

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 715**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2001 E 01992582 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 1330260**

54 Título: **Uso de inhibidores de IL-1 y antagonistas de TNF, parcialmente en combinación con eritropoyetinas recombinantes, para el tratamiento de la anemia**

30 Prioridad:

31.10.2000 US 244792 P

02.10.2001 US 969739

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

12.08.2014

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**KAY, JONATHAN;
MCCABE, DOROTHY;
NEWMARK, RICHARD y
COCCIA, MARCO A.**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 484 715 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 inhibidores de IL-1 y antagonistas de TNF, parcialmente en combinación con eritropoyetinas recombinantes, para el tratamiento de la anemia

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere al tratamiento de trastornos de la sangre usando un inhibidor de interleucina-1 (IL-1). La invención también se refiere a métodos de tratamiento de trastornos de la sangre en un mamífero usando un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de eritropoyetina (EPO).

Antecedentes de la invención

- 10 Los trastornos de la sangre plantean muchas preocupaciones de salud importantes. Por ejemplo, un hematocrito disminuido, por ejemplo número bajo de glóbulos rojos, volumen disminuido de glóbulos rojos o concentración de hemoglobina reducida, es indicativo de estados patológicos tales como, pero sin limitarse a, anemia. Los síntomas de anemia pueden incluir fatiga, mareo, cefalea, dolor torácico, falta de aliento y depresión.

- 15 El tratamiento de trastornos de la sangre tales como anemia puede implicar aumentar el hematocrito del paciente. Un método de tratamiento de la anemia es administrar transfusiones de glóbulos rojos. Este procedimiento, sin embargo, puede tener riesgos asociados con el mismo. Pueden producirse reacciones a la transfusión si la sangre no corresponde de manera correcta y completa entre el donante y el paciente, y puede haber algunas enfermedades, especialmente enfermedades virales, en la sangre que está transfundiéndose. Una preocupación teórica, todavía no demostrada, es que las transfusiones de sangre frecuentes pueden dañar el sistema inmunitario, que protege al organismo de infecciones.

- 20 Las autoridades normativas han aprobado la eritropoyetina humana recombinante para el tratamiento de la anemia asociada con insuficiencia renal crónica (IRC), anemia relacionada con terapia con AZT (zidovudina) en pacientes infectados por VIH, anemia en pacientes con tumores malignos no mieloides que reciben quimioterapia y anemia en pacientes que se someten a cirugía para reducir la necesidad de transfusiones de sangre alogénicas.

- 25 Debido a los graves problemas de salud que surgen a partir de trastornos de la sangre, tales como los estados asociados con hematocrito disminuido, es de interés desarrollar otros agentes que puedan tratar estos trastornos. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a, los que aumentan el nivel de hematocrito.

Sumario de la invención

- 30 La invención proporciona un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de eritropoyetina (EPO) para su uso en un método de tratamiento de la anemia en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dichos inhibidor y agonista, en donde el inhibidor de IL-1 es la proteína IL-1ra o un derivado o variante de la misma con una homología de secuencia de al menos el 90%, que inhibe la activación de receptores celulares mediante IL-1; y en donde el agonista del receptor de EPO es EPO, un anticuerpo anti-agonista del receptor de EPO o un derivado o variante de los mismos con una homología de secuencia de al menos el 90%, que produce la activación del receptor de EPO. La invención proporciona el mantenimiento del hematocrito en un mamífero. La invención proporciona además una composición que comprende un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de EPO, en donde el inhibidor de IL-1 es anakinra o Fc-IL-1ra, y en donde el agonista del receptor de EPO es EPO, un anticuerpo anti-agonista del receptor de EPO o un derivado o variante de los mismos con una homología de secuencia de al menos el 90%, que produce la activación del receptor de EPO.

- 40 En determinados aspectos, la descripción proporciona la elevación y/o el mantenimiento del hematocrito en un mamífero que comprende administrar un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de EPO. El inhibidor de IL-1 y los agonistas del receptor de EPO pueden administrarse por separado, al mismo tiempo o en diferentes momentos. El inhibidor de IL-1 y el agonista del receptor de EPO pueden administrarse juntos al mismo tiempo.

- 45 También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de EPO, en las que el inhibidor de IL-1 es anakinra o Fc-IL-1ra, y en las que el agonista del receptor de EPO es EPO, un anticuerpo anti-agonista del receptor de EPO o un derivado o variante de los mismos con una homología de secuencia de al menos el 90%, que produce la activación del receptor de EPO.

Descripción de las la figuras

- La figura 1 muestra la historia clínica y los datos demográficos de nivel inicial de sujetos en el estudio descrito en los ejemplos 1, 2 y 3 de esta solicitud. Los datos se agrupan por tipo y nivel de tratamiento.

- 50 La figura 2 compara la distribución de cambio con respecto al nivel inicial en el hematocrito para el tratamiento con anakinra y el tratamiento con placebo en el estudio descrito en los ejemplos 1, 2 y 3 de esta solicitud.

La figura 3 muestra la historia clínica y los datos demográficos de nivel inicial de sujetos en el estudio descrito en los ejemplos 1, 2 y 3 de esta solicitud que tenían artritis reumatoide y anemia. Los datos se agrupan por tipo y nivel de

tratamiento.

La figura 4 muestra el número y el porcentaje de sujetos en el estudio descrito en los ejemplos 1, 2 y 3 de esta solicitud que tenían artritis reumatoide y anemia que demostraron mejora del hematocrito en la semana 24.

5 La figura 5 muestra el número y el porcentaje de sujetos en el estudio descrito en los ejemplos 1, 2 y 3 de esta solicitud que tenían artritis reumatoide y anemia y que demostraron aumentos en el nivel de hematocrito que también cumplían los criterios de respuesta ACR20. Los datos se agrupan por niveles de aumento de hematocrito.

La figura 6 compara el número de sujetos en el estudio descrito en los ejemplos 1, 2 y 3 de esta solicitud con artritis reumatoide y anemia que mostraron tanto mejora del hematocrito como respuesta ACR20, con el número total de sujetos con artritis reumatoide y anemia que demostraron mejora del hematocrito.

10 La figura 7 muestra el efecto de ARANESP™ (darbepoyetina alfa) y Fc-IL-1ra sobre la concentración de hemoglobina en sangre media en ratas que padecían anemia de trastornos crónicos en el estudio descrito en el ejemplo 4 de esta solicitud. El tratamiento de combinación de 100 mg/kg de Fc-IL-1RA 3x/semana con 6 µg/kg/2 semanas de ARANESP fue significativamente mejor en elevar los niveles de Hb en sangre que cualquier tratamiento individual solo ($p < 0,02$).

15 La figura 8 muestra el efecto de ARANESP™ solo y con Fc-IL-1ra o un inhibidor de TNF (PEG sTNF R1) sobre edema de pata en ratas que padecen anemia de trastornos crónicos en el estudio descrito en el ejemplo 4 de esta solicitud.

20 La figura 9 muestra el efecto de ARANESP™ y Fc-IL-1ra sobre el número medio de reticulocitos en ratas que padecen anemia de trastornos crónicos en el estudio descrito en el ejemplo 4 de esta solicitud. El tratamiento de combinación de 100 mg/kg de Fc-IL-1RA 3x/semana con 6 µg/kg/2 semanas de ARANESP fue significativamente mejor en elevar los niveles de reticulocitos que cualquier tratamiento individual solo ($p < 0,004$).

25 La figura 10 muestra el efecto de ARANESP™ y Fc-IL-1ra sobre el número de glóbulos rojos (GR) en ratas que padecen anemia de trastornos crónicos en el estudio descrito en el ejemplo 4 de esta solicitud. El tratamiento de combinación de 100 mg/kg de Fc-IL-1RA 3x/semana con 6 µg/kg/2 semanas de ARANESP fue significativamente mejor en elevar el número de GR que cualquier tratamiento individual solo ($p < 0,03$).

La figura 11 muestra el efecto de ARANESP™ y Fc-IL-1ra sobre el volumen corpuscular medio (VCM) en ratas que padecen anemia de trastornos crónicos en el estudio descrito en el ejemplo 4 de esta solicitud. El tratamiento de combinación de 100 mg/kg de Fc-IL-1RA 3x/semana con 6 µg/kg/2 semanas de ARANESP fue significativamente mejor en elevar VCM que cualquier tratamiento individual solo ($p < 0,04$).

30 La figura 12 muestra el efecto de ARANESP™ y Fc-IL-1ra sobre la hemoglobina corpuscular media (HCM) en ratas que padecen anemia de trastornos crónicos en el estudio descrito en el ejemplo 4 de esta solicitud. El tratamiento de combinación de 100 mg/kg de Fc-IL-1RA 3x/semana con 6 µg/kg/2 semanas de ARANESP fue significativamente mejor en elevar VCM que el tratamiento con ARANESP solo ($p < 0,01$).

35 La figura 13 muestra el efecto de ARANESP™ y Fc-IL-1ra sobre las concentraciones de hierro sérico total (HST) en ratas que padecen anemia de trastornos crónicos en el estudio descrito en el ejemplo 4 de esta solicitud. El tratamiento de combinación de 100 mg/kg de Fc-IL-1RA 3x/semana con 6 µg/kg/2 semanas de ARANESP fue significativamente mejor en elevar HST que cualquier tratamiento individual solo ($p < 0,02$).

La figura 14 muestra el efecto de ARANESP™ y Fc-IL-1ra sobre la capacidad total de fijación de hierro (CTFH) en ratas que padecen anemia de trastornos crónicos en el estudio descrito en el ejemplo 4 de esta solicitud.

40 Definiciones

Las siguientes definiciones se aplican a los términos tal como se usan durante toda esta memoria descriptiva, a menos que se limiten de otro modo en casos específicos.

“Variante adicional” se refiere a una variante que tiene al menos un residuo de aminoácido más que la molécula original.

45 “Aduvante” es una sustancia añadida a una composición farmacéutica que afecta a la acción del principio activo de la composición de manera predecible.

“Administrar” se refiere a cualquier proceso de introducción de una composición en o sobre el organismo de un mamífero e incluye, pero no se limita a, métodos particulares descritos en esta memoria descriptiva.

50 “Anemia de enfermedades crónicas” (AEC) se refiere a cualquier anemia de leve a moderadamente grave que está asociada con enfermedades crónicas tales como, pero sin limitarse a, traumatismo, infeccioso e inflamación (por ejemplo, artritis reumatoide (AR) o enfermedad inflamatoria del intestino (EII)) y enfermedades neoplásicas que persisten durante más de 2 meses.

- “ARANESP™” se refiere a la proteína eritropoyética super-sialada descrita en la solicitud PCT publicada n.º WO 00/24893 “Methods and Compositions for the Prevention and Treatment of Anemia” y cualquier derivado o variante de esta proteína.
- “Polipéptido quimérico” se refiere a un polipéptido creado mediante la fusión entre dos o más polipéptidos diferentes.
- 5 “Variante de delección” se refiere a una variante que tiene al menos un residuo de aminoácido menos que la molécula original.
- “Derivado” se refiere a una proteína modificada químicamente en la que un resto no proteináceo se une a la proteína.
- “Diluyente” es una sustancia usada para reducir la concentración de los otros componentes de una composición.
- 10 “Emulsionante” es un agente tal como, pero sin limitarse a, un jabón, detergente, esteroide o una proteína usada para estabilizar una emulsión de una fase hidrófoba y una fase acuosa.
- “Agonista del receptor de eritropoyetina (EPO)” se refiere a moléculas que pueden producir la activación del receptor de EPO, que puede resultar de cualquier número de mecanismos. Los agonistas del receptor de EPO incluyen los descritos o a los que se hace referencia en esta memoria descriptiva, tales como, pero sin limitarse a darbepoyetina alfa (ARANESP™), epoyetina alfa (EPO, EPOGEN®) y anticuerpos anti-agonista del receptor de EPO.
- 15 “Fc” se refiere a la totalidad o a parte del dominio constante de la cadena pesada o ligera de la inmunoglobulina humana y cualquier variante o derivado de este dominio.
- “Fc-IL-1ra” se refiere a una molécula que comprende las secuencias tanto de IL-1ra como el dominio constante de la cadena pesada o ligera de la inmunoglobulina humana y cualquier variante o derivado de este dominio. Fc-IL-1ra a modo de ejemplo se describe en la solicitud PCT WO 97/28828, publicada el 14 de junio de 1997 y cualquiera de los derivados o variantes de este polipéptido.
- 20 “Inhibidor de interleucina-1 (IL-1)” se refiere a moléculas que pueden inhibir específicamente la activación de receptores celulares mediante IL-1, que puede resultar de cualquiera o varios mecanismos. Tales mecanismos incluyen, pero no se limitan a, regular por disminución la producción de IL-1, unirse a IL-1 libre, interferir con la unión de IL-1 a su receptor, interferir con la formación del complejo IL-1-receptor (es decir, asociación del receptor de IL-1 con la proteína accesoria del receptor de IL-1) o interferir con la modulación de la señalización de IL-1 tras unirse a su receptor. Los inhibidores de interleucina-1 incluyen, pero no se limitan a, los descritos o a los que se hace referencia en esta memoria descriptiva tales como anticuerpos anti-receptor de IL-1, antagonista del receptor de IL-1 y Fc-IL-1ra.
- 25 “Molécula original” se refiere a una molécula no modificada o una molécula variante que carece de la variación particular que está describiéndose. Por ejemplo, cuando se describen variantes de sustitución de una molécula original, la molécula original puede ser una variante de delección.
- “Conservante” es una sustancia añadida a una composición para inhibir el cambio químico a la composición o la contaminación de la composición.
- 30 “Solubilizante” es una sustancia añadida a una composición para aumentar la disolución de los componentes de la composición.
- “sTNF-RI” se refiere a una forma soluble del receptor de tipo I (p55) para el factor de necrosis tumoral (TNF) y cualquier proteína de fusión, derivado o variante del mismo. sTNF-RI a modo de ejemplo se describe en el documento WO 98/01555.
- 35 “Variante de sustitución” se refiere a una variante en la que se elimina al menos un residuo de aminoácido en una molécula original y se inserta un residuo diferente en su lugar.
- “Cantidad terapéuticamente eficaz” es aquella cantidad que da como resultado una mejora medible de al menos un parámetro clínico en un mamífero que padece el trastorno particular.
- 40 “Variante” se refiere a un polipéptido con una homología de secuencia de aminoácidos de al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 95% o al menos el 99% con respecto al polipéptido de referencia y que mantiene algún nivel, incluyendo un nivel reducido, de actividad relevante del polipéptido de referencia. El porcentaje de homología tal como se describe en el presente documento se calcula como el porcentaje de residuos de aminoácido encontrados en la menor de las dos secuencias que se alinean con residuos de aminoácido idénticos en la secuencia que está comparándose cuando pueden introducirse cuatro huecos de una longitud de 100 aminoácidos para ayudar en esa alineación, tal como expone Dayhoff (1972), Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:124, National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C., cuya descripción se incorpora al presente documento como referencia para cualquier fin. Las variantes pueden basarse en un polipéptido de referencia en el que se han delecionado uno o más aminoácidos de (“variantes de delección”), insertado en
- 45
- 50

("variantes de adición") o sustituido dentro de ("variantes de sustitución") la molécula de referencia.

