina de ambos el receptor y numerosas proteínas intracelulares, incluyendo Shc, vav y quinasa JAK2. Por lo tanto, otro ensayo *in vitro* mide la capacidad de los péptidos de la invención de inducir la fosforilación de tirosina del EPO-R y proteínas transductoras de la señal intracelular posterior. Los péptidos activos, identificados mediante ensayos de enlace y proliferación descritos arriba, provocan un patrón de fosforilación casi idéntico al de la EPO en células que responden a la eritropoyetina. Para este ensayo, las células FDC-P1/ER [Dexter, et al. (1980) *J Exp Med* 152:1036-47] se mantienen en medio complementado con EPO y crecen a la fase estacionaria. A continuación, se cultivan estas células en medio sin EPO durante 24 h. Después, se incuban un número definido de dichas células con un péptido de prueba aproximadamente durante 10 min a 37 °C. Se realiza una muestra de control de células con EPO con cada ensayo. A continuación, las células tratadas se recogen mediante centrifugación, se resuspenden en solución amortiguadora de lisis SDS, y se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. Las proteínas sometidas a electroforesis en el gel se transfectan a nitrocelulosa, y las proteínas que contienen fosfotirosina que en la transferencia ("blot") se visualizan mediante técnicas inmunológicas estándares. Por ejemplo, la transferencia puede sondarse con un anticuerpo anti-fosfotirosina (p.ej., IgG anti-fosfotirosina de ratón de Upstate Biotechnology, Inc.), lavarse, y después sondarse con un anticuerpo secundario [p.ej., IgG de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa de Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, DC)]. A partir de entonces, las proteínas con contenido de fosfotirosina pueden visualizarse mediante técnicas estándares incluyendo ensayos colorimétricos, quimioluminiscentes o

fluorescentes. Por ejemplo, puede llevarse a cabo un ensayo quimioluminiscente utilizando el sistema ECL Western Blotting de Amersham.

[0104] Otro ensayo celular *in vitro* que puede usarse para evaluar la actividad de los péptidos de la presente invención comprende un ensayo de colonias, usando células de sangre periférica humana o médula ósea murina. La médula ósea murina puede obtenerse del fémur de ratones, mientras que una muestra de sangre periférica humana puede obtenerse de un donante sano. En el caso de la sangre periférica, las células mononucleares se aíslan en primer lugar de la sangre, por ejemplo, mediante centrifugación en un gradiente Ficoll-Hypaque [Stem Cell Technologies, Inc. (Vancouver, Canada)]. Para este ensayo se lleva a cabo un recuento de células nucleadas para establecer el número y la concentración de células nucleadas en la muestra original. Se coloca un número definido de células en metilcelulosa según las instrucciones del fabricante [Stem Cell Technologies, Inc. (Vancouver, Canada)]. Se trata un grupo experimental con un péptido de prueba, el grupo de control positivo se trata con EPO y el grupo de control negativo no recibe tratamiento. Después, se puntúa el número de colonias crecientes para cada grupo tras periodos definidos de incubación, generalmente 10 días y 18 días. Un péptido activo fomentará la formación de colonias.

[0105] Otros ensayos biológicos *in vitro* que pueden usarse para demostrar la actividad de los compuestos de la presente invención son revelados en Greenberger, et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2931-2935 (línea celular progenitora hematopoyética dependiente de EPO); Quelle y Wojchowski (1991) *J. Biol. Chem.* 266:609-614 (fosforilación de proteína tirosina en células B6SUt.EP); Dusanter-Fourt, et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:10670-10678 (fosforilación de tirosina del receptor de EPO en células que responden a la EPO humanas); Quelle, et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:17055-17060 (fosforilación de tirosina de una proteína citosólica, pp 100, en células FDC-ER); Worthington, et al. (1987) *J. Exp. Hematol.* 15:85-92 (ensayo colorimétrico para hemoglobina); Kaiho and Miuno (1985) *Anal. Biochem.* 149:117-120 (detección de hemoglobina con 2,7-diaminofluoreno); Patel, et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267:21300-21302 (expresión de c-myb); Witthuhn, et al. (1993) *Cell* 74:227-236 (asociación y fosforilación de tirosina de JAK2); Leonard, et al. (1993) *Blood* 82:1071-1079 (expresión de factores de transcripción GATA); y Ando, et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9571-9575 (regulación de la transición G₁ mediante ciclación de D2 y D3).

[0106] Se ha informado del uso eficaz de un instrumento diseñado por Molecular Devices Corp., conocido como microfisiómetro, para medir el efecto de los agonistas y antagonistas en diversos receptores. La base de este aparato es la medición de las alteraciones en el índice de acidificación del medio extracelular en respuesta a la activación del receptor.

Ensayos funcionales in vivo

[0107] Un ensayo funcional *in vivo* que puede usarse para evaluar la potencia de un péptido de prueba es el bioensayo con ratones policitémicos exhipóxicos. Para este ensayo, los ratones se someten a un ciclo de acondicionamiento alterno durante varios días. En este ciclo, los ratones alternan entre periodos de condiciones hipobáricas y condiciones de presión atmosférica. Después, los ratones se mantienen a presión atmosférica durante 2-3 días antes de la administración de muestras de la prueba. Las muestras de péptidos de prueba, o EPO estándar en el caso de los ratones de control positivo, son inyectadas en los ratones acondicionados por vía subcutánea. Se administra hierro radiomarcado (p.ej., Fe⁵⁹) 2 días después, y se toman muestras de sangre dos días después de la administración de hierro radiomarcado. Después, se determinan mediciones de la radiactividad y hematocritos para cada muestra mediante técnicas estándares. Las muestras de sangre de ratones a los que se ha inyectado péptidos de prueba activos mostrarán una mayor radiactividad (debido al enlace de Fe⁵⁹ por la hemoglobina de los eritrocitos) que los ratones que no recibieron péptidos de prueba o EPO.

[0108] Otro ensayo funcional *in vivo* que puede usarse para evaluar la potencia de un péptido de prueba es el ensayo de reticulocitos. Para este ensayo, se inyecta de manera subcutánea a ratones normales no tratados en tres días consecutivos EPO o péptido de prueba. El tercer día, se inyecta a los ratones por vía intraperitoneal hierro dextrano. El quinto día, se toman muestras de sangre de los ratones. Se determina el porcentaje (%) de reticulocitos en la sangre mediante tinción con naranja tiazol y análisis de citómetro de flujo (programa retic-count). Además, se determinan manualmente los hematocritos. El porcentaje de reticulocitos corregido se determina utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{RETIC}_{\text{CORREGIDO}} = \% \text{RETIC}_{\text{OBSERVADO}} \times (\text{Hematocrito}_{\text{INDIVIDUAL}} / \text{Hematocrito}_{\text{NORMAL}})$$

Los compuestos de prueba activos mostrarán un aumento en el nivel de %RETIC_{CORREGIDO} en comparación con los ratones que no recibieron péptidos de prueba o EPO.

Uso de péptidos agonistas del EPO-R de la invención

[0109] Los compuestos peptídicos de la invención son útiles *in vitro* como instrumento para comprender el papel biológico de la EPO, incluyendo la evaluación de muchos factores que se cree que influyen, y son influenciados por, la producción de EPO y el enlace de EPO al EPO-R (p.ej., el mecanismo de activación del receptor/transducción de señal de EPO/EPO-R). Los presentes péptidos también son útiles en el desarrollo de otros compuestos que se unen al EPO-R, porque los presentes compuestos proporcionan una

importante información de la relación estructura/actividad que facilita ese desarrollo.

[0110] Además, basándose en su capacidad de enlace al EPO-R, los péptidos de la presente invención pueden utilizarse como reactivos para detectar EPO-R en células vivas; células fijas; en fluidos biológicos; en homogeneizados de tejido; en materiales biológicos naturales purificados, etc. Por ejemplo, al marcar dichos péptidos, se puede identificar las células que tienen EPO-R en su superficie. Además, basándose en su capacidad de enlace al EPO-R, los péptidos de la presente invención pueden usarse en tinción *in situ*, análisis FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia), Western blotting, ELISA (prueba de inmunoabsorción enzimática), etc. Además, basándose en su capacidad de enlace al EPO-R, los péptidos de la presente invención pueden utilizarse en la purificación del receptor, o en la purificación de células que expresan EPO-R en la superficie celular (o dentro de células permeabilizadas).

[0111] Los péptidos de la invención pueden utilizarse también como reactivos comerciales para diversas investigaciones médicas y fines de diagnóstico. Dichos usos incluyen, sin carácter limitativo: (1) uso como un estándar de calibración para cuantificar las actividades de agonistas de EPO-R candidatos en una variedad de ensayos funcionales; (2) uso como reactivos de bloqueo en exploración de péptidos aleatorios, es decir, en la búsqueda de nuevas familias de ligandos peptídicos de EPO-R, los péptidos pueden usarse para bloquear la recuperación de péptidos de EPO de la presente invención; (3) uso en la co-cristalización con EPO-R, es decir, pueden formarse cristales de los péptidos de la presente invención unidos al EPO-R, lo que permite la determinación de la estructura péptido/receptor mediante cristalografía de rayos X; (4) uso para medir la capacidad de las células precursoras de eritrocitos de inducir la síntesis de globina y síntesis del complejo heme, y de aumentar el número de receptores de ferritina, iniciando la diferenciación; (5) uso para mantener la proliferación y crecimiento de líneas celulares dependientes de la EPO; como las líneas celulares FDCEP-1-mEPO-R y TF-1; y (6) otras aplicaciones de investigación y diagnóstico donde el EPO-R está preferiblemente activado o dicha activación se calibra de manera conveniente contra una cantidad conocida de un agonista de EPO-R, y similares.

[0112] En otro aspecto más de la presente invención, los péptidos se destinan al tratamiento y uso en la fabricación de un medicamento. Los compuestos peptídicos de la invención pueden administrarse a animales con sangre caliente, incluyendo los seres humanos, para estimular el enlace de EPO al EPO-R *in vivo*. De este modo, la presente invención abarca péptidos para el tratamiento terapéutico de trastornos asociados a la deficiencia de EPO, que comprende administrar un péptido de la invención en cantidades suficientes para estimular el EPO-R y así, aliviar los síntomas asociados a la deficiencia de

EPO *in vivo*. Por ejemplo, los péptidos de la presente invención encontrarán un uso en el tratamiento de la insuficiencia renal y/o diálisis/insuficiencia renal en fase terminal; anemia asociada al SIDA; anemia asociada a las enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo, artritis reumatoide e inflamación intestinal crónica) y enfermedad autoinmune; y para potenciar el recuento de glóbulos rojos de paciente antes de la cirugía. Otros estados de enfermedad, trastornos, y estados de irregularidad hematológica que pueden tratarse mediante la administración de los péptidos de esta invención incluyen: beta talasemia; fibrosis cística; trastornos menstruales y del embarazo; anemia de la premadurez temprana; lesión de la médula espinal; vuelo espacial; pérdida de sangre aguda; envejecimiento; y diversos estados de enfermedades neoplásicas acompañados de eritropoyesis anormal.

[0113] En otros modos de realización, los compuestos peptídicos de la invención pueden utilizarse en el tratamiento de trastornos que no se caracterizan por un número de glóbulos rojos bajo o deficiente, por ejemplo como pretratamiento anterior a las transfusiones. Además, la administración de los compuestos de esta invención puede resultar en una disminución del tiempo de sangrado y así, encontrará uso en la administración a pacientes anterior a la cirugía o para indicaciones en las que se espere sangrado. Además, los compuestos de esta invención encontrarán uso en la activación de megacariocitos.

[0114] Puesto que la EPO ha demostrado tener un efecto mitogénico y quimiotáctico en las células endoteliales vasculares así como un efecto en las neuronas colinérgicas centrales [véase, p.ej., Amagnostou, et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5978-5982 y Konishi, et al. (1993) *Brain Res.* 609:29-35], los compuestos de esta invención encontrarán uso también en el tratamiento de una variedad de trastornos vasculares, como: fomentando la curación de heridas; fomentando el crecimiento de vasos sanguíneos colaterales coronarios (como aquellos que pueden producirse tras un infarto de miocardio); tratamiento de traumatismos; y tratamiento de injerto vascular posterior. Los compuestos de esta invención encontrarán también uso en el tratamiento de una variedad de trastornos neurológicos, caracterizados generalmente por niveles absolutos bajos de acetilcolina o niveles relativos bajos de acetilcolina en comparación con otras sustancias neuroactivas, p.ej., neurotransmisores.

30 Composiciones farmacéuticas

[0115] En otro aspecto más de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas de los compuestos peptídicos agonistas de EPO-R anteriores. Las afecciones aliviadas o moduladas por la administración de dichas composiciones incluyen aquellas indicadas arriba. Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, parenteral (inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), transdérmica (bien de manera pasiva o usando iontoforesis o electroporación),

transmucosa (nasal, vaginal, rectal o sublingual) o usando insertos bioerosionables y pueden formularse en formas farmacéuticas apropiadas para cada vía de administración. En general, la invención comprende composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades eficaces de un péptido agonista del EPO-R, o productos derivados, de la invención junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones incluyen diluyentes con diverso contenido de amortiguadores (p.ej., Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos como detergentes y agentes solubilizantes (p.ej., Tween 20, Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (p.ej., ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (p.ej., Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias aumentadoras de volumen (p.ej., lactosa, manitol); incorporación del material en preparaciones particuladas de compuestos poliméricos como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc. o en liposomas. También puede usarse ácido hialurónico. Dichas composiciones pueden influenciar el estado físico, estabilidad, índice de liberación *in vivo*, e índice de eliminación *in vivo* de las presentes proteínas y derivados. Véase, p.ej. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712. Las composiciones pueden prepararse en forma líquida, o pueden encontrarse en forma de polvo seco (p.ej. liofilizada).

