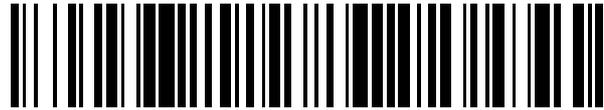


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 035**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

**A61P 25/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2006 E 06793581 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 1940447**

54 Título: **Tratamiento de trastornos neurodegenerativos**

30 Prioridad:

**28.09.2005 EP 05108946**

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

**27.02.2014**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
GRENZACHERSTRASSE 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**HASELBECK, ANTON;  
HERTING, FRANK;  
HUWYLER, JOERG y  
JARSCH, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 445 035 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

Tratamiento de trastornos neurodegenerativos

5 La presente invención se refiere a un método para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos del cerebro y de la médula espinal utilizando un nuevo agente eritropoyético (NAE).

La biodisponibilidad de proteínas terapéuticas comercialmente disponibles como la eritropoyetina humana (EPO) es limitada, tanto por la reducida vida media en plasma como por la susceptibilidad a la degradación por proteasas. Estas carencias evitan que éstas alcancen su máximo potencial clínico. Se han desarrollado agentes eritropoyéticos mediante modificación química de la EPO y análogos de la misma. Estos nuevos agentes proporcionan una actividad eritropoyética potente y prolongada que permite un control óptimo de la anemia en pacientes con enfermedad renal y en SIDA, y en pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia.

15 La presente invención se refiere a un método para tratar trastornos neurodegenerativos del cerebro y de la médula espinal mediante la administración a un paciente que necesite dicha terapia de una cantidad terapéuticamente efectiva de un nuevo agente eritropoyético (NAE), que es una eritropoyetina humana químicamente modificada o un análogo de eritropoyetina humana químicamente modificado que comprende grupos polietilenglicol covalentemente integrados con un peso molecular y estructura de unión concretos.

20 Descripción de las Figuras:

La Figura 1 muestra la concentración de EPO y un NAE de la invención en el suero de las ratas, 2 y 6 horas tras la inyección.

25 La Figura 2 muestra la concentración de EPO y un NAE de la invención en el líquido cefalorraquídeo de las ratas, 2 y 6 horas tras la inyección.

30 La Figura 3 muestra la concentración de EPO y un NAE de la invención en el líquido cefalorraquídeo de las ratas así como en el suero de las ratas, 2 y 6 horas tras la inyección.

Específicamente, los NAE utilizados en esta invención son moléculas eritropoyéticas químicamente modificadas, preferiblemente con al menos un grupo amino libre, y que comprenden una porción eritropoyetina seleccionada de entre el grupo que consiste en eritropoyetina humana y análogos de la misma, que tienen la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por la adición de alrededor de 1 a 6 sitios de glicosilación o una reorganización de al menos un sitio de glicosilación; y dicha porción de eritropoyetina está covalentemente unida a "n" grupos polietilenglicol de la fórmula  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$  con el  $-\text{CO}$  (es decir, carbonilo) de cada grupo polietilenglicol formando un enlace amida con uno de los dichos grupos amino; en los que R es alquilo inferior; x es 2 o 3; m es de alrededor de 450 a alrededor de 900; n es de 1 a 3; y n y m se escogen de tal forma que el peso molecular del NAE resultante sustrayéndose el peso molecular de la porción de eritropoyetina no modificada, sea de alrededor de 20 kilodaltons a alrededor de 100 kilodaltons. Tales NAE están descritos, por ejemplo, en la Pat. US No. 6.583.272, que está incorporada aquí como referencia en la extensión necesaria.

45 Los NAE útiles en esta invención son bioquímicamente y funcionalmente distintos de la EPO. Los datos in vivo e in vitro unidos, indican que estos NAE presentan una afinidad de unión sustancialmente menor al receptor de EPO y se disocian más rápidamente, comparado con la EPO. En comparación con la eritropoyetina humana (hEPO), estos NAE presentan distintas propiedades clínicas ventajosas, lo que incluye un aumento en la vida media en circulación y el tiempo de residencia en plasma, una disminución del aclaramiento, y un aumento de la actividad clínica in vivo.

50 Alguna de las observaciones anteriores en relación a las propiedades diferentes de los NAE de la invención posiblemente pueden explicarse por un nuevo modo de acción. La rápida disociación del receptor de la eritropoyetina ("EPO-R") junto con una vida media en suero más larga, pueden resultar en un efecto eritropoyético potenciado y sostenido mediante interacciones múltiples con el receptor. Por razones estéricas, éstas interacciones múltiples pueden ser suficientes para inducir la cascada de señalización del EPO-R pero no son lo suficientemente potentes como para resultar en una unión fuerte en la que el complejo receptor/molécula se internalice y se degrade. Estadísticamente, solo un cierto porcentaje de las moléculas pueden generar una unión de esa potencia. En resumen, este modo de acción conduciría a que una molécula activara más de un receptor antes de ser degradada.

60 Es importante que las propiedades ventajosas de estos NAE permiten una menor frecuencia de administración y un control más estable de la hemoglobina, permitiendo un control óptimo de la anemia en pacientes con enfermedad renal y en pacientes con SIDA o cáncer sometidos a quimioterapia. Estas ventajas se espera que produzcan una mejora de los resultados del tratamiento, así como una mejora en la calidad de vida del paciente.

65 La eritropoyetina humana natural (hEPO) se produce en diferentes tejidos del cuerpo (por ejemplo los riñones, cerebro, etc.) y es el factor humoral del plasma que inter alia estimula la producción de glóbulos rojos (Carnot P., y Deflandre C., (1906) C.R. Acad. Sci. 143: 432; Erslev, AJ (1953 Blood 8: 349; Reissmann, KR (1950) Blood 5: 372;

Jacobson, LO, Goldwasser, E, Freid, W y Plzak, LF (1957) *Nature* 179: 6331-4). La EPO natural estimula la división y diferenciación de los progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea y ejerce su actividad biológica uniéndose a los receptores de los precursores eritroides (Krantz, BS (1991) *Blood* 77: 419).

5 Además del uso de la EPO para tratar la anemia, recientemente se ha postulado que esta molécula puede tener efectos neuroprotectores y miocardioprotectores. Véase el artículo de revisión de W. Jelkmann y K. Wagner, *Ann. Hematol* 83:673-686 (2004).

10 Esta invención proporciona el uso de los NAE de la invención para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos del cerebro y de la médula espinal introduciendo el NAE en el torrente sanguíneo. Esta invención está basada en los hallazgos de que pese a su relativo gran tamaño, los NAE de esta invención también pueden cruzar la barrera hematoencefálica y utilizarse como agentes neuroprotectores de las neuronas que se encuentran en el cerebro y la médula espinal. Se espera que las propiedades clínicas superiores y diferentes que estos NAE presentan en otras situaciones, como se ha descrito anteriormente, también resulte en una ventaja terapéutica sustancial cuando éstos se utilizan para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, comparado con la terapia con EPO.

15 La eritropoyetina se ha elaborado de forma biosintética utilizando tecnología de DNA recombinante (Egrie, JC, Strickland, TW, Lane, J et al. (1986) *Immunobiol.* 72: 213-224) y es el producto de un gen de EPO humana clonado, insertado y expresado en células de tejido de ovario de hámster Chino (células CHO). La estructura primaria de la forma predominante, completamente procesada de la hEPO se ilustra en el ID DE SEC N°:1. Existen dos puentes disulfuro entre las Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>161</sup> y las Cys<sup>29</sup>-Cys<sup>33</sup>. El peso molecular de la cadena polipeptídica de la EPO sin las porciones de azúcar es de 18.236 Da. En la molécula de EPO intacta, aproximadamente el 40% del peso molecular se adjudica a los grupos carbohidrato que glicosilan la proteína en los sitios de glicosilación de la proteína (Sasaki, H, Bothner, B, Dell, A y Fukuda, M (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 12059).