Dentro de esta solicitud, la mención del singular incluye el plural a menos que se indique explícitamente otra cosa.

Descripción detallada de la invención

5 En el presente documento se describe un método de elevación del hematocrito en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IL-1. En determinados aspectos, la invención incluye mantener un hematocrito elevado. En determinados aspectos, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de EPO según la invención.

10 La invención, en determinadas realizaciones, proporciona un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de eritropoyetina (EPO) para su uso en un método de tratamiento de la anemia en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dichos inhibidor y agonista, en donde el inhibidor de IL-1 es la proteína IL-1ra o un derivado o variante de la misma con una homología de secuencia de al menos el 90%, que inhibe la activación de receptores celulares mediante IL-1; y en donde el agonista del receptor de EPO es EPO, un anticuerpo anti-agonista del receptor de EPO o un derivado o variante de los mismos con una homología de secuencia de al menos el 90%, que produce la activación del receptor de EPO. En determinados aspectos, la invención proporciona elevar el hematocrito mediante la administración de un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de EPO según la invención. En determinados aspectos, la invención incluye mantener un hematocrito elevado mediante la administración de un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de EPO según la invención. En determinadas realizaciones, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de EPO según la invención.

20 Según determinadas realizaciones, la invención puede emplearse en el tratamiento de trastornos de la sangre, tales como, pero sin limitarse a, los siguientes:

- anemia asociada con una disminución o pérdida de función renal (insuficiencia renal crónica);
- anemia asociada con terapia mielosupresora, tal como fármacos quimioterápicos o antivirales (tal como AZT);
- 25 • anemia asociada con la progresión de cánceres no mieloides, anemia asociada con infecciones virales (tales como VIH);
- anemia asociada con deficiencia relativa de eritropoyetina;
- anemia asociada con insuficiencia cardíaca congestiva; y
- anemia de enfermedad crónica tal como enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, artritis reumatoide).

30 Según determinados aspectos, la descripción puede emplearse con estados que pueden conducir a anemia en un individuo por lo demás sano, tal como una pérdida prevista de sangre durante cirugía. En determinadas realizaciones, el tratamiento incluye la dosificación una vez al día para anemia asociada con artritis reumatoide (AR). Los trastornos de la sangre también incluyen, pero no se limitan a, trastornos de hematopoyesis, hemacromatosis y deficiencias en el metabolismo del hierro. La hematopoyesis se refiere a la formación de la sangre y las células sanguíneas.

35 La anemia puede producirse como una complicación extra-articular de la artritis reumatoide (AR) y habitualmente se correlaciona con marcadores de actividad patológica (Peeters HRM *et al.*, Ann. Rheum. Dis., 55: 162-68 1996). Los inventores encontraron que el tratamiento con un inhibidor de IL-1 de pacientes con AR aumentaba el hematocrito de estos pacientes (figura 2). En particular, se aumentó el hematocrito en aquellos pacientes con AR que también eran anémicos con respecto al placebo (figura 4). Además, los inventores encontraron que el hematocrito mejoraba incluso en aquellos pacientes cuya respuesta de AR (conocida como ACR20) no cumplía los criterios aceptados (figuras 5 y 6).

40 Tal como se observó anteriormente, una forma de anemia es la anemia de enfermedad crónica (AEC). AEC es un término amplio para anemia de leve a moderadamente grave que está asociada a menudo con estados tales como, pero sin limitarse a:

- 45 • traumatismo;
- inflamación infecciosa;
- inflamación no infecciosa, tal como puede asociarse con artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria del intestino (EII), lupus (incluyendo lupus eritematoso sistémico o LES), esclerosis múltiple (EM), insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), inflamación cardiovascular y enfermedades neoplásicas que persisten durante más de
- 50 dos meses.

Para una revisión de determinadas AEC, véase Means (1999), International J. of Hematol. 70(1):7-12. Se sabe que

la AEC tiene una patogénesis multifactorial mediada en un grado variable por la respuesta inmunitaria innata y consanguínea y por citocinas proinflamatorias tales como INF- γ , TNF- α e IL-1 (Means (1999), International J. of Hematol. 70(1):7-12; Voulgari, *et al.*, (1999), Clin. Immunol. 92:153-160).

La inmunización de ratas Lewis con polímeros de peptidoglicano-polisacárido induce la recaída de artritis y una AEC bifásica que reproduce estrechamente la AEC humana. Los inventores encontraron que la administración de Fc-IL-1ra con ARANESPTM a estas ratas aumentaba el nivel de Hb media, el número de reticulocitos, el número de glóbulos rojos, el volumen corpuscular, el nivel de HB corpuscular y la concentración de hierro sérico total en mayor grado que cualquiera de Fc-IL-1ra o ARANESPTM administrados solos (véanse las figuras 7 a 15).

Las terapias de combinación de esta descripción también pueden ser útiles en el tratamiento de estados asociados con trastornos de almacenamiento de hierro. El hierro almacenado está implicado en la generación de superóxidos y otras especies reactivas que median daño tisular en numerosas enfermedades o trastornos. Para tales estados y trastornos, el inhibidor de IL-1 puede ayudar a la liberación de hierro y el agonista del receptor de EPO puede ayudar al consumo de hierro en exceso por la eritropoyesis. Por este y otros motivos, las terapias de combinación pueden ser útiles en el tratamiento de la enfermedad cardíaca crónica, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, deficiencias o trastornos cognitivos, hemacromatosis, enfermedad inflamatoria del intestino, y similares.

Agonistas del receptor de EPO

Los agonistas del receptor de eritropoyetina (EPO) son moléculas que pueden producir la activación del receptor de EPO, que puede resultar de cualquiera o varios mecanismos. Los agonistas del receptor de EPO incluyen los descritos o a los que se hace referencia en esta memoria descriptiva, tales como, pero sin limitarse a, ARANESPTM, EPO y anticuerpos anti-agonista del receptor de EPO.

Inhibidores de interleucina-1

La interleucina-1 es una proteína producida por numerosos tipos celulares, incluyendo monocitos y algunos macrófagos. Esta proteína tiene efectos fisiológicos importantes sobre varias células diana diferentes. Los inhibidores de interleucina-1 incluyen, pero no se limitan a, moléculas que pueden evitar específicamente la activación de receptores celulares para IL-1, que puede resultar de cualquiera o varios mecanismos. Tales mecanismos incluyen, pero no se limitan a, regular por disminución la producción de IL-1, unirse a IL-1 libre, interferir con la unión de IL-1 a su receptor, interferir con la formación del complejo IL-1-receptor (es decir, asociación del receptor de IL-1 con la proteína accesoria del receptor de IL-1) o interferir con la modulación de la señalización de IL-1 tras unirse a su receptor. Las clases de inhibidores de interleucina-1 incluyen, pero no se limitan a:

- antagonistas del receptor de interleucina-1 tales como IL-1ra, comentado a continuación;
- anticuerpos monoclonales anti-receptor de IL-1 (por ejemplo, documento EP 623674);
- proteínas de unión a IL-1 tales como receptores de IL-1 solubles (por ejemplo, patente estadounidense n.º 5.492.888, patente estadounidense n.º 5.488.032 y patente estadounidense n.º 5.464.937, patente estadounidense n.º 5.319.071 y patente estadounidense n.º 5.180.812);
- anticuerpos monoclonales anti-IL-1 (por ejemplo, documentos WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, patente estadounidense n.º 4.935.343, documentos EP 364778, EP 267611 y EP 220063);
- proteínas accesorias del receptor de IL-1 y anticuerpos frente a las mismas (por ejemplo, documentos WO 96/23067 y WO 99/37773);
- inhibidores de la enzima convertora de interleucina-1 beta (ECI) o caspasa 1 (por ejemplo, documentos WO 99/46248, WO 99/47545 y WO 99/47154), que pueden usarse para inhibir la producción y secreción de IL-1 beta;
- inhibidores de proteasa de interleucina-1 beta;
- y otros compuestos y proteínas que bloquean la síntesis *in vivo* o la liberación extracelular de IL-1.

Inhibidores de IL-1 a modo de ejemplo se dan a conocer en las siguientes referencias:

patentes estadounidenses n.ºs 5.747.444; 5.359.032; 5.608.035; 5.843.905; 5.359.032; 5.866.576; 5.869.660; 5.869.315; 5.872.095; 5.955.480; 5.965.564;

solicitudes de patente internacionales (WO) 98/21957, 96/09323, 91/17184, 96/40907, 98/32733, 98/42325, 98/44940, 98/47892, 98/56377, 99/03837, 99/06426, 99/06042, 91/17249, 98/32733, 98/17661, 97/08174, 95/34326, 99/36426, 99/36415;

solicitudes de patente europeas (EP) 534978 y 894795; y

solicitud de patente francesa FR 2762514.

Determinados aspectos de la descripción proporcionan variantes de inhibidores de IL-1, que no afectan de manera sustancialmente adversa a la capacidad para usarlos para tratar anemia. Tales adiciones, deleciones y sustituciones pueden producirse en el extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido, o pueden ser internas al mismo. En general, las deleciones o adiciones relativamente pequeñas es menos probable que afecten a la estructura y/o función de los inhibidores de IL-1. En determinados aspectos, las deleciones, adiciones o sustituciones pueden ser desde 5-10 residuos de aminoácido, desde 2-5 residuos de aminoácido o desde 1-2 residuos de aminoácido.

Las moléculas descritas en las referencias anteriores y las variantes y derivados de las mismas comentadas a continuación en el presente documento se denominan colectivamente "inhibidores de IL-1".

Antagonista del receptor de interleucina-1

El antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra) es una proteína humana que actúa como un inhibidor natural de interleucina-1 y que es miembro de la familia de IL-1, que incluye, pero no se limita a, IL-1 α e IL-1 β . Determinados antagonistas del receptor (incluyendo IL-1ra y variantes y derivados, por ejemplo, del mismo), así como métodos de obtención y uso de los mismos, se describen en la patente estadounidense n.º 5.075.222; documentos WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; WO 92/16221; WO 93/21946; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626, WO 94/20517; WO 96/22793; WO 97/28828; y WO 99/36541.

Específicamente, la patente estadounidense n.º 5.075.222 describe varias formas de IL-1ra. Una de ellas, IL-1ra α , denominada "IL-1i" en la patente '222, está caracterizada como una molécula de 22-23 kD en SDS-PAGE con un punto isoeléctrico aproximado de 4,8, que eluye de una columna Mono Q para FPLC en aproximadamente NaCl 52 mM en tampón Tris, pH 7,6. Otra, IL-1ra β , está caracterizada como una molécula de 22- 23 kD, que eluye de una columna Mono Q en NaCl 48 mM. Tanto IL-1ra α como IL-1ra β están glicosiladas. Una tercera, IL-1rax, está caracterizada como una proteína de 20 kD, que eluye de una columna Mono Q en NaCl 48 mM y no está glicosilada. La patente 5.075.222 también da a conocer determinados métodos para aislar los genes responsables para la codificación de inhibidores, clonar genes en vectores y tipos celulares adecuados, y expresar genes para producir los inhibidores. Las proteínas incluyen antagonistas del receptor de IL-1 glicosilados así como no glicosilados. En determinadas realizaciones, los antagonistas del receptor de IL-1 glicosilados pueden expresarse en células humanas, células COS o células CHO. Para los fines de la presente invención, IL-1ra y variantes y derivados del mismo tal como se comenta a continuación en el presente documento se denominan colectivamente "proteína(s) IL-1ra".

Variante de proteínas

Variante se refiere a un polipéptido con una homología de secuencia de aminoácidos de al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 95% o al menos el 99% con respecto al polipéptido de referencia y que mantiene algún nivel, incluyendo un nivel reducido, de actividad relevante del polipéptido de referencia. El porcentaje de homología tal como se describe en el presente documento se calcula como el porcentaje de residuos de aminoácido encontrados en la menor de las dos secuencias que se alinean con residuos de aminoácido idénticos en la secuencia que está comparándose cuando pueden introducirse cuatro huecos de una longitud de 100 aminoácidos para ayudar en esa alineación, tal como expone Dayhoff (1972), Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:124, National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C. También se incluyen dentro del término "sustancialmente homólogo" variante(s) de moléculas originales que pueden aislarse mediante reactividad cruzada con anticuerpos frente a las secuencias de aminoácidos de la molécula original o cuyos genes pueden aislarse a través de hibridación con el ADN de las moléculas originales o segmentos de la misma en condiciones de hibridación altamente rigurosas o moderadamente rigurosas.

Los expertos en la técnica entenderán que pueden obtenerse muchas variantes basándose en inhibidores de IL-1 o agonistas del receptor de EPO en los que se han delecionado ("variantes de deleción"), insertado ("variantes de adición) y/o sustituido ("variantes de sustitución") aminoácidos. Tales variantes deben mantener, sin embargo, en algún nivel (incluyendo un nivel reducido) determinada actividad relevante de la molécula no modificada u "original" y por tanto pueden usarse como inhibidores de IL-1 o agonistas del receptor de EPO.