Administración oral

[0116] Se encuentran contempladas para su uso aquí formas farmacéuticas sólidas orales, que se describen generalmente en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. 1990 (Mack Publishing Co. Easton PA 18042) en el capítulo 89. Las formas farmacéuticas sólidas incluyen comprimidos, cápsulas, pastillas, píldoras o grageas, sellos, pellets, polvos o gránulos. Además, puede usarse la encapsulación liposomal o proteinoide para formular las presentes composiciones (como, por ejemplo, microsferas proteinoideas descritas en la patente estadounidense nº 4.925.673). Puede usarse la encapsulación liposomal y los liposomas pueden derivatizarse con diversos polímeros (p.ej., patente estadounidense nº 5.013.556). Se aporta una descripción de formas farmacéuticas sólidas posibles para la composición terapéutica por Marshall, K. In: *Modern Pharmaceutics* Edited by G.S. Banker y C.T. Rhodes Capítulo 10, 1979. En general, la formulación incluirá los péptidos agonistas del EPO-R (o formas químicamente modificadas de los mismos) e ingredientes inertes que permiten la protección frente al ambiente del estómago, y liberación de material biológicamente activo en el intestino.

[0117] También se contemplan para su uso aquí formas farmacéuticas líquidas para la administración oral, incluyendo emulsiones, soluciones, suspensiones, y jarabes farmacéuticamente aceptables, que pueden contener otros componentes incluyendo

diluyentes inertes; adyuvantes como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión; y agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

5 **[0118]** Los péptidos pueden modificarse químicamente de forma que la administración oral del derivado sea eficaz. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos una fracción a la propia molécula componente, donde dicha fracción permite (a) la inhibición de proteólisis; y (b) la absorción en el torrente sanguíneo a partir del estómago o intestino. También resulta deseado el aumento en la estabilidad global del componente o componentes y el aumento en el tiempo de circulación en el cuerpo. Como se ha analizado arriba, la pegilación es una modificación química preferida para su uso farmacéutico. Otras
10 fracciones que pueden usarse incluyen: propilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano [véase, p.ej., Abuchowski y Davis (1981) "Soluble Polymer-Enzyme Adducts," en *Enzymes as Drugs*. Hocenberg y Roberts, eds. (Wiley-Interscience: New York, NY) pp. 367-383; y Newmark, et al. (1982) *J. Appl. Biochem.* 4:185-
15 189].

[0119] Para las formulaciones orales, el lugar de liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno o el íleon), o el intestino grueso. Aquellos con experiencia en la técnica cuentan con formulaciones disponibles que no se disolverán en el estómago, sino que liberarán el material en el duodeno u otro sitio en el intestino.
20 Preferiblemente, la liberación evitará los efectos perjudiciales del ambiente del estómago, bien mediante la protección del péptido (o derivado) o mediante la liberación del péptido (o derivado) más allá del ambiente del estómago, como en el intestino.

[0120] Para garantizar la resistencia gástrica total es esencial un recubrimiento impermeable de al menos pH 5,0. Los ejemplos de ingredientes inertes más comunes que
25 se usan como recubrimientos entéricos son trimelitato de acetato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, ftalato de acetato polivinílico (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ftalato de acetato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y Shellac. Estos recubrimientos pueden usarse como películas mixtas.

30 **[0121]** También puede usarse un recubrimiento o mezcla de recubrimiento en comprimidos, cuya finalidad no sea la protección frente al estómago. Esto puede incluir recubrimientos de azúcar, o recubrimientos que hagan que el comprimido sea más fácil de tragar. Las cápsulas pueden constar de una cáscara dura (como gelatina) para la administración del agente terapéutico seco (es decir, polvo), en las formas líquidas puede usarse una cáscara
35 de gelatina blanda. El material de cáscara de los sellos puede ser papel de almidón grueso u otro papel comestible. Para pastillas, grageas, comprimidos moldeados o triturado de

comprimido pueden usarse técnicas de concentración de humedad.

[0122] El péptido (o derivado) puede incluirse en la formulación como multiparticulados finos en forma de gránulos o pellets de un tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración de cápsulas también puede ser un polvo, 5 tapones ligeramente comprimidos o incluso como comprimidos. Estos agentes terapéuticos pueden prepararse mediante compresión.

[0123] También pueden incluirse colorantes y/o agentes aromatizantes. Por ejemplo, el péptido (o derivado) puede formularse (como mediante encapsulación de microesferas o liposomas) y después incluirse en un producto comestible, como una bebida refrigerada 10 que contenga colorantes y agentes aromatizantes.

[0124] Se puede diluir o aumentar el volumen del péptido (o derivado) con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir carbohidratos, especialmente manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, almidón y dextranos modificados. También pueden utilizarse determinadas sales inorgánicas como rellenos incluyendo trifosfato de calcio, 15 carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Algunos diluyentes disponibles en el mercado son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

[0125] Se pueden incluir disgregantes en la formulación del agente terapéutico en una forma farmacéutica sólida. Los materiales usados como disgregantes incluyen, sin carácter limitativo, almidón, incluyendo el disgregante comercial basado en almidón, Explotab. Se 20 puede usar almidón glicolato de sodio, Amberlite, carboximetilcelulosa de sodio, ultramilopectina, alginato de sodio, gelatina, corteza de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Los disgregantes también pueden ser resinas de intercambio catiónico insolubles. Pueden usarse gomas en polvo como disgregantes y aglutinantes y éstas pueden incluir gomas en polvo como agar, Karaya o tragacanto. También resultan 25 útiles el ácido algínico y su sal sódica como disgregantes.

[0126] Pueden usarse aglutinantes para mantener el agente peptídico (o derivado) unido para formar un comprimido duro e incluir materiales de productos naturales como acacia, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), eticelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). Podría usarse polivinilpirrolidona (PVP) e 30 hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en soluciones alcohólicas para granular el péptido (o derivado).

[0127] Puede incluirse un agente antifriccional en la formulación del péptido (o derivado) para evitar que se pegue durante el proceso de formulación. Pueden usarse lubricantes como capa entre el péptido (o derivado) y la pared del molde, y estos pueden incluir, sin 35 carácter limitativo; ácido esteárico incluyendo sus sales de calcio y magnesio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También pueden

usarse lubricantes solubles como lauril sulfato de sodio, lauril sulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

[0128] Se pueden añadir deslizantes que mejoren las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación y para ayudar a la reconfiguración durante la compresión. Los deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénico y silicoaluminato hidratado.

[0129] Para ayudar a la disolución del péptido (o derivado) en el ambiente acuoso se puede añadir un tensoactivo como un agente humectante. Los tensoactivos pueden incluir detergentes aniónicos como lauril sulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato sódico y dioctil sulfonato sódico. Pueden usarse detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que podrían incluirse en la formulación como tensoactivo son lauromacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino hidrogenado y polioxietilenado 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 20, 40, 60, 65 y 80, sacaroésteres de ácidos grasos, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensoactivos pueden estar presentes en la formulación de la proteína o derivado bien solo o bien como mezcla en diferentes proporciones.

[0130] Los aditivos que aumentan potencialmente la absorción del péptido (o derivado) son, por ejemplo, ácidos grasos, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico.

[0131] Pueden ser deseables las formulaciones orales de liberación controlada. El péptido (o derivado) podría incorporarse en una matriz inerte que permita la liberación mediante mecanismos de difusión o de lixiviación, p.ej., gomas. Pueden incorporarse también en la formulación matrices de degeneración lenta. Algunos recubrimientos entéricos tienen también un efecto de liberación retardada. Otra forma de liberación controlada es mediante un método basado en el sistema terapéutico de Oros (Alza Corp.), es decir, el fármaco se incluye en una membrana semipermeable que permite que el agua pase y empuje el fármaco hacia fuera a través de una sola abertura pequeña debido a los efectos osmóticos.

[0132] Se pueden usar otros recubrimientos para la formulación. Estos incluyen una variedad de azúcares que podrían aplicarse en una turbina de revestimiento. El péptido (o derivado) podría darse también en un comprimido recubierto con una película y los materiales usados en este caso se dividen en 2 grupos. El primero son materiales no entéricos e incluyen metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, providona y los polietilenglicoles. El segundo grupo consta de los materiales entéricos que son comúnmente ésteres de ácido ftálico.

[0133] Puede usarse una mezcla de materiales para proporcionar un recubrimiento de película óptimo. El recubrimiento de película puede llevarse a cabo en una turbina de revestimiento o en un lecho fluidizado o mediante recubrimiento por compresión.

Administración parenteral

[0134] Las preparaciones según esta invención para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Los ejemplos de solventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables como oleato de etilo. Dichas formas farmacéuticas pueden contener también adyuvantes como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. Estos pueden ser esterilizados mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, mediante incorporación de agentes esterilizantes en las composiciones, mediante la irradiación de las composiciones, o mediante el calentamiento de las composiciones. También pueden fabricarse utilizando agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes del uso.

Administración rectal o vaginal

[0135] Las composiciones para la administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden contener, además de la sustancia activa, excipientes como manteca de cacao o una cera para supositorios. Las composiciones para la administración nasal o sublingual también se preparan con excipientes estándares conocidos en la técnica.

Administración pulmonar

[0136] También se contempla aquí la administración pulmonar de los péptidos agonistas de EPO-R (o derivados de los mismos). El péptido (o derivado) se administra a los pulmones de un mamífero al inhalar y atraviesa el revestimiento epitelial de los pulmones hasta el torrente sanguíneo [véase, p.ej., Adjei, et al. (1990) *Pharmaceutical Research* 7:565-569; Adjei, et al. (1990) *Int. J. Pharmaceutics* 63:135-144 (acetato de leuprolide); Braquet, et al. (1989) *J. Cardiovascular Pharmacology* 13(sup5):143-146 (endotelina-1); Hubbard, et al. (1989) *Annals of Internal Medicine, Vol. III*, pp. 206-212 (α 1-antitripsina); Smith, et al. (1989) *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (α -1-proteinasa); Oswein, et al. (1990) "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II Keystone, Colorado* (hormona de crecimiento humana recombinante); Debs, et al. (1988) *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferón- γ y factor de necrosis tumoral α); y patente estadounidense nº 5.284.656 de Platz, et al. (factor estimulante de colonia de granulocitos). Se describe un método y composición para la administración pulmonar de fármacos para un efecto sistémico en la patente estadounidense nº 5.451.569 de Wong, et al.

[0137] Se contempla para su uso en la práctica de esta invención una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo, sin carácter limitativo, nebulizadores, inhaladores de dosis medida, e inhaladores en polvo, siendo todos ellos familiares para aquellos con experiencia

en la técnica. Algunos ejemplos específicos de dispositivos disponibles en el mercado adecuados para la práctica de esta invención son los nebulizadores Ultravent (Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO); el nebulizador Acorn II (Marquest Medical Products, Englewood, CO); el inhalador de dosis medida Ventolin (Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC); y el inhalador de polvo Spinhaler (Fisons Corp., Bedford, MA).

[0138] Todos estos dispositivos exigen el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación del péptido (o derivado). Normalmente, cada formulación es específica del tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propulsor apropiado, además de los diluyentes., adyuvantes y/o portadores habituales útiles en la terapia. También se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, inclusión de complejos, u otros tipos de portadores. Los péptidos químicamente modificados pueden prepararse también en formulaciones diferentes dependiendo del tipo de modificación química o el tipo de dispositivo empleado.

[0139] Las formulaciones adecuadas para su uso con un nebulizador, tanto de chorro como ultrasónico, comprenderá normalmente péptido (o derivado) disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de proteína activa biológicamente por mL de solución. La formulación puede incluir también un amortiguador y un azúcar simple (p.ej., para la estabilización de proteínas y regulación de la presión osmótica). La formulación de nebulizador puede contener también un tensoactivo, para reducir o prevenir la agregación inducida de superficie del péptido (o derivado) causada por la atomización de la solución al formar el aerosol.

[0140] Las formulaciones para su uso con un dispositivo de inhalador de dosis medida comprenderán generalmente un polvo finamente dividido que contiene el péptido (o derivado) suspendido en un propulsor con la ayuda de un tensoactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, como un clorofluorocarbono, un hidroc fluorocarbono, un hidrofluorocarbono, o un hidrocarbono, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol, y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los tensoactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oléico también puede ser útil como tensoactivo.

[0141] Las formulaciones para la dispensación a partir de un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene el péptido (o derivado) y puede incluir también un agente aumentador de volumen, como lactosa, sorbitol, sacarosa, o manitol en cantidades que faciliten la dispersión del polvo desde el dispositivo, p.ej., de un 50 a un 90% en peso de la formulación. El péptido (o derivado) debería prepararse de la forma más ventajosa en forma particulada con un tamaño medio de partículas de menos de

10 mm (o micrones), más preferiblemente de 0,5 a 5 mm, para la administración más eficaz al pulmón distal.

