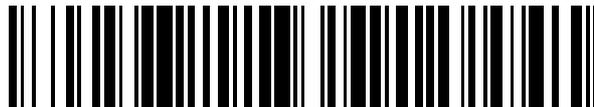


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 671**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2004** **E 04803748 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014** **EP 1696947**

54 Título: **Uso de eritropoyetina en el tratamiento de alteraciones de la distribución del hierro en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas**

30 Prioridad:

19.12.2003 EP 03104832

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

14.05.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KLIMA, HORST;
LEHMANN, PAUL;
ROEDDIGER, RALF y
WALTER-MATSUI, RUTH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 460 671 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

Uso de eritropoyetina en el tratamiento de alteraciones de la distribución del hierro en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas

5 La presente invención se refiere a un nuevo uso de la eritropoyetina, especialmente al tratamiento de alteraciones de la distribución del hierro en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas.

10 Se conocen diversas enfermedades, en las que el metabolismo del hierro no es normal. En una anemia, no se puede formar la sangre suficiente debido a una carencia global de hierro en el organismo. Otra afección metabólica relacionada con el hierro es la hemocromatosis, en la que la concentración global de hierro en el organismo es superior a la normal, lo que conduce a diversas afecciones tales como, por ejemplo, la destrucción de órganos.

15 Las alteraciones de la distribución del hierro difieren de la anemia y de la hemocromatosis que se han descrito anteriormente porque la concentración global de hierro en el organismo es normal. Por un lado, el hierro se acumula en diversos órganos y puede conducir a daños e incluso a la destrucción de estos órganos. Por otro lado, el uso del hierro que está presente en cantidades normales en la formación de sangre se ve alterado, lo que conduce a efectos secundarios que son comparables con los relacionados con la anemia.

20 Hasta ahora no se sabía que los pacientes que padecen enfermedades intestinales inflamatorias crónicas tienen una alta probabilidad de verse afectados por alteraciones de la distribución del hierro. Las alteraciones de la distribución del hierro se pueden diagnosticar con diversos parámetros que se usan habitualmente en el diagnóstico del estado del hierro. En base a medidas de ferritina y receptores solubles de transferrina es posible evaluar si la concentración global de hierro en un paciente que padece enfermedades intestinales inflamatorias crónicas es normal. Si éste es el caso, entonces una concentración reducida de Hemoglobina en reticulocitos es un indicador de alteraciones graves en la distribución del hierro. Otro indicador es una concentración elevada de forma continua/prolongada de proteína C-reactiva (CRP) en pacientes que padecen enfermedades intestinales inflamatorias crónicas y que presentan una concentración global de hierro normal. Un método para diagnosticar alteraciones de la distribución del hierro se ha descrito en P. Lehmann, M. Volkmann, J. Lotz, A. Baldauf, R. Roeddiger, cartel presentado en la AACCC/SCCC, Reunión Anual, 29 de julio - 2 de agosto de 2001, Chicago, Illinois.

35 Schreiber et al. (S. Schreiber et al., N. Engl. J. Med., vol. 334, nº 10, 1996, páginas 619-623) desvelan el uso de eritropoyetina recombinante (150 U/kg, por vía subcutánea dos veces a la semana) para el tratamiento de pacientes con anemia refractaria a tratamiento con hierro sostenido en enfermedad de Crohn así como en colitis ulcerosa. La anemia refractaria es el resultado de anemia de enfermedad crónica con mayores niveles de EPO pero inadecuados para el grado de anemia, y citoquinas proinflamatorias elevadas.

40 Gasche et al. (C. Gasche, Digestion, vol. 60, nº 3, páginas 262-267) desvelan el uso de eritropoyetina recombinante (150 U/kg, por vía subcutánea tres veces a la semana) en pacientes con colitis ulcerosa acompañada con anemia refractaria al tratamiento con hierro. Todos los pacientes muestran deficiencia de hierro, bajos niveles de ferritina, bajos porcentajes de saturación de transferrina y niveles elevados de EPO en suero.

45 Dohil et al. (R. Dohil et al., Journal of Pediatrics, vol. 132, nº 1, páginas 155-159) desvelan el uso de eritropoyetina recombinante (150 U/kg, por vía subcutánea tres veces a la semana) para el tratamiento de niños con anemia asociada con la enfermedad de Crohn y refractaria a la terapia oral con hierro.

50 Gasche et al. (C. Gasche, Digestive Diseases and Sciences, Plenum Publishing Co., US, vol. 3, nº 9, páginas 1930-1934) desvelan el uso de eritropoyetina recombinante (150 U/kg, por vía subcutánea tres veces a la semana) para el tratamiento de pacientes con anemia asociada con la enfermedad de Crohn. Los pacientes muestran almacenamientos disminuidos de hierro y concentración en plasma reducida y producción de EPO inadecuada pero la implicación positiva de IL-6 no se pudo demostrar.

55 Christodolou et al. (D. K. Christodolou, European Journal of Internal Medicine, vol. 11, 2000, páginas 222-227) revisan la anemia en IBD y proponen el uso de hrEPO en combinación con tratamiento con hierro para el tratamiento satisfactorio de la enfermedad.

60 Gasche (C. Gasche, "Anemia in IBD: The overlooked villain", Inflammatory Bowel Diseases vol. 6, nº 2, 2000, páginas 142-150) revisa la anemia en IBD y propone el uso de hrEPO en combinación con tratamiento con hierro para el tratamiento satisfactorio de la enfermedad.

65 Hasta el momento, todavía no se ha sugerido ningún tratamiento para pacientes con enfermedades intestinales inflamatorias crónicas que padecen alteraciones de la distribución del hierro. Por lo tanto, el problema que subyace en la presente invención es proporcionar un tratamiento para alteraciones de la distribución del hierro en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas para minimizar o suprimir las desventajas que se han mencionado anteriormente. Sorprendentemente, se encontró que la eritropoyetina tiene un efecto beneficioso en alteraciones de la distribución del hierro en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas. Por lo tanto, el problema se

resuelve, de acuerdo con la presente invención, al proporcionar eritropoyetina para el uso en el tratamiento de alteraciones de la distribución del hierro en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas.

5 A menos que se indique de otro modo, las siguientes definiciones se establecen para ilustrar y definir el significado y al alcance de los diversos términos usados para describir la invención en el presente documento.

10 La expresión "alquilo inferior" tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquilo inferior incluyen metilo, etilo e isopropilo, preferentemente metilo.

15 La expresión "alcoxi inferior" tal como se usa en el presente documento se refiere a un grupo R'-O-, en el que R' es un alquilo inferior tal como se ha descrito anteriormente.

20 La expresión "alteraciones de la distribución del hierro en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas" se refiere a una alteración de la distribución del hierro que se produce en pacientes que padecen enfermedades intestinales inflamatorias crónicas. Una alteración de la distribución del hierro se caracteriza por los siguientes parámetros: concentración de receptores solubles de transferrina [mg/l] dividida entre log(concentración de ferritina [µg/l]) es inferior a 3,5 y simultáneamente la concentración de proteína C-reactiva es superior a 5 mg/l.