Pueden prepararse variantes mediante una variedad de técnicas de mutagénesis disponibles para un experto en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis por PCR y mutagénesis por inserción de un casete (Zoller *et al.* Met. Enz. 100, 468-500 (1983); Higuchi, en PCR Protocols págs. 177-183 (Academic Press, 1990); Wells *et al.* Gene 34, 315-323 (1985)). Las variantes pueden examinarse rápidamente para evaluar sus propiedades físicas. Se apreciará que tales variante(s) demostrarán propiedades similares a la molécula no modificada, pero no necesariamente todas las mismas propiedades y no necesariamente en el mismo grado que la molécula original correspondiente.

Normalmente hay dos variables principales en la construcción de variante(s) de secuencia de aminoácidos: la ubicación del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación. En el diseño de variante(s), la ubicación de cada sitio de mutación y la naturaleza de cada mutación pueden depender de la(s) característica(s) bioquímica(s) que va(n) a modificarse. En determinadas realizaciones, cada sitio de mutación puede modificarse individualmente o en serie, por ejemplo, (1) delecionando el residuo de aminoácido diana, (2) insertando uno o más residuos de aminoácido

adyacente(s) al sitio ubicado o (3) sustituyendo primero con elecciones de aminoácidos conservativas y, dependiendo de los resultados logrados, luego con más selecciones de radical.

En determinadas realizaciones, las deleciones en la secuencia de aminoácidos oscilan entre aproximadamente 1 y 30 residuos de aminoácido, entre aproximadamente 1 y 20 residuos de aminoácido, entre aproximadamente 1 y 10 residuos de aminoácido o entre aproximadamente 1 y 5 residuos de aminoácido contiguos. Las deleciones incluyen, pero no se limitan a, del extremo amino-terminal, extremo carboxilo-terminal e internas dentro de la secuencia. En el caso de IL-1ra, en determinadas realizaciones, las deleciones pueden realizarse en regiones de baja homología en la familia de IL-1 (que comprende IL-1 α , IL-1 β e IL-1ra). Las deleciones en zonas de homología sustancial con otros miembros de la familia normalmente será más probable que modifiquen significativamente la actividad biológica

En determinadas realizaciones, una adición en la secuencia de aminoácidos puede incluir inserciones de una fusión en el extremo amino y/o carboxilo-terminal que oscila en longitud entre un residuo y cien o más residuos, así como inserciones internas dentro de la secuencia de residuos de aminoácido individuales o múltiples. En determinadas realizaciones, las adiciones internas pueden oscilar entre aproximadamente 1 y 20 residuos de aminoácido, entre aproximadamente 1 y 10 residuos de aminoácido, entre aproximadamente 1 y 5 residuos de aminoácido o entre aproximadamente 1 y 3 residuos de aminoácido.

Se contempla que una adición en el extremo amino-terminal incluye, pero no se limita a, la adición de una metionina (por ejemplo, como un artefacto de la expresión directa en un cultivo celular recombinante bacteriano). Un ejemplo adicional de una adición en el extremo amino-terminal incluye, pero no se limita a, la fusión de una secuencia señal con el extremo amino-terminal de una molécula madura con el fin de facilitar su secreción de células huésped recombinantes. Tales secuencias señal normalmente se obtendrán de y por tanto serán homólogas a la especie de célula huésped deseada. Para las células huésped procariontas que no reconocen ni procesan la secuencia señal nativa de la molécula madura, la secuencia señal puede sustituirse por una secuencia señal procarionta seleccionada en determinadas realizaciones. En determinadas realizaciones, la secuencia señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, las secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinasas o enterotoxina II termoestable. Para la expresión en células de levadura, en determinadas realizaciones, la secuencia señal puede seleccionarse de la invertasa de levadura, factor alfa o fosfatasa ácida. Para la expresión en células de mamífero, en determinadas realizaciones, las secuencias señal nativas son satisfactorias, aunque pueden ser adecuadas otras secuencias señal de mamíferos.

Según determinados aspectos, las adiciones en el extremo amino o carboxilo terminal pueden incluir proteínas quiméricas que comprenden la fusión en el extremo amino terminal o carboxilo terminal de moléculas originales de inhibidor de IL-1 moléculas originales de agonista de receptor de EPO con todo o parte del dominio constante de la cadena pesada o ligera de la inmunoglobulina humana (individual o colectivamente, ("variante(s) de Fc"). En determinados aspectos, la parte de inmunoglobulina de cada proteína quimérica comprende todos los dominios excepto el primero dominio de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana tal como IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG3), IgA, IgM o IgE. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un inhibidor de IL-1 es una proteína quimérica que comprende IL-1ra y un dominio Fc, particularmente el de una IgG1 humana. Véase, por ejemplo, el documento WO 97/28828). Un experto en la técnica apreciará que, en determinadas realizaciones, cualquier aminoácido de la parte de inmunoglobulina puede deleccionarse o sustituirse por uno o más aminoácidos, o puede añadirse uno o más aminoácidos siempre que la molécula original todavía mantenga cierto nivel de su actividad relevante y la parte de inmunoglobulina muestre una o más de sus propiedades características.

Otro grupo de variantes son las variantes de sustitución de aminoácidos. Éstas son variantes en las que al menos se elimina un residuo de aminoácido en una molécula original y se inserta un residuo diferente en su sitio. Las variantes de sustitución incluyen, pero no se limitan a, variantes alélicas que se caracterizan por cambios en la secuencia de nucleótidos que se produce de manera natural en la población de especie que pueden dar como resultado o no un cambio de aminoácido. Un experto en la técnica puede usar cualquier información conocida sobre la unión o el sitio activo del polipéptido en la selección de posibles sitios de mutación.

En determinados aspectos, un método para identificar residuos de aminoácido o regiones para mutagénesis de una proteína se denomina "mutagénesis por barrido de alanina", tal como describen Cunningham y Wells (1989), Science, 244:1081-1085. En este método, se identifica un residuo de aminoácido o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el entorno acuoso circundante en o fuera de la célula. Estos dominios/residuos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se depuran entonces introduciendo residuos adicionales o alternativos en los sitios de sustitución. Por tanto, el sitio para introducir una modificación de secuencia de aminoácidos está predeterminado. Para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede llevarse a cabo mutagénesis aleatoria o por barrido de alanina y pueden examinarse la(s) variante(s) para determinar la combinación óptima de actividad y grado de actividad deseados en determinados aspectos.

Los sitios normalmente del mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen, pero no se limitan a, sitios en los que residuos de aminoácido particulares dentro de una molécula original son sustancialmente diferentes de otras especies u otros miembros de la familia en lo que se refiere al volumen de la cadena lateral, la carga y/o la hidrofobicidad. Otros sitios de interés incluyen aquellos en los que residuos particulares de una molécula original son

idénticos entre otras especies u otros miembros de la familia, ya que tales posiciones normalmente son importantes para la actividad biológica de una proteína.

5 En determinados aspectos, un experto en la técnica apreciará que inicialmente los sitios pueden modificarse normalmente por sustitución de una manera relativamente conservativa. Los cambios de aminoácidos conservativos pueden implicar la sustitución de un aminoácido por otro que sea de estructura y/o función similares (por ejemplo, aminoácidos con cadenas laterales similares en tamaño, carga y conformación). Los ejemplos de tales sustituciones conservativas incluyen, pero no se limitan a, las mostradas en la tabla 1 con el título de "Sustituciones preferidas". Si tales sustituciones no dan como resultado un cambio sustancial en la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales (Sustituciones a modo de ejemplo) y/o pueden realizarse otras adiciones/delecciones y examinarse los productos resultantes.

TABLA 1: Sustituciones de aminoácidos

<u>Residuo original</u>	<u>Sustituciones preferidas</u>	<u>Sustituciones a modo de ejemplo</u>
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina
Leu (L)	Ile	norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Leu	Leu; Val; Ile; Ala
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina

15 Al realizar tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos en determinados aspectos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conferir función biológica interactiva sobre una proteína se entiende generalmente en la técnica (Kyte y Doolittle (1982), J. Mol. Biol., 157:105-131). Se sabe que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen una puntuación o índice hidropático similar y todavía conservan una actividad biológica similar.

20 También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse de manera efectiva basándose en la hidrofiliidad, particularmente cuando la proteína o péptido funcionalmente equivalente creado de ese modo está destinado para su uso en realizaciones inmunológicas. La patente estadounidense 4.554.101 establece que la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, regida por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

En cambio, pueden llevarse a cabo modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de una molécula original seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre mantener (a) la

estructura de la estructura principal polipeptídica en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación helicoidal o en lámina, (b) la carga relativa o hidrofobicidad de la proteína en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que se producen de manera natural pueden dividirse en grupos basándose en propiedades comunes de cadena lateral:

- 5 1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr;
- 3) ácidos: Asp, Glu;
- 4) básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) aromáticos: Trp, Tyr, Phe; y
- 10 6) residuos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro.

Las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de uno de estos grupos por otro.

Derivados polipeptídicos

15 En determinados aspectos, esta descripción también comprende derivados modificados químicamente de las moléculas originales del inhibidor de IL-1 y el agonista del receptor de EPO, y los usos de los mismos, en los que la proteína se une a un resto no proteináceo (por ejemplo, un polímero) con el fin de modificar las propiedades. Estas moléculas originales modificadas químicamente se denominan en el presente documento "derivados". Tales derivados pueden prepararse por un experto en la técnica dadas las descripciones en el presente documento. En determinadas realizaciones, pueden prepararse conjugados usando molécula(s) original(es) glicosilada(s), no glicosilada(s) o desglicosilada(s) y restos químicos adecuados. En determinadas realizaciones, se usarán moléculas originales no glicosiladas y polímeros solubles en agua. En determinadas realizaciones, los derivados englobados por la invención incluyen modificaciones postraduccionales (por ejemplo, cadenas de hidratos de carbono N-unidas u O-unidas, procesando extremos N-terminales o C-terminales), unión de restos químicos a la estructura principal de aminoácidos y modificaciones químicas de cadenas de hidratos de carbono N-unidas u O-unidas. En determinadas realizaciones, los polipéptidos también pueden modificarse con un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente, isotópico o de afinidad para permitir la detección y el aislamiento de la proteína. Tales derivados polipeptídicos deben mantener en cierto nivel (incluyendo un nivel reducido) la actividad relevante de la molécula original y por tanto pueden usarse como inhibidores de IL-1 o agonistas del receptor de EPO.

25 En determinadas realizaciones, los polímeros solubles en agua son deseables porque la proteína a la que se une cada uno normalmente no precipitará en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. En determinadas realizaciones, el polímero será farmacéuticamente aceptable para la preparación de un producto o composición terapéutico. Un experto en la técnica podrá seleccionar el polímero deseado basándose en consideraciones tales como, pero sin limitarse a, si el conjugado de polímero/proteína se usará terapéuticamente y, en caso afirmativo, el perfil terapéutico de la proteína (por ejemplo, duración de liberación sostenida; resistencia a proteólisis; efectos, si los hay, sobre la dosificación; actividad biológica; facilidad de manipulación; grado o falta de antigenicidad y otros efectos conocidos de un polímero soluble en agua sobre una proteína terapéutica).

30 Los polímeros solubles en agua adecuados, clínicamente aceptables, incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), propionaldehído de polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poli(β -aminoácidos) (o bien homopolímeros o bien copolímeros al azar), poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, polipropilenglicol homopolímeros (PPG) y otros óxidos de polialquileo, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxielilados (POG) (por ejemplo, glicerol) y otros polioles polioxielilados, sorbitol polioxielilado o glucosa polioxielilada, ácidos colónicos u otros polímeros de hidratos de carbono, Ficoll o dextrano y mezclas de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, polietilenglicol pretende englobar cualquiera de las formas que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como monoalcoxi(C₁-C₁₀) o ariloxi-polietilenglicol. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua.

35 Los polímeros solubles en agua pueden ser cada uno de cualquier peso molecular y pueden estar ramificados o no ramificados. Normalmente, cuanto mayor es el peso molecular o más sean las ramificaciones, será superior la razón polímero : proteína. Los polímeros solubles en agua normalmente tienen cada uno un peso molecular promedio de entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa (indicando el término "aproximadamente" que en las preparaciones de un polímero soluble en agua, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular establecido). En determinadas realizaciones, el peso molecular promedio de cada polímero soluble en agua es de entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 40 kDa, entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 35 kDa, o entre aproximadamente 15 kDa y aproximadamente 30 kDa.

55 En determinadas realizaciones, la proteína tiene polietilenglicol (PEG) unido porque PEG normalmente tiene

toxicidad muy baja en mamíferos [Carpenter *et al.*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 18, 35-40 (1971)]. Un aducto de PEG de adenosina desaminasa se aprobó en los Estados Unidos para su uso en seres humanos para el tratamiento de síndrome de inmunodeficiencia combinada grave. Una segunda ventaja que puede proporcionarse mediante la conjugación de PEG es la de reducir eficazmente la inmunogenicidad y antigenicidad de proteínas heterólogas. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un aducto de PEG de una proteína humana podría ser útil para el tratamiento de una enfermedad en otras especies de mamíferos sin riesgo de desencadenar una respuesta inmunitaria grave.

En determinadas realizaciones, polímeros tales como PEG pueden unirse convenientemente a uno o más residuos de aminoácidos reactivos en una proteína tal como el grupo alfa-amino del aminoácido amino terminal, los grupos épsilon-amino de cadenas laterales de lisina, los grupos sulfhidrido de cadenas laterales de cisteína, los grupos carboxilo de cadenas laterales de aspartilo y glutamilo, el grupo alfa-carboxilo del aminoácido carboxilo terminal, cadenas laterales de tirosina, o a derivados activados de cadenas de glicosilo unidas a determinados residuos de asparagina, serina o treonina. Se han descrito numerosas formas activadas de PEG adecuadas para la reacción directa con proteínas. En determinadas realizaciones, los reactivos de PEG para la reacción con grupos amino de proteínas incluyen, pero no se limitan a, ésteres activos de derivados de carbonato o ácido carboxílico, particularmente aquellos en los que los grupos salientes son N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2-nitrobenzeno-4-sulfonato. Los derivados de PEG derivados que contienen grupos maleimido o haloacetilo son reactivos útiles para la modificación de grupos sulfhidrido libres de proteínas. Asimismo, los reactivos de PEG que contienen grupos amino, hidrazina o hidrazida son útiles para la reacción con aldehídos generados por oxidación con peryodato de grupos carbohidratados en proteínas.