20 El término "eritropoyetina" o "EPO" se refiere a una proteína glicosilada, con la secuencia de aminoácidos expuesta en el (ID DE SEC N°: 1) o (ID DE SEC N°: 2) o una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a ésta, cuyas propiedades biológicas pueden relacionarse con la estimulación de la producción de glóbulos rojos y la estimulación de la división y diferenciación de los progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea. Además, "eritropoyetina" se refiere a una proteína glicosilada que muestra al menos una de las propiedades biológicas o afinidades de unión conocidas en la actualidad. Por tanto, están comprendidas las moléculas que sólo muestran efectos neuroprotectores. Tal como se usa aquí, estos términos incluyen aquellas proteínas modificadas deliberadamente, como por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida o accidentalmente a través de mutaciones. Estos términos también incluyen análogos que tienen de 1 a 6 sitios adicionales para la glicosilación, análogos con al menos un aminoácido adicional en el extremo carboxiterminal de la glicoproteína, en los que el aminoácido adicional incluye al menos un sitio de glicosilación, y los análogos con una secuencia de aminoácidos que incluye una reordenación de al menos un sitio de glicosilación. Estos términos incluyen tanto la eritropoyetina humana natural como la recombinante.

30 La EPO se une a receptores transmembrana específicos (EPO-R). El EPO-R humano funcional es un miembro de la superfamilia de receptores de clase I de citoquinas y se presenta como un homodímero de dos cadenas idénticas de glicoproteína de 484 aminoácidos. Cada cadena comprende un dominio extracelular, una secuencia transmembrana hidrofóbica, y un dominio citoplasmático al que se une la proteína tirosina quinasa JAK2. La EPO no modificada se une a las subunidades del receptor, difiriendo enormemente las constantes de disociación para los dos sitios de unión. La unión de EPO con el receptor da lugar a un cambio conformacional y una conexión más fuerte de las dos subunidades de EPO-R, lo que conduce a una autofosforilación de las dos moléculas de JAK y resulta en una compleja cascada de señalización. Se ha demostrado que la ruta de señalización inducida por EPO retorna a niveles cerca de los basales tras 30-60 min de estimulación. El efecto de la EPO finaliza por acción de la fosfatasa de la célula hematopoyética (HCP) que provoca la internalización y degradación del complejo EPO/EPO-R.

35 Recientemente se ha demostrado que la EPO es un factor de crecimiento y supervivencia más pleotrópico de lo que inicialmente se pensaba. Se cree que la EPO posee una función neurotrófica y neuroprotectora (Cerami A et al. (2002) *Nephrol. Dial. Transplant.* 17: 8-12; Chong, ZZ et al. (2003) *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 3: 141-154; Jumbe, NL (2002) *Oncology* 16: 91-107; Marti, HH et al. (2000) *News Physiol. Sci.* 15: 225-229), vascular (Masuda, S et al. (1999) *Int. J. Hematol.* 70: 1-6; Smith, KJ et al. (2003) *Cardiovasc. Res.* 59: 538-548), y cardioprotectora (Smith, KJ et al. (2003) *Cardiovasc. Res.* 59: 538-548; Parsa, CJ et al. (2003) *J. Clin. Invest.* 112: 999-1007). Se ha observado que el EPO-R está presente en diferentes áreas del cerebro en roedores y mamíferos (Digicaylioglu, M et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3717-3720; Li, Y et al. (1996) *Pediatr. Res.* 40: 376-380; Marti, HH et al. (1996) *Eur. J. Neurosci.* 8: 666-676). Los sitios de unión de la EPO se localizan principalmente en el hipocampo, la cápsula interna, el córtex, y el cerebro medio de ratones (Digicaylioglu, M et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3717-3720). Además se sabe que la EPO estimula la proliferación y diferenciación de las células madre y progenitoras neuronales (Shingo, T et al. (2001) *J. Neurosci.* 21: 9733-9743; Studer, L et al. (2000) *J. Neurosci.* 20: 7377-7383).

65 El efecto neuroprotector de la EPO puede llegar a relacionarse con la importancia primordial de la ruta PI-3K/Akt en la acción neuroprotectora de la EPO al mantener el potencial de la membrana mitocondrial en cultivos primarios

anóxicos de células neuronales del hipocampo (Chong, ZZ et al. (2003) *Circulation* 106: 2973-2979). La desestabilización del potencial de membrana de la mitocondria conduce a la liberación de citocromo C, que activa las caspasas 8, 1 y 3, que promueven la fragmentación del DNA.

5 El efecto neuroprotector in vivo de la EPO en el cerebro lo observó por primera vez el grupo de Sasaki en 1998 (Sadamoto, Y et al. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 26-32; Sakanak, M et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4635-4640) trabajando con gerbos de Mongolia. Se mostró que la infusión de EPO en los ventrículos laterales evita la discapacidad de aprendizaje inducida por isquemia y rescata las neuronas CA1 del hipocampo de la muerte. Unos experimentos similares con ratas han mostrado una reducción de la discapacidad de orientación de lugar inducida por isquemia, infarto cortical, y degeneración talámica (Sadamoto, Y et al. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 26-32). Además, el conocido efecto protector del preconditionamiento hipóxico se reduce significativamente en ratones cuando se bloquea localmente la señalización de la EPO mediante infusión de EPO-R soluble en el ventrículo cerebral (Prass, K et al. (2003) *Stroke* 34: 1981-1986).

15 Anteriormente se había asumido que la EPO administrada sistémicamente no penetraría en el cerebro debido a la barrera hematoencefálica (Junk, AK et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 10659-10664; Juul, SE et al. (1999) *Pediatr. Res.* 46: 543-547). La barrera hematoencefálica (BHE) separa el cerebro así como el fluido cerebroespinal (líquido cefalorraquídeo, LCR) de la sangre y regula el intercambio de sustancias entre la sangre y el cerebro. Tal como se usa aquí, el término "BHE" comprende la barrera hematoencefálica así como la barrera hemato-LCR. Está comprendida principalmente de capilares cerebrales, el epitelio cúbico del plexo coroideo y la membrana aracnoidea. Todos los puntos de la BHE se caracterizan por la presencia de uniones estrechas entre células contiguas, la ausencia de poros endoteliales, y la escasez de vesículas pinocíticas. Además, los capilares del cerebro tienen un aumento en la densidad numérica de mitocondrias endoteliales de varias veces comparado con los capilares de otras regiones del cuerpo. Las células que constituyen la BHE funcionan efectivamente como una capa celular continua, permitiendo el intercambio de solutos principalmente solo por la ruta transcelular. Así, los solutos solubles en lípidos penetran fácilmente la BHE mientras que los electrolitos, los no electrolitos insolubles en lípidos, y las proteínas entran en el cerebro desde la sangre más lentamente de lo que lo hacen en los tejidos no nerviosos. El funcionamiento de esta barrera ayuda a proteger al cerebro de sustancias dañinas.

30 Existen cuatro mecanismos básicos mediante los cuales las moléculas solubles se mueven a través de las membranas. (1) difusión simple, (2) difusión facilitada, (3) difusión simple a través de un canal acuoso, y (4) transporte activado mediante un transportador proteico. La difusión paracelular no sucede en gran medida en la BHE, debido a las uniones estrechas. En el caso de la difusión transcelular, la regla general es que cuanto mayor sea la lipofiliidad de una sustancia, mayor la difusión hacia el cerebro. La glucosa, el alcohol y otras moléculas pequeñas entran en el cerebro mediante difusión. La mayoría de las proteínas necesitan normalmente utilizar un transporte activado.

La barrera hematoencefálica puede "abrirse" mediante ciertas soluciones como la inyección intra-arterial de manitol hipertónico. Se cree que el manitol abre la barrera hematoencefálica mediante la osmosis al retraerse las células endoteliales.