25 La expresión "eritropoyetina" o "proteína eritropoyetina" se refiere a una proteína con la actividad biológica *in vivo* que provoca que las células de la médula ósea aumenten la producción de reticulocitos y glóbulos rojos y se seleccionan entre el grupo que consiste en eritropoyetina humana y análogos que se definen a continuación.

30 La expresión "eritropoyetina pegilada (Peg-EPO o PEG-EPO)" se refiere a una proteína de eritropoyetina que se une covalentemente con uno a tres derivados de polietileno tal como se describe a continuación.

Descripción de las Figuras:

35 Figura 1: Estructura primaria de EPO humana (165 aminoácidos) (SEC ID N°: 1).

40 Figura 2: Estructura primaria de EPO humana (166 aminoácidos) (SEC ID N°: 2).

45 Con más detalle, la presente invención se refiere al uso de eritropoyetina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de alteraciones de la distribución del hierro en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas. Ejemplos de enfermedades intestinales inflamatorias crónicas son, por ejemplo, morbus crohn, también denominado enfermedad de Crohn, y colitis ulcerosa. En una realización preferente, la invención se refiere a un uso tal como se ha definido anteriormente, en la que la enfermedad intestinal inflamatoria crónica es la enfermedad de Crohn. En otra realización preferente, la invención se refiere a un uso tal como se ha definido anteriormente, en el que la enfermedad intestinal inflamatoria crónica es colitis ulcerosa.

50 La presente invención es especialmente útil para la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden eritropoyetina como principio farmacéuticamente activo. La expresión "eritropoyetina" o "proteína eritropoyetina" o "EPO" es tal como sigue a continuación: en particular, las expresiones se refieren a una glicoproteína, por ejemplo la eritropoyetina humana, que tiene, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que se establece en (SEC ID N°: 1) o (SEC ID N°: 2) o una secuencia de aminoácidos básicamente homólogas a las mismas, cuyas propiedades biológicas se refieren a la estimulación de la producción de glóbulos rojos y a la estimulación de la división y la diferenciación de progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea. Tal como se usa en el presente documento, estas expresiones incluyen dichas proteínas modificadas deliberadamente, tal como por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio o accidentalmente a través de mutaciones. Estas expresiones también incluyen análogos que tienen de 1 a 6 sitios adicionales para glicosilación, análogos que tienen al menos un aminoácido adicional en el extremo terminal carboxi de la glicoproteína, en los que el aminoácido adicional incluye al menos un sitio de glicosilación, y análogos que tienen una secuencia de aminoácidos que incluye una reorganización de al menos un sitio para glicosilación. Estas expresiones incluyen eritropoyetina humana producida tanto de forma natural como recombinante. En una realización preferente de la presente invención, la proteína eritropoyetina es una eritropoyetina humana.

55 Tal como se establece con detalle a continuación, la preparación y purificación de EPO son bien conocidas en la técnica. Por eritropoyetina se hace referencia a la proteína natural o recombinante, preferentemente humana, por ejemplo epoetina alfa o epoetina beta, tal como se obtiene a partir de cualquier fuente convencional tal como tejidos, síntesis de proteínas, cultivo celular con células naturales o recombinantes.

60 En una realización preferente de la presente invención, la proteína eritropoyetina es epoetina alfa o epoetina beta. La EPO recombinante se puede preparar a través de expresión en líneas celulares CHO-, BHK- o HeLa, mediante tecnología de ADN recombinante o mediante activación de genes endógenos. La expresión de proteínas, que incluye, activación de genes endógenos, es bien conocida en la técnica y se desvela, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.733.761, N° 5.641.670, y N° 5.733.746, y en las publicaciones de patente internacional N°

WO 93/09222, N° WO 94/12650, N° WO 95/31560, N° WO 90/11354, N° WO 91/06667 y N° WO 91/09955. El uso tal como se ha definido anteriormente, en el que la proteína eritropoyetina se expresa mediante la activación de genes endógenos, es preferente. Las especies de EPO preferentes para la preparación de productos de glicoproteína eritropoyetina son especies de EPO humana. Más preferentemente, la especie de EPO es la EPO humana que tiene la secuencia de aminoácidos que se establece en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2, más preferentemente la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 1. Por lo tanto, una realización preferente de la presente invención se refiere al uso tal como se han descrito anteriormente, en el que la proteína eritropoyetina tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2.

Además, la eritropoyetina puede ser un análogo de glicoproteína que tiene de 1 a 6 sitios adicionales para glicosilación. Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso tal como se ha descrito anteriormente, en el que la proteína eritropoyetina tiene la secuencia de eritropoyetina humana modificada mediante la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación. La glicosilación de una proteína, con uno o más grupos oligosacárido, se produce en posiciones específicas a lo largo de una cadena principal de polipéptidos y afecta en gran medida a las propiedades físicas de la proteína tales como estabilidad, secreción, localización subcelular, y actividad biológica de la proteína. La glicosilación normalmente es de dos tipos. Los oligosacáridos unidos a O se unen a restos de serina o treonina y los oligosacáridos unidos a N se unen a restos de asparagina. Un tipo de oligosacárido encontrado en oligosacáridos tanto unidos a N como unidos a O 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 resto terminal en oligosacáridos tanto unidos a N como unidos a O y, debido a que soporta una carga negativa, confiere propiedades ácidas a la glicoproteína. La eritropoyetina humana, que tiene 165 aminoácidos, contiene tres cadenas de oligosacáridos unidas a N y una unida a O que comprenden aproximadamente un 40 % del peso molecular total de la glicoproteína. La glicosilación unida a N se produce en restos de asparagina situados en las posiciones 24, 38, y 83 y la glicosilación unida a O se produce en un resto de serina situado en la posición 126. Las cadenas de oligosacáridos se modifican con restos de ácido siálico terminal. La retirada enzimática de todos los restos de ácido siálico a partir de la eritropoyetina glicosilada da como resultado la pérdida de actividad *in vivo* pero no de la actividad *in vitro* porque la sialilación de la eritropoyetina evita su unión, y posterior eliminación, mediante proteína de unión hepática.