Administración nasal

5 **[0142]** También se contempla la administración nasal de los péptidos agonistas de EPO-R (o derivados). La administración nasal permite el paso del péptido al torrente sanguíneo directamente tras la administración del producto terapéutico a la nariz, sin la necesidad de deposición del producto en el pulmón. Las formulaciones para la administración nasal incluyen aquellas con dextrano o ciclodextrano.

Dosis

10 **[0143]** Para todos los compuestos peptídicos, a medida que se realizan más estudios, surge información acerca de los niveles de dosis adecuados para el tratamiento de diversas afecciones en diversos pacientes, y el trabajador con habilidad ordinaria, teniendo en cuenta el contexto terapéutico, edad, y salud general del receptor, será capaz de determinar la dosis correcta. La dosis elegida depende del efecto terapéutico deseado, la
15 vía de administración y la duración del tratamiento deseada. Generalmente, se administran niveles de dosis diarias de 0,001 a 10 mg/kg del peso corporal a mamíferos. Generalmente, pueden ser inferiores para la dosis de infusión o inyección intravenosa. El horario de dosificación puede variar, dependiendo de la vida media de circulación, y la formulación utilizada.

20 **[0144]** Los péptidos de la presente invención (o sus derivados) pueden administrarse junto con uno o más ingredientes activos o composiciones farmacéuticas adicionales.

Ejemplos

[0145] La presente invención se describe a continuación por medio de los siguientes ejemplos. Sin embargo, el uso de estos y otros ejemplos en cualquier parte de la
25 especificación es simplemente ilustrativo, y no limita el alcance y significado de la invención o de cualquier forma ejemplificada en modo alguno. Asimismo, la invención no se limita a ningún modo de realización preferido concreto aquí descrito. De hecho, podrán ser evidentes numerosas modificaciones y variaciones de la invención a aquellos con experiencia en la técnica al leer esta especificación, y pueden realizarse sin salir de su
30 espíritu y alcance. Por lo tanto, la invención solo debe limitarse por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de equivalentes a los que tienen derecho las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Síntesis de péptidos agonistas de EPO-R

1. Síntesis de monómero peptídico

35 **[0146]** Se sintetizaron diversos monómeros peptídicos de la invención usando la técnica de síntesis en fase sólida de Merrifield [véase, Stewart y Young. *Solid Phase Peptide*

Synthesis, 2nd edition (Pierce Chemical, Rockford, IL) 1984] en un instrumento automático de Applied Biosystems modelo 433A. La resina usada era PAL (Milligen/Biosearch), que es poliestireno reticulado con ácido 5-(4'-Fmoc-aminometil-3,5'-dimetoxifenoxi) valérico. El uso de resina PAL resulta en una función amida con terminal carboxilo en la escisión del péptido de la resina. Se logró la protección de amina primaria en los aminoácidos con Fmoc, y los grupos protectores de cadena lateral eran t-butilo para serina, treonina, e hidroxilos de tirosina; tritilo para amidas de asparagina y glutamina; Trt o AcM para cisteína; y Pmc (sulfonato de 2,2,5,7,8-pentametilcroman) para el grupo guanidino de la arginina. Cada acoplamiento se llevó a cabo durante 1h o 2h con BOP (hexafluorofosfato de benzotriazolil N-oxtris- dimetilaminofosfonio) y HOBt (1-hidroxibenzotriazol).

[0147] Para la síntesis de péptidos con una extremo carboxi-terminal amidado, el péptido completamente ensamblado se escindió con una mezcla de 90% ácido trifluoroacético, 5% etanoditiol, y 5% agua, inicialmente a 4 °C y aumentando gradualmente hasta la temperatura ambiente durante 1,5 h. El producto desprotegido fue filtrado de la resina y precipitado con éter dietílico. Tras el secado exhaustivo, el producto fue purificado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa C18 con un gradiente de acetonitrilo/agua en ácido trifluoroacético 0,1%.

2. Síntesis de dímero peptídico

[0148] Se sintetizaron diversos dímeros peptídicos de la invención directamente en un enlazador de lisina en una variación de la técnica en fase sólida.

[0149] Para la síntesis simultánea de dos cadenas peptídicas, se acopló Fmoc-Lys-Fmoc a una resina PAL (Milligen/Biosearch), proporcionando así un residuo de lisina inicial para que sirva como el enlazador entre las dos cadenas a sintetizar. Los grupos protectores Fmoc se eliminan con base suave (20% piperidina en DMF), y las cadenas peptídicas se sintetizaron usando los grupos amino libres resultantes como puntos de inicio. Se llevó a cabo la síntesis de cadena peptídica usando la técnica de síntesis en fase sólida descrita arriba. Se usó Trt para proteger todos los residuos de cisteína. Tras la desprotección de dímero, se llevó a cabo la escisión de la resina, y purificación, oxidación de los residuos de cisteína mediante incubación del dímero desprotegido en 100% DMSO durante 2-3 días a 5°C hasta 25°C. Esta reacción de oxidación produjo principalmente dímeros (>75%) con dos enlaces disulfuro intramoleculares.

[0150] Para la síntesis secuencial de dos cadenas peptídicas, se acopló Fmoc-Lys-Alloc a una resina PAL (Milligen/Biosearch), proporcionando así un residuo de lisina inicial para que actúe como el enlazador entre las dos cadenas a sintetizar. El grupo de protector Fmoc se eliminó con una base suave (20% piperidina en DMF). La primera cadena peptídica se sintetizó después usando el grupo amino libre resultante como un punto inicial. Se llevó a

cabo la síntesis de péptidos usando la técnica de fase sólida descrita arriba. Los dos residuos de cisteína de la primera cadena se protegieron con Trt. Tras la síntesis de la primera cadena peptídica, el grupo Alloc se eliminó del enlazador de lisina unido al soporte con Pd[P(C₆H₅)₃]₄, 4-metil morfolina, y cloroformo. La segunda cadena peptídica se sintetizó después en el segundo grupo amino libre. Los dos residuos de cisteína de la segunda cadena se protegieron con Acm. Se formó un enlace disulfuro intramolecular en la primera cadena peptídica eliminando los grupos protectores Trt utilizando ácido trifluoroacético, seguido por oxidación mediante agitación en 20% DMSO durante la noche. Después, se formó un enlace disulfuro intramolecular en la segunda cadena peptídica eliminando simultáneamente los grupos protectores Acm y oxidando los residuos de cisteína desprotegidos usando yodo, metanol, y trifluoroacetato de talio.

3. Unión de espaciadores

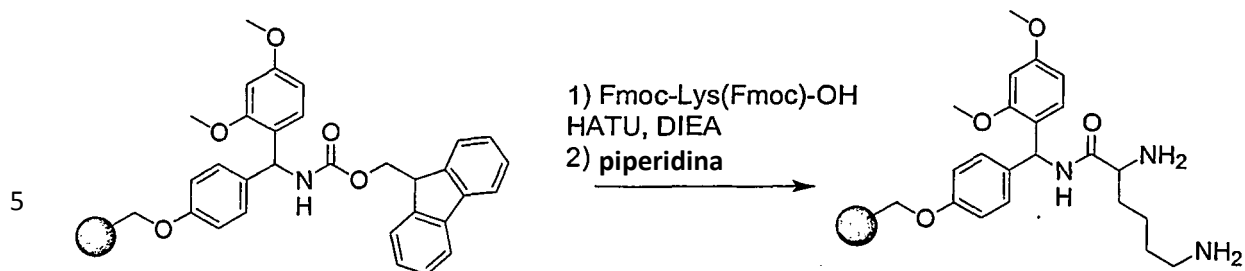
[0151] Cuando el espaciador era un aminoácido (p.ej., glicina o lisina como en AF35462 y AF35464, respectivamente), el espaciador se incorporó al péptido durante la síntesis de péptidos en fase sólida. En este caso, el aminoácido espaciador se unió a la resina PAL, y su grupo amino libre actuó como la base para la unión de otro aminoácido espaciador, o del enlazador de lisina. Tras la unión del enlazador de lisina, se sintetizaron péptidos díméricos como se describe arriba.

4. Síntesis de dímeros peptídicos de ejemplo

[0152] Los modos de realización ejemplares de estas técnicas de síntesis se describen a continuación. En un ejemplo, se describe la síntesis de un dímero peptídico unido mediante una lisina amida C-terminal. En otro ejemplo, se describe la síntesis de un dímero peptídico unido mediante una lisina C-terminal, y que contiene una molécula espaciadora unida a la lisina de enlace.

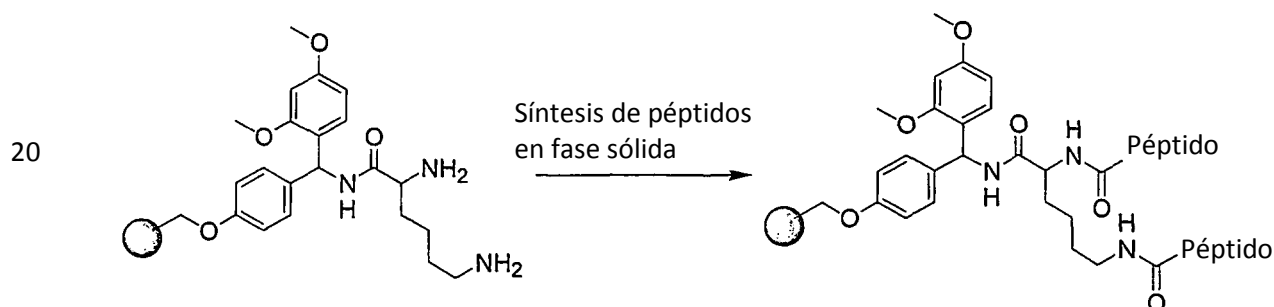
25 **Síntesis de un dímero peptídico unido mediante una lisina amida C-terminal:**

[0153] Etapa 1- Formación de TentaGel-Rink-Lys: La resina TentaGel-Rink (0,18 mml/g de Rapp Polymere, Alemania) se trató con una solución activada de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (preparada a partir de 5 eq. de aminoácido y 5 eq. de HATU disuelto en 0,5 M en DMF, seguido de la adición de 10 eq. de DIEA) y se dejó agitar suavemente durante 14 h. Se lavó la resina (DMF, THF, DCM, MeOH) y se secó para obtener la resina protegida. Los grupos amina residuales se protegieron mediante el tratamiento de la resina con una solución de 10% anhídrido acético, 20% piridina en DCM durante 20 minutos, seguido de lavado como se ha explicado arriba. Los grupos Fmoc se eliminaron agitando suavemente la resina en 30% piperidina en DMF durante 20 minutos, seguido de lavado (DMF, THE, DCM, MeOH) y secado.



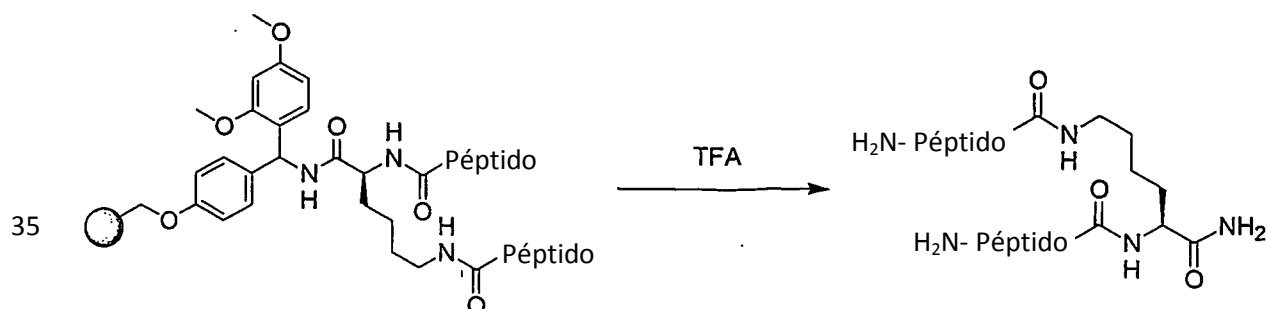
[0154] Etapa 2- Formación de TentaGel-Rink-Lys(Péptido)₂: La resina de la Etapa 1 se sometió a repetidos ciclos de acoplamiento Fmoc-aminoácido con activación HBTU/HOBt y eliminación de Fmoc con piperidina para construir ambas cadenas peptídicas simultáneamente. Esto se llevó a cabo convenientemente en un sintetizador de péptidos automático ABI 433 disponible en Applied Biosystems, Inc. Tras la eliminación final de Fmoc, los grupos amina terminales fueron acilados con anhídrido acético (10 eq.) y DIEA (20 eq.) en DMF durante 20 minutos, seguido del lavado según se explica arriba.

10
15



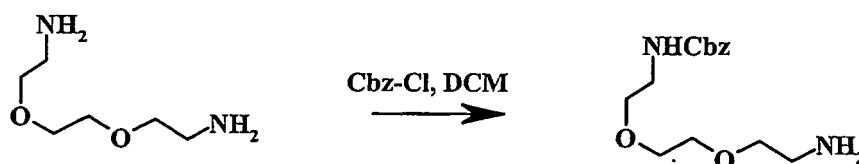
[0155] Etapa 3 - Escisión de la resina: La resina arriba mencionada es suspendida en una solución de TFA (82,5%), fenol (5%), etanoditiol (2,5%), agua (5%), y tianisol (5%) durante 3 h a temperatura ambiente. También pueden usarse cócteles de escisión alternativos como TFA (95%), agua (2,5%), y triisopropilsilano (2,5%). La solución de TFA se enfrió a 5°C y se vertió en Et₂O para precipitar el péptido. La filtración y secado a presión reducida dio el péptido deseado. La purificación mediante HPLC preparativa con una columna C18 proporciona el péptido puro.