45 El LCR está situado en los ventrículos, el canal espinal, y los espacios subaracnoideos. La principal fuente de LCR son los plexos coroideos de los ventrículos laterales tercero y cuarto, y el volumen varía entre el 10 y el 20% del peso del cerebro. El volumen de LCR en humanos es de 140-150 ml con un recambio de 5 h en humanos (1 h en ratas). El LCR se mueve dentro de los ventrículos y los espacios subaracnoideos por la influencia de la presión hidrostática generada en su producción. El LCF protege el cerebro de impactos, regula el fluido extracelular del cerebro, permite la distribución de sustancias neuroactivas, y es el sumidero que recoge los productos de desecho producidos por el cerebro.

50 Jumbe (Jumbe NL (2002) *Oncology* 16: 91-107) ha demostrado que la proporción entre la concentración en líquido cefalorraquídeo respecto en suero en ratas a las que se había administrado por vía intravenosa EPO humana recombinante (500 U/kg), fue de alrededor de  $1 \times 10^{-3}$ . Algo similar se observa tras la administración de 25 µg/kg de darbepoyetina alfa. El área bajo la curva de concentración-tiempo ( $AUC_{0-8}$ ) media calculada mediante análisis no compartimental, fue de 340 mU h/ml para la EPO recombinante humana (rhEPO) y 3,6 ng h/ml para la darbepoyetina alfa en líquido cefalorraquídeo frente a las 370.000 mU h/ml y 4500 ng h/ml en suero, respectivamente.

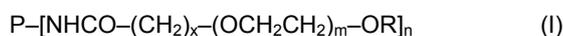
60 Respecto a los experimentos de infarto cerebral, se ha demostrado que la administración sistémica de altas dosis de rhEPO a los animales de ensayo, reduce el volumen de infarto 24 h tras la oclusión de la arteria cerebral media (Siren, AL et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4044-4049), reduce la tasa de mortalidad (Buemi, M et al. (2000) *Eur. J. Pharmacol.* 392: 31-34), evita el daño neuronal (Alafaci, C et al. (2000) *Eur. J. Pharmacol.* 406: 219-225), aumenta el flujo sanguíneo cerebral (Grasso, G (2001) *J. Neurosurg. Sci.* 45: 7-14), y reduce las deficiencias neurológicas (Grasso, G et al. (2002) *J. Neurosurg.* 96: 565-570). La EPO además evita la apoptosis de las neuronas motoras y la discapacidad neurológica (Cerami, A et al. (2002) *Nephrol. Dial. Transplant* 17: 8-12), mejora la recuperación de la función motora (Gorio, A et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9450-9455), y reduce la reacción inflamatoria en el cerebro hipóxico (Villa, P et al. (2003) *J. Exp. Med.* 198: 971-975).

- Además, actualmente se está considerando la utilización de eritropoyetina en la Esclerosis Múltiple (EM). La EM es una enfermedad inflamatoria del Sistema Nervioso Central (SNC), que está formado por el cerebro y la médula espinal. En las personas afectadas por EM aparecen zonas de lesión, denominadas placas o lesiones, en áreas aparentemente aleatorias de la materia blanca del SNC. En el lugar de la lesión, se pierde un material aislante de los nervios llamado mielina, probablemente durante una inflamación autoinmune. El recubrimiento de mielina se desprende de los axones en un proceso conocido como desmielinización. El recubrimiento de mielina se forma en el SNC por ciertas partes de los oligodendrocitos. En la actualidad aún no está clara la causa de la EM. Se han propuesto diferentes teorías, por ejemplo la autoinmunidad, mediación de un patógeno, componentes genéticos, eventos bioquímicos in utero, daño de la barrera hematoencefálica, deficiencias en la dieta y vitamínicas, reacción alérgica y otros. Además, es discutido si la inflamación también daña la membrana axónica. Hasta el momento no existe tratamiento curativo disponible para la EM. No obstante, se pueden utilizar varios medicamentos para tratar los síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, se pueden administrar corticosteroides, varios fármacos inmunosupresores e interferón beta.
- 15 Diem et al. (Brain (2005), 128: 375-85) describe un tratamiento de esteroides combinado con la aplicación de EPO para abordar los aspectos inflamatorios así como los neurodegenerativos. Así, la metilprednisolona y la eritropoyetina se utilizan con éxito como terapia combinada en un modelo de EM.
- 20 Los experimentos en humanos realizados por Ehrenreich et al. (Ehrenreich, H et al. (2002) Mol. Med. 8: 495-505) en pacientes con infarto cerebral, mostraron que existe una fuerte tendencia a la reducción del tamaño del infarto en los pacientes tratados con rhEPO asociado con una recuperación neurológica marcada y resultados clínicos 1 mes después del infarto cerebral. Los pacientes recibieron rhEPO por vía intravenosa ( $3,3 \times 10^4$  U) una vez al día durante los primeros días tras el infarto. La concentración media de EPO en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes aumentó a 17 U/l (el valor normal es de alrededor de 1 U/l). Los niveles en suero de los pacientes se aproximó a 5.000 U/l 3 h tras la infusión (los niveles normales en suero son de alrededor de 15 U/l). Además, la EPO puede también utilizarse con éxito para reducir los daños por reperfusión de la región cercana al infarto cerebral agudo.
- 25 Se sabe que la EPO y el EPO-R se expresan en el tejido cerebral humano y de los roedores (Sirén AL et al. (2001) Acta Neuropathologica 101: 271-276), se inducen por hipoxia (Jelkmann, W (1994) Clin. Investig. 72: 3-10), y han mostrado un potencial neuroprotector notable (Bernaudin, M et al. (1999) J. Cereb. Blood Flow Metab. 19: 643-651; Genc, S et al. (2001) Neurosci. Lett. 298: 139-141). En el cerebro humano adulto, sólo se ha detectado una expresión débil de EPO y su receptor en neuronas y astrocitos (Sirén AL et al. (2001) Acta Neuropathologica 101: 271-276). A pesar de esto, se ha detectado en cerebros humanos, tras una isquemia y/o hipoxia, la presencia de EPO en tejido vascular y células inflamatorias, y de EPO-R en los vasos sanguíneos y en procesos neuronales y astrocíticos en el interior de la zona del infarto y del peri-infarto. En los infartos isquémicos más viejos, la EPO y el EPO-R eran más abundantes en la glía reactiva. El efecto neto de la estimulación del EPO-R en la célula diana es la proliferación, inhibición de la apoptosis y, en el caso de los eritroblastos, la diferenciación.
- 30 Se ha asumido que la BHE excluye de forma efectiva las moléculas glicosiladas grandes como la EPO. Aunque en la visión clásica de la BHE se considera que ésta es impermeable a las moléculas grandes, estudios han mostrado que algunas moléculas grandes pueden transportarse específicamente hacia el cerebro a través del endotelio capilar, afectando la función del cerebro. Esto tiene lugar mediante una unión a receptores que están presentes en la superficie luminal de las células endoteliales. Esto inicia la endocitosis, seguido de la translocación a través de la BHE. Como el EPO-R se expresa en los capilares del cerebro, se asume que el transporte de la EPO a través de la BHE funciona mediante este transporte mediado por receptor.
- 35 Es notable el hecho de que las concentraciones de EPO en suero necesarias para la protección de tejido son mayores que las necesarias para la eritropoyesis. Una razón para ello es que el receptor para la protección tisular, presenta una afinidad menor (aproximadamente 1000 veces) en comparación con los progenitores eritroides (Masuda, S et al. (1993) J. Biol. Chem. 268: 11208-11216). Otra razón puede ser la presencia de la BHE. Los datos preclínicos sugieren que el nivel terapéutico mínimo necesario de EPO para la protección del daño tisular es del orden de 300-500 ml U/kg de peso corporal. Las unidades de EPO se definen como la cantidad de EPO que induce la misma reacción eritropoyética en ratas que 15  $\mu$ mol de  $\text{CoCl}_2$  (cloruro de cobalto). Brevemente, se conoce por lo tanto que la EPO posee un efecto neuroprotector sobre las neuronas del cerebro y de la médula espinal. No obstante, el uso potencial de la EPO para esta terapia está limitado por la necesidad de los niveles terapéuticos sustancialmente altos que son necesarios para alcanzar tal efecto. Sería preferible un nuevo Factor Estimulante de la Eritropoyesis (FEE) con una vida media mejorada y que atravesase la BHE, especialmente si tal FEE puede administrarse en una concentración inicial relativamente baja en el torrente sanguíneo para evitar los efectos secundarios negativos.
- 40 El documento WO 02/49673 se refiere a métodos y compuestos para proteger o mejorar la función de tejido excitable en mamíferos mediante la administración sistémica de un modulador receptor de eritropoyetina, tal como eritropoyetina, que señala vía un receptor activado por EPO modular la función de tejido excitable.
- 45 El documento EP 1525889 se refiere a una composición farmacéutica líquida que comprende una proteína de eritropoyetina, un anión inorgánico de carga múltiple en un tampón farmacéuticamente aceptable para mantener el