El término "eritropoyetina" incluye análogos de eritropoyetina humana con uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana que da como resultado un aumento del número de sitios para unión de ácido siálico. Estos análogos de glicoproteína se pueden generar mediante mutagénesis dirigida al sitio que tiene adiciones, supresiones, o sustituciones de restos de aminoácidos que aumentan o alteran sitios que están disponibles para glicosilación. Los análogos de glicoproteína que tienen niveles de ácido siálico superiores a los que se encuentran en la eritropoyetina humana se generan por adición de sitios de glicosilación que no alteran la conformación secundaria o terciaria requerida para la actividad biológica. El uso de glicoproteínas de la presente invención también incluye análogos que tienen niveles aumentados de unión de hidratos de carbono a un sitio de glicosilación que normalmente implica la sustitución de uno o más aminoácidos en estrecha proximidad a un sitio unido a N o unido a O. Se pueden usar análogos que tienen uno o más aminoácidos que se extienden desde el extremo terminal carboxi de la eritropoyetina y que proporcionan al menos un sitio de hidrato de carbono adicional. Las proteínas eritropoyetina también pueden incluir análogos que tienen una secuencia de aminoácidos que incluye una reorganización de al menos un sitio para glicosilación. Dicha reorganización del sitio de glicosilación implica la supresión de uno o más sitios de glicosilación en la eritropoyetina humana y la adición de uno o más sitios de glicosilación de origen no natural. El aumento del número de cadenas de hidrato de carbono en la eritropoyetina, y por lo tanto el número de ácidos siálico por moléculas de eritropoyetina puede conferir propiedades ventajosas tales como mayor solubilidad, mayor resistencia a la proteólisis, inmunogenicidad reducida, mayor vida media en suero, y mayor actividad biológica. Los análogos de eritropoyetina con sitios de glicosilación adicional se desvelan con más detalle en la Solicitud de Patente Europea N° 640 619, de Elliot publicada el 1 de marzo de 1995.

La composición farmacéutica puede comprender proteínas eritropoyetina con una secuencia de aminoácidos que incluye al menos un sitio adicional para glicosilación tales como, pero no limitadas a, eritropoyetinas que comprenden la secuencia de eritropoyetina humana modificada con una modificación seleccionada entre las siguientes:

Asn³⁰Thr³²;
 Asn⁵¹Thr⁵³;
 Asn⁵⁷Thr⁵⁹;
 Asn⁶⁹;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹;
 Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;
 Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;

Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹.
 Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 Asn¹³⁶Thr¹³⁸.
 Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
 Thr¹²⁵, y
 Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

La notación usada en el presente documento para la modificación de secuencias de aminoácidos se refiere a que la posición o posiciones de la correspondiente proteína sin modificar (por ejemplo, hEPO de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2) indicada con el número o números en superíndice se cambia al aminoácido o aminoácidos que preceden inmediatamente al respectivo número o números en superíndice.

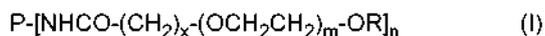
La proteína eritropoyetina también puede ser un análogo que tiene al menos un aminoácido adicional en el extremo terminal carboxi de la glicoproteína, en el que el aminoácido adicional incluye al menos un sitio de glicosilación. El aminoácido adicional puede comprender un fragmento de péptido derivado del extremo terminal carboxi de la gonadotropina coriónica humana. Preferentemente, la glicoproteína es un análogo seleccionado entre el grupo que consiste en (a) eritropoyetina humana que tiene la secuencia de aminoácidos, Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln, que se extiende desde el extremo carboxi; (b) el análogo en (a) que comprende adicionalmente Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰EPO; y (c) el análogo en (a) que comprende adicionalmente Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰EPO.

La proteína eritropoyetina también puede ser un análogo que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye una reorganización de al menos un sitio de glicosilación. La reorganización puede comprender una supresión de cualquiera de los sitios de hidrato de carbono unido a N en la eritropoyetina humana y una adición de un sitio de hidrato de carbono unido a N en la posición 88 de la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana. Preferentemente, la glicoproteína es un análogo seleccionado entre el grupo que consiste en Gln²⁴Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰EPO; Gln³⁸Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰EPO; y Gln⁸³Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰EPO. Un análogo adicional es la darbepoetina alfa. Una proteína eritropoyetina preferente en el uso que se ha descrito anteriormente es la darbepoetina alfa.

Más particularmente, la proteína eritropoyetina de esta composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente también puede incluir derivados pegilados de la misma. En la técnica se conocen derivados pegilados de eritropoyetina y su preparación y se describen por ejemplo en el documento WO 01/02017, documento EP-A-1064951, documento EP-A-539,167, documento EP-A-605,963, documento WO 93/25212, documento WO 94/20069, documento WO 95/11924, Patente de Estados Unidos N° 5.566, documento EP-A-584.876, documento WO 92/16555, documento WO 94/28024, documento WO 97/04796, Pat. de Estados Unidos N° 5.359.030 y N° 5.681.811, Patente de Estados Unidos N° 4.179.337, Patente Japonesa, documento WO 98/32466, Patente de Estados Unidos N° 5.324.650. Preferentemente, en el uso que se ha descrito anteriormente, la proteína eritropoyetina está pegilada. Una realización preferente de especies de eritropoyetina pegilada se refieren a los derivados tal como se describe a continuación.

En consecuencia, la presente invención también se refiere al uso tal como se ha descrito anteriormente, en el que la proteína eritropoyetina es un conjugado, comprendiendo dicho conjugado una proteína eritropoyetina tal como se ha descrito anteriormente que tiene al menos un grupo amino libre y que tiene la actividad biológica *in vivo* de provocar que las células de la médula ósea aumenten la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos y se selecciona entre el grupo que consiste en eritropoyetina humana y análogos de la misma que tienen una secuencia de eritropoyetina humana modificada mediante la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación o una reorganización de al menos un sitio de glicosilación; estando dicha eritropoyetina unida covalentemente a n grupos de poli(etilenglicol) de fórmula -CO-(CH₂)_x-(OCH₂CH₂)_m-OR con el -CO (es decir, carbonilo) de cada grupo poli(etilenglicol) formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino; en la que R es alquilo inferior; x es 2 o 3; m es de aproximadamente 450 a aproximadamente 900; n es de 1 a 3; y n y m se eligen de modo que el peso molecular del conjugado menos la proteína eritropoyetina sea de 20 kilodaltons a 100 kilodaltons. Además, la presente invención se refiere al uso de composiciones farmacéuticas que contienen conjugados que se describen en el presente documento en la que el porcentaje de conjugados en los que n es 1 es al menos de un noventa por ciento, preferentemente al menos de un noventa y dos por ciento, o es preferentemente de un noventa y seis por ciento de todos los conjugados de la composición.

Más específicamente, los conjugados anteriores se pueden representar con la fórmula (I)



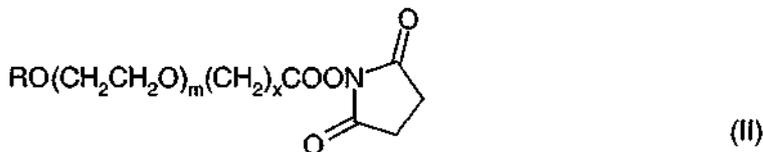
en la que P es el resto de una proteína eritropoyetina tal como se describe en el presente documento, (es decir, sin el grupo amino o grupos amino que forman un enlace amida con el carbonilo que se muestra en la Fórmula I), que tiene la actividad biológica *in vivo* de provocar que las células de la médula ósea aumenten la producción de

reticulocitos y de glóbulos rojos; y en la que R es alquilo inferior; x es 2 o 3; m es de aproximadamente 450 a aproximadamente 900; n es de 1 a 3; y n y m se eligen de modo que el peso molecular del conjugado menos el de la glicoproteína eritropoyetina sea de 20 kilodaltons a 100 kilodaltons. De acuerdo con la presente invención, R es cualquier alquilo inferior. Son preferentes los conjugados en los que R es metilo.