25
30

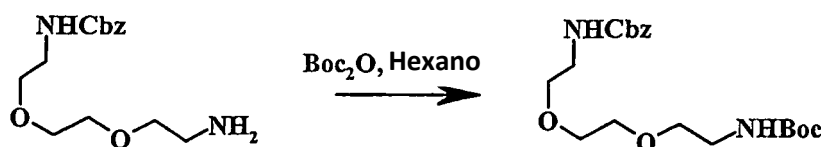


Síntesis de un dímero peptídico unido mediante una lisina amida C-terminal y que contiene una molécula espaciadora:

[0156] Etapa 1- Síntesis de Cbz-TAP: Se enfrió una solución que contenía diamina disponible en el mercado ("TAP" de Aldrich Chemical Co.) (10g, 67,47mmol) en DCM anhidro (100 ml) a 0°C. Se añadió una solución de cloroformiato de bencilo (4,82ml, 33,7mmol) en DCM anhidro (50ml) lentamente a través de un embudo de decantación durante un periodo de 6-7 h, manteniendo la temperatura de la mezcla de reacción a 0°C durante el proceso, y se permitió después que se calentara a la temperatura ambiente (~25°C). Después de 16 h más, se eliminó el DCM en vacío y se dividió el residuo entre 3N HCl y éter. Las capas acuosas fueron recogidas y neutralizadas con 50% aq. NaOH a pH8-9 y extraídas con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se secó sobre anhidro Na₂SO₄, se concentró después en vacío para proporcionar el mono-Cbz-TAP crudo (5g, aproximadamente rendimiento 50%). Este compuesto se utilizó para la siguiente reacción sin realizar ninguna otra purificación.

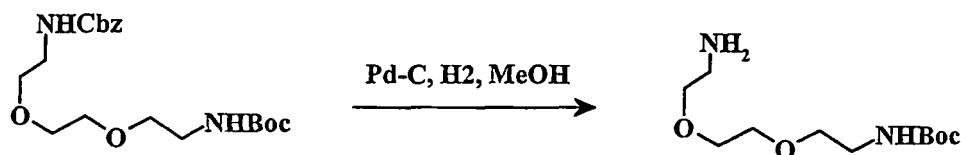


[0157] Etapa 2- Síntesis de Cbz-TAP-Boc: A una suspensión agitada enérgicamente del Cbz-TAP (5g, 17,7mmol) en hexano (25ml) se añadió Boc₂O (3,86g, 17,7mmol) y la agitación continuó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (25ml) y se lavó con 10% aq. ácido cítrico (2X), agua (2X) y salmuera. La capa orgánica se secó sobre anhidro Na₂SO₄ y se concentró en vacío. El producto crudo (rendimiento 5g) se utilizó directamente en la siguiente reacción.



[0158] Etapa 3- Síntesis de Boc-TAP: El producto crudo de la reacción previa se disolvió en metanol (25ml) y se hidrogenó en presencia de 5% Pd en Carbono (5% p/p) en presión de globo durante 16 h. La mezcla se filtró, lavó con metanol y el filtrado concentrado *in vacuo* para proporcionar el producto H-TAP-Boc crudo (rendimiento 3,7g). El rendimiento aproximado global de Boc-TAP tras las etapas 1-3 fue del 44% (calculado en base a la

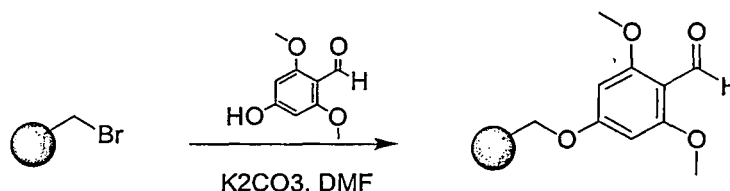
cantidad de Cbz-Cl usada).



5

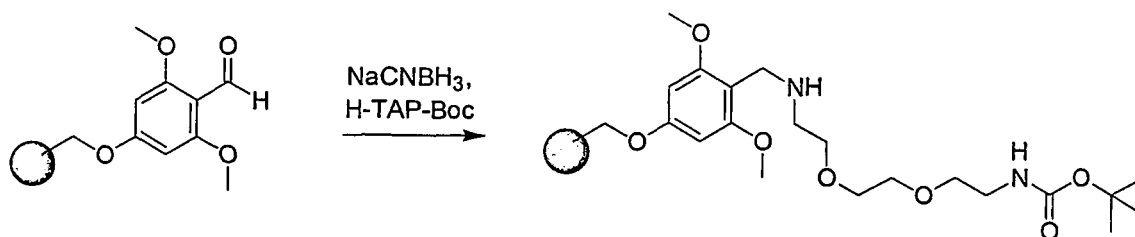
[0159] Etapa 4- Síntesis de TentaGel-Enlazador: Bromuro TentaGel (2,5 g, 0,48 mmol/g, de Rapp Polymere, Alemania), enlazador fenólico (5 equivalentes), y K_2CO_3 (5 equivalentes) se calentaron en 20 mL de DMF a $70^\circ C$ durante 14 h. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, se lavó la resina (0,1 N HCl, agua, ACN, DMF, MeOH) y se secó para dar una resina de color ámbar.

10



[0160] Etapa 5- Síntesis de TentaGel-enlazador-TAP(Boc): Se tomaron 2,5 g de la resina de arriba y H-TAP-Boc (1,5 g, 5eq.) y AcOH glacial (34 μ l, 5 eq.) en una mezcla de 1:1 MeOH-THF y se agitó durante la noche. Se añadió 1 M de solución de cianoborohidruro de sodio (5 eq) en THF a lo anterior y se agitó durante otras 7 h. La resina se filtró y lavó (DMF, THF, 0,1 N HCl, agua, MeOH) y se secó. Una pequeña cantidad de la resina fue benzoilada con Bz-Cl y DIEA en DCM y escindida con 70% TFA-DCM y comprobada mediante LCMS (cromatografía líquida - espectrometría de masas) y HPLC.

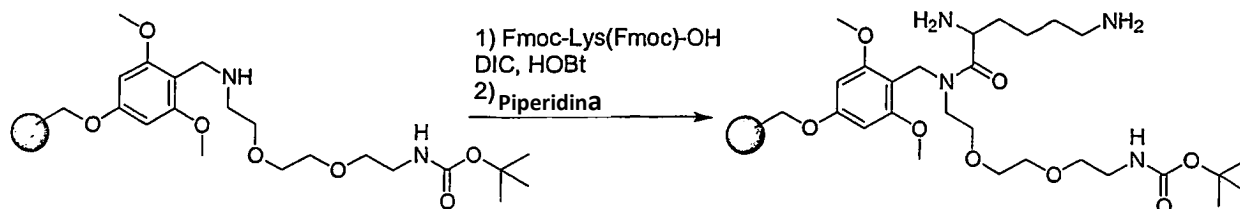
20



[0161] Etapa 6- Síntesis de TentaGel-enlazador-TAP-Lys: La resina de arriba se trató con una solución activada de Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (preparada a partir de 5 eq. de aminoácido y 5 eq. de HATU disuelto en 0,5 M en DMF, seguido de la adición de 10 eq. de DIEA) y se dejó agitar suavemente durante 14 h. Se lavó la resina (DMF, THF, DCM, MeOH) y se secó para obtener la resina protegida. Los grupos amina residuales se protegieron tratando la resina con una solución de 10% anhídrido acético, 20% piridina en

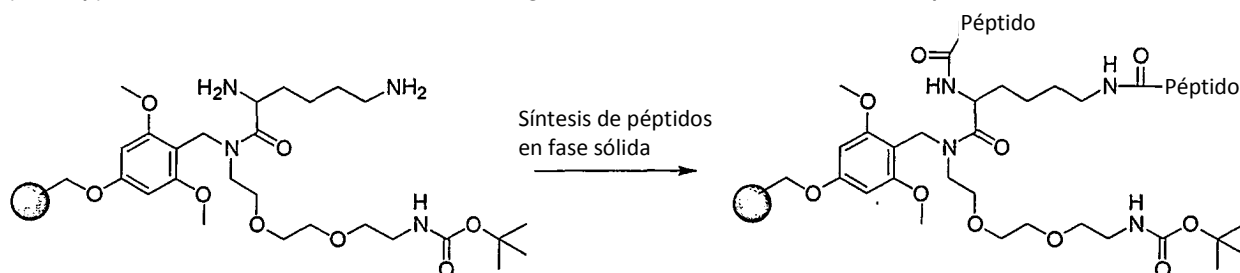
30

DCM durante 20 minutos, seguido de lavado como se ha explicado arriba. Los grupos Fmoc se eliminaron agitando suavemente la resina en 30% piperidina en DMF durante 20 minutos, seguido de lavado (DMF, THF, DCM, MeOH) y secado.



[0162] Etapa 7- Síntesis de TentaGel-Enlazador-TAP-Lys(Péptido)₂: La resina de arriba se sometió a ciclos repetidos de acoplamiento Fmoc-amino con activación HBTU/HOBt eliminación de Fmoc con piperidina para construir ambas cadenas peptídicas de forma simultánea. Esto se llevó a cabo convenientemente en un sintetizador de péptidos automático ABI 433 disponible de Applied Biosystems, Inc. Tras la eliminación final de Fmoc, los grupos amina terminales fueron acilados con anhídrido acético (10 eq.) y DIEA (20 eq.) en DMF durante 20 minutos, seguido de lavado como se ha explicado arriba.

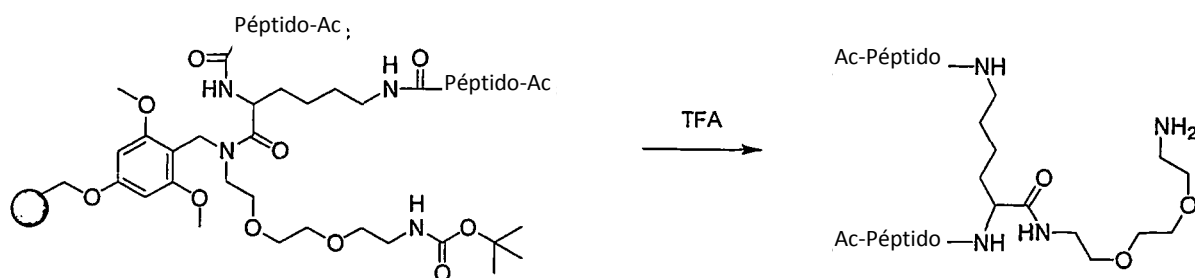
10



[0163] Etapa 8 - Escisión de la resina: La resina de arriba fue suspendida en una solución de TFA (82,5%), fenol (5%), etanoditiol (2,5%), agua (5%), y tianisol (5%) durante 3 h a temperatura ambiente. También pueden usarse cócteles de escisión alternativos como TFA (95%), agua (2,5%), y triisopropilsilano (2,5%). La solución de TFA se enfrió a 5°C y se vertió en Et₂O para precipitar el péptido. La filtración y secado a presión reducida dio el péptido deseado. La purificación mediante HPLC preparativa con una columna C18 proporcionó el péptido puro.

15

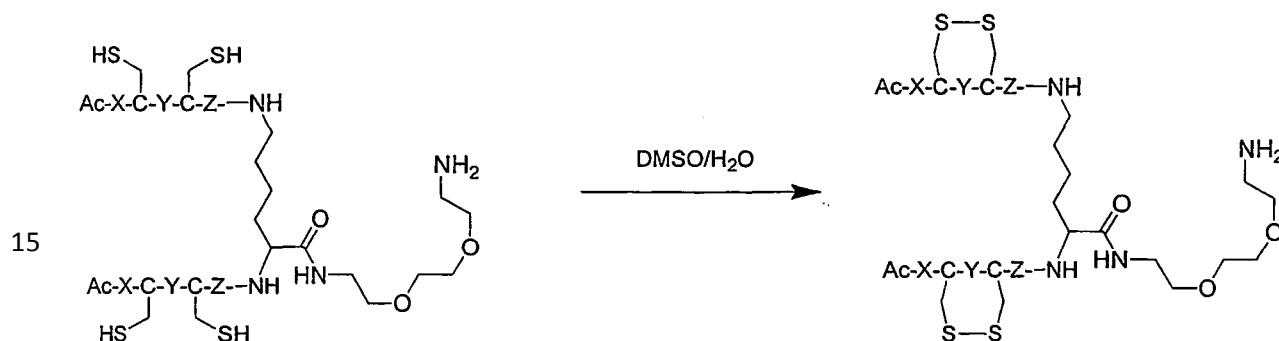
20



5. Oxidación de péptidos para formar enlaces disulfuro intramoleculares

[0164] El dímero peptídico se disolvió en 20% DMSO/agua (1 mg en peso seco de péptido/mL) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 36 h. El péptido se purificó cargando la mezcla de reacción en una columna HPLC C18 (Waters Delta-Pack C18, tamaño de partícula 15 micrones, tamaño del poro de 300 angstroms, 40 mm x 200 mm de longitud), seguido por un gradiente lineal de ACN/agua/0,01% TFA de 5 a 95% ACN durante 40 minutos. La liofilización de las fracciones que contienen el péptido deseado proporciona el producto como un sólido blanco esponjoso. Por ejemplo, en el caso de AF35525, esta reacción puede ilustrarse esquemáticamente como sigue:

10



15

Péptido dimérico (XYZ) que contiene residuos de cisteína reducidos

Péptido dimérico (XYZ) que contiene enlaces disulfuro oxidados

20

6. Pegilación de péptidos

[0165] Se llevó a cabo la pegilación de los péptidos de la invención utilizando diversas técnicas diferentes.