Hay varios métodos de unión disponibles para los expertos en la técnica, incluyendo reacciones de acilación o reacciones de alquilación con una molécula soluble en agua reactiva. En determinadas realizaciones, tales reacciones generan una proteína modificada químicamente en el extremo N-terminal. Véanse, por ejemplo, el documento EP 0 401 384; Malik *et al.* (1992), *Exp. Hematol.*, 20:1028- 1035; Francis (1992), *Focus on Growth Factors*, 3(2):4-10, publicado por Mediscript, Mountain Court, Friern Barnet Lane, Londres N20 OLD, R.U.; documentos EP 0 154 316; EP 0 401 384; WO 92/16221; WO 95/34326; WO 95/13312; WO 96/11953; WO 96/19459 y WO 96/19459 y las otras publicaciones citadas en el presente documento que se refieren a pegilación.

En determinadas realizaciones, la pegilación también puede llevarse a cabo específicamente usando polímeros solubles en agua que tienen al menos un grupo hidroxilo reactivo (por ejemplo polietilenglicol). En determinadas realizaciones, el polímero soluble en agua puede hacerse reaccionar con un grupo de activación, formando de ese modo un "elemento de unión activado" útil en la modificación de diversas proteínas. Los elementos de unión activados pueden ser monofuncionales, bifuncionales o multifuncionales.

Los grupos de activación que pueden usarse para unir el polímero soluble en agua a dos o más proteínas incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: sulfona, maleimida, sulfhidrido, tiol, triflato, tresilato, azidirina, oxirano y 5-piridilo. Los reactivos útiles que tienen un grupo sulfona reactivo que pueden usarse en los métodos incluyen, sin limitación, clorosulfona, vinilsulfona y divinilsulfona. Estos derivados de PEG normalmente son estables frente a hidrólisis durante periodos prolongados en entornos acuosos a pH de aproximadamente 11 o menos y pueden formar enlaces con moléculas para formar conjugados que también son hidrolíticamente estables. Los derivados homobifuncionales útiles incluyen, pero no se limitan a, PEG-bis-clorosulfona y PEG-bisvinilsulfona (véase el documento WO 95/13312).

El documento WO 97/04003 enseña métodos de obtención de elementos de unión activados por sulfona mediante la obtención de un compuesto que tiene un grupo hidroxilo reactivo y la conversión del grupo hidroxilo en un aceptor de Michael reactivo para formar un elemento de unión activado, con tetrahidrofurano como disolvente para la conversión. La solicitud también enseña un procedimiento para purificar los elementos de unión activados, que utiliza cromatografía de interacción hidrófoba para separar los elementos de unión basándose en el tamaño y la funcionalidad del grupo terminal.

Como ejemplo, los derivados modificados químicamente de una molécula pueden proporcionar ventajas tales como estabilidad aumentada, tiempo aumentado en circulación o inmunogenicidad disminuida (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.179.337). Los restos químicos para derivatización pueden seleccionarse de polímeros solubles en agua tales como, pero no se limitan a, polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico) y similares. Según determinadas realizaciones, los polipéptidos pueden modificarse en posiciones aleatorias dentro de la molécula, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o más restos químicos unidos.

En determinadas realizaciones, puede desearse específicamente una proteína modificada químicamente en el extremo N-terminal. Usando polietilenglicol como ejemplo de las presentes composiciones, en determinadas realizaciones, puede seleccionarse de una variedad de moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de polietilenglicol con respecto a moléculas de proteína (o péptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación que va a realizarse y el método de obtención de la proteína pegilada en el extremo N-terminal seleccionada. En determinadas realizaciones, el método de obtención de la preparación pegilada en el extremo N-terminal (es decir, la separación de este resto de otros restos monopegilados si es necesario) puede ser mediante la purificación del material pegilado en el extremo N-terminal de una población

de moléculas de proteína pegiladas. En determinadas realizaciones, la modificación química selectiva en el extremo N-terminal puede llevarse a cabo mediante alquilación reductora, que se aprovecha de la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al extremo N-terminal) disponibles para la derivatización en una proteína particular. En determinadas condiciones de reacción apropiadas, se logra la derivatización sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo N-terminal con un grupo carbonilo que contiene polímero.

Formas polivalentes

Las técnicas para la formación de formas polivalentes incluyen, pero no se limitan a, reticulación fotoquímica (por ejemplo, exposición a luz ultravioleta), reticulación química (por ejemplo, con moléculas de elemento de unión bifuncionales tales como polietilenglicol) y mutagénesis (por ejemplo, introducción de residuos de cisteína adicionales).

Pueden construirse formas polivalentes acoplado químicamente al menos una molécula original y otro resto con un elemento de unión clínicamente aceptado (por ejemplo, un polímero soluble en agua). En principio, el elemento de unión normalmente no debe conferir inmunogenicidad nueva. En determinadas realizaciones, el elemento de unión normalmente tampoco debe alterar, en virtud de los nuevos residuos de aminoácido, la hidrofobicidad y el equilibrio de carga de la estructura, que afecta a su biodistribución y aclaramiento. Puede usarse una variedad de elementos de reticulación químicos dependiendo de qué propiedades del dímero proteico se deseen. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los elementos de reticulación pueden ser cortos y relativamente rígidos o más largos y más flexibles, pueden ser biológicamente reversibles y pueden proporcionar inmunogenicidad reducida o semivida farmacocinética más larga.

En determinadas realizaciones, las moléculas se unen a través del extremo amino-terminal mediante una síntesis de dos etapas. En la primera etapa, una molécula se modifica químicamente en el extremo amino terminal para introducir un tiol protegido, que tras la purificación se desprotege y se usa como punto de unión para la conjugación específica de sitio a través de una variedad de elementos de reticulación cruzada con una segunda molécula. Las reticulaciones en el extremo amino terminal incluyen, pero no se limitan a, un puente disulfuro, uniones de tioéter usando elementos de reticulación alifáticos, bifuncionales, de cadena corta, y uniones de tioéter con elementos de reticulación de polietilenglicol bifuncionales, de longitud variable ("*mancuemas*" de PEG). También englobados por la síntesis de dímeros de tipo *mancuema* de PEG está un subproducto de tal síntesis, denominado una "*semimancuema*". Una *semimancuema* incluye, pero no se limita a, un monómero acoplado a PEG bifuncional lineal con un extremo terminal de polímero libre. Alternativamente, en determinadas realizaciones, las moléculas pueden reticularse directamente a través de una variedad de técnicas de reticulación homobifuncionales específicas de amina que incluyen reactivos tales como, pero sin limitarse a: dianhídrido dietilentriaminopentaacético (DTPA), p-benzoquinona (pBQ) o bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS³) así como otros conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, también es posible tiolar una molécula directamente con reactivos tales como iminotiolano en presencia de una variedad de elementos de reticulación específicos de tiol, bifuncionales, tales como PEG-bismaleimida y lograr dimerización y/o *mancuemas* en un procedimiento de una etapa.

En determinadas realizaciones, los polímeros solubles en agua para esta forma polivalente pueden ser, basándose en los monómeros enumerados en el presente documento, homopolímeros, copolímeros al azar o de bloque, terpolímeros de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos. El polímero puede ser de cualquier longitud o peso molecular, pero estas características pueden afectar a las propiedades biológicas. Los pesos moleculares promedio de polímero particularmente útiles para disminuir las tasas de aclaramiento en aplicaciones farmacéuticas normalmente están en el intervalo de 2.000 a 35.000 daltons. Además, en determinadas realizaciones, la longitud del polímero puede variarse para optimizar o conferir la actividad biológica deseada.

En determinadas realizaciones, una molécula bivalente puede incluir dos repeticiones en tándem de moléculas originales separadas por una región de elemento de unión polipeptídico. El diseño de los elementos de unión polipeptídicos puede ser similar en diseño a la inserción de secuencias de bucle cortas entre dominios en el diseño *de novo* de proteínas (Mutter (1988), TIBS, 13:260-265 y Regan y DeGrado (1988), Science, 241:976-978). Se han ensamblado varios constructos de elemento de unión diferentes y se ha mostrado que son útiles para formar anticuerpos de cadena sencilla; los elementos de unión más funcionales normalmente varían en tamaño desde 12 hasta 25 aminoácidos (aminoácidos que tienen grupos laterales no reactivos, por ejemplo, alanina, serina y glicina) que juntos constituyen una secuencia hidrófila, tienen algunos residuos cargados de manera opuesta para potenciar la solubilidad y son flexibles (Whitlow y Filpula (1991), Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2:97-105; y Brigido *et al.* (1993), J. Immunol., 150:469-479). Se ha demostrado que un elemento de unión adecuado para anticuerpos de cadena sencilla es eficaz para producir una forma dimerica del sTNFR-11 humano (Neve *et al.* (1996), Cytokine, 8(5):365-370).

En determinadas realizaciones, también pueden formarse formas polivalentes usando variantes de sustitución. En determinadas realizaciones, pueden modificarse moléculas originales para formar dímeros o multímeros mediante mutagénesis dirigida al sitio para crear residuos de cisteína no emparejados para la formación de puentes disulfuro entre cadenas.

Adicionalmente, en determinadas realizaciones, una molécula original puede acoplarse químicamente a biotina y

entonces puede permitirse que el conjugado resultante se una a avidina, dando como resultado moléculas parentales/biotina/avidina tetravalentes. En determinadas realizaciones, la molécula original también puede acoplarse covalentemente a dinitrofenol (DNP) o trinitrofenol (TNP) y los conjugados resultantes pueden precipitarse con anti-DNP o anti-TNP-IgM para formar conjugados decaméricos.

5 En determinadas realizaciones, también pueden producirse proteínas de fusión recombinantes en las que cada molécula quimérica recombinante tiene una secuencia de molécula(s) parental(es) fusionada en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal a todos o parte de los dominios constantes, pero al menos a un dominio constante, de la cadena pesada o ligera de la inmunoglobulina humana. En determinadas realizaciones, tras la transcripción y la traducción de un gen quimérico de cadena pesada, o de un gen que contiene la cadena ligera y un gen quimérico de cadena pesada, los productos pueden ensamblarse dando lugar a una única molécula quimérica que tiene una(s) a 10 molécula(s) original(es) mostradas de manera bivalente. Detalles adicionales relacionados con la construcción de tales moléculas quiméricas se dan a conocer, por ejemplo, en la patente estadounidense 5.116.964, documentos WO 89/09622, WO 91/16437, WO 97/23614 y EP 315062.

Composiciones farmacéuticas

15 A menos que se indique otra cosa, todas las afirmaciones relacionadas con composiciones farmacéuticas en esta memoria descriptiva se refieren a composiciones que comprenden una combinación de agonista del receptor de EPO e inhibidor de IL-1.

20 En determinadas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un diluyente, portador, solubilizante, emulsionante, conservante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, las moléculas terapéuticas pueden formularse juntas o envasarse juntas en un kit. En determinadas realizaciones, la composición puede estar en forma líquida o liofilizada y comprende un diluyente (tampones Tris, acetato o fosfato) que tienen diversos valores de pH y fuerzas iónicas, solubilizante tal como Tween o Polisorbato, portadores tales como albúmina sérica humana o gelatina, conservantes tales como timerosal o alcohol bencílico, y antioxidantes tales como ácido ascórbico o metabisulfito de sodio. También se engloban, en 25 determinadas realizaciones, composiciones que comprenden cualquiera de las moléculas terapéuticas modificadas con polímeros solubles en agua para aumentar la solubilidad o la estabilidad. En determinadas realizaciones, las composiciones también pueden comprender la incorporación de cualquiera de las moléculas terapéuticas en liposomas, microemulsiones, micelas o vesículas para la administración controlada a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

30 Específicamente, en determinadas realizaciones, las composiciones en el presente documento pueden comprender la incorporación en matrices poliméricas tales como hidrogeles, siliconas, polietilenos, copolímeros de etilenoacetato de vinilo o polímeros biodegradables. Los ejemplos de hidrogeles incluyen, pero no se limitan a, polihidroxiálquilmacrilatos (p-HEMA), poliácridamida, polimetacrilamida, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico) y diversos complejos de polielectrolitos. Los ejemplos de polímeros biodegradables incluyen, pero no se limitan a, 35 poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA, poliamidas y copolímeros de poliamidas y poliésteres. Otras formulaciones de liberación controlada incluyen, pero no se limitan a, microcápsulas, microesferas, complejos macromoleculares y perlas poliméricas que pueden administrarse mediante inyección.

40 La selección de una composición particular dependerá de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, el estado que está tratándose, la vía de administración y los parámetros farmacocinéticos deseados. Se encuentra un estudio más amplio de componentes adecuados para composiciones farmacéuticas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. A. R. Gennaro, ed. Mack, Easton, PA (1980).

45 En determinadas realizaciones, una cantidad o cantidades eficaces de las moléculas terapéuticas dependerán, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración y el estado del paciente. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, el terapeuta puede ajustar la dosificación y modificar la vía de administración según sea necesario para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación diaria típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 mg/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En determinadas realizaciones, un médico puede administrar la composición o composiciones hasta que se alcanza una dosificación que logra el aumento deseado en el hematocrito o la mejora clínica del trastorno de la sangre.

50 En determinadas realizaciones, la composición o composiciones pueden administrarse como una dosis única o como dos o más dosis de una o más de las moléculas terapéuticas. Estas dosis pueden consistir en la misma o diferentes cantidades de las moléculas terapéuticas y pueden administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes a través de la misma o diferentes vías de administración. En determinadas realizaciones, la composición puede administrarse como una composición que comprende una cualquiera o cualquier combinación de las moléculas terapéuticas. En determinadas realizaciones, la combinación puede incluir la misma o diferentes 55 cantidades de moléculas terapéuticas. En determinadas realizaciones, la composición o composiciones pueden administrarse como una infusión continua a través de un dispositivo de implantación o catéter. En realizaciones en las que la infusión continua contiene más de una molécula terapéutica, puede contener la misma o diferentes concentraciones de las moléculas terapéuticas.