El símbolo "m" representa el número de restos de óxido de etileno (OCH₂CH₂) en el grupo poli(óxido de etileno). Una sola subunidad de PEG (polietilenglicol) de óxido de etileno tiene un peso molecular de aproximadamente 44 daltons. Por lo tanto, el peso molecular del conjugado (excluyendo el peso molecular de la EPO) depende del número "m". En los conjugados "m" es de aproximadamente 450 a aproximadamente 900 (que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 40 kDa), preferentemente de aproximadamente 650 a aproximadamente 750 (que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 30 kDa). El número m se selecciona de modo que el conjugado resultante tenga una actividad fisiológica comparable con la de la EPO sin modificar, cuya actividad puede representar la misma que, superior a, o una fracción de la actividad correspondiente de la EPO sin modificar. Un peso molecular de "aproximadamente" un determinado número se refiere a que está dentro de un intervalo razonable de ese número tal como se determina mediante técnicas analíticas convencionales. El número "m" se selecciona de modo que el peso molecular de cada grupo poli(etilenglicol) unido covalentemente a la glicoproteína eritropoyetina sea de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 40 kDa, y es preferentemente de aproximadamente 30 kDa.

En los conjugados, el número "n" es el número de grupos poli(etilenglicol) unidos covalentemente 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* enlace o enlaces amida. Un conjugado puede tener uno, dos, o tres grupos PEG por molécula de EPO. "n" es un número entero que varía de 1 a 3, preferentemente "n" es 1 o 2, y más preferentemente "n" es 1. Un conjugado preferente de los conjugados que se han descrito anteriormente comprende compuestos en los que x es 2, m es de 650 a 750, n es 1 y R es metilo.

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

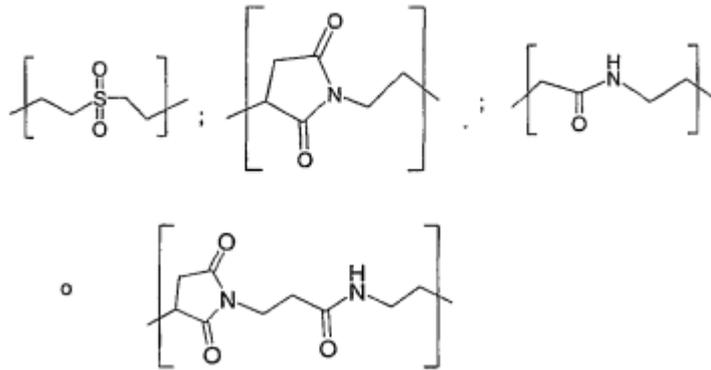


en el que R y m son como se han descrito anteriormente, por condensación del compuesto de Fórmula II con la glicoproteína eritropoyetina. Los compuestos de fórmula (II), en la que x es 3, son alcoxi inferiores-alfa, succinimidil ésteres del ácido butírico de poli(etilenglicol) (alcoxi inferior-PEG-SBA). Los compuestos de fórmula (II) en la que x es 2 son alcoxi inferiores-alfa, succinimidil ésteres del ácido propiónico de poli(etilenglicol) (alcoxi inferior-PEG-SPA). Se puede usar cualquier método convencional de reacción de un éster activado con una amina para formar una amida. En la reacción que se ha descrito anteriormente, el succinimidil éster a modo de ejemplo es un grupo saliente que provoca la formación de la amida. El uso de succinimidil ésteres tales como los compuestos de fórmula II para producir conjugados con proteínas se desvelan en la Patente de Estados Unidos Nº 5.672.662, expedida 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 8 restos de lisina. Cuando el reactivo de pegilación se combinó con un compuesto de SBA de Fórmula II, se ha encontrado que, a pH 7,5, se produjeron una relación de proteína:PEG de 1:3, y una temperatura de reacción de 20-25 °C, una mezcla de mono-, di-, y cantidades traza de las especies tripegiladas. Cuando el reactivo de pegilación era un compuesto SPA de Fórmula II, en condiciones similares excepto en que la relación de proteína:PEG era de 1:2, se produce principalmente la especie mono-pegilada. La EPO pegilada se puede administrar en forma de una mezcla, o en forma de las diferentes especies pegiladas separadas por cromatografía de intercambio catiónico. Mediante manipulación de las condiciones de reacción (por ejemplo, relación de reactivos, pH, temperatura, concentración de proteínas, tiempo de reacción, etc.), las cantidades relativas de las diferentes especies pegiladas se puede variar.

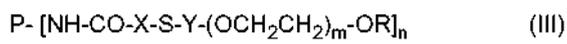
Además, una realización preferente de la presente invención se refiere al uso tal como se ha definido anteriormente, en el que la proteína eritropoyetina es un conjugado, comprendiendo dicho conjugado una proteína eritropoyetina tal como se ha definido anteriormente que tiene al menos un grupo amino libre y que tiene la actividad biológica *in vivo* de provocar que las células de la médula ósea aumenten la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos y se selecciona entre el grupo que consiste en proteína eritropoyetina humana y análogos de la misma que tienen la estructura primaria de la proteína eritropoyetina humana modificada mediante la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación; dicha proteína eritropoyetina está unida covalentemente a de uno a tres grupos alcoxi inferior poli(etilenglicol), estando cada grupo poli(etilenglicol) unido covalentemente a la proteína eritropoyetina *mediante* un

conector de fórmula -C(O)-X-S-Y- con el C(O) del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino, X es-(CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, k es de 1 a 10, Y es



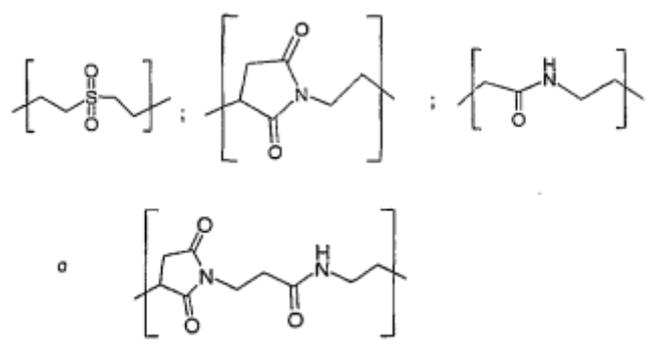
5 el peso molecular medio de cada resto poli(etilenglicol) es de aproximadamente 20 kilodaltons a aproximadamente 40 kilodaltons, y el peso molecular del conjugado es de aproximadamente 51 kilodaltons a aproximadamente 175 kilodaltons.