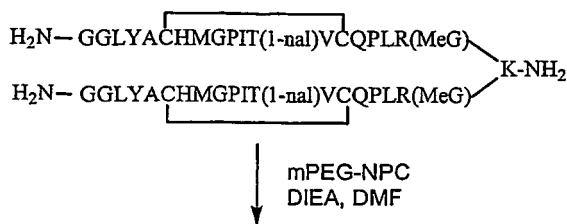
[0166] Pegilación de un grupo NH_2 terminal: El dímero peptídico se mezcló con 1,5 eq. (base de mol) de especies PEG activadas (mPEG-NPC de NOF Corp. Japan) en DMF seco para proporcionar una solución clara. Tras 5 minutos se añadieron 4 eq. de DIEA a la solución de arriba. Se revolvió la mezcla a temperatura ambiente durante 14h, seguido por la purificación con HPLC de fase reversa C18. La estructura del péptido pegilado se confirmó mediante espectrometría de masas MALDI. El péptido purificado se sometió también a purificación mediante cromatografía de intercambio iónico (catiónico) como se explica a continuación. Por ejemplo, en el caso de AF35593, la monopegilación del grupo NH_2 terminal de la fracción espaciadora puede ilustrarse esquemáticamente como sigue:

35

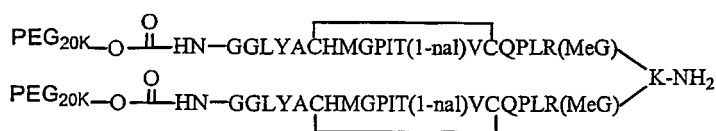


[0167] Dipegilación de los extremos N-terminales de un dímero peptídico: El dímero peptídico se mezcla con 2,5 eq. (base de mol) de especies PEG activadas (mPEG-NPC de NOF Corp. Japón) en DMF seco para proporcionar una solución clara. Tras 5 minutos se añaden 4 eq. de DIEA a la solución anterior. Se revuelve la mezcla a temperatura ambiente durante 14h, seguido por la purificación con HPLC de fase reversa C18. El péptido purificado se somete también a purificación mediante cromatografía de intercambio iónico (catiónico) como se explica a continuación. Por ejemplo, en el caso de AF35083, esta reacción puede ilustrarse esquemáticamente como sigue:

10

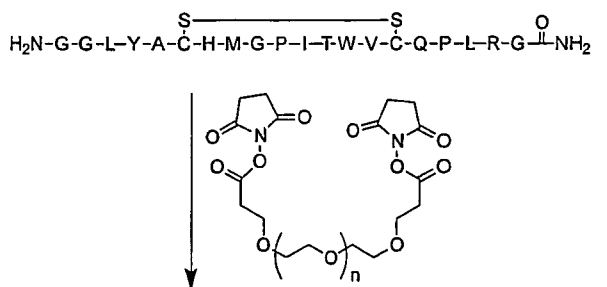


15

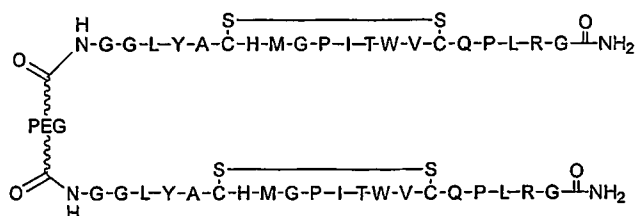


[0168] Dimerización peptídica mediante pegilación de los extremos N-terminales: El péptido (2,5 eq.) y PEG-(SPA-NHS)₂ (1 eq. De Shearwater Corp, Estados Unidos) se disolvieron en DMF seco a 0,25 M para obtener una solución clara. Tras 5 minutos, se añaden 10 eq. de DIEA a la solución anterior. Se revuelve la mezcla a temperatura ambiente durante 2h, seguido por la purificación con HPLC de fase reversa C18. El péptido purificado se somete también a purificación mediante cromatografía de intercambio iónico (catiónico) como se explica a continuación. Por ejemplo, en el caso de AF33131, esta reacción puede ilustrarse esquemáticamente como sigue:

30

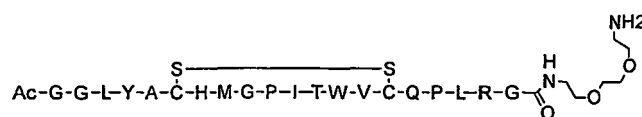


35

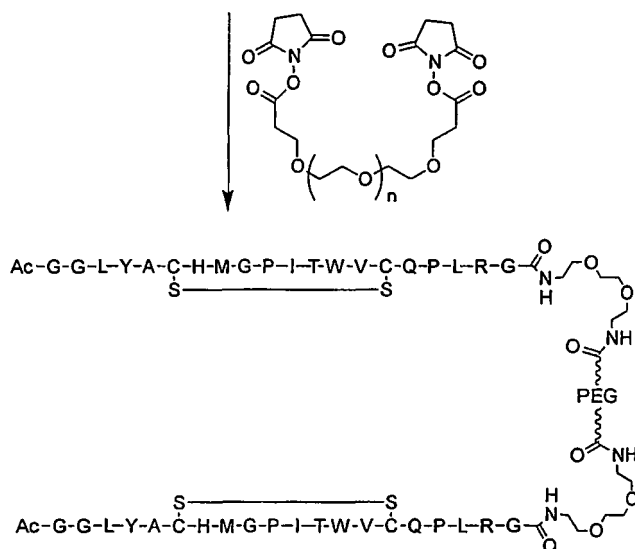


[0169] Dimerización peptídica mediante pegilación de los extremos C-terminales: El péptido (2,5 eq.) y PEG-(SPA-NHS)₂ (1 eq. De Shearwater Corp, Estados Unidos) se disolvieron en DMF seco a 0,25 M para obtener una solución clara. Tras 5 minutos, se añaden 10 eq. de DIEA a la solución anterior. Se revuelve la mezcla a temperatura ambiente durante 2h, seguido por la purificación con HPLC de fase reversa C18. El péptido purificado se somete también a purificación mediante cromatografía de intercambio iónico (catiónico) como se explica a continuación. Por ejemplo, esta reacción puede resumirse de la siguiente manera:

10



15



20

25 7. Purificación de péptidos por intercambio iónico.

[0170] Se estudiaron diversos soportes de intercambio en cuanto a su capacidad de separar el conjugado péptido-PEG anterior del PEG sin reaccionar (o hidrolizado), además de su capacidad de retener los péptidos diméricos iniciales. Se cargó la resina de intercambio iónico (2-3g) en una columna de 1 cm, seguido de la conversión a la forma sódica (0,2 N NaOH cargados en la columna hasta que el eluyente tiene pH 14, aprox. 5 volúmenes de la columna), y después a la forma de hidrógeno (eluida con 0,1 N HCl o 0,1 M HOAc hasta que el eluyente se corresponde con el pH de la carga, aprox. 5 volúmenes de la columna), seguido de lavado con 25% ACN/agua hasta un pH 6. Bien el péptido antes de la conjugación o bien el conjugado péptido-PEG se disolvió en 25% ACN/agua (10 mg/mL) y se ajustó el pH a <3 con TFA, y se cargó después en la columna. Tras el lavado con 2-3 volúmenes de columna de 25% ACN/agua y recogida de fracciones de 5 mL, se

35

liberó el péptido de la columna mediante elución con 0,1 M NH₄OAc en 25% ACN/agua, recogiendo de nuevo fracciones de 5 mL. El análisis mediante HPLC reveló que fracciones contenían el péptido deseado. El análisis con un detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD) indicó que cuando el péptido se retenía en la columna y se eluyó con la solución de NH₄OAc (generalmente entre las fracciones 4 y 10), no se observó nada de PEG no conjugado como contaminante. Cuando el péptido se eluyó en el amortiguador de lavado inicial (generalmente las primeras 2 fracciones), no se observó separación del conjugado-PEG deseado y exceso de PEG.

[0171] Las siguientes columnas retuvieron de forma exitosa tanto el péptido como el conjugado péptido-PEG, y purificaron con éxito el conjugado péptido-PEG del péptido no conjugado:

Tabla 1: Resinas de intercambio iónico

Soporte	Fuente
Columna precargada de intercambio catiónico fuerte mono S HR 5/5	Amersham Biosciences
Soporte de intercambio catiónico fuerte microgranulado de celulosa SE53	Whatman
Soporte de intercambio catiónico fuerte SP Sepharose Fast Flow	Amersham Biosciences

Ejemplo 2: Ensayos de actividad *in vitro*

[0172] Este ejemplo describe diversos ensayos *in vitro* que resultan útiles en la evaluación de la actividad y potencia de los péptidos agonistas de EPO-R de la invención. Los resultados de estos ensayos demuestran que los péptidos novedosos de esta invención se enlazan a EPO-R y activan la señalización de EPO-R. Además, los resultados de estos ensayos demuestran que las composiciones peptídicas novedosas presentan un sorprendente aumento en la afinidad de enlace a EPO-R y actividad biológica en comparación con los péptidos miméticos de EPO que se han descrito previamente.

[0173] Los monómeros y dímeros peptídicos agonistas del EPO-R se preparan según los métodos proporcionados en el Ejemplo 1. La potencia de estos monómeros y dímeros peptídicos se evaluó usando una serie de ensayos de actividad *in vitro*, incluyendo: un ensayo indicador, un ensayo de proliferación, un ensayo de enlace competitivo, y un ensayo C/BFU-e. Estos cuatro ensayos se describen con mayor detalle a continuación.

[0174] Los resultados de estos ensayos de actividad *in vitro* se resumen en la Tabla 2 (para

monómeros peptídicos) y Tabla 3 (para dímeros peptídicos). Estas tablas proporcionan la designación de compuesto y estructura para cada péptido probado, así como los resultados experimentales para cada uno de estos cuatro ensayos. Estos resultados demuestran la potencia drásticamente aumentada de los péptidos novedosos de la invención.

5 *1. Ensayo indicador*

[0175] Este ensayo se basa en una célula indicadora derivada de la línea celular pre B murina, Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux. Esta línea celular indicadora expresa un receptor quimérico que comprende la parte extracelular del receptor de EPO humana hasta la parte intracelular del receptor de GCSF humano. Esta línea celular se transfecta con una
10 construcción de gen indicador de luciferasa promovido por el promotor fos. La activación de esta receptor quimérico a través de la adición de agente eritropoyético resulta en la expresión del gen indicador de luciferasa, y por tanto, la producción de luz con la adición de la luciferina del sustrato de luciferasa. De este modo, el nivel de activación de EPO-R en dichas células puede cuantificarse mediante la medición de la actividad de la luciferasa.

[0176] Las células Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux se cultivan en medio DMEM/F12 (Gibco) complementado con 10% suero fetal bovino (FBS; Hylcone), 10% sobrenadante WEHI-3 (el sobrenadante de un cultivo de células WEHI-3, ATCC # TIB-68, y penicilina/estreptomicina. Aproximadamente 18 h antes del ensayo, las células fueron privadas de nutrientes transfiriéndolas a medio DMEM/F12 complementado con 10% FBS y
20 0,1% sobrenadante WEHI-3. El día del ensayo, se lavan las células una vez con medio DMEM/F12 complementado con 10% FBS (sin sobrenadante WEHI-3), después se cultivan 1×10^6 células/mL en presencia de una concentración conocida de péptido de prueba, o con EPO (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN) como control positivo, en medio DMEM/F12 complementado con 10% FBS (sin sobrenadante WEHI-3). Las diluciones
25 seriadas del péptido de prueba se prueban de manera concurrente en este ensayo. Las placas de ensayo se incuban durante 4 h a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂, tras lo cual se añade luciferina (Steady-Glo; Promega, Madison, Wi) a cada pocillo. Tras una incubación de 5 minutos, se mide la emisión de luz en un luminómetro Packard Topcount (Packard Instrument Co., Downers Grove, Ill.). Los recuentos de luz se trazan en relación
30 con la concentración de péptido de prueba y se analizan usando *software* Graph Pad. La concentración de péptido de prueba que resulta en la mitad de la emisión máxima de luz se registra como la CE50 [véase Tablas 2 y 3; Indicador CE50].

2. Ensayo de proliferación

[0177] Este ensayo se basa en una línea celular pre B murina, Baf3, transfectada para
35 expresar EPO-R humano. La proliferación de la línea celular resultante, BaF3/Gal4/Elk/EPOR, depende de la activación de EPO-R. El grado de proliferación celular

se cuantifica usando MTT, donde la señal en el ensayo MTT es proporcional al número de células viables.