Puesto que se realizan estudios adicionales, surgirá información con respecto a los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento de diversos estados en diversos pacientes, y el experto habitual, considerando el contexto terapéutico, el tipo de trastorno en tratamiento, la edad y la salud general del receptor, podrá determinar la dosificación apropiada.

5 Las composiciones que van a usarse para la administración *in vivo* normalmente son estériles. En determinadas realizaciones, esto puede llevarse a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando las composiciones se liofilizan, puede realizarse la esterilización usando estos métodos o bien antes de, o bien después de, la liofilización y la reconstitución. En determinadas realizaciones, la composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en disolución.

10 En determinadas realizaciones, las composiciones pueden colocarse en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de disolución intravenosa que tiene un tapón que puede perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica.

15 La vía de administración de las composiciones es de acuerdo con métodos conocidos incluyendo, pero sin limitarse a, administración o inyección oral, nasal, pulmonar, rectal o infusión por vía subcutánea, vía intravenosa, vía intraperitoneal, vía intracerebral (intraparenquimatosa), vía intracerebroventricular, vía intramuscular, vía intraocular, vía intraarterial o vía intralesional, o mediante sistemas de liberación sostenida o un dispositivo de implantación que puede incluir opcionalmente el uso de un catéter. En determinadas realizaciones, las composiciones pueden administrarse de manera continua mediante infusión, inyección en bolo o mediante un dispositivo de implantación.

20 En determinadas realizaciones, las composiciones pueden administrarse localmente a través de la implantación en la zona afectada de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido la molécula o moléculas terapéuticas. En determinadas realizaciones, cuando se usa un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de las composiciones puede ser directamente a través del dispositivo a través de bolo, o a través de administración continua, o a través de catéter usando infusión continua.

25 En determinadas realizaciones, las composiciones pueden administrarse en una formulación o preparación de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poliésteres, hidrogeles, polilactidas (documentos U.S. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, Biopolymers, 22: 547-556 [1983]), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 [1981] y Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 [1982]), acetato de etilenvinilo (Langer *et al.*, citado anteriormente) o poli(ácido D(-)-3-hidroxibutírico) (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir, pero no se limitan a, liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de diversos métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Eppstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 [1985]; documento EP 36.676; EP 30 88.046; EP 143.949).

35 En determinados aspectos, puede ser deseable usar composiciones de una manera *ex vivo*. En este caso, se exponen células, tejidos u órganos que se han extraído del paciente a las composiciones, tras lo cual las células, tejidos y/u órganos se implantan posteriormente de nuevo en el paciente.

40 En determinados aspectos, las composiciones pueden administrarse a través de la implantación en pacientes de determinadas células que se han modificado por ingeniería genética, usando métodos conocidos en la técnica, para expresar y secretar los polipéptidos, fragmentos, variantes o derivados. En determinados aspectos, tales células pueden ser células animales o humanas y pueden derivarse del propio tejido del paciente o de otra fuente, o bien humana o bien no humana. En determinados aspectos, las células pueden ser inmortalizadas. Sin embargo, con el fin de disminuir la probabilidad de una respuesta inmunológica, en determinados aspectos, las células pueden 45 encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación normalmente son membranas o receptáculos poliméricos semipermeables, biocompatibles, que permiten la liberación del/de los producto(s) proteico(s) pero evitan la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

50 Los métodos usados para la encapsulación en membrana de células son conocidos para el experto en la técnica, y la preparación de células encapsuladas y su implantación en pacientes pueden llevarse a cabo sin experimentación excesiva. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.892.538; 5.011.472; y 5.106.627. Un sistema para encapsular células vivas se describe en el documento PCT WO 91/10425 (Aebischer *et al.*). Las técnicas para formular una variedad de otros productos de administración sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, partículas o perlas bioerosionables, también se conocen por aquellos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.653.975 (Baetge *et al.*, CytoTherapeutics, Inc.). En determinados 55 aspectos, las células, con o sin encapsulación, pueden implantarse en tejidos u órganos corporales adecuados del paciente.

Cuando se administran por vía parenteral, las proteínas pueden eliminarse rápidamente de la circulación y pueden

provocar por tanto actividad farmacológica relativamente corta. Por consiguiente, pueden usarse inyecciones frecuentes de dosis relativamente grandes de proteínas bioactivas para mantener la eficacia terapéutica con este método de administración. Se conoce que proteínas modificadas mediante la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona o poliprolina, muestran semividas sustancialmente más largas en sangre tras inyección intravenosa que las proteínas no modificadas correspondientes [Abuchowski *et al.*, En: "Enzymes as Drugs", Holcenberg *et al.*, eds. Wiley-Interscience, Nueva York, NY, 367-383 (1981), Newmark *et al.*, J. Appl. Biochem. 4:185-189 (1982) y Katre *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1487-1491 (1987)]. Tales modificaciones también pueden aumentar la solubilidad de la proteína en disolución acuosa, eliminar o disminuir la agregación, potenciar la estabilidad física y química de la proteína, y reducir enormemente la inmunogenicidad y antigenicidad de la proteína. Como resultado, en determinadas realizaciones, la actividad biológica *in vivo* deseada puede lograrse mediante la administración de tales aductos de polímero-proteína menos frecuentemente o en dosis inferiores que la proteína no modificada. En determinados aspectos, pueden usarse inhibidores de IL-1 solos o con uno o más factores hematopoyéticos adicionales u otras moléculas terapéuticas, tales como EPO (Epogen®), nueva proteína estimulante de la eritropoyesis (NESP, ARANESP™), G-CSF (Neupogen®) y derivados de los mismos, GM-CSF, CSF-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-18BP, inhibidor de IL-18 (por ejemplo, anticuerpo frente a IL-18), inhibidor de interferón gamma (IFN- γ) (por ejemplo, anticuerpo frente a IFN- γ), IGF-1 o LIF (factor inhibidor leucémico) en el tratamiento de trastornos hematopoyéticos.

En determinadas realizaciones, también puede usarse el tratamiento con un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de EPO según la invención para potenciar la recuperación hematopoyética tras pérdida de sangre aguda.

Ensayos

Para someter a prueba compuestos adecuados para el tratamiento para aumentar el nivel de hematocrito, puede emplearse cualquier ensayo o protocolo *in vivo* que someta a prueba tal actividad. Los ejemplos de tales ensayos y protocolos *in vivo* están incluidos en la solicitud de patente internacional WO 00/24893. Los expertos en la técnica conocen ensayos adecuados.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar más completamente la invención, pero no se interpretan como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

La administración de un análogo de IL-1ra aumenta los niveles de hematocrito

En un estudio multicéntrico, doble ciego, de determinación de la dosis, sujetos con artritis reumatoide activa grave o muy grave (N=472) recibieron inyecciones subcutáneas diarias durante 6 meses de placebo, 30, 75 ó 150 mg de un análogo de IL-1ra no glicosilado, recombinante ("anakinra"). Véase la figura 1 para comprobar la historia clínica y los datos demográficos de nivel inicial por grupo de tratamiento. Anakinra es una forma no glicosilada de IL-1ra humana que se obtiene de manera recombinante en *E. coli*.

Se inyectó anakinra a concentraciones de o bien 30, o bien 75 o bien 150 mg/ml de anakinra purificada en disolución en suspensión. La disolución en suspensión contenía cloruro de sodio 140 mM, citrato de sodio 10 mM, polisorbato 80 al 0,1% (p/p), EDTA 0,5 mM y agua estéril para inyección. El placebo consistió en disolución en suspensión. Se almacenaron las disoluciones de anakinra y placebo a temperaturas de entre 20° y 80°C. El pH de todas las disoluciones fue de 6,5.

Se inyectó cada día un volumen total de 1 ml. Los posibles sitios de inyección incluyeron, pero no se limitaron a, la parte delantera del muslo, el abdomen por encima del ombligo y la parte trasera de la parte superior del brazo. Se recomendó que los sujetos cambiaran el sitio de inyección. Se instruyó a los sujetos para que se inyectaran la disolución de estudio a la misma hora del día durante las 24 semanas, preferiblemente por la tarde/noche.

Se evaluó el hematocrito en el nivel inicial y tras 24 semanas de la terapia con anakinra. Se evaluó la diferencia en el cambio con respecto al nivel inicial en la semana 24 en el hematocrito (porcentajes en volumen) entre el grupo con anakinra grupo reunido y el grupo con placebo a través de la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney (E.L. Lehmann, Nonparametrics: Statistical Methods Based on Ranks, 1975) y se confirmó con una prueba t de dos muestras.

El hematocrito medio de los sujetos tratados con anakinra aumentó en 0,28 porcentajes en volumen a lo largo de seis meses, mientras que el hematocrito medio de los sujetos tratados con placebo disminuyó en 0,867 porcentajes en volumen a lo largo del mismo periodo de tiempo (figura 2).

Ejemplo 2

La administración de anakinra mejora la anemia

En el estudio del efecto de anakinra sobre los niveles de hematocrito descritos en el ejemplo 1, un subconjunto de sujetos con artritis reumatoide era anémico, tal como se define como niveles de hematocrito inferiores o iguales al

treinta y cuatro por ciento (Pincus *et al.*, Am. J. Med 89:161, 1990), tras el inicio del estudio. Cincuenta (14,2%) de los sujetos tratados con anakinra y trece (10,7%) de los sujetos tratados con placebo se caracterizaron con este grado de anemia (véase la figura 3 para comprobar la historia clínica y los datos demográficos de nivel inicial).

5 Aunque el número de sujetos anémicos en este estudio fue pequeño, más pacientes tratados con anakinra mostraron mejora en los niveles de hematocrito tras veinticuatro semanas de tratamiento que los sujetos que recibieron placebo. La anemia mejoró en los pacientes que tomaban cada una de las tres dosis de IL-1ra (véase la figura 4 para comprobar los resultados).

Ejemplo 3

La administración de anakinra puede mejorar la anemia independientemente de la enfermedad articular

10 En el estudio del efecto de la administración de anakinra sobre la anemia descrito en el ejemplo 2, tres de los siete pacientes tratados con anakinra con mejora de más que o igual a seis porcentajes en volumen en los niveles de hematocrito no cumplieron los criterios de respuesta ACR20 (figuras 5 y 6). ACR20 define que un sujeto ha mejorado si se cumplen los siguientes criterios: > 20% de disminución con respecto al nivel inicial en el número de articulaciones sensibles/dolorosas; > 20% de disminución con respecto al nivel inicial en el número de articulaciones hinchadas; y > 20% de disminución con respecto al nivel inicial en 3 de los siguientes 5 criterios: 1) evaluación del sujeto de la actividad de la enfermedad; 2) evaluación del investigador de la actividad de la enfermedad; 3) evaluación del sujeto del dolor; 4) puntuación de incapacidad del Cuestionario de Evaluación de Salud (HAQ); o 5) proteína C reactiva. Por tanto, la terapia con IL-1ra puede mejorar la anemia en sujetos con artritis reumatoide independientemente de su efecto sobre la actividad de la enfermedad articular.

20 Ejemplo 4

En el día 0, se inmunizó a un grupo de ratas Lewis hembra de ocho a diez semanas de edad con una inyección intraperitoneal (i.p.) de polímeros de peptidoglicano-polisacárido (PG-APS) (Lee Laboratories, Grayson, GA) equilibrada hasta una dosis de 15 µg de ramnosa/kg en solución salina al 0,85% (3 mg/rata en un volumen de 0,520 ml, ratas a las que inyectó PG-APS de reserva). Además, en el día 0, otro grupo de ratas Lewis hembra de ocho a diez semanas de edad recibieron inyecciones i.p. de 0,5 ml de solución salina al 0,85% para obtener ratas inyectadas con portador.

Desde el día 0 hasta el día 77, se recogió sangre semanalmente de arterias de la cola en tubos Microtainer recubiertos con EDTA (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY) y se realizaron hemogramas completos (HC) en un sistema de hematología ADVIA 120 (Bayer Corporation, Tarrytown, NY) calibrado para sangre de rata. En el día 42, se dividieron las ratas en dos grupos. Las ratas con concentraciones de hemoglobina (Hb) media inferiores a 12,0 g/dl se denominaron anémicas. Las ratas anémicas que tenían concentraciones de Hb media similares se colocaron en el grupo experimental.

El grupo control consistió en ratas inyectadas con portador que tenían concentraciones de Hb similares entre sí.

35 Comenzando en el día 43, se subdividieron las ratas en el grupo experimental en ocho grupos de tratamiento. Todos los grupos tenían n=5 excepto el grupo portador, que tenía n=6. Se trataron siete grupos con uno de los siguientes regímenes de tratamiento: a) 100 mg/kg de Fc-IL-1ra tres veces por semana, b) 3 µg/kg de ARANESP™ una vez cada dos semanas, c) 6 µg/kg de ARANESP™ una vez cada dos semanas, d) 100 mg/kg de Fc-IL-1ra tres veces por semana y 3 µg/kg de ARANESP™ una vez cada dos semanas, o e) 100 mg/kg de Fc-IL-1ra tres veces por semana y 6 µg/kg de ARANESP™ una vez cada dos semanas, f) 4 mg/kg de PEG sTNR-R 1 tres veces por semana, g) 4 mg/kg de PEG sTNR-R1 tres veces por semana y 3 µg/kg de ARANESP™ una vez cada dos semanas, h) 4 mg/kg de PEG sTNR-R1 tres veces por semana y 6 µg/kg de ARANESP™ una vez cada dos semanas. Se inyectó a un grupo de las ratas experimentales 0,4 ml de disolución de portador con el mismo calendario que los inhibidores de citocina y se alojaron y se les extrajo sangre igual que en todos los grupos experimentales. El periodo de tratamiento duró hasta el día 57.

45 Se obtuvieron datos experimentales de la sangre extraída de la vena de la cola y se analizaron con la máquina de análisis de hemograma completo (HC) ADVIA (Bayer, Inc) el mismo día de la toma de muestras y según el protocolo de fabricación. Se recogió sangre para suero en dispositivos separadores de suero centrífugos, se permitió que se coagulara, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se separó el suero por pipeteo y se colocó en tubos Eppendorf, se almacenó a -80 hasta la entrega a LabCorp, Inc. (Research Park, NC) a través de transporte durante la noche en hielo seco. La sangre recogida para HC se produjo en los días 30, 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63, 66, 70, 77. La sangre recogida para suero se produjo en los días 0, 42, 49, 57, 63, 77. En resumen, una vez comenzado el tratamiento terapéutico, se extrajo sangre de las ratas dos veces a la semana para análisis de HC y una vez a la semana para suero).