pH en solución en el rango de alrededor de 5,5 a alrededor de 7,0, y opcionalmente uno o mas excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los problemas actuales en la materia se resuelven utilizando un NAE de la invención que comprende grupos polietilenglicol covalentemente integrados con un peso molecular concreto y una estructura de unión como se ilustra en las reivindicaciones anexas. En particular, este NAE se utiliza para la producción de un medicamento para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos del cerebro y de la médula espinal mediante la introducción del medicamento en el torrente sanguíneo. En una realización preferida dicho NAE es una molécula eritropoyética químicamente modificada con al menos un grupo amino libre y que comprende una porción de eritropoyetina seleccionada de entre el grupo que consiste en la eritropoyetina humana y los análogos de la misma que poseen la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por la adición de entre 1 y 6 sitios de glicosilación o una reorganización de al menos un sitio de glicosilación; estando dicha porción de eritropoyetina covalentemente unida a "n" grupos polietilenglicol con la fórmula  $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ , con el  $-\text{CO}$  (es decir, carbonilo) de cada grupo polietilenglicol formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino; en la que R es alquilo inferior; x es 2 o 3; m está entre alrededor de 450 y alrededor de 900; n es de 1 a 3; y n y m se escogen de tal forma que el peso molecular del NAE resultante sustrayéndose el peso molecular de la glicoproteína de eritropoyetina no modificada, sea de alrededor de 20 kilodaltons a alrededor de 100 kilodaltons.

Preferiblemente, el NAE es de fórmula:



en la que x, m, n y R son como se define en la reivindicación 1, y P es el residuo de la porción de eritropoyetina sin el(los) n grupo(s) amino que forman enlaces amida con el(los) grupo(s) polietilenglicol. En la forma anteriormente descrita, R es más preferiblemente metilo, m está entre alrededor de 650 y alrededor de 750, y n es 1.

Más preferiblemente, el NAE utilizado en el método de la invención posee la fórmula



en la que m está entre 650 y 750, n es 1 y P es el residuo de una porción de eritropoyetina .

Preferiblemente la porción de eritropoyetina es una glicoproteína eritropoyetina humana, que puede expresarse mediante activación génica endógena, y que posee la secuencia de aminoácidos ID DE SEC N°:1.

Alternativamente la porción de eritropoyetina posee la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por la adición de alrededor de 1 a 6 sitios de glicosilación.

En otra realización preferida, los trastornos neurodegenerativos del cerebro y de la médula espinal tratables con el método de la invención están relacionados con un evento agudo seleccionado de entre un infarto cerebral, LCT (Lesión Cerebral Traumática) o lesión de la médula espinal. Además, los trastornos neurodegenerativos del cerebro y de la médula espinal pueden estar relacionados con un tratamiento crónico que comprende el infarto cerebral, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, demencia, FXTAS (síndrome de temblor/ataxia asociado al frágil X), enfermedad de Parkinson, encefalopatía espongiiforme, esclerosis múltiple, y neurodegeneración asociada con infecciones bacterianas o virales.

En el presente método, el NAE se administra en una cantidad suficiente para tratar o aliviar los trastornos neurodegenerativos (una "cantidad terapéuticamente efectiva"). El NAE puede administrarse a los pacientes mediante los métodos convencionales utilizados para la terapia con EPO. La cantidad exacta de NAE depende del tipo exacto de condición a tratar, la condición del paciente a tratar, así como de otros ingredientes en la composición. La cantidad en  $\mu\text{g}$  está relacionada sólo con la respectiva porción de eritropoyetina (es decir de proteína). Preferiblemente, a un paciente se le administra entre alrededor de 0,1 y alrededor de 100  $\mu\text{g}$  por kg de peso corporal de un FEE de la invención, preferiblemente entre alrededor de 1 y alrededor de 10  $\mu\text{g}$  por kg de peso corporal una vez a la semana.

Si es necesario, el NAE puede administrarse más frecuentemente. No obstante, el NAE utilizado de acuerdo con la invención puede también administrarse cada dos semanas, cada tres semanas o una vez al mes o incluso en intervalos de tiempo más largos, dependiendo de la enfermedad a tratar y del tipo de administración. Las composiciones farmacéuticas que contienen el conjugado pueden formularse con una potencia efectiva para su administración mediante varios medios a un paciente humano que sufre trastornos neurodegenerativos caracterizados por la muerte de neuronas. La cantidad media terapéuticamente efectiva del conjugado puede variar, y en particular deberán basarse en las recomendaciones y prescripción de un médico cualificado.

La actividad específica de los NAE de acuerdo con esta invención puede determinarse mediante varios ensayos conocidos en la materia. La actividad biológica del NAE purificado de esta invención es tal que la administración del

NAE, por ejemplo, mediante inyección, a pacientes humanos resulta en la protección de las neuronas del cerebro y de la médula espinal.

Las preparaciones farmacéuticas de la invención incluyen composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección que están formuladas con un transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable. La preparación de tales composiciones farmacéuticas es conocido en la materia. Véase, por ejemplo, la patente US 2002/0037841 A1 (correspondiente a WO 01/87329), cuya Publicación US se incorpora aquí como referencia. Los transportadores farmacéuticamente aceptables para la formulación de los productos de la invención incluyen la albúmina de suero humano, proteínas de plasma humano, y similares.

Además, el uso de preparaciones secadas por pulverización de la composición pueden ser deseables con o sin la adición de ningún estabilizante o excipiente.

Los FEE utilizados en la presente invención pueden formularse en tampón fosfato sódico/potásico 10 mM a pH 7 que contenga un agente de tonicidad, por ejemplo, cloruro sódico 132 mM. Opcionalmente la composición farmacéutica puede contener un conservante. La composición farmacéutica puede contener diferentes cantidades de proteína eritropoyetina, por ejemplo, 10–1000 µg/ml, preferiblemente 50 µg o 400 µg .

El NAE se introducirá preferiblemente en el torrente sanguíneo por inyección, parche dérmico, depósito subcutáneo o inhalación.

Preferiblemente el NAE se administrará a un individuo a una dosis desde alrededor de 25 µg a alrededor de 500 µg/día durante hasta dos semanas en casos agudos de neurodegeneración, o aplicando desde alrededor de 25 µg a alrededor de 1.000 µg/semana con tratamiento crónico de enfermedades neurodegenerativas. La administración en este último caso puede también extenderse hasta aplicaciones mensuales o incluso en marcos temporales más prolongados, dependiendo del tipo de aplicación y del tipo de enfermedad. En una realización preferida, el NAE se aplicará a alrededor de 165 µg /día hasta una semana en casos agudos o a alrededor de 200 µg/semana en casos crónicos.