[0178] Las células BaF3/Gal4/Elk/EPOR se cultivan en frascos de agitación en medio DMEM/F12 (Gibco) complementado con 10% FBS (Hyclone) y 2% sobrenadante WEHI-3 (ATCC # TIB-68). Las células cultivadas fueron privadas de nutrientes durante la noche, en un frasco de agitación en una densidad celular de 1×10^6 células/ml, en medio DMEM/F12 complementado con 10% FBS y 0,1% sobrenadante WEHI-3. Las células privadas de nutrientes se lavan entonces dos veces con PBS de Dulbecco (Gibco), y se resuspenden a una densidad de 1×10^6 células/ml, en DMEM/F12 complementado con 10% FBS (sin sobrenadante WEHI-3). Después, se sitúan alícuotas de 50 μ L (~50,000 células) de la suspensión celular en una placa, por triplicado, en placas de ensayo de 96 pocillos. Se añaden alícuotas de 50 μ L de series de dilución de los péptidos miméticos de EPO de prueba, o 50 μ L de EPO (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN) o Aranesp™ (darbepoetina alfa, un agonista de EPO-R disponible comercialmente en Amgen) en medio DMEM/F12 complementado con 10% FBS (sin sobrenadante de WEHI-3) a las placas de ensayo de 96 pocillos (volumen final del pocillo de 100 μ L). Por ejemplo, pueden probarse 12 diluciones diferentes donde la concentración final de péptido de prueba (o péptido de EPO de control) oscile entre 810 pM y 0,0045 pM. Después, las células en las placas son incubadas durante 48 h a 37 °C. A continuación, se añaden 10 μ L de MTT (Roche Diagnostics) a cada pocillo de la placa de cultivo, y después de deja incubar durante 4 h. A continuación, se para la reacción añadiendo 10% SDS + 0,01N HCl. Después, se incuban las placas durante la noche a 37 °C. A continuación, se mide la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 595 nm mediante espectrofotometría. Se realizan gráficos de las lecturas de absorbancia frente a la concentración de péptido de prueba y se calcula el CE50 usando *software* Graph Pad. La concentración de péptido de prueba que resulta en la mitad de la absorbancia máxima se registra como el CE50 [véase la Tabla 3: Proliferación CE50].

3. Ensayo de enlace competitivo

[0179] Los cálculos de enlace competitivo se realizan usando un ensayo en el que se genera una señal de luz en función de la proximidad de dos perlas: una perla donante de estreptavidina que porta un trazador de péptidos de enlace a EPO-R biotinilado y una perla aceptora a la que se une el EPO-R. Se genera luz mediante la transferencia de energía no radiativa, durante la cual se libera un oxígeno singlete de la primera perla con la iluminación, y el contacto con el oxígeno singlete liberado provoca que la segunda perla emita luz. Estos grupos de perlas se encuentran disponibles en el mercado (Packard). La proximidad de las perlas es generada por el enlace del trazador de péptido de enlace a EPO-R al EPO-R. Un péptido de prueba que compite con el trazador de péptido de enlace

de EPO-R por unirse a la EPO-R evitará este enlace, provocando una disminución en la emisión de luz.

[0180] Con mayor detalle, el método es el siguiente: Añadir 4 μL de diluciones seriadas del péptido agonista de EPO-R de prueba, o controles positivo o negativo, a los pocillos de una placa de 384 pocillos. Después, añadir 2 μL /pocillo de cóctel receptor/perla. El cóctel de perla receptora consta de: 15 μL de 5mg/ml de perlas donantes de estreptavidina (Packard), 15 μL de 5mg/ml de anticuerpo monoclonal ab179 (este anticuerpo reconoce la parte de la proteína fosfatasa alcalina placentaria humana contenida en el EPO-R recombinante), perlas aceptoras recubiertas con proteína A (la proteína A enlazará al anticuerpo ab179; Packard), 112,5 μL de una dilución 1:6,6 de EPO-R recombinante (producido en células de ovario de hámster chino como una proteína de fusión a una parte de proteína fosfatasa alcalina placentaria humana que contiene el epítipo objetivo ab179) y 607,5 μL de amortiguador Alphaquest (40mM HEPES, pH 7,4; 1mM MgCl_2 ; 0,1% BSA, 0,05% Tween 20). Golpear suavemente para mezclar. Añadir 2 μL /pocillo de trazador de péptido de enlace a EPO-R biotinilado, AF33068 (concentración final de 30nM). AF33068, un péptido de enlace a EPO-R (véase la Tabla 3 "Indicador CE50 (pM)"), se produce según los métodos descritos en el Ejemplo 1.



[0181] Centrifugar 1 minuto para mezclar. Sellar la placa con Packard Top Seal y envolver en la lámina. Incubar durante la noche a temperatura ambiente. Tras 18 horas tomar lectura de la emisión de luz utilizando un lector AlphaQuest (Packard). Trazar la emisión frente a la concentración de péptido y analizar con Graph Pad o Excel.

[0182] La concentración de péptido de prueba que resulta en un descenso del 50% en la emisión de luz, en comparación con la observada sin el péptido de prueba, se registra como el CI50 [Véase Tablas 2 y 3: AQ CI50].

4. Ensayo C/BFU-e

[0183] La señalización de EPO-R estimula la diferenciación de células madre de la médula ósea para proliferar precursores de glóbulos rojos. Este ensayo mide la capacidad de péptidos de prueba de estimular la proliferación y diferenciación de precursores de glóbulos rojos de células madre pluripotentes de médula ósea humana primarias.

[0184] Para este ensayo, se realizan diluciones seriadas del péptido de prueba en medio IMDM (Gibco) complementado con 10% FBS (Hyclone). Después, se añaden estas diluciones seriadas, o péptido de EPO de control positivo, a metilcelulosa para dar un volúmen final de 1,5 mL. La mezcla de metilcelulosa y péptido se agita entonces en un vórtex rigurosamente. Se descongelan alícuotas (100.000 células/mL) de células CD34+ derivadas de médula ósea humanas (Poletics/Cambrex). Se añaden cuidadosamente las células descongeladas a 0,1 mL de 1 mg/ml de DNAsa (células madre) en un tubo de 50 mL. A continuación, se añaden 40-50 mL de medio IMDM cuidadosamente a las células: el medio se añade gota a gota a lo largo del lateral del tubo de 50mL los primero 10 mL, y después se dispensa el volumen de medio restante lentamente a lo largo del lateral del tubo. Después, se giran las células a 900 rpm durante 20 min, y se elimina el medio con cuidado mediante aspiración suave. Se resuspenden las células en 1ml de medio IMDM y se cuenta la densidad celular por mL en un portaobjetos de hemocitómetro (alícuota de 10µL de suspensión celular en portaobjetos, y la densidad celular es el recuento medio X 10.000 células/ml). Las células se diluyen después en medio IMDM a una densidad celular de 15.000 células/mL. Después, se añaden 100µL de células diluidas a cada muestra de péptido más metilcelulosa de 1,5mL (concentración celular final en medio de ensayo es de 1000 células/mL), y se agita la mezcla en vórtex. Se permite que las burbujas de la mezcla desaparezcan, y después se aspira 1mL utilizando una aguja de punta roma. Añadir 0,25 mL de mezcla aspirada de cada muestra en cada uno de 4 pocillos de una placa de 24 pocillos (marca Falcon). Incubar las mezclas en la placa a 37°C en 5% CO₂ en un incubador húmedo durante 14 días. Puntuar la presencia de colonias eritroides utilizando un microscopio de fase (objetivo 5X-10X, aumento final 100X). La concentración de péptido de prueba a la que el número de colonias formadas es el 90% del maximo, en comparación con la observada con el control positivo de EPO, se registra como la CE90 [Véase Tabla 3: C/BFU-e CE90].

5. Ensayo de enlace competitivo de radioligandos

[0185] Se puede utilizar también un ensayo de enlace competitivo de radioligandos alternativo para medir los valores CI50 de los péptidos de la presente invención. Este ensayo mide el enlace de ¹²⁵I-EPO a EPOr. Este ensayo puede llevarse a cabo según el siguiente protocolo de ejemplo:

A. Materiales

[0186]

5	Quimera EPO R/Fc humano recombinante	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación: Quimera EPO R/Fc humano recombinante • Proveedor: R&D Systems (Minneapolis, MN, EE.UU.) • Número de catálogo: 963-ER • Número de lote: EOK033071 • Almacenamiento: 4 °C
10	Eritropoyetina humana recombinante yodada	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación: (3 [¹²⁵I]yodotirosil)Eritripoyetina, actividad específica alta humana recombinante, 370 kBq, 10 µCi • Proveedor: Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EE.UU.) • Número de catálogo: 1M219-10µCi • Número de lote: • Almacenamiento: 4 °C
15	Sefarosa-Proteína G	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación: Sefarosa-Proteína G 4 Fast Flow • Proveedor: Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EE.UU.) • Número de catálogo 17-0618-01 • Número de lote: • Almacenamiento: 4 °C
	Amortiguador de ensayo	<ul style="list-style-type: none"> • Solución salina fosfatada (PBS), pH 7,4, que contiene 0,1% albúmina de suero bobino y 0,1% ácida sódica • Almacenamiento: 4 °C

20

B. Determinación de la concentración de receptor apropiada.

[0187] Un vial de 50µg de dominio extracelular de EPOr recombinante liofilizado fusionado a la parte Fc de IgG1 humana se reconstituye en 1mL de amortiguador de ensayo. Para determinar la cantidad correcta de receptor a usar en el ensayo, se combinan 100 µL de diluciones seriadas de esta preparación de receptor con aproximadamente 20.000 cpm en 25 200 µL de Eritropoyetina recombinante humana yodada (¹²⁵I-EPO) en tubos de ensayo de polipropileno de 12 x 75 mm. Se tapan los tubos y se mezcla suavemente a 4°C durante la noche en un agitador rotativo LabQuake.

[0188] Al día siguiente, se añaden 50µL de una mezcla 50% de Proteína G-Sefarosa a cada tubo. A continuación, se incuban los tubos durante 2 horas a 4°C, mezclando suavemente. Después, se centrifugan los tubos durante 15 min a 4000 RPM (3297 x G) para peletizar la proteína G-sefarosa. Los sobrenadantes se eliminan y descartan cuidadosamente. Tras lavar 3 veces con 1mL de amortiguador de ensayo a 4°C, los pellets se cuentan con un contador gamma Wallac Wizard. Después, se analizaron los resultados y se calculó la dilución que debe alcanzar el 50% del valor de enlace máximo. 35

C. Determinación de CI_{50} para péptido

[0189] Para determinar la CI_{50} de un péptido de la presente invención, se combinan 100 μ L de diluciones seriadas del péptido con 100 μ L de receptor de eritropoyetina recombinante (100 pg/tubo) en tubos de prueba de polipropileno de 12 x 75 mm. Después, se añaden 100 μ L de Eritropoyetina humana recombinante yodada (125 I-EPO) a cada tubo y se taparon los tubos y se mezcló suavemente a 4°C durante la noche.

[0190] Al día siguiente, se cuatificó la 125 I-EPO unida como se describe arriba. Se analizan los resultados y se calcula el valor CI_{50} utilizando software Graphpad Prism versión 4.0, de GraphPad Software, Inc. (San Diego, CA). El ensayo se repite preferiblemente 2 o más veces para cada péptido cuyo valor CI_{50} se mida por este procedimiento, durante un total de 3 repeticiones de determinaciones de CI_{50} .

6. Análisis

[0191] El ensayo de indicador *in vitro* para monómeros peptídicos de la presente invención se comparó directamente con aquellos para las secuencias peptídicas relacionadas reveladas previamente (véase AF31552 y AF31748 en la Tabla 2): a saber,

GGLYACHMGPMTVCQPLRG SEQ ID NO: 32 y
GGLYACHMGPMT(1-nal)VCQPLRG SEQ ID NO: 33.

[0192] Estos resultados demuestran la potencia drásticamente aumentada de los monómeros peptídicos novedosos de la invención, puesto que los dímeros peptídicos novedosos eran de 3 a 7,5 veces más potentes que los monómeros peptídicos revelados previamente en el ensayo de indicador. Estos monómeros peptídicos novedosos se utilizaron entonces para preparar dímeros peptídicos novedosos de potencia y actividad incluso superior.