10 Esta especie de eritropoyetina también se puede representar con la fórmula (III)

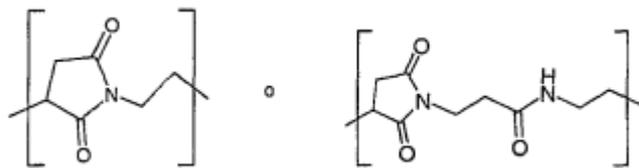


15 en la que R puede ser cualquier alquilo inferior. Un alquilo inferior preferente es metilo. X puede ser -(CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, en el que k es de 1 a aproximadamente 10. Preferentemente, k es de 1 a aproximadamente 4, más preferentemente, k es 1 o 2. Lo más preferentemente, X es -(CH₂)₂-.

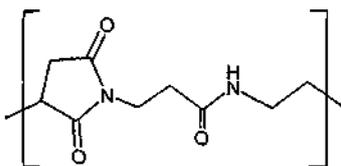
En la Fórmula 1, Y es



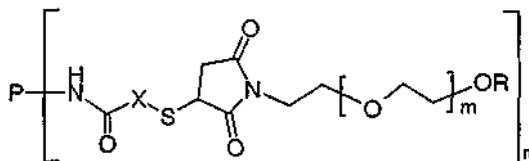
20 preferentemente



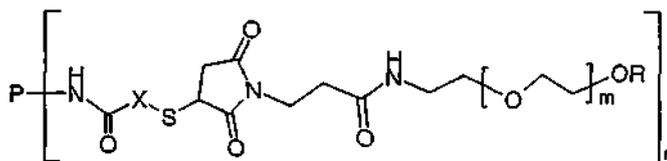
25 más preferentemente



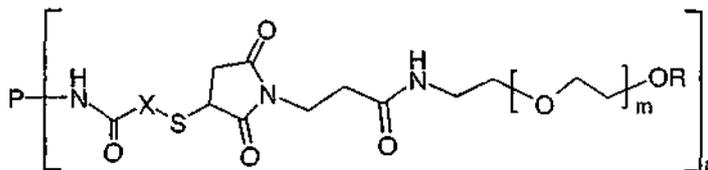
- 5 En la fórmula (III), el número m se selecciona de modo que el conjugado resultante de fórmula (III) tiene una actividad fisiológica comparable con la EPO sin modificar, cuya actividad puede representar la misma que, superior a, o una fracción de la actividad correspondiente de la EPO sin modificar. m representa el número de restos de óxido de etileno en la unidad de PEG. Una sola subunidad de PEG de $-(OCH_2CH_2)-$ tiene un peso molecular de aproximadamente 44 daltons. Por lo tanto, el peso molecular del conjugado (excluyendo el peso molecular de la EPO) depende del número m. Un peso molecular de "aproximadamente" un determinado número se refiere a que está dentro de un intervalo razonable de ese número tal como se determina mediante técnicas analíticas convencionales. m es un número entero que varía de 450 a aproximadamente 900 (que corresponde a un peso molecular de 20 a 40 kDa), preferentemente m es de aproximadamente 550 a aproximadamente 800 (de aproximadamente 24 a 35 kDa), y lo más preferentemente m es de aproximadamente 650 a aproximadamente 700 (de aproximadamente 29 a aproximadamente 31 kDa).
- 10
- 15 En la fórmula (III), el número n es el número de grupos ϵ -amino de un aminoácido lisina en una proteína eritropoyetina unida covalentemente a una unidad de PEG mediante un enlace amida. Un conjugado de la presente invención puede tener una, dos, o tres unidades de PEG por molécula de EPO. n es un número entero que varía de 1 a 3, preferentemente n es 1 o 2, y más preferentemente n es 1.
- 20 Las proteínas eritropoyetina preferentes de fórmula (III) se representan con las fórmulas:



25 y

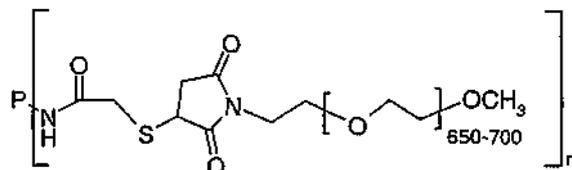


30 En la realización más preferente de la presente invención, un conjugado de eritropoyetina se representa con la fórmula:

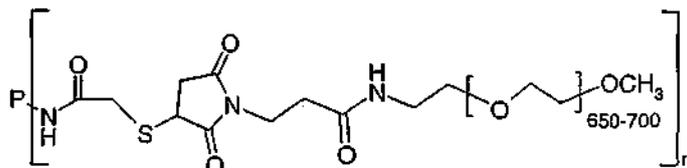


35 en la que en las fórmulas anteriores n es un número entero de 1 a 3; m es un número entero de 450 a 900; R es alquilo inferior; X es $-(CH_2)_k-$ o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, y P es el resto de la proteína eritropoyetina sin el grupo o grupos amino que forman un enlace amida con X.

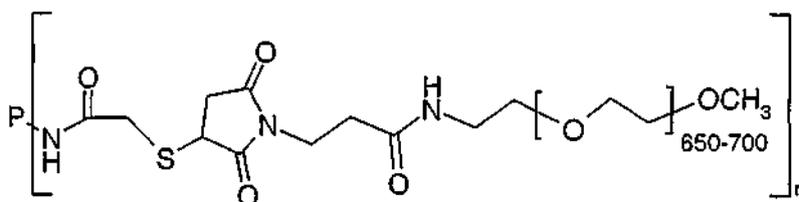
Otros productos preferentes de glicoproteína eritropoyetina se representan con las fórmulas:



5 y



Los productos de glicoproteína eritropoyetina más preferentes se representan con la fórmula:



10

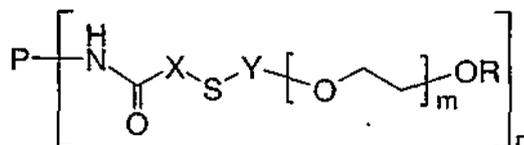
Estas proteínas eritropoyetina se pueden preparar

15 (a) haciendo reaccionar covalentemente un grupo ε-amino de un aminoácido lisina de una proteína eritropoyetina representado con la fórmula, P-[NH₂]_n, con un reactivo bifuncional representado con la fórmula, Z-CO-X-S-Q, para formar un compuesto intermedio con un enlace amida representado con la fórmula:



20 en la que P es una proteína eritropoyetina menos el grupo amino que forma un enlace amida; n es un número entero que varía de 1 a 3; Z es un grupo reactivo, por ejemplo un éster carboxílico-NHS; X es -(CH₂)_k- o -CH₂(O-CH₂-CH₂)_k-, en el que k es de 1 a aproximadamente 10; y Q es un grupo protector, tal como alcanoílo, por ejemplo acetilo.