Además, la invención concierne a un equipo que comprende un NAE útil de acuerdo con los usos anteriormente mencionados y una sustancia que mejora la penetración en la barrera hematoencefálica, siendo la sustancia que mejora la penetración en la barrera hematoencefálica manitol.

La eritropoyetina humana y las proteínas análogas como se han definido antes pueden expresarse mediante activación génica endógena. Las glicoproteínas de eritropoyetina humana preferidas son aquellas con el ID DE SEC N°:1 e ID DE SEC N°:2, más preferiblemente aquellas de la ID DE SEC N°:1.

Además, la P puede seleccionarse del grupo que consiste en los residuos de la eritropoyetina humana y los análogos de la misma con de 1 a 6 sitios adicionales de glicosilación. Tal y como se detalla a continuación, la preparación y la purificación de EPO es bien conocida en la materia. Por EPO se entiende la proteína natural o recombinante, preferiblemente humana, como se obtiene de cualquier fuente convencional como los tejidos, síntesis de proteínas, cultivo celular con células naturales o recombinantes. Cualquier proteína con la actividad de la EPO, como las muteínas u otras proteínas modificadas de otro modo, están comprendidas en la definición. "Cualquier actividad" al respecto, también incluye la especificidad de unión al receptor de la EPO que sólo presentan las células neuronales. Por lo tanto, están incluidos los derivados de los NAE de acuerdo con esta invención que no muestran actividad eritropoyética. La EPO recombinante puede prepararse mediante la expresión en líneas celulares CHO, BHK o HeLa, mediante tecnología de DNA recombinante o mediante activación génica endógena. La expresión de proteínas, incluyendo la EPO, mediante la activación génica endógena es bien conocida en la materia y se describe, por ejemplo en las Patentes U.S. N°. 5.733.761, 5.641.670, y 5.733.746, y en las publicaciones internacionales de patente N°. WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 y WO 91/09955, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia. El tipo preferido de EPO para la preparación de productos de glicoproteína de eritropoyetina es el tipo de EPO humana. Más preferiblemente, el tipo de EPO es la EPO humana con la secuencia de aminoácido descrita en el ID DE SEC N°:1 o ID DE SEC N°:2, más preferiblemente la secuencia de aminoácido de ID DE SEC N°:1.

Además, la P puede ser el residuo de un análogo de glicoproteína con de 1 a 6 sitios adicionales de glicosilación. La glicosilación de una proteína, con uno o más grupos de oligosacárido, sucede en localizaciones específicas a lo largo del esqueleto polipeptídico y afecta en gran medida a las propiedades físicas de la proteína como la estabilidad de la proteína, la secreción, la localización subcelular, y la actividad biológica. La glicosilación es normalmente de dos tipos. Los oligosacáridos O-unidos están unidos a los residuos serina o treonina y los oligosacáridos N-unidos están unidos a los residuos asparagina. Un tipo de oligosacárido que se encuentra tanto en oligosacáridos N-unidos como O-unidos es el ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), que es una familia de amino azúcares que contienen 9 o más átomos de carbono. El ácido siálico es normalmente el residuo terminal tanto en oligosacáridos N-unidos como en O-unidos y, debido a que lleva una carga negativa, confiere propiedades ácidas a la glicoproteína. La eritropoyetina humana, de 165 aminoácidos, contiene tres cadenas de oligosacáridos N-unidos y una de O-unidos que comprende alrededor del 40% del peso molecular total de la glicoproteína. La glicosilación N-unida sucede en

los residuos de asparagina localizados en las posiciones 24, 38 y 83, y la glicosilación O-unida sucede en el residuo serina localizado en la posición 126. Las cadenas de oligosacáridos están modificadas con residuos de ácido siálico terminal. La eliminación enzimática de todos los residuos de ácido siálico de la eritropoyetina glicosilada resulta en la pérdida de la actividad in vivo pero no de la actividad in vitro debido a que la sialización de la eritropoyetina previene su unión, y el aclaramiento posterior, a la proteína de unión hepática.

Las glicoproteínas utilizadas en la síntesis química de los NAE de la presente invención incluyen análogos de la eritropoyetina humana con uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana, que resulta en un aumento en el número de sitios de unión del ácido siálico. Éstos análogos de glicoproteína pueden generarse mediante mutagénesis dirigida con adiciones, deleciones, o sustituciones de los residuos de aminoácidos, que aumentan o alteran los sitios que están disponibles para la glicosilación. Los análogos de glicoproteína con niveles de ácido siálico mayores que los encontrados en la eritropoyetina humana se generan mediante la adición de sitios de glicosilación que no alteran la conformación secundaria o terciaria, necesaria para la actividad biológica. Las glicoproteínas utilizadas en la síntesis química de NAE de la presente invención también incluyen análogos con niveles aumentados de unión de carbohidratos en un sitio de glicosilación, lo que normalmente involucra la sustitución de uno o más aminoácidos muy cercanos al lugar de N-unión u O-unión. Las glicoproteínas utilizadas en la síntesis química de los NAE de la presente invención también incluyen los análogos con uno o más aminoácidos que se extienden desde el extremo carboxi-terminal de la eritropoyetina y que proporcionan al menos un sitio de carbohidrato adicional. Las glicoproteínas utilizadas en la síntesis química de los NAE de la presente invención también incluyen los análogos con una secuencia de aminoácidos que incluye una reorganización de al menos un sitio para la glicosilación. Tal reorganización del sitio de glicosilación involucra la delección de uno o más sitios de glicosilación en la eritropoyetina humana y la adición de uno o más sitios de glicosilación que no suceden de forma natural. Los análogos de eritropoyetina con sitios de glicosilación adicional se describen en más detalle en la Solicitud de Patente Europea 640.619, de Elliot publicada el 1 de Marzo de 1995.

Además, las glicoproteínas utilizadas en la síntesis química de los NAE de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos que incluye al menos un sitio adicional para la glicosilación como, pero sin limitarse a, las eritropoyetinas que comprenden la secuencia de la eritropoyetina humana modificada con una modificación seleccionada de entre las siguientes:

Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>,  
 Asn<sup>51</sup>Thr<sup>53</sup>,  
 Asn<sup>57</sup>Thr<sup>59</sup>,  
 Asn<sup>69</sup>,  
 Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>,  
 Ser<sup>68</sup>Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>,  
 Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>,  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>,  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Gly<sup>89</sup>Thr<sup>90</sup>,  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Thr<sup>92</sup>,  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>Ala<sup>162</sup>,  
 Asn<sup>69</sup>Thr<sup>71</sup>Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>,  
 Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>,  
 Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>,  
 Ser<sup>87</sup>Asn<sup>89</sup>Ile<sup>90</sup>Thr<sup>91</sup>,  
 Asn<sup>136</sup>Thr<sup>138</sup>,  
 Asn<sup>138</sup>Thr<sup>140</sup>,  
 Thr<sup>125</sup>, y  
 Pro<sup>124</sup>Thr<sup>125</sup>.

La anotación que se ha utilizado aquí para la modificación de secuencias de aminoácidos indica que la(s) posición(es) de la correspondiente proteína sin modificar (por ejemplo, la hEPO de ID DE SEC N°:1 o ID DE SEC N°:2) indicado por el número en superíndice, está cambiada por el(los) aminoácido(s) que inmediatamente precede al número respectivo en superíndice.