Tabla 2: Ensayo indicador *in vitro* para monómeros peptídicos

Denominación del compuesto	Monómero peptídico	Indicador CE50 (nM)
AF31552	GGLYACHMGPMTWVCQPLRG-NH ₂	100
AF31748	GGLYACHMGPMT(1-nal)VCQPLRG-NH ₂	40
AF33128	GGLYACHMGPITWVCQPLRG-NH ₂	13
AF36729	(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRK-NH ₂	13,3

Tabla 3: Ensayo de actividad *in vitro* para dímeros peptídicos

Denominación del compuesto	Dímero peptídico	Indicador CE50(pM)	Proliferación CE50 (pM)	AQ C150 (nM)	C/BFU-e CE90 (nM)
AF33065	$\begin{array}{c} \boxed{\text{LYACHMGPITWVCQPLRG}} \\ \text{LYACHMGPITWVCQPLRG} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{K-NH}_2 \\ \text{K-NH}_2 \end{array}$	300	---	---	---
AF34602	$\begin{array}{c} \boxed{\text{GLYACHMGPITWVCQPLR}} \\ \text{GLYACHMGPITWVCQPLR} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{K-NH}_2 \\ \text{K-NH}_2 \end{array}$	727	---	---	---
AF34395	$\begin{array}{c} \boxed{\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG}} \\ \text{GLYACHMGPITWVCQPLRG} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{K-NH}_2 \\ \text{K-NH}_2 \end{array}$	100	---	---	---
AF34601	$\begin{array}{c} \boxed{\text{GGLYACHMGPITWVCQPLR}} \\ \text{GGLYACHMGPITWVCQPLR} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{K-NH}_2 \\ \text{K-NH}_2 \end{array}$	100	---	---	---
AF32579	$\begin{array}{c} \boxed{\text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG}} \\ \text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{K-NH}_2 \\ \text{K-NH}_2 \end{array}$	47	142	1,7	3
AF33068	$\begin{array}{c} \boxed{\text{Biotina 1-GGLYACHMGPITWVCQPLRG}} \\ \text{Biotina 1-GGLYACHMGPITWVCQPLRG} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{K-NH}_2 \\ \text{K-NH}_2 \end{array}$	170	---	---	---

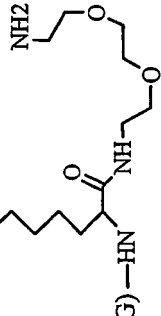
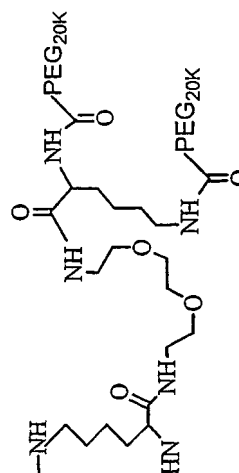
Denominación del compuesto	Dímero peptídico	Indicador CE50 (pM)	Proliferación CE50 (pM)	AQ C150 (nM)	C/BFU-e CE90 (nM)
AF33131	$\begin{array}{c} \text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG-NH}_2 \\ \text{PEG}_{3,4\text{K}} \\ \text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG-NH}_2 \end{array}$	158	---	18	---
AF34351	$\begin{array}{c} \text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG} \\ \text{K-Abx-Abx} \\ \text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG} \end{array}$	50	---	---	---
AF34350	$\begin{array}{c} \text{PEG}_{5\text{k}}-\text{O}-\text{L}-\text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG} \\ \text{O} \\ \text{PEG}_{5\text{k}}-\text{O}-\text{L}-\text{GGLYACHMGPITWVCQPLRG} \\ \text{K-NH}_2 \end{array}$	267	---	16	---
AF34753	$\begin{array}{c} (\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG} \\ \text{K-Abx-Abx} \\ (\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG} \end{array}$	73	---	---	1,2
AF34757	$\begin{array}{c} (\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG} \\ \text{K-Abx-Abx-PEG}_{5\text{k}} \\ (\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG} \end{array}$	110	---	---	2,7
AF35062	$\begin{array}{c} (\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG} \\ \text{K-Abx-Abx-PEG}_{20\text{k}} \\ (\text{AcG})\text{GLYACHMGPITWVCQPLRG} \end{array}$	91	---	---	1,6

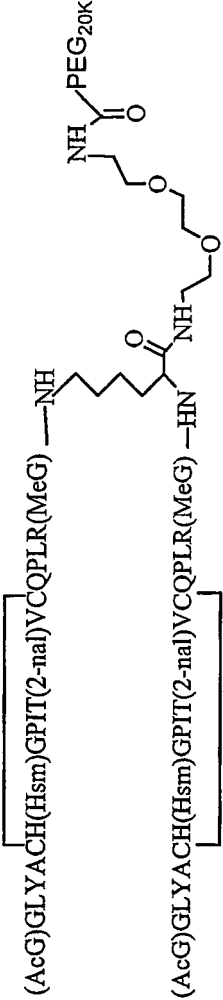
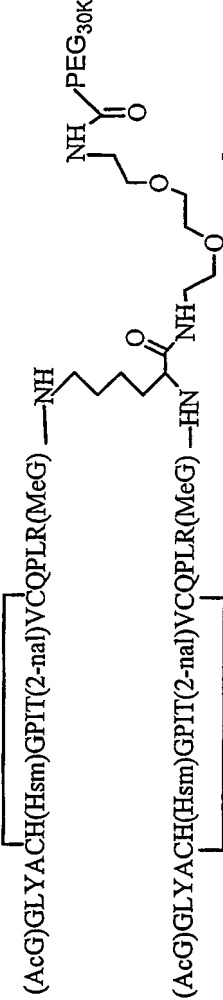
Denominación del compuesto	Dímero peptídico	Indicador CE50 (pM)	Proliferación CE50 (pM)	AQ C150 (nM)	C/BFU-e CE90 (nM)
AF35218	$\begin{array}{c} \boxed{\text{(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRGKGG}} \\ \text{(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRGKGG} \end{array} \begin{array}{c} \text{K-NH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \end{array}$	27	--	--	--
AF35462	$\begin{array}{c} \boxed{\text{(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG}} \\ \text{(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG} \end{array} \begin{array}{c} \text{KGG} \\ \diagup \quad \diagdown \end{array}$	194	--	--	--
AF35464	$\begin{array}{c} \boxed{\text{(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG}} \\ \text{(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG} \end{array} \begin{array}{c} \text{KK-NH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \end{array}$	181	--	--	--
AF33197	$\begin{array}{c} \boxed{\text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLRG}} \\ \text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLRG} \end{array} \begin{array}{c} \text{K-NH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \end{array}$	80	--	--	--
AF34994	$\begin{array}{c} \boxed{\text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)}} \\ \text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)} \end{array} \begin{array}{c} \text{K-NH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \end{array}$	27	170	--	3,7
AF35083	$\begin{array}{c} \text{PEG}_{20k} \text{---O---} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \boxed{\text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)}} \end{array} \\ \text{PEG}_{20k} \text{---O---} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \boxed{\text{GGLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)}} \end{array} \begin{array}{c} \text{K-NH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \end{array} \end{array}$	92	--	--	--

Denominación del compuesto	Dímero peptídico	Indicador CE50 (pM)	Proliferación CE50 (pM)	AQ C150 (nM)	C/BFU-e CE90 (nM)
AF35525	<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)→NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)→HN</p>	57	57	--	3
AF35526	<p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)→NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(1-naI)VCQPLR(MeG)→HN</p>	900	800	---	13
AF35563	<p>(AcG)GLYACHMGPIT(2-naI)VCQPLR(MeG)→NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(2-naI)VCQPLR(MeG)→HN</p>	135	47	---	3
AF35575	<p>(AcG)GLYACHMGPITWVCPLRG→NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPITWVCPLRG→HN</p>	127	57.000	-	1,1

Denominación del compuesto	Dímero peptídico	Indicador CE50 (pM)	Proliferación CE50 (pM)	AQ C150 (nM)	C/BFU-e CE90 (nM)
AF35592	<p>(AcG)GLYACHMGPITWVCPLRG-NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPITWVCPLRG-HN</p>	67	40	-	1,3
AF35593	<p>(AcG)GLYACHMGPITWVCPLRG-NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPITWVCPLRG-HN</p>	76	32	--	1,5
AF35594	<p>(AcG)GLYACHMGPIT(2-naI)VCQPLR(MeG)-NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPIT(2-naI)VCQPLR(MeG)-HN</p>	54	40	--	2,2
AF35219	<p>(AcG)GLYACHMGPITWVCPLRGG-NH</p> <p>(AcG)GLYACHMGPITWVCPLRGG-HN</p>	403	--	--	--

Denominación del compuesto	Dímero peptídico	Indicador CE50 (pM)	Proliferación CE50 (pM)	AQ C150 (nM)	C/BFU-e CE90 (nM)
AF32876	<p>GGLYACH(Hsm)GPITWVQCPLRG K-NH₂</p> <p>GGLYACH(Hsm)GPITWVQCPLRG</p>	100	--	--	--
AF32881	<p>GGLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG K-NH₂</p> <p>GGLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG</p>	100	--	--	11
AF35179	<p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG K-Abx-Abx</p> <p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG</p>	57	--	--	3,7
AF35180	<p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG K-Abx-Abx-PEG₂₀K</p> <p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG</p>	303	--	--	--
AF35463	<p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG) KGG</p> <p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)</p>	125	--	--	--
AF35090	<p>GGLYACH(Hsm)GPITWVQCPLRG(MeG) K-NH₂</p> <p>GGLYACH(Hsm)GPITWVQCPLRG(MeG)</p>	35	190	--	3,7

Denominación del compuesto	Dímero peptídico	Indicador CE50 (pM)	Proliferación CE50 (pM)	AQ C150 (nM)	C/BFU-e CE90 (nM)
AF35148	$\text{PEG}_{20\text{K}}-\text{O}-(\text{AcG})\text{GLYACH}(\text{Hsm})\text{GPIT}(1\text{-nal})\text{VCQPLR}(\text{MeG})-\text{K-NH}_2$ $\text{PEG}_{20\text{K}}-\text{O}-(\text{AcG})\text{GLYACH}(\text{Hsm})\text{GPIT}(1\text{-nal})\text{VCQPLR}(\text{MeG})$	3600	--	--	--
AF35149	$(\text{AcG})\text{GLYACH}(\text{Hsm})\text{GPIT}(1\text{-nal})\text{VCQPLR}(\text{MeG})-\text{NH}$ $(\text{AcG})\text{GLYACH}(\text{Hsm})\text{GPIT}(1\text{-nal})\text{VCQPLR}(\text{MeG})-\text{HN}$ 	43	57	--	2
AF35168	$(\text{AcG})\text{GLYACH}(\text{Hsm})\text{GPIT}(1\text{-nal})\text{VCQPLR}(\text{MeG})-\text{NH}$ $(\text{AcG})\text{GLYACH}(\text{Hsm})\text{GPIT}(1\text{-nal})\text{VCQPLR}(\text{MeG})-\text{HN}$ 	1800	--	--	--
AF35361	$(\text{AcG})\text{GLYACH}(\text{Hsm})\text{GPIT}(2\text{-nal})\text{VCQPLR}(\text{MeG})-\text{KK-NH}_2$ $(\text{AcG})\text{GLYACH}(\text{Hsm})\text{GPIT}(2\text{-nal})\text{VCQPLR}(\text{MeG})$	77	--	--	--

Denominación del compuesto	Dímero peptídico	Indicador CE50 (pM)	Proliferación CE50 (pM)	AQ C150 (nM)	C/BFU-e CE90 (nM)
AF35595	<p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-naI)VCQPLR(MeG) —NH</p>  <p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-naI)VCQPLR(MeG) —HN</p>	65	42	--	1,5
AF35564	<p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-naI)VCQPLR(MeG) —NH</p>  <p>(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-naI)VCQPLR(MeG) —HN</p>	887	270	--	4,5

Ejemplo 3: Ensayos de actividad *in vivo*

[0193] Este ejemplo describe diversos ensayos *in vivo* que resultan útiles en la evaluación de la actividad y potencia de los péptidos agonistas de EPO-R de la invención. Los monómeros y dímeros peptídicos agonistas del EPO-R se preparan según los métodos proporcionados en el Ejemplo 1. La actividad *in vivo* de estos monómeros y dímeros peptídicos se evalúa utilizando un ensayo en serie, incluyendo un bioensayo con ratones policitémicos exhipóxicos y un ensayo de reticulocitos. Estos dos ensayos se describen con mayor detalle a continuación.

10 **1. Bioensayo con ratones policitémicos exhipóxicos**

[0194] Los péptidos de prueba se someten a ensayo para la actividad *in vivo* en el bioensayo con ratones policitémicos exhipóxicos adaptado del método descrito por Cotes y Bangham (1961), *Nature* 191: 1065-1067. Este ensayo examina la capacidad de un péptido de prueba de funcionar como un mimético de EPO: es decir, de activar EPO-R e inducir una nueva síntesis de glóbulos rojos. La síntesis de glóbulos rojos se cuantifica basándose en la incorporación de hierro radiomarcado en la hemoglobina de los glóbulos rojos sintetizados.

[0195] Se deja a ratones BDF1 aclimatarse a las condiciones ambientales durante 7-10 días. Se determina el peso corporal de todos los animales, y no se usan animales de bajo peso (<15 gramos). Se somete a los ratones a ciclos de acondicionamiento sucesivos en una cámara hipobárica durante un total de 14 días. Cada ciclo de 24 horas consta de 18 horas a $0,40 \pm 0,02\%$ presión atmosférica y 6 horas a presión ambiental. Tras el acondicionamiento, los ratones se mantienen a presión ambiental durante 72 horas más antes de la dosis.

[0196] Los péptidos de prueba, o estándares de EPO humana recombinante, se diluyen en PBS + vehículo de 0,1% BSA (PBS/BSA). Las soluciones madre de monómeros peptídicos se solubilizan primero en dimetil sulfóxido (DMSO). Los grupos de control negativo incluyen un grupo de ratones a los que solo se les inyecta PBS/BSA, y un grupo al que se le inyecta 1% DMSO. Cada grupo de dosificación contiene 10 ratones. Se inyecta a los ratones por vía subcutánea (pescuezo del cuello) 0,5 mL de la muestra apropiada.

[0197] Cuarenta y ocho horas después de la inyección de la muestra, se administra a los ratones una inyección intraperitoneal de 0,2 ml de Fe^{59} (Dupont, NEN), para una dosis de aproximadamente $0,75 \mu\text{Curies/ratón}$. Se determina el peso corporal de los ratones 24 h después de la administración de Fe^{59} , y se sacrifica a los ratones 48 h después de la administración de Fe^{59} . Se recoge sangre de cada animal mediante punción cardiaca y se

determinan los hematocritos (se utilizó heparina como anticoagulante). Se analiza la incorporación de Fe⁵⁹ de cada muestra de sangre (0,2ml) utilizando un contador gamma Packard. Los ratones sin respuesta (es decir, aquellos ratones con una incorporación radioactiva inferior al grupo de control negativo) se eliminan del grupo de datos apropiado.