55 Todos estos parámetros, excepto las concentraciones de hierro, forman parte de los datos generados por el análisis de "hemograma completo" (HC) que se produjo simultáneamente por el análisis con la máquina Advia ya descrito anteriormente. Las concentraciones de hierro sérico total (HST) y la capacidad total de fijación de hierro de

transferrina se midieron por LabCorp, Inc. (Research Park, NC). La capacidad de fijación de hierro no saturado (CFHNS) se calculó tal como sigue: $CTFH-HST=CFHNS$. (Véase: "Clinical Biochemistry of Domestic Animals" páginas 263-264. Jiro J. Kaneko, Ed., Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers). Se determinó el volumen de la pata tal como se describe en Feige U, *et al.*, Cellular Molecular Life Sciences 57:1457- 1470 (2000).

5 Las ratas del grupo experimental tratadas con Fc-IL-1ra solo tendieron a concentraciones de Hb sérica media y edema de pata medio reducido en comparación con las ratas no tratadas del grupo experimental. La administración de 100 mg/kg de Fc-IL-1ra aumentó las concentraciones de Hb sérica media en 1,8 g/dl con respecto a las concentraciones de Hb sérica media de las ratas no tratadas ($p=0,1$) (véase la figura 7) y redujo los volúmenes de pata medios en 0,4 ml en relación con los volúmenes de pata medios de las ratas no tratadas ($p=0,1$) (véase la figura 8). Las ratas del grupo experimental tratadas con ARANESP™ solo a 3 ó 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mostraron concentraciones de Hb sérica media en comparación con las ratas no tratadas. El tratamiento con 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ solo aumentó las concentraciones de Hb sérica media en 0,4 g/dl con respecto a las concentraciones de Hb sérica media de las ratas no tratadas ($p=0,7$) (véase la figura 7). El tratamiento con 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ARANESP™ solo aumentó las concentraciones de Hb sérica media en 1,3 g/dl con respecto a las concentraciones de Hb sérica media de las ratas no tratadas ($p=0,4$) (véase la figura 7).

10 El tratamiento de ratas del grupo experimental con 100 mg/kg de Fc-IL-1ra y 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ no aumentó significativamente las concentraciones de Hb sérica media en comparación con el tratamiento en 100 mg/kg de Fc-IL-1ra solo. Sin embargo, el tratamiento de ratas del grupo experimental con 100 mg/kg de Fc-IL-1ra y 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ aumentó en más de dos veces las concentraciones de Hb sérica media en comparación con el tratamiento con Fc-IL-1ra o ARANESP™ solos. El tratamiento con 100 mg/kg de Fc-IL-1ra y 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ aumentó las concentraciones de Hb sérica media en 2,2 g/dl más que el aumento a partir del tratamiento con 100 mg/kg de Fc-IL-1ra solo ($p=0,04$) (véase la figura 7). El tratamiento con 100 mg/kg de Fc-IL-1ra y 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ aumentó las concentraciones de Hb sérica media en 2,7 g/dl más que el aumento a partir del tratamiento con 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ solo ($p=0,01$) (véase la figura 7). Por tanto, el aumento total en ratas en las concentraciones de Hb sérica media con respecto a las ratas experimentales no tratadas que resulta del tratamiento con 100 mg/kg de Fc-IL-1ra y 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ fue de 4,0 g/dl. Esto fue mayor que la suma de los aumentos en las concentraciones de Hb sérica media con respecto a las ratas experimentales no tratadas que resulta del tratamiento con 100 mg/kg de Fc-IL-1ra solo (1,8 g/dl) y 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ solo (1,3 g/dl).

20 El tratamiento de ratas del grupo experimental tanto con 100 mg/kg de Fc-IL-1ra como con 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ aumentó el número medio de reticulocitos ($p<0,004$) en comparación con la misma dosis de cualquier tratamiento individual solo y el número de glóbulos rojos (GR) ($p<0,03$) en comparación con la misma dosis de 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ solo (véanse la figuras 9 y 10). El tratamiento de ratas del grupo experimental tanto con 100 mg/kg de Fc-IL-1ra como con 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ también aumentó las concentraciones de hierro sérico total en 44 $\mu\text{g}/\text{dl}$ más que el tratamiento con 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ solo ($p=0,02$) (véase la figura 14). El tratamiento tanto con 100 mg/kg de Fc-IL-1ra como con 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ también aumentó el volumen corpuscular medio en un grado mayor que 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ solo ($p=0,008$) o 100 mg/kg de Fc-IL-1ra solo ($p=0,04$) (véase la figura 11). Este tratamiento también aumentó la HB corpuscular media en un grado mayor que 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ARANESP™ solo ($p=0,03$) o 100 mg/kg de Fc-IL-1ra solo ($p=0,08$) (véase la figura 12).

REIVINDICACIONES

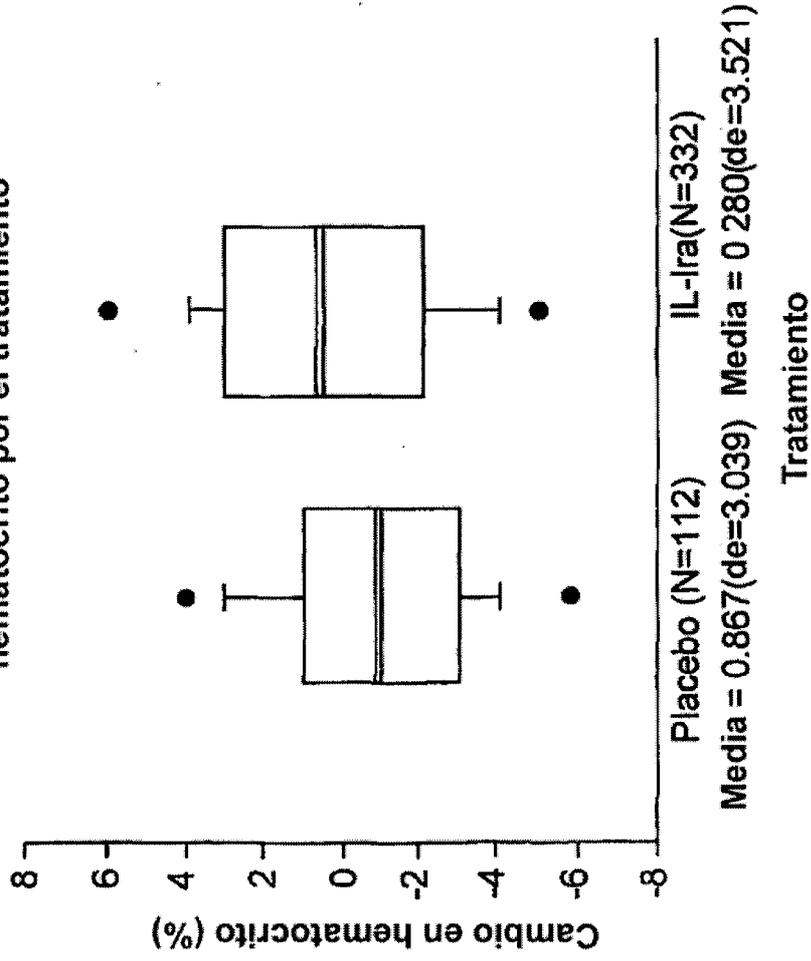
1. Inhibidor de IL-1 y agonista del receptor de eritropoyetina (EPO) para su uso en un método de tratamiento de la anemia en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dichos inhibidor y agonista,
- 5 en donde el inhibidor de IL-1 es la proteína IL-1ra o un derivado o variante de la misma con una homología de secuencia de al menos el 90%, que inhibe la activación de receptores celulares mediante IL-1; y
en donde el agonista del receptor de EPO es EPO, epoyetina alfa, darbepoyetina alfa, un anticuerpo anti-agonista del receptor de EPO o un derivado o variante de los mismos con una homología de secuencia de al menos el 90%, que produce la activación del receptor de EPO.
- 10 2. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento de la anemia eleva el hematocrito en el mamífero.
3. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de IL-1 y el agonista del receptor de EPO se administran en composiciones separadas.
- 15 4. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de IL-1 y el agonista del receptor de EPO se administran en composiciones separadas en diferentes momentos.
5. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de IL-1 y el agonista del receptor de EPO se administran en composiciones separadas al mismo tiempo.
- 20 6. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de IL-1 y el agonista del receptor de EPO se administran en la misma composición.
7. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de IL-1 es anakinra.
8. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el antagonista del receptor de IL-1 es Fc-IL-1ra.
- 25 9. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde se administra Fc-IL-1ra al mamífero dos veces o tres veces por semana, y se administra darbepoyetina alfa al mamífero una vez cada dos semanas.
10. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el trastorno de la sangre tratado es anemia de enfermedad crónica.
- 30 11. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el mamífero padece anemia asociada con una disminución o pérdida de función renal.
12. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el mamífero padece anemia asociada con artritis reumatoide.
- 35 13. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el mamífero padece anemia asociada con terapia mielosupresora.
14. Inhibidor y agonista según la reivindicación 13 para su uso según la reivindicación 1, en donde la terapia mielosupresora comprende fármacos quimioterápicos o antivirales.
15. Inhibidor y agonista según la reivindicación 1 para su uso según la reivindicación 1, en donde el mamífero padece anemia asociada con pérdida de sangre excesiva.
- 40 16. Composición que comprende un inhibidor de IL-1 y un agonista del receptor de EPO, en la que el inhibidor de IL-1 es anakinra o Fc-IL-1ra, y en donde el agonista del receptor de EPO es EPO, epoyetina alfa, darbepoyetina alfa, un anticuerpo anti-agonista del receptor de EPO o un derivado o variante de los mismos con una homología de secuencia de al menos el 90%, que produce la activación del receptor de EPO.
17. Composición según la reivindicación 16, en la que el inhibidor de IL-1 es anakinra.
- 45 18. Composición según la reivindicación 16, en la que el inhibidor de IL-1 es Fc-IL-1ra.
19. Composición según la reivindicación 16, en la que la composición comprende además al menos uno de un diluyente, portador, solubilizador, emulsionante, conservante y adyuvante farmacéuticamente aceptables.

FIG. 1
Historia clínica y datos demográficos
de nivel inicial por grupo de tratamiento

	IL-1ra			
	Placebo (N = 121)	30 mg (N = 119)	75 mg (N = 116)	150 mg (N = 116)
Sexo - n (%)				Total (N = 351)
Machos	36 (29.8)	34 (28.6)	24 (20.7)	24 (20.7)
Hembras	85 (70.2)	85 (71.4)	94 (79.3)	92 (79.3)
				82 (23.4)
				269 (76.6)
Edad (años)	121	119	116	116
n	52.2 (11.9)	53.3 (13.5)	52.6 (12.0)	54.2 (13.9)
Media (DE)				53.4 (13.2)
Duración de AR (años)	121	118	116	116
n	3.7 (2.4)	4.3 (2.2)	4.2 (2.4)	3.9 (2.5)
Media (DE)				4.1 (2.4)
Positivo para factor reumatoide n (%)	84 (69.4)	84 (70.6)	80 (69.0)	80 (69.0)
Erosiones presentes n (%)	90 (74.4)	91 (76.5)	86 (74.1)	80 (69.0)
Uso de FARME previo n (%)	98 (81.0)	84 (79.0)	87 (75.0)	77 (66.4)
Uso de corticosteroides n (%)	48 (39.7)	58 (48.7)	47 (40.5)	48 (41.4)
Uso de AINE n (%)	106 (87.6)	95 (79.8)	97 (83.6)	96 (82.8)
N Número de pacientes aleatorizados				268 (82.1)

FIG. 2

Distribución de cambio con respecto al nivel inicial en el hematocrito por el tratamiento



El hematocrito (Hct) medio de pacientes tratados con anakinra aumentó en el 0,28% en vol. a lo largo de 6 meses, mientras que el Hct medio de pacientes tratados con placebo disminuyó en el 0,867% en vol. a lo largo del mismo periodo de tiempo.