La glicoproteína puede también ser un análogo con al menos un aminoácido adicional en el extremo carboxi-terminal de la glicoproteína, en la que el aminoácido adicional incluye al menos un sitio de glicosilación, es decir, el conjugado como se ha definido antes también se refiere a un compuesto en el que la glicoproteína posee una secuencia que comprende la secuencia de eritropoyetina humana y una segunda secuencia en el extremo carboxi-terminal de la secuencia de eritropoyetina humana, en la que la segunda secuencia contiene al menos un sitio de glicosilación. El aminoácido adicional puede comprender un fragmento de péptido derivado del extremo carboxi-terminal de la gonadotropina coriónica humana. Preferiblemente, la glicoproteína es un análogo seleccionado de entre el grupo que consisten en (a) eritropoyetina humana con la secuencia de aminoácidos, Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln (ID DE SEC N°:3), que se extienden desde el carboxi-terminal; (b) el análogo en (a) que comprende además EPO Ser<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>, y (c) el análogo en (a) que comprende además EPO Asn<sup>30</sup>Thr<sup>32</sup>Val<sup>87</sup>Asn<sup>88</sup>Thr<sup>90</sup>.

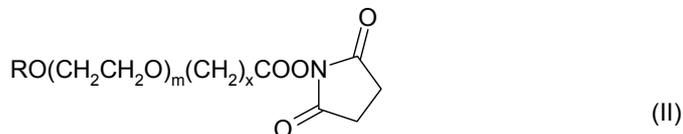
La glicoproteína puede también ser un análogo con una secuencia de aminoácidos que incluye una reorganización de al menos un sitio para la glicosilación. La reorganización puede comprender una delección de cualquiera de los sitios de carbohidratos N-unidos en la eritropoyetina humana y una adición de un sitio de carbohidratos N-unidos en la posición 88 de la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana. Preferiblemente, la glicoproteína es un análogo seleccionado de entre el grupo que consiste en EPO Gln<sup>24</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup>; EPO Gln<sup>38</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup>; y EPO Gln<sup>83</sup> Ser<sup>87</sup> Asn<sup>88</sup> Thr<sup>90</sup>.

Tal como se usa aquí, "alquilo inferior" significa un grupo alquilo lineal o ramificado con uno a seis átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilo inferior incluye metilo, etilo e isopropilo. De acuerdo con esta invención, R es cualquier alquilo inferior. Los conjugados en los que R es metilo son preferidos.

El símbolo "m" representa el número de residuos óxido de etileno (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) en el grupo óxido de polietileno. Una sola subunidad PEG de óxido de etileno tiene un peso molecular de alrededor de 44 dalton. Así, el peso molecular del conjugado (excluyendo el peso molecular de la EPO) depende del número "m". En los conjugados de esta invención "m" es de alrededor de 450 a alrededor de 900 (que corresponde a un peso molecular de alrededor de 20 kDa a alrededor de 40 kDa), preferiblemente de alrededor de 650 a alrededor de 750 (que corresponde a un peso molecular de alrededor de 30 kDa). El número m se selecciona de tal forma que el conjugado resultante de esta invención posea una actividad fisiológica comparable a la de la EPO no modificada, cuya actividad puede representar la misma, más, o una fracción de la correspondiente actividad de la EPO no modificada. Un peso molecular de "alrededor de" un cierto número, indica que está dentro de un intervalo razonable cercano a este número, determinado por las técnicas analíticas convencionales. El número "m" se selecciona de tal modo que el peso molecular de cada grupo polietilenglicol covalentemente unido a la glicoproteína de eritropoyetina es de alrededor de 20kDa a alrededor de 40kDa, y es preferiblemente de alrededor de 30kDa.

En los conjugados de esta invención, el número "n" es el número de grupos polietilenglicol covalentemente unidos a grupos amino libres (lo que incluye grupos ε-amino de un aminoácido lisina y/o el grupo amino amino-terminal) de una proteína eritropoyetina mediante una unión amida. Un conjugado de esta invención puede tener uno, dos, o tres grupos PEG por molécula de EPO. "n" es un número entero entre 1 y 3, preferiblemente "n" es 1 o 2, y más preferiblemente "n" es 1.

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



en el que R y m son como se ha descrito antes, por la condensación del compuesto de Fórmula II con la glicoproteína de eritropoyetina. Los compuestos de Fórmula II en los que x es 3 son alcoxi inferiores alfa, succinimidil éster butírico de polietilenglicol (alcoxi inferior-PEG-SBA). Los compuestos de Fórmula II en los que x es 2 son alcoxi inferiores-alfa, succinimidil éster propiónico de polietilenglicol (alcoxi inferior-PEG-SPA). Puede utilizarse cualquier método convencional de reacción de un éster activado con una amina para formar una amida. En la reacción descrita anteriormente, el succinimidil éster ejemplificado es un grupo saliente que causa la formación de la amida. El uso de succinimidil ésteres como los compuestos de fórmula II para producir conjugados con proteínas se describe en la Patente U.S. N° 5.672.662, publicada el 30 de Septiembre de 1997 (Harris et al.).

La EPO humana contiene nueve grupos amino libres, el grupo amino amino-terminal más los grupos ε-amino de los 8 residuos lisina. Se ha visto que cuando el reactivo de pegilación se combina con un compuesto SBA de Fórmula II a pH 7,5, una proporción de proteína:PEG 1:3, y una temperatura de reacción de alrededor de 20-25°C, se produce una mezcla de especies mono-, di-, y cantidades traza de las tri-pegiladas. Cuando el reactivo de pegilación es un compuesto SPA de Fórmula II, en condiciones similares excepto que la proporción de proteína:PEG es de 1:2, principalmente se producen las especies mono-pegiladas. La EPO pegilada puede administrarse como una mezcla, o como las diferentes especies pegiladas separadas por cromatografía de intercambio catiónico. Mediante la variación de las condiciones de reacción (por ejemplo, la proporción de reactivos, pH, temperatura, concentración de proteína, tiempo de reacción, etc.) pueden cambiarse las cantidades relativas de las diferentes especies pegiladas.

Esta invención proporciona el uso de una composición comprendida por conjugados como los descritos anteriormente. Una composición que contiene al menos un noventa por ciento de conjugados mono-PEG, es decir, en los que n es 1, puede prepararse como se muestra en el Ejemplo 5. Normalmente son deseables los conjugados mono-PEG de glicoproteínas de eritropoyetina debido a que tienden a tener mayor actividad que los conjugados di-PEG. El porcentaje de conjugados mono-PEG así como la proporción entre las especies mono- y di-PEG pueden controlarse mediante la agrupación de fracciones más amplias alrededor del pico de elución para disminuir el porcentaje de mono-PEG o fracciones más reducidas para aumentar el porcentaje de mono-PEG en la composición. Alrededor del noventa por ciento de los conjugados mono-PEG tiene un buen equilibrio entre rendimiento y

actividad. Algunas veces, pueden desearse composiciones en las que, por ejemplo, al menos el noventa y dos por ciento o al menos el noventa y seis por ciento de los conjugados sean especies mono-PEG (n equivale a 1). En una realización de esta invención el porcentaje de conjugados en los que n es 1 es del noventa por ciento al noventa y seis por ciento.

Es contrario a la intuición que la proteína eritropoyética químicamente modificada, tal como se presenta en esta invención, sea capaz de pasar a través de la BHE mediante difusión simple, ya que la NAE de la invención es altamente hidrofílica y tiene un peso molecular elevado. Esto es debido a que Partridge et al. (Pharmaceutical Research, Vol. 15, No. 4, 1998) han mostrado que la pegilación con una molécula pequeña de PEG (peso molecular de 2000 Dalton) reduce la captación pasiva en el cerebro de los péptidos como el factor neurotrófico derivado del cerebro. A pesar de esto, nuestros siguientes ejemplos demuestran claramente la presencia del NAE en el LCR. Estos hallazgos son consistentes, y nosotros, por tanto, hipotetizamos que el NAE de la invención que comprende porciones polietilenglicol integradas en la estructura de la molécula pasa a través de la BHE mediante un proceso de transporte facilitado o activo.