- 5 También se eliminan los ratones que tienen valores de hematocrito inferiores al 53% del grupo de control negativo.

[0198] Los resultados se obtienen de grupos de 10 animales para cada dosis experimental. Se calcula la cantidad media de radiactividad incorporada [cuentas por minuto (CPM)] en las muestras de sangre de cada grupo.

10 *2. Ensayo de reticulocitos*

- [0199]** Se administra la dosis (0,5 mL, inyectado por vía subcutánea) a ratones BDF1 normales en tres días consecutivos bien con control de EPO o bien con péptido de prueba. Al tercer día, se administra también a los ratones una dosis (0,1 mL, inyectado por vía intraperitoneal) con hierro dextrano (100 mg/ml). Al quinto día, se anestesia a los ratones con CO₂ y se extrae una muestra de sangre mediante punción cardiaca. Se determina el porcentaje (%) de reticulocitos para cada muestra de sangre mediante tinción con naranja tiazol y análisis de citómetro de flujo (programa retic-count). Los hematocritos se determinan manualmente. El porcentaje de reticulocitos corregido se determina utilizando la siguiente fórmula:

20

$$\%RETIC_{CORREGIDO} = \%RETIC_{OBSERVADO} \times \left(\frac{Hematocrito_{INDIVIDUAL}}{Hematocrito_{NORMAL}} \right)$$

3. Ensayo hematológico

- [0200]** Se administra a ratones CD1 normales cuatro inyecciones en bolo intravenoso semanales de control positivo de EPO, péptido de prueba, o vehículo. Se prueba una variedad de dosis de control positivo y péptido de prueba, expresadas en mg/kg, mediante la variación de la concentración de compuesto activo en la formulación. Los volúmenes inyectados son 5ml/kg. El grupo de control de vehículo comprende doce animales, mientras que hay ocho animales en cada uno de los grupos de dosis restantes. Se registra la viabilidad diaria y el peso corporal semanal.

- [0201]** Los ratones a los que se les administra la dosis son ratones sometidos a ayuno y después anestesiados con isoflurano inhalado y se recogen muestras de sangre terminal mediante punción de la aorta abdominal o cardiaca el Día 1 (para los ratones de control de vehículo) y los Días 15 y 29 (4 ratones/grupo/día). Se traspasa la sangre a tubos de la marca Vacutainer[®]. El anticoagulante preferido es ácido etilendiaminatetraacético (EDTA).

35

[0202] Se evalúan las muestras de sangre para criterios de valoración que miden la síntesis y fisiología de glóbulos rojos como el hematocrito (Hct), hemoglobina (Hgb) y el recuento total de eritrocitos (RBC) utilizando analizadores clínicos automáticos conocidos en la técnica (p.ej., aquellos fabricados por Coulter, Inc.).

- 5 **[0203]** Se aporta información de los péptidos agonistas del EPO-R representativos en este ensayo en la Tabla 4. Los resultados se dan como aumento en porcentaje (%) de hematocrito (Ht), en comparación con los ratones control a los que se inyectó el vehículo, en el día 15 y el día 29. Se administraron los compuestos peptídicos indicados a los ratones de prueba con una dosis de 1 mg/kg.

5 **[0204]** La presente invención no se debe limitar en su alcance por los modos de realización específicos descritos aquí. De hecho, serán evidentes diversas modificaciones de la invención, además de aquellas descritas aquí, para aquellos con experiencia en la técnica de la descripción que antecede y las figuras que la acompañan. Dichas modificaciones deben recaer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

[0205] Además, se entenderá que todos los valores son aproximados, y se proporcionan para la descripción.

10 **[0206]** Se citan y analizan numerosas referencias, incluyendo patentes, solicitudes de patentes y diversas publicaciones en la descripción de esta invención. La cita y/o análisis de dichas referencias se aporta simplemente para aclarar la descripción de la presente invención y no es una admisión de que dichas referencias sean "técnica precedente" de la presente invención".

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de 17 a 40 residuos de aminoácidos de longitud y comprendiendo la secuencia de aminoácidos:

5 LYACHX₀GPITX₁VCQPLR (SEQ ID NO: 1),

en la que X₀ es un residuo seleccionado entre metionina (M) y homoserina metiléter (Hsm), y X₁ es un residuo seleccionado entre triptófano (W), 1-naftilalanina (1-nal), y 2-naftilalanina (2-nal), donde dicho péptido se une a y activa el receptor de eritropoyetina (EPO-R).

2. Un péptido según la reivindicación 1, en el que el extremo N-terminal de dicho péptido está acetilado.

3. Un péptido según la reivindicación 1 o reivindicación 2, comprendiendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos elegida entre:

15

LYACHMGPITWVCQPLR	(SEQ ID NO: 2);
LYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR	(SEQ ID NO: 3);
LYACHMGPIT(2-nal)VCQPLR	(SEQ ID NO: 4);
GGLYACHMGPITWVCQPLRG	(SEQ ID NO: 5);
GGLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 6);
20 GGLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 7);
(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG	(SEQ ID NO: 8);
(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 9);
(AcG)GLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 10);
GGLYACHMGPITWVCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 11);
GGLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 12);
25 GGLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 13);
(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 14);
(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 15);
(AcG)GLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 16);
LYACH(Hsm)GPITWVCQPLR	(SEQ ID NO: 17);
LYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR	(SEQ ID NO: 18);
LYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR	(SEQ ID NO: 19);
GGLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG	(SEQ ID NO: 20);
GGLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 21);
GGLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 22);
35 (AcG)GLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG	(SEQ ID NO: 23);

(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 24);
(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 25);
GGLYACH(Hsm)GPITWVCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 26);
GGLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 27);
GGLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 28);
(AcG)GLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 29);
(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 30); y
(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 31).

5

10

4. Un péptido según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, en el que el péptido es un monómero.
5. Un péptido según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, comprendiendo además uno o más polímeros solubles en agua unidos covalentemente al péptido.
- 15 6. Un péptido según la reivindicación 5, en el que el polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG).
7. Un péptido según la reivindicación 6, en el que dicho PEG comprende una molécula lineal no ramificada que tiene un peso molecular de 500 a 60.000 Daltons.
8. Un péptido según la reivindicación 7, en el que el PEG tiene un peso molecular de
20 menos de 20.000 Daltons.
9. Un péptido según la reivindicación 7, en el que el PEG tiene un peso molecular de 20.000 a 60.000 Daltons.
10. Un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 6-7 y 9, en el que el PEG tiene un peso molecular de 20.000 a 40.000 Daltons.
- 25 11. Un péptido según la reivindicación 7, en el que dos fracciones de PEG están unidas de forma covalente al péptido, comprendiendo cada uno de dichos PEG una molécula lineal no ramificada.
12. Un péptido según la reivindicación 11, en el que cada uno de dichos PEG tiene un peso molecular de 20.000 a 30.000 Daltons.
- 30 13. Un dímero peptídico que comprende dos monómeros, siendo los dos de dichos monómeros un péptido según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3 y de la 5 a la 12.
14. Un dímero peptídico según la reivindicación 13, en el que el péptido es un homodímero.
15. Un dímero peptídico según la reivindicación 13, que comprende:
- 35 (a) una primera cadena peptídica;
- (b) una segunda cadena peptídica; y

(c) una fracción de enlace que conecta dicha primera y segunda cadena peptídica, donde tanto dicha primera cadena peptídica como dicha segunda cadena peptídica son péptidos según la reivindicación 1.

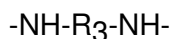
5 **16.** Un dímero peptídico según la reivindicación 15, en el que al menos una de dichas primera cadena peptídica y segunda cadena peptídica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

	LYACHMGPITWVCQPLR	(SEQ ID NO: 2);
	LYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR	(SEQ ID NO: 3);
10	LYACHMGPIT(2-nal)VCQPLR	(SEQ ID NO: 4);
	GGLYACHMGPITWVCQPLRG	(SEQ ID NO: 5);
	GGLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 6);
	GGLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 7);
	(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG	(SEQ ID NO: 8);
	(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 9);
15	(AcG)GLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 10);
	GGLYACHMGPITWVCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 11);
	GGLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 12);
	GGLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 13);
	(AcG)GLYACHMGPITWVCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 14);
	(AcG)GLYACHMGPIT(1-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 15);
20	(AcG)GLYACHMGPIT(2-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 16);
	LYACH(Hsm)GPITWVCQPLR	(SEQ ID NO: 17);
	LYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLR	(SEQ ID NO: 18);
	LYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR	(SEQ ID NO: 19);
	GGLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG	(SEQ ID NO: 20);
25	GGLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 21);
	GGLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 22);
	(AcG)GLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG	(SEQ ID NO: 23);
	(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 24);
	(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLRG	(SEQ ID NO: 25);
	GGLYACH(Hsm)GPITWVCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 26);
30	GGLYACH(Hsm)GPTT(1-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 27);
	GGLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLR(MeG)	(SEQ ID NO: 28);
	(AcG)GLYACH(Hsm)GPITWVCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 29); -
	(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(1-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 30); y
	(AcG)GLYACH(Hsm)GPIT(2-nal)VCQPLRG(MeG)	(SEQ ID NO: 31).

35

17. Un dímero peptídico según la reivindicación 15, en el que la fracción de enlace

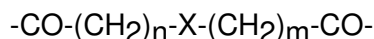
comprende la fórmula:



donde R_3 es un alquileo C_{1-6} .

5 **18.** Un dímero peptídico según la reivindicación 17, en el que la fracción de enlace es un residuo de lisina.

19. Un dímero peptídico según la reivindicación 15, en el que la fracción de enlace comprende la fórmula:



10 donde n es un entero de 0 a 10, m es un entero de 1 a 10, X se elige entre O, S, $\text{N}(\text{CH}_2)_p\text{NR}_1$, $\text{NCO}(\text{CH}_2)_p\text{NR}_1$, y CHNR_1 , R_1 se elige entre H, Boc y Cbz, y p es un entero de 1 a 10.

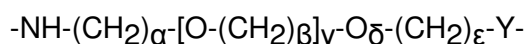
20. Un dímero peptídico según la reivindicación 19, en el que n y m son cada uno 1, X es $\text{NCO}(\text{CH}_2)_p\text{NR}_1$, p es 2, y R_1 es H.

15 **21.** Un dímero peptídico según la reivindicación 15, que comprende además un polímero soluble en agua.

22. Un dímero peptídico según la reivindicación 21, en el que el polímero soluble en agua está unido de forma covalente a la fracción de enlace.

23. Un dímero peptídico según la reivindicación 15, que comprende además una fracción espaciadora.

20 **24.** Un dímero peptídico según la reivindicación 23, en el que la fracción espaciadora comprende la fórmula:



25 donde α , β , y ε son todos enteros cuyos valores se eligen de forma independiente de 1 a 6, δ es 0 ó 1, γ es un entero seleccionado de 0 a 10, e Y se selecciona de NH o CO, siempre que β sea 2 cuando γ sea mayor de 1.

25. Un dímero peptídico según la reivindicación 24 en el que cada uno de α , β , y ε es 2, cada uno de γ y δ es 1, e Y es NH.

26. Un dímero peptídico según la reivindicación 23, que comprende además uno o más polímeros solubles en agua.

30 **27.** Un dímero peptídico según la reivindicación 26, en el que el polímero soluble en agua está unido de forma covalente a la fracción espaciadora.

28. Un dímero peptídico según la reivindicación 21 ó 26, en el que el polímero soluble en agua es polietilenglicol (PEG).

35 **29.** Un dímero peptídico según la reivindicación 28, en el que el PEG es un PEG lineal no ramificado que tiene un peso molecular de 500 a 60.000 Daltons.

30. Un dímero peptídico según la reivindicación 28 ó 29, en el que el PEG tiene un peso molecular de 500 a menos de 20.000 Daltons.
31. Un dímero peptídico según la reivindicación 28 ó 29, en el que el PEG tiene un peso molecular de 20.000 a 60.000 Daltons.
- 5 32. Un dímero peptídico según la reivindicación 28, 29 ó 31, en el que el PEG tiene un peso molecular de 20.000 a 40.000 Daltons.
33. Un dímero peptídico según la reivindicación 28, en el que dos fracciones de PEG están unidas de forma covalente al péptido, comprendiendo cada uno de dichos PEG una molécula lineal no ramificada.
- 10 34. Un dímero peptídico según la reivindicación 33, en el que cada uno de dichos PEG tiene un peso molecular de 20.000 a 30.000 Daltons.
35. Un péptido o dímero peptídico según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 34 para su uso en el tratamiento de un trastorno **caracterizado por** una deficiencia de eritropoyetina o por una población de glóbulos rojos baja o deficiente.
- 15 36. Un péptido o dímero peptídico para su uso según la reivindicación 35, en el que el trastorno se selecciona entre el grupo compuesto por: diálisis o insuficiencia renal en fase terminal; anemia asociada al SIDA; enfermedades autoinmunes o una malignidad; beta talasemia; fibrosis cística; anemia de la premadurez temprana; anemia asociada con enfermedades inflamatorias crónicas; lesión de la médula espinal; pérdida de sangre aguda;
- 20 envejecimiento; y estados de enfermedad neoplásicos acompañados por eritropoyesis anormal.
37. Una composición farmacéutica que comprende:
- (i) un péptido o dímero peptídico según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 34; y
- 25 (ii) un portador farmacéuticamente aceptable.