FIG. 3

Historia clínica y datos demográficos
de nivel inicial de pacientes anémicos* por grupo de tratamiento

	IL-Ira			Total (N = 50)
	Placebo (N = 13)	30 mg (N = 17)	75 mg (N = 18)	
Sexo - n (%)				
Machos	1 (7.7)	1 (5.9)	1 (5.6)	2 (4.0)
Hembras	12 (92.3)	16 (94.1)	17 (94.4)	48 (96.0)
Edad (años)				
n	13	17	18	15
Media (DE)	47.7 (13.0)	52.1 (13.1)	47.8 (13.5)	51.2 (13.2)
				50.3 (13.1)
Duración de AR (años)				
n	13	16	18	15
Media (DE)	2.2 (1.6)	4.2 (2.0)	4.2 (2.2)	4.2 (2.3)
				4.2 (2.1)
Positivo para factor reumatoide n (%)				
	10 (76.9)	15 (88.2)	10 (55.5)	14 (93.3)
				39 (78.0)
Erosiones presentes n (%)				
	11 (84.6)	15 (88.2)	16 (88.9)	14 (93.3)
				45 (90.0)
Uso de FARME previo n (%)				
	11 (84.6)	15 (88.2)	14 (77.8)	11 (73.3)
				40 (80.0)
Uso de corticosteroides n (%)				
	5 (38.5)	10 (58.8)	8 (44.4)	6 (40.0)
				24 (48.0)
Uso de AINE n (%)				
	11 (84.6)	12 (70.6)	18 (100)	13 (86.7)
				43 (86.0)

N Número de pacientes aleatorizados

FIG. 4

La terapia con anakinra mejora la anemia en AR
 Número (%) de pacientes anémicos* con
 mejora de hematocrito en la semana 24

Aumento de Hct	Placebo (n=13)	Anakinra 30 mg (n=17)	Anakinra 75 mg (n=18)	Anakinra 150 mg (n=15)	Anakinra Total (n=50)
≥ 3% en vol.	2 (15.4%)	10 (58.8%)	6 (33.3%)	5 (33.3%)	21 (42.0%)
≥ 4% en vol.	1 (7.7%)	5 (29.4%)	4 (22.2%)	3 (20.0%)	12 (24.0%)
≥ 5% en vol.	1 (7.7%)	3 (17.6%)	4 (22.2%)	2 (13.3%)	9 (18.0%)
≥ 6% en vol.	1 (7.7%)	2 (11.8%)	4 (22.2%)	1 (6.7%)	7 (14.0%)

*Pacientes con hematocrito ≤ 34% en el nivel inicial

FIG. 5

Anakinra puede mejorar la anemia en AR independientemente de enfermedad articular
 Número (%) de pacientes anémicos* que son respondedores según ACR20 en la semana 24

Aumento de Hct	Placebo	Anakinra 30 mg	Anakinra 75 mg	Anakinra 150 mg	Anakinra Total
	(n=13)	(n=17)	(n=18)	(n=15)	(n=50)
≥ 3% en vol.	1 (7.7%)	5 (29.4%)	3 (16.6%)	2 (13.3%)	10 (20%)
≥ 4% en vol.	1 (7.7%)	2 (11.8%)	2 (11.1%)	2 (13.3%)	6 (12%)
≥ 5% en vol.	1 (7.7%)	2 (11.8%)	2 (11.1%)	1 (6.7%)	5 (10%)
≥ 6% en vol.	1 (7.7%)	1 (5.9%)	2 (11.1%)	1 (6.7%)	4 (8%)

*Pacientes con hematocrito ≤ 34% en el nivel inicial

FIG. 6

**Anakinra puede mejorar la anemia en AR
independientemente de enfermedad articular
% si pacientes anémicos* que responden según ACR20
con mejora en Hct en la semana 24 ***

Aumento de Hct	Placebo	Anakinra 30 mg	Anakinra 75 mg	Anakinra 150 mg	Anakinra Total
≥ 3% en vol.	1/2 (50%)	5/10 (50%)	3/6 (50%)	2/5 (40%)	10/21 (48%)
≥ 4% en vol.	1/1 (100%)	2/5 (40%)	2/4 (50%)	2/3 (67%)	6/12 (50%)
≥ 5% en vol.	1/1 (100%)	2/3 (67%)	2/4 (50%)	1/2 (50%)	5/9 (56%)
≥ 6% en vol.	1/1 (100%)	1/2 (50%)	2/4 (50%)	1/1 (100%)	4/7 (57%)

* Pacientes con hematocrito ≤ 34% en el nivel inicial

FIG. 7

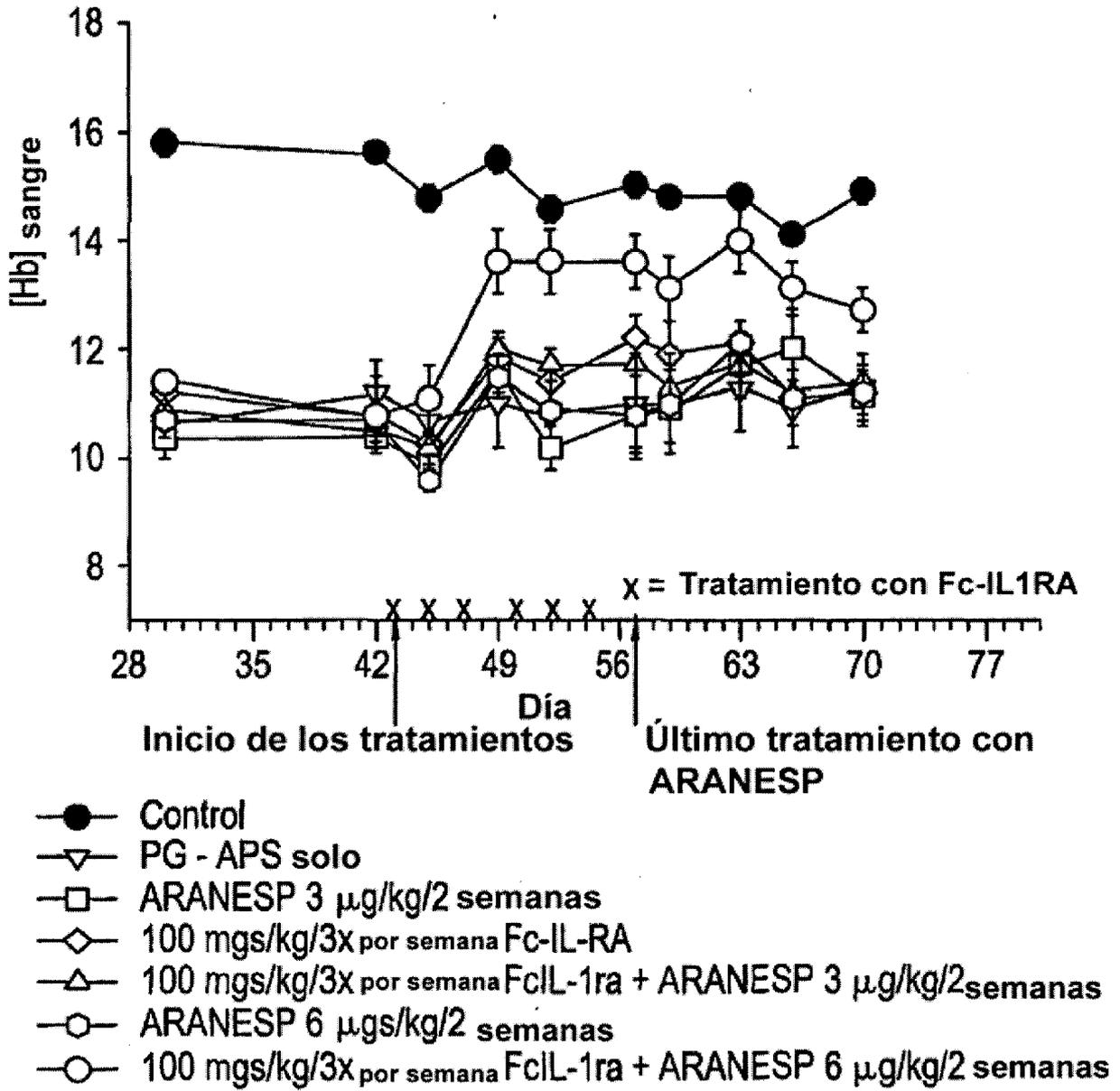
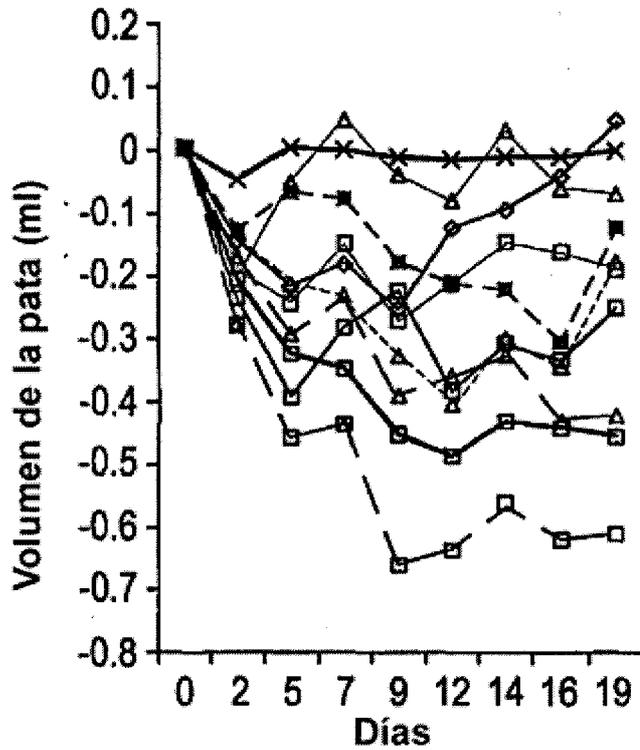


FIG. 8



- x— Portador
- ◇— PG-APS
- NESP 3 ug/kg
- △— NESP 6 ug/kg
- Fc-IL-1ra 100 mg/kg
- - * - Fc-IL-1ra 100 mg/kg + NESP 3 μg/kg
- - △ - Fc-IL-1ra 100 mg/kg + NESP 6 μg/kg
- PEG sTNF-RI 4 mg/kg
- PEG sTNF-RI 4 mg/kg + NESP 3 μg/kg
- △— PEG sTNF-RI 4 mg/kg + NESP 6 μg/kg