Los pacientes que han padecido un infarto cerebral tienen que tratarse con el NAE de la invención tan pronto como sea posible. Respecto a las enfermedades neurológicas crónicas, el NAE se administrará periódicamente debido a su tiempo de residencia mejorado en el torrente sanguíneo (es decir, su mayor vida media). Como el NAE posee un tiempo de residencia largo y muestra una afinidad reducida hacia el receptor de EPO, el nivel de hemoglobina puede controlarse en un rango bastante estrecho. Debido a que los altibajos en el nivel de hemoglobina que aparecen normalmente con la EPO se reducen con la administración del NEA, también se reducen los efectos secundarios negativos como el aumento del riesgo de trombosis y el espesamiento no deseado de la sangre.

La invención se describe en más detalle a continuación mediante ejemplos demostrativos. Estos ejemplos describen varias realizaciones de la invención, pero no intentan limitar la solicitud.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Pegilación de la EPO con mPEG-SBA

La fermentación y purificación de la EPO humana se describe por ejemplo en US 6.583.272, Ejemplo 1. La EPO purificada de acuerdo con el procedimiento libre de suero (EPOsf) del Ejemplo 1 de la US 6.583.272 fue homogénea, lo que se determinó mediante métodos analíticos, y mostró el patrón de isoformas típico que consiste en 8 isoformas. Se detectó una actividad biológica específica de 190.000 IU/mg como se ha determinado mediante el ensayo del ratón normocítico. El reactivo de pegilación utilizado fue un metoxi-PEG-SBA, que es un compuesto de Fórmula II en el que R es metilo; x es 3; y m es de 650 a 750 (media de alrededor de 680, correspondiente a un peso molecular medio de alrededor de 30 kDa).

### Reacción de Pegilación

A cien miligramos de EPOsf (9,71 ml de una reserva de 10,3 mg/ml de EPOsf, 5,48  $\mu$ mol) se le añadieron 10 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH, 7,5 que contiene 506 mg de metoxi-PEG-SBA de 30kDa (16,5  $\mu$ mol) (obtenido de Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama) y se mezcló durante 2h a temperatura ambiente (20-23 °C). La concentración final de proteína fue de 5 mg/ml y la proporción de proteína:reactivo PEG fue de 1:3. Tras dos horas, se paró la reacción ajustando el pH a 4,5 con ácido acético glacial y se guardó a -20°C, hasta estar listos para su purificación.

### Purificación

1. Mezcla de Conjugado: Aproximadamente 28 ml de SP-SEPHAROSE FF (resina de intercambio de cationes de sulfo-propilo) se empaquetaron en una columna de cristal AMICON (2,2 x 7,5 cm) y se equilibró con tampón acetato 20 mM pH, 4,5 a una tasa de flujo de 150 ml/h. Seis mililitros de la mezcla de reacción que contenían 30 mg de proteína se diluyeron 5 veces con el tampón de equilibrado y se aplicaron a la columna. El material no adsorbido se eliminó por lavados con el tampón y la mezcla de conjugado PEG adsorbida se eluyó de la columna con NaCl 0,175 M en tampón de equilibrado. La EPOsf no modificada que aún quedaba en la columna se eluyó con NaCl 750 mM. La columna se reequilibró con el tampón de inicio. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y se determinó su grado de pegilación. Se encontró que el eluido con NaCl 0,175M contenía, especies mono- así como di- y cantidades traza de las tri-pegiladas, mientras que el eluido con NaCl 750 mM contenía EPOsf sin modificar.

2. EPOsf Di-PEG y Mono-PEG: La mezcla de conjugado purificado eluido de la columna en el paso anterior se diluyó 4 veces con el tampón y se volvió a aplicar a la columna y se lavó como se ha descrito. Se eluyeron de forma separada la EPOsf di-PEG y la EPOsf mono-PEG de la columna con NaCl 0,1M y NaCl 0,175 M, respectivamente. La elución se realizó también con NaCl 750mM para eluir cualquier EPOsf restante sin modificar.

Alternativamente, la mezcla de reacción se diluyó 5 veces con el tampón acetato y se aplicó a la columna de SP-Sepharose (~0,5 mg de proteína/ml gel). La columna se lavó y se eluyeron EPOsf mono-PEG, EPOsf di-PEG y EPOsf no modificada como se ha descrito en la sección anterior.

## 5 Resultados

La PEG-EPOsf se sintetizó mediante conjugación química de una molécula de PEG lineal con una media de peso molecular de 30 kDa. La PEG-EPOsf derivó de la reacción entre los grupos amino primarios de la EPOsf y el derivado succinimidil éster de un PEG-ácido butírico de 30 kDa, lo que resulta en un enlace amida.

10 Los resultados se resumen en la Tabla 1. La mezcla de conjugado purificado contenía EPOsf mono- y di-PEG y estaba libre de EPOsf no modificada como se determinó mediante análisis SDS-PAGE. La mezcla de conjugado consistió en 23,4 mg o el 78% del material de partida. La separación cromatográfica de intercambio de cationes de la EPOsf mono- y di-PEG indicó que la proporción de mono- respecto a di-PEG en la mezcla de conjugado fue de casi 1:1. Tras completar la reacción, la proporción de los componentes individuales de mono: di: no modificado fue de 40: 38: 20 (%). El rendimiento total fue casi cuantitativo.

Tabla 1. Resumen de los resultados de Pegilación de la EPOsf

Muestra	Proteína (mg)	Rendimiento(%)
Mezcla Reacc.	30	100
Mono-	12,0	40
Di-	11,4	38
Sin mod.	6,0	20
25 Mezcla Conju.	23,4	78

### Ejemplo 2: Pegilación de la EPO con mPEG-SPA

30 Una alícuota diferente de la EPOsf utilizada en el Ejemplo 2 se hizo reaccionar con metoxi-PEG-SPA de 30 kDa (Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama). La reacción se realizó con una proporción de proteína:reactivo de 1:2 y las técnicas de purificación fueron según el Ejemplo 2. Principalmente se produjeron especies mono-pegiladas.

La actividad in vivo de los conjugados de EPO descritos, se describen en US 6.583.272, Ejemplo 4.

### 35 Ejemplo 3: Ensayos in vivo

Los experimentos in vivo se realizaron en ratas macho Wistar del Charles River RCC, Füllinsdorf, Suiza. La EPO y el conjugado de EPO (generado de acuerdo con el Ejemplo 1) se administraron por vía intravenosa como una dosis única de 25 µg/kg de peso corporal en la vena de la cola de las ratas. En los momentos indicados (2 y 6 horas post inyección), se tomaron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) seguido de la recogida de plasma (sublingual o terminal). EL LCR se obtuvo mediante inserción de una aguja de recogida (0,7 x 19 mm) en la cisterna cerebelo-medular (cisterna magna). El LCR se drenó mediante un tubo de silicona (ID 0,5 mm) mediante capilaridad. Utilizando esta técnica, es posible obtener ~0,1 ml de LCR de una rata.

### 45 Compuestos:

EPO, concentración: 1,84 mg/ml  
 Volumen de administración: 2 ml/kg de peso corporal  
 Composición: tampón acuoso  
 50 Conjugado de EPO, concentración: 6,2 mg/ml  
 Volumen de administración: 2 ml/kg de peso corporal  
 Composición: tampón acuoso

La concentración del compuesto en las muestras recogidas se determinó mediante Ensayo Inmunosorbente Acoplado a Enzima (ELISA).