25 (b) haciendo reaccionar covalentemente el compuesto intermedio con un enlace amida a partir de la etapa (a) con un derivado de poli(etilenglicol) activado representado con la fórmula, W-[OCH₂CH₂]_m-OR, para formar un producto de glicoproteína eritropoyetina representado con la fórmula:



30 en la que W es una forma reactiva sulfhidrido de Y; m es un número entero que varía de aproximadamente 450 a aproximadamente 900; R es alquilo inferior; e Y es tal como se ha definido anteriormente.

35 En la presente realización, el reactivo bifuncional es preferentemente N-succinimidil-S-acetilpropionato o N-succinimidil-S-acetilacetato, Z es preferentemente N-hidroxisuccinimida, y el derivado de poli(etilenglicol) activado W-[OCH₂CH₂]_m-OR se selecciona preferentemente entre el grupo consiste en yodo-acetil-metoxi-PEG, metoxi-PEG-vinilsulfona, y metoxi-PEG-maleimida.

40 Con más detalle, las proteínas eritropoyetina de fórmula (III) se pueden preparar mediante enlace covalente de grupos tiol a EPO ("activación") y acoplamiento de la EPO activada resultante con un derivado de poli(etilenglicol)

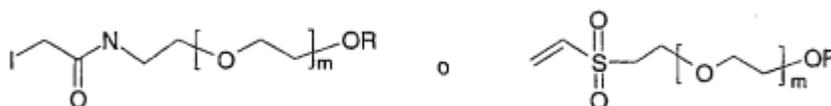
acetiltio se describe en March, J., *Advanced Organic Chemistry*, McGraw-Hill, 1977, 375-376. SATA está disponible en el mercado (Molecular Probes, Eugene, OR, USA y Pierce, Rockford, IL).

5 El número de grupos tiol a añadir a una molécula de EPO se puede seleccionar mediante el ajuste de los parámetros de reacción, es decir, la concentración de proteína (EPO) y la relación de proteína/reactivo bifuncional. Preferentemente, la EPO se activa mediante el enlace covalente de 1 a 5 grupos tiol por molécula de EPO, más preferentemente de 1,5 a 3 grupos tiol por molécula de EPO. Estos intervalos se refieren a la distribución estadística del grupo tiol sobre la población de proteína EPO.

10 La reacción se realiza, por ejemplo, en una solución tampón acuosa, pH 6,5-8,0, por ejemplo, en fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,3. El reactivo bifuncional se puede añadir en DMSO. Después de la finalización de la reacción, preferentemente después de 30 minutos, la reacción se detiene mediante la adición de lisina. El exceso de reactivo bifuncional se puede separar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por diálisis o filtración en columna. El número medio de grupos tiol añadidos a EPO se puede determinar mediante métodos fotométricos que se describen, por ejemplo, en Grasetti, D. R. y Murray, J. F. en *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 41- 49 (1967).

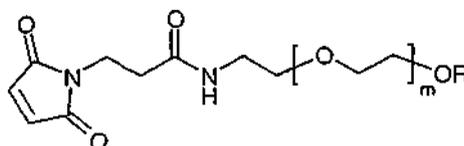
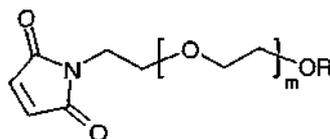
15 La reacción anterior va seguida por el acoplamiento covalente de un derivado de poli(etilenglicol) (PEG) activado. Los derivados de PEG adecuados son moléculas de PEG activadas con un peso molecular medio de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 kDa, más preferentemente de aproximadamente 24 a aproximadamente 35 kDa, y lo más preferentemente de aproximadamente 30 kDa.

20 En la técnica se conocen derivados de PEG activados y se describen, por ejemplo, en Morpurgo, M. et al. *J. Bioconj. Chem.* (1996) 7, página 363 ff para PEG-vinilsulfona. Las especies de PEG de cadena lineal y de cadena ramificada son adecuadas para la preparación de los compuestos de Fórmula 1. Ejemplos de reactivos de PEG reactivos son yodo-acetil-metoxi-PEG y metoxi -PEG-vinilsulfona:

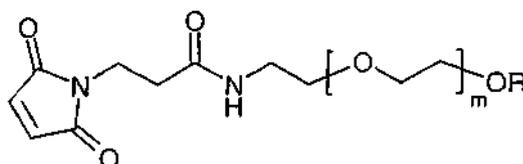


30 En la técnica se conoce el uso de estas sustancias activadas con yodo y se describe, por ejemplo, en Hermanson, G. T. en *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) páginas 147-148.

35 Lo más preferentemente, las especies de PEG se activan con maleimida usando (alcoxi inferior-PEG-maleimida), tal como metoxi-PEG-maleimida (PM 30000; Shearwater Polymers, Inc.). La estructura de alcoxi inferior-PEG-maleimida es tal como sigue a continuación:



con R y m tal como se han definido anteriormente, preferentemente



La reacción de acoplamiento con alcoxi inferior-PEG-maleimida tiene lugar tras la escisión *in situ* del grupo protector tiol en una solución tampón acuosa, por ejemplo fosfato potásico 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,2. La escisión del grupo protector se puede realizar, por ejemplo, con hidroxilamina en DMSO a 25 °C, pH 6,2 durante 90 minutos. Para la modificación del PEG, la relación molar de EPO/alcoxi inferior-PEG-maleimida activada debería ser de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:6 y preferentemente 1:4. La reacción se puede detener mediante la adición de cisteína y haciendo reaccionar los grupos tiol (-SH) remanentes con N-metilmaleimida u otros compuestos apropiados capaces de formar enlaces disulfuro. Debido a la reacción de cualquier grupo tiol activo remanente con un grupo protector tal como N-metilmaleimida u otro grupo protector adecuado, las glicoproteínas EPO en los conjugados de la presente invención pueden contener dichos grupos protectores. Generalmente, el procedimiento que se describe en el presente documento producirá una mezcla de moléculas que tienen números variables de tioles protegidos con números diferentes del grupo protector, dependiendo del número de grupos tiol activados en la glicoproteína que no se conjugaron con PEG-maleimida.

Mientras que N-metilmaleimida forma el mismo tipo de enlace covalente cuando se usa para bloquear los grupos tiol remanentes en la proteína pegilada, los compuestos disulfuro se dirigirán en una reacción de intercambio sulfuro/disulfuro intermolecular a un acoplamiento con puente disulfuro del reactivo de bloqueo. Los reactivos de bloqueo preferentes para ese tipo de reacción de bloqueo son glutatión oxidado (GSSG), cisteína y cistamina. Mientras que con cisteína no se introduce ninguna carga neta adicional en la proteína pegilada, el uso de los reactivos de bloqueo GSSG o cistamina da como resultado una carga adicional negativa o positiva.

La purificación adicional de los compuestos de fórmula (III), incluyendo la separación de especies de EPO mono-, di- y tripegiladas, se puede realizar con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, cromatografía en columna.