FIG. 9

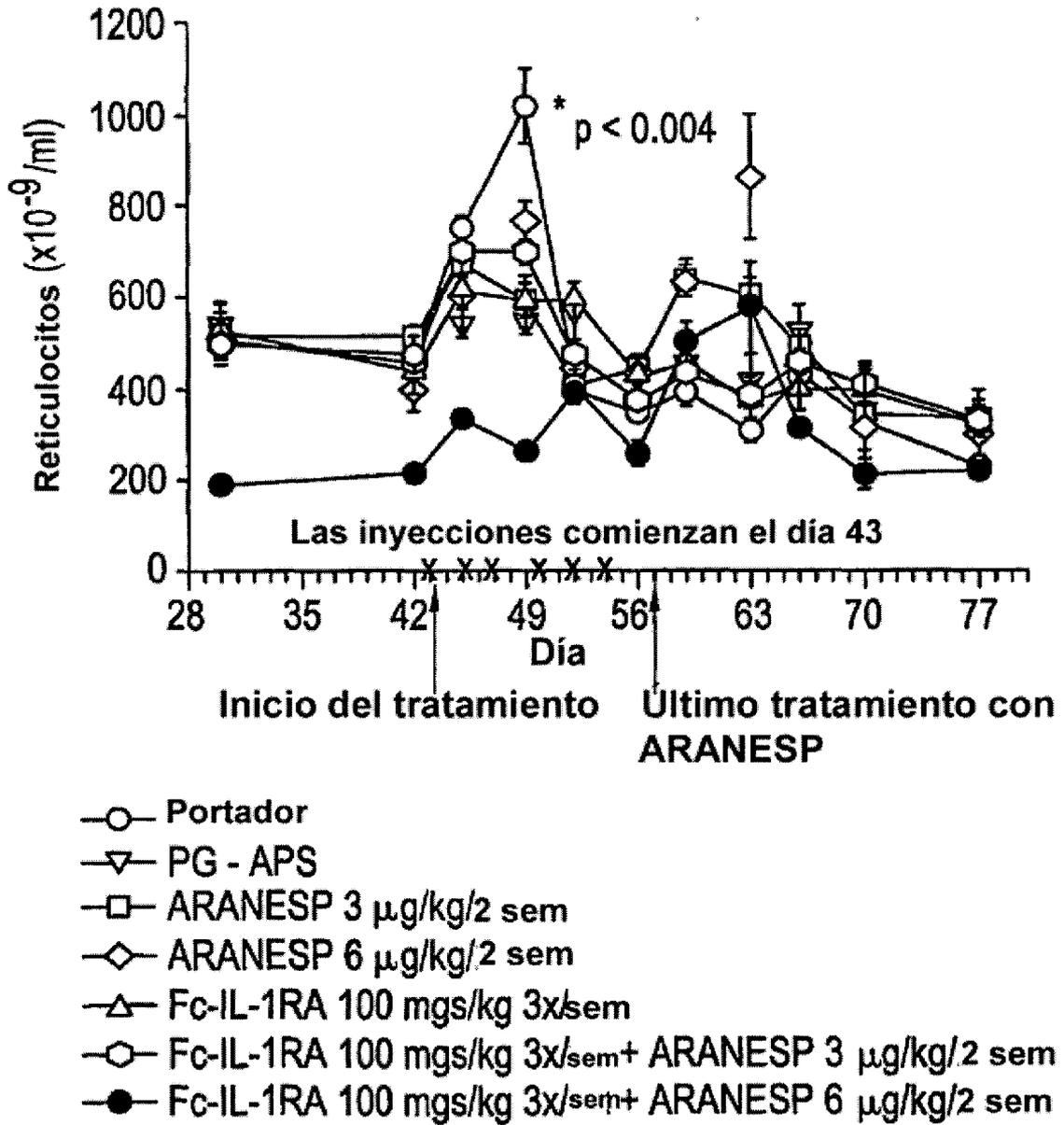


FIG. 10

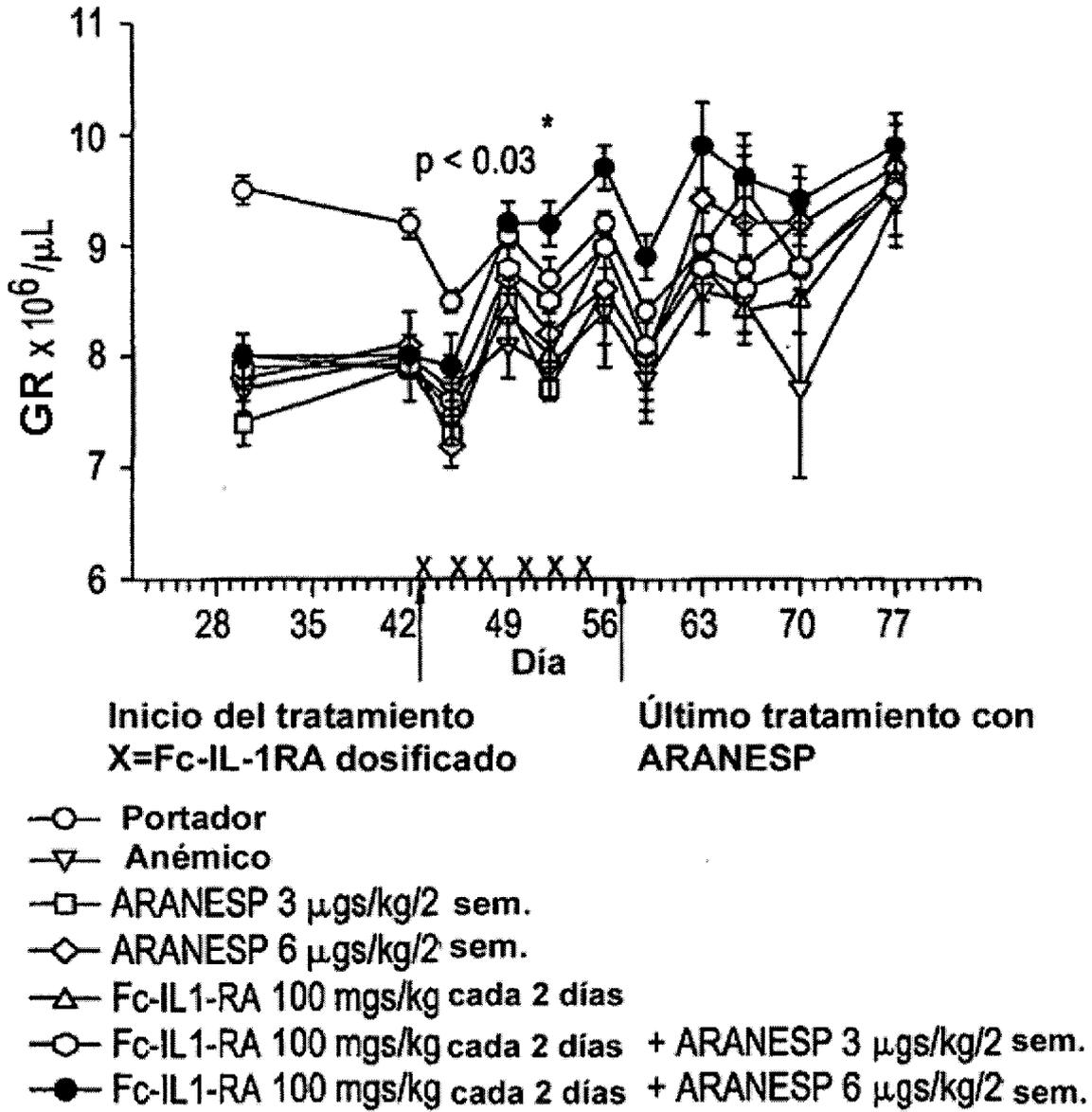
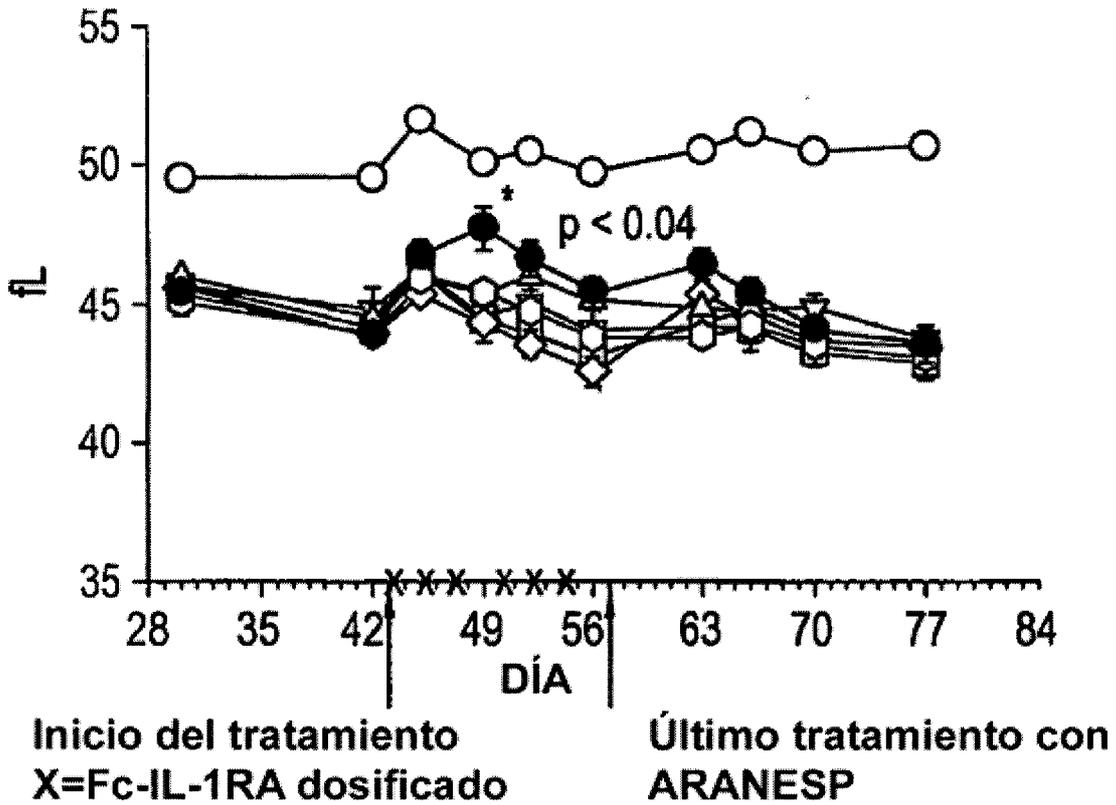


FIG. 11



- Portador
- ▽ PG-APS
- ARANESP 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/2\text{sem.}$
- ◇ ARANESP 6 $\mu\text{g}/\text{kg}/2\text{sem.}$
- △ Fc-IL-1RA 100 mgs/kg 3x/sem.
- Fc-IL-1RA 100 mgs/kg 3x/sem.+ ARANESP 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/2\text{sem.}$
- Fc-IL-1RA 100 mgs/kg 3x/sem.+ ARANESP 6 $\mu\text{g}/\text{kg}/2\text{sem.}$

FIG. 12

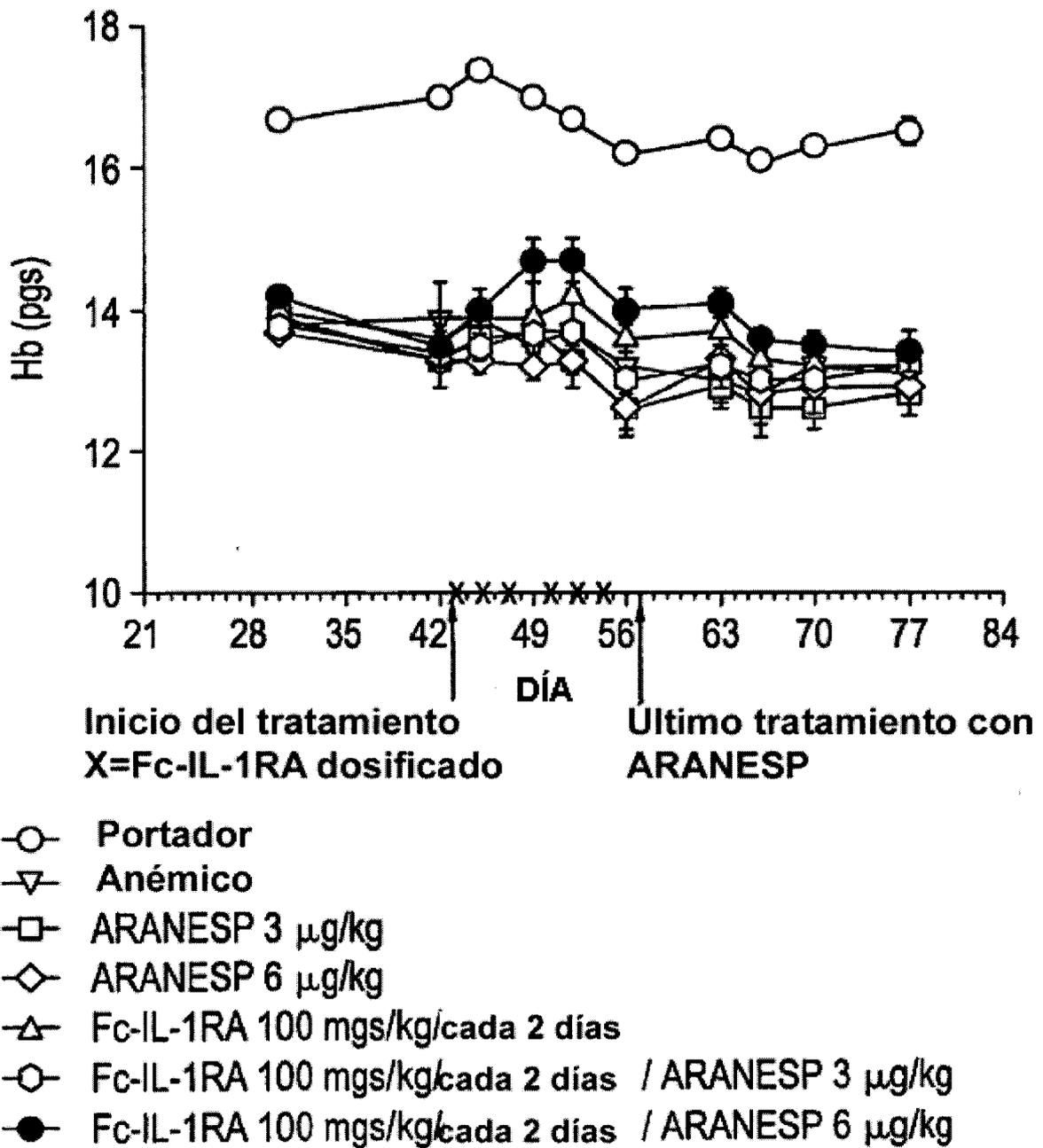
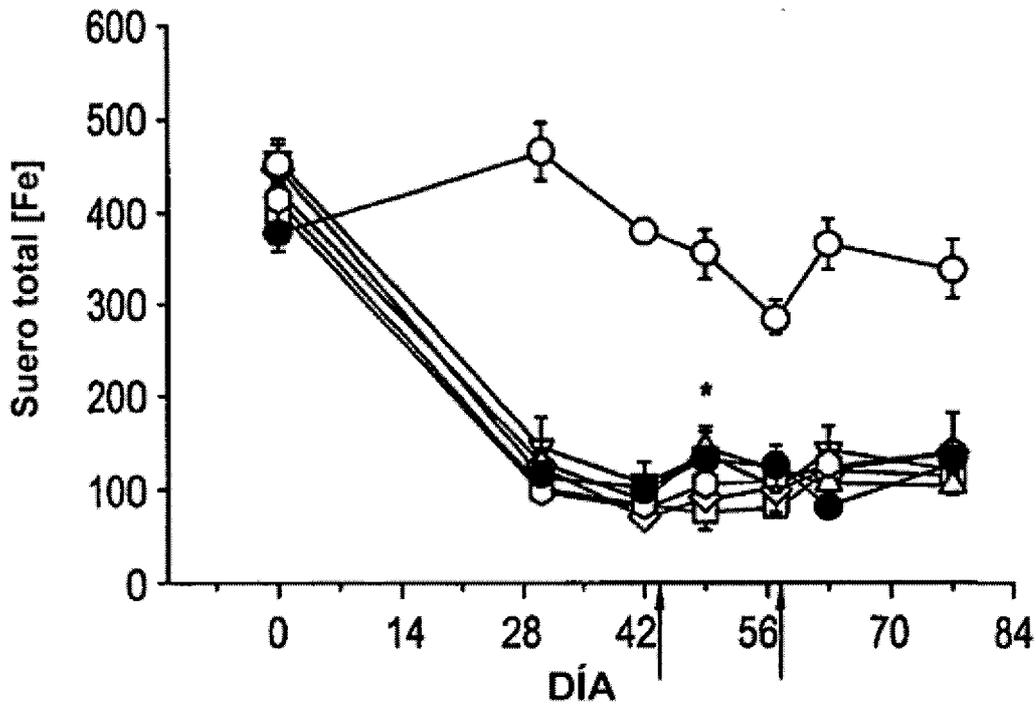


FIG. 13

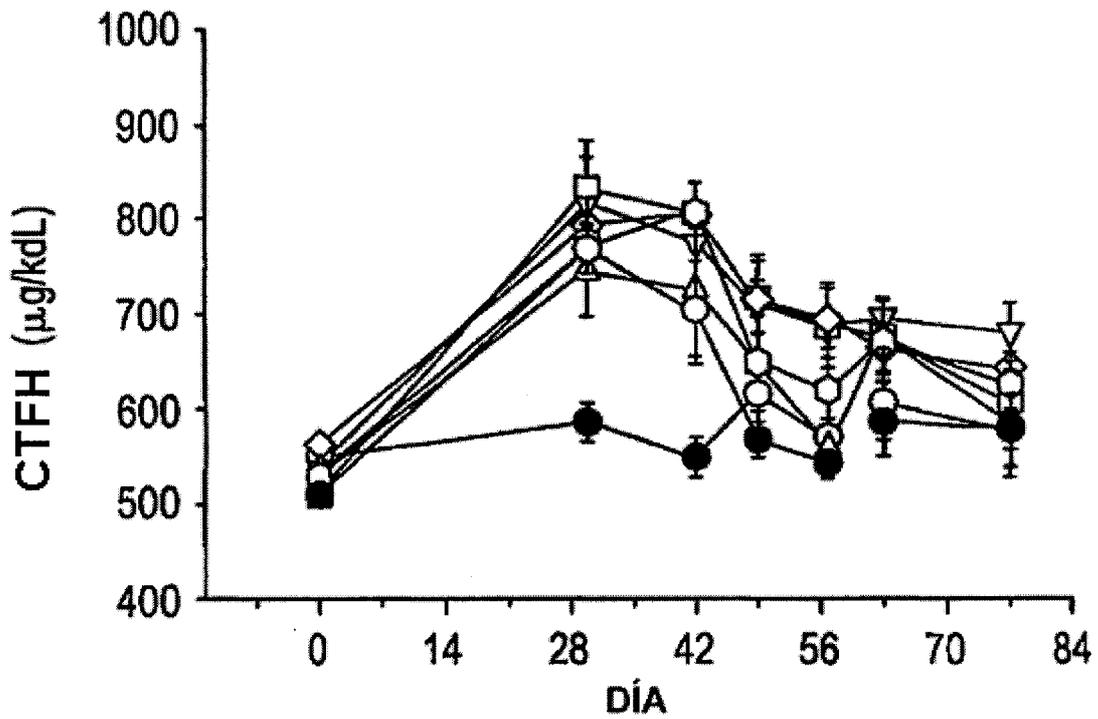


* Fc-IL-RA + ARANESP 6 μ g/kg/2 sem.

$p = 0.02$ comparado con ARANESP 6 μ g/kg/2 sem. solo