### Resultados

60 Las Figuras 1-3 muestran que el NAE de acuerdo con la invención es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. En el periodo de tiempo de 2 a 6 horas, la concentración del conjugado en el líquido cefalorraquídeo aumenta.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Hoffmann-La Roche

5 <120> tratamiento de trastornos neurodegenerativos

<130> 23251

<160> 3

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 165

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

20 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His  
 20 25 30

25 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe  
 35 40 45

30 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp  
 50 55 60

Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu  
 65 70 75 80

35 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp  
 85 90 95

Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu  
 100 105 110

40 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala  
 115 120 125

45 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val  
 130 135 140

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

50 Cys Arg Thr Gly Asp  
 165

<210> 2

<211> 166

55 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

60 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His  
 20 25 30

65

ES 2 445 035 T3

Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe  
 35 40 45  
 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp  
 5 50 55 60  
 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu  
 65 70 75 80  
 10 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp  
 85 90 95  
 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu  
 100 105 110  
 15 Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala  
 115 120 125  
 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val  
 20 130 135 140  
 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala  
 145 150 155 160  
 25 Cys Arg Thr Gly Asp Arg  
 165  
 <210> 3  
 <211> 28  
 30 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3  
 35 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
 20 25  
 40

## REIVINDICACIONES

1. El uso de una molécula eritropoyética para la producción de un medicamento para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos del cerebro y de la médula espinal mediante la administración de una cantidad efectiva del medicamento en el torrente sanguíneo de un paciente que necesita dicha terapia, en el que la molécula eritropoyética comprende una porción de eritropoyetina con al menos un grupo amino libre seleccionado de entre el grupo que consiste en la eritropoyetina humana y los análogos de la misma que poseen la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación o una reorganización de al menos un sitio de glicosilación; y en la que dicha porción de eritropoyetina está covalentemente unida a "n" grupos polietilenglicol de la fórmula



con el -CO de cada grupo polietilenglicol formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino; en el que R es un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono;

x es 2 o 3;

m está entre alrededor de 450 y alrededor de 900;

n es de 1 a 3; y

n y m se escogen de tal forma que el peso molecular de la molécula eritropoyética resultante sustrayéndose el peso molecular de la porción eritropoyética es de alrededor de 20 kilodaltons a alrededor de 100 kilodaltons.

2. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con la reivindicación 1 con a fórmula:



en la que x, m, n y R son como se han definido en la reivindicación 1, y P es el residuo de la porción de eritropoyetina sin el(los) n grupo(s) amino que forman enlaces amida con el(los) grupo(s) polietilenglicol.

3. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que R es metilo.

4. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que m es de alrededor de 650 a alrededor de 750.

5. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que n es 1.

6. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que R es metilo; m es de alrededor de 650 a alrededor de 750; y n es 1.

7. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, con la fórmula



en la que m es de 650 a 750, n es 1 y P es como se ha definido en la reivindicación 1.

8. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la porción de eritropoyetina es una eritropoyetina humana.

9. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la porción de eritropoyetina tiene la secuencia ID DE SEC N°:1.

10. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la porción de eritropoyetina tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación.

11. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los trastornos neurodegenerativos del cerebro y de la médula espinal están relacionados con un evento agudo seleccionado de entre infarto cerebral, lesión cerebral traumática o lesión de la médula espinal.

12. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-10 en el que los trastornos neurodegenerativos del cerebro están relacionados con el tratamiento crónico, y seleccionados de entre esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, demencia, síndrome de temblor/ataxia asociado al frágil X, enfermedad de Parkinson, encefalopatía espongiiforme, esclerosis múltiple, y neurodegeneración asociada con infecciones bacterianas o virales.

13. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la administración de la molécula eritropoyética en el torrente sanguíneo se produce por inyección, parche dérmico, depósito subcutáneo o inhalación.
- 5 14. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad a administrar, medida como la cantidad de la porción de eritropoyetina, es de alrededor de 25 µg a alrededor de 500 µg/día durante hasta alrededor de dos semanas en casos agudos o desde alrededor de 25 µg a alrededor de 1.000 µg/semana en los tratamientos crónicos.
- 10 15. El uso de una molécula eritropoyética de acuerdo con la reivindicación 14 aplicando 165 µg/día durante hasta una semana en casos agudos o aplicando 200 µg/semana en los tratamientos crónicos.
- 15 16. Un medicamento que comprende una molécula eritropoyética para el uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos del cerebro y de la médula espinal mediante la administración de una cantidad efectiva del medicamento en el torrente sanguíneo de un paciente que necesite dicha terapia, en el que la molécula eritropoyética comprende una porción de eritropoyetina con al menos un grupo amino libre seleccionado de entre el grupo que consiste en la eritropoyetina humana y los análogos de la misma que poseen la secuencia de la eritropoyetina humana modificada por la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación o una reorganización de al menos un sitio de glicosilación; y en la que dicha porción de eritropoyetina está covalentemente unida a "n" grupos polietilenglicol de fórmula
- 20



- 25 con el -CO de cada grupo polietilenglicol formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino; en la que R es un grupo de alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono; x es 2 o 3; m es de alrededor de 450 a alrededor de 900; n es de 1 a 3; y n y m se escogen de tal forma que el peso molecular de la molécula eritropoyética resultante sustrayéndose el peso molecular de la porción eritropoyética es de alrededor de 20 kilodaltons a alrededor de 100 kilodaltons.
- 30

Figura 1

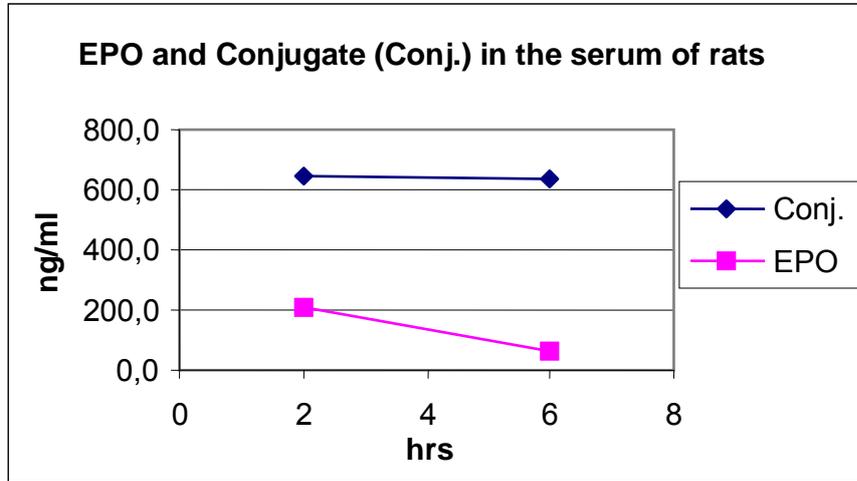


Figura 2

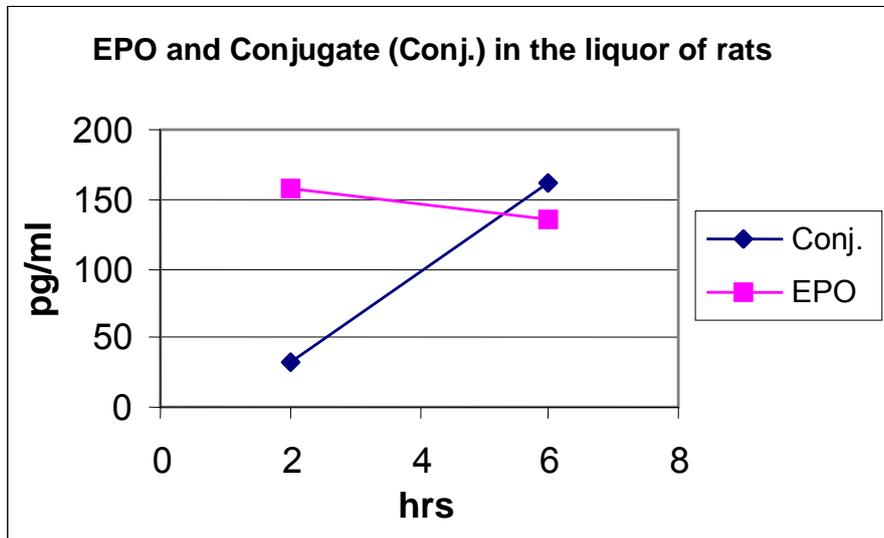


Figura 3