Los derivados de eritropoyetina pegilada contienen preferentemente al menos un noventa por ciento de conjugados mono-PEG. Habitualmente, los conjugados mono-PEG de glicoproteínas eritropoyetina son deseables porque tienden a tener una actividad mayor que los conjugados di-PEG. El porcentaje de conjugados mono-PEG, así como la relación de especies mono- y di-PEG, se puede controlar combinando fracciones más amplias alrededor del pico de elución para disminuir el porcentaje de mono-PEG o fracciones más estrechas para aumentar el porcentaje de mono-PEG en la composición. Aproximadamente un noventa por ciento de conjugados mono-PEG es un buen balance de rendimiento y de actividad. En algunas ocasiones, se pueden desear composiciones en las que, por ejemplo, al menos un noventa y dos por ciento o al menos un noventa y seis por ciento de los conjugados son especies mono-PEG (n igual a 1). En una realización de la presente invención, el porcentaje de conjugados en los que n es 1 es de un noventa por ciento a un noventa y seis por ciento.

En la técnica se conocen composiciones farmacéuticas que comprenden eritropoyetina pegilada y se describen, por ejemplo, en la Solicitud de patente internacional WO 01/87329. Las composiciones pueden comprender de 10 a 10000 µg de una proteína eritropoyetina por ml tal como se ha definido anteriormente. Preferentemente, las composiciones comprenden de 10 a 1000 µg, por ejemplo, 10, 50, 100, 400, 800 o 2500 µg por ml. Además, las composiciones pueden comprender de 10 µg a 10000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 10 - 200 mmol/l de sulfato, de 10 a 50 mmol/l de fosfato, pH de 6,0 a 6,5. Esta composición también puede comprender metionina hasta 20 mM, un 1 - 5 % de un poliol (p/v), pluronic F68 hasta un 0,1 % (p/v) y opcionalmente hasta 1 mM de CaCl₂. Un ejemplo de esta composición comprende de 10 µg a 10000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmol/l de sulfato, 10 mmol/l de fosfato, manitol al 3 % (p/v), metionina 10 mM, pluronic F68 al 0,01 % (p/v), pH 6,2. Como alternativa, la composición puede comprender de 10 µg a 10000 µg de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 100 mmol/l de NaCl, de 10 a 50 mmol/l de fosfato pH de 6,0 a 7,0, opcionalmente un 1-5 % (p/v) de un poliol. Además, esta composición también puede comprender metionina hasta 20 mM, pluronic F68 hasta un 0,1 % (p/v) y opcionalmente 7,5 mmol/l de CaCl₂. Específicamente, esta composición puede comprender de 10 µg a 10000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 100 mmol/l de NaCl, metionina 10 mM, pluronic F68 al 0,01 % (p/v), y 10 mmol/l de fosfato, pH 7,0.

La presente invención también se refiere al uso de la composición anterior que comprende de 10 µg a 10000 µg de proteína eritropoyetina por ml, de 10 a 50 mmol/l de arginina, pH 6 a pH 6,5, de 10 a 100 mmol/l de sulfato sódico. Además, esta composición puede comprender metionina hasta 20 mM, pluronic F68 hasta un 0,1 % (p/v), opcionalmente hasta 1 mmol/l de CaCl₂ y opcionalmente un 1-5 % (p/v) de un poliol. Específicamente, esta composición puede comprender de 10 µg a 10000 µg de proteína eritropoyetina por ml, 40 mmol/l de arginina, pH 6,2, 30 mmol/l de sulfato sódico, manitol al 3 % (p/v), metionina 10 mM, pluronic F68 al 0,01 % (p/v) y opcionalmente 1 mmol/l de CaCl₂.

Una realización preferente de la presente invención se refiere al uso de composiciones que comprenden de 10 a 10000 µg/ml de eritropoyetina, preferentemente de 25 a 2500 µg/ml de eritropoyetina, y

- a) fosfato sódico/potásico 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0 o
- b) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 120 mM, pH 6,2 o
- c) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manitol al 3 % (p/v), pH 6,2 o

- d) fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manitol al 3 % (p/v), metionina 10 mM, pluronic F68 al 0,01% (p/v), pH 6,2 o
 e) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, manitol al 3 % (p/v), pH 6,2 o
 f) arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, manitol al 3 % (p/v), metionina 10 mM, pluronic F68 al 0,01% (p/v), pH 6,2.

En la realización más preferente, las composiciones comprenden una cantidad de proteína eritropoyetina de 50, 100, 400, 800 o 2500 µg/ml. Las composiciones más preferentes comprenden fosfato sódico 10 mM, sulfato sódico 40 mM, manitol al 3 % (p/v), metionina 10 mM, pluronic F68 al 0,01% (p/v), pH 6,2 o arginina 40 mM, sulfato sódico 30 mM, manitol al 3 % (p/v), metionina 10 mM, pluronic F68 al 0,01% (p/v), pH 6,2. Detalles adicionales de dichas composiciones se conocen a partir del documento WO 01/87329.

La invención se refiere a un medicamento para uso en el tratamiento de alteraciones de la distribución del hierro en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas caracterizado por que contiene una cantidad eficaz de proteína eritropoyetina. Ejemplos de enfermedades intestinales inflamatorias crónicas son, por ejemplo, morbus crohn, también denominado enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. En contexto con el método y el medicamento que se han mencionado anteriormente, morbus crohn es una forma preferente de enfermedades intestinales inflamatorias crónicas. La colitis ulcerosa es otra forma preferente enfermedades intestinales inflamatorias crónicas. Métodos y medicamentos preferentes, tal como se han descrito anteriormente, son aquéllos en los que la proteína eritropoyetina es tal como se ha definido anteriormente.

La actividad específica de EPO o de conjugados de EPO de acuerdo con la presente invención se puede determinar mediante diversos ensayos conocidos en la técnica. La actividad biológica de las proteínas EPO purificadas de la presente invención es tal que la administración de la proteína EPO mediante inyección a pacientes humanos da como resultado células de la médula ósea que aumentan la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos en comparación con grupos de sujetos sin inyectar o de control. La actividad biológica de las proteínas EPO, o fragmentos de las mismas, obtenidas y purificadas de acuerdo con la presente invención se puede someter a ensayo con métodos de acuerdo con Annable, et al., Bull. Wild. Hlth. Org. (1972) 47: 99-112 y Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997 (2). Otro ensayo biológico para determinar la actividad de la proteína EPO, el ensayo de ratón normocitémico, se describe en la técnica (por ejemplo Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997 (2), y la monografía de eritropoyetina de Ph. Eur. BRP.).

Ejemplos

Ejemplo 1

Una mujer de mediana edad con colitis ulcerosa se examina para alteraciones de la distribución del hierro mediante la determinación de los siguientes parámetros - CRP (proteína reactiva C), ferritina y receptor soluble de transferrina - tal como se describe en P. Lehmann, M. Volkmann, J. Lotz, A. Baldauf, R. Roeddiger, cartel presentado en la AACC/CSCC, Reunión Anual, 29 de julio - 2 de agosto de 2001, Chicago, Illinois. Los resultados muestran alteraciones de la distribución del hierro. El paciente se trata por vía subcutánea con 150/U kg de Recormon™ (proteína eritropoyetina disponible en el mercado) dos veces a la semana durante un máximo de 12 semanas. A continuación, la determinación de los parámetros, tal como se ha descrito anteriormente, muestra una mejora del trastorno por deficiencia de hierro.

Ejemplo 2

Una mujer de mediana edad con morbus crohn se examina para alteraciones de la distribución del hierro mediante la determinación de los siguientes parámetros - CRP (proteína reactiva C), ferritina y receptor soluble de transferrina - tal como se describe en P. Lehmann, M. Volkmann, J. Lotz, A. Baldauf, R. Roeddiger, cartel presentado en la AACC/CSCC, Reunión Anual, 29 de julio - 2 de agosto de 2001, Chicago, Illinois. Los resultados muestran alteraciones de la distribución del hierro. El paciente se trata por vía subcutánea con 150/U kg de Recormon™ (proteína eritropoyetina disponible en el mercado) dos veces a la semana durante un máximo de 12 semanas. A continuación, la determinación de los parámetros tal como se ha descrito anteriormente muestra una mejora del trastorno por deficiencia de hierro.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: F.Hoffmann-La Roche AG
- (B) CALLE: 124 Grenzacherstrasse
- (C) CIUDAD: Basilea
- (E) PAÍS: Suiza

ES 2 460 671 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

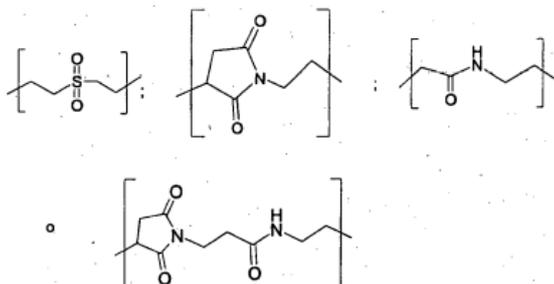
Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val
 130 135 140

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

Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 165

REIVINDICACIONES

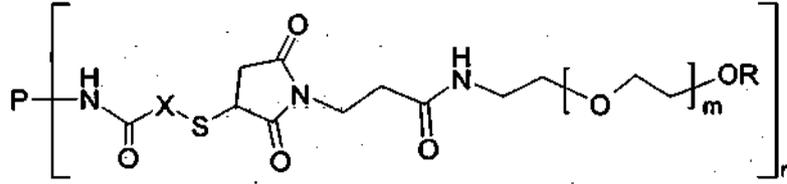
1. El uso de proteína eritropoyetina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de alteraciones de la distribución del hierro en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas, en el que la alteración de la distribución del hierro se caracteriza por que la concentración de receptor soluble de transferrina [mg/l]: (concentración log de ferritina [$\mu\text{g/l}$] es inferior a 3,5 y por que la concentración de proteína C-reactiva es superior a 5 mg/l.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la enfermedad intestinal inflamatoria crónica es enfermedad de Crohn.
3. El uso de la reivindicación 1, en el que la enfermedad intestinal inflamatoria crónica es colitis ulcerosa.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína eritropoyetina es una eritropoyetina humana.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la proteína eritropoyetina es epoetina alfa o epoetina beta.
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína eritropoyetina se expresa mediante activación de genes endógenos.
7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína eritropoyetina comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2.
8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína eritropoyetina tiene la secuencia de la eritropoyetina humana modificada mediante la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación.
9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína eritropoyetina es darbepoetina alfa.
10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína eritropoyetina tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 está pegilada.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la proteína eritropoyetina es un conjugado, comprendiendo dicho conjugado una proteína eritropoyetina que tiene al menos un grupo amino libre y que tiene la actividad biológica *in vivo* de provocar que las células de la médula ósea aumenten la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos y se selecciona entre el grupo que consiste en eritropoyetina humana y análogos de la misma que tienen una secuencia de eritropoyetina humana modificada mediante la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación o una reorganización de al menos un sitio de glicosilación; estando dicha proteína eritropoyetina unida covalentemente a n grupos poli(etilenglicol) de fórmula $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ con el $-\text{CO}$ de cada grupo poli(etilenglicol) formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino; en el que R es alquilo inferior lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono; x es 2 o 3; m es de aproximadamente 450 a aproximadamente 900; n es de 1 a 3; y n y m se eligen de modo que el peso molecular del conjugado menos la proteína eritropoyetina es de 20 kilodaltons a 100 kilodaltons.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que x es 2, m es de 650 a 750, n es 1 y R es metilo.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la proteína eritropoyetina es un conjugado, comprendiendo dicho conjugado una proteína eritropoyetina que tiene al menos un grupo amino libre y que tiene la actividad biológica *in vivo* de provocar que las células de la médula ósea aumenten la producción de reticulocitos y de glóbulos rojos y se selecciona entre el grupo que consiste en proteína eritropoyetina humana y análogos de la misma que tienen la estructura primaria de la proteína eritropoyetina humana modificada mediante la adición de 1 a 6 sitios de glicosilación; estando dicha proteína eritropoyetina unida covalentemente a de uno a tres grupos alcoxi inferior poli(etilenglicol), estando cada grupo poli(etilenglicol) unido covalentemente a la proteína eritropoyetina mediante un conector de fórmula $-\text{C}(\text{O})-\text{X}-\text{S}-\text{Y}-$ con el $-\text{C}(\text{O})$ del conector formando un enlace amida con uno de dichos grupos amino, X es $-(\text{CH}_2)_k-$ o $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, k es de 1 a 10, Y es



el peso molecular medio de cada resto poli(etilenglicol) es de aproximadamente 20 kilodaltons a aproximadamente 40 kilodaltons, y el peso molecular del conjugado es de aproximadamente 51 kilodaltons a aproximadamente 175 kilodaltons.

5

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, con un conjugado de eritropoyetina de fórmula:



10 en la que n es un número entero de 1 a 3; m es un número entero de 450 a 900; R es alquilo inferior lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono; X es $-(CH_2)_k-$ o $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, k es de 1 a 10 y P es el resto de la proteína eritropoyetina sin los n grupos amino que forman un enlace amida con X.

15 Un medicamento para uso en el tratamiento de alteraciones de la distribución del hierro en enfermedades intestinales inflamatorias crónicas caracterizado por que contiene una cantidad eficaz de proteína eritropoyetina, en el que la alteración de la distribución del hierro se caracteriza por que la concentración de receptor soluble de transferrina [mg/l]; (concentración log de ferritina [μ g/l]) es inferior a 3,5 y por que la concentración de proteína C-reactiva es superior a 5 mg/l.

Figura 1

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

Figura 2

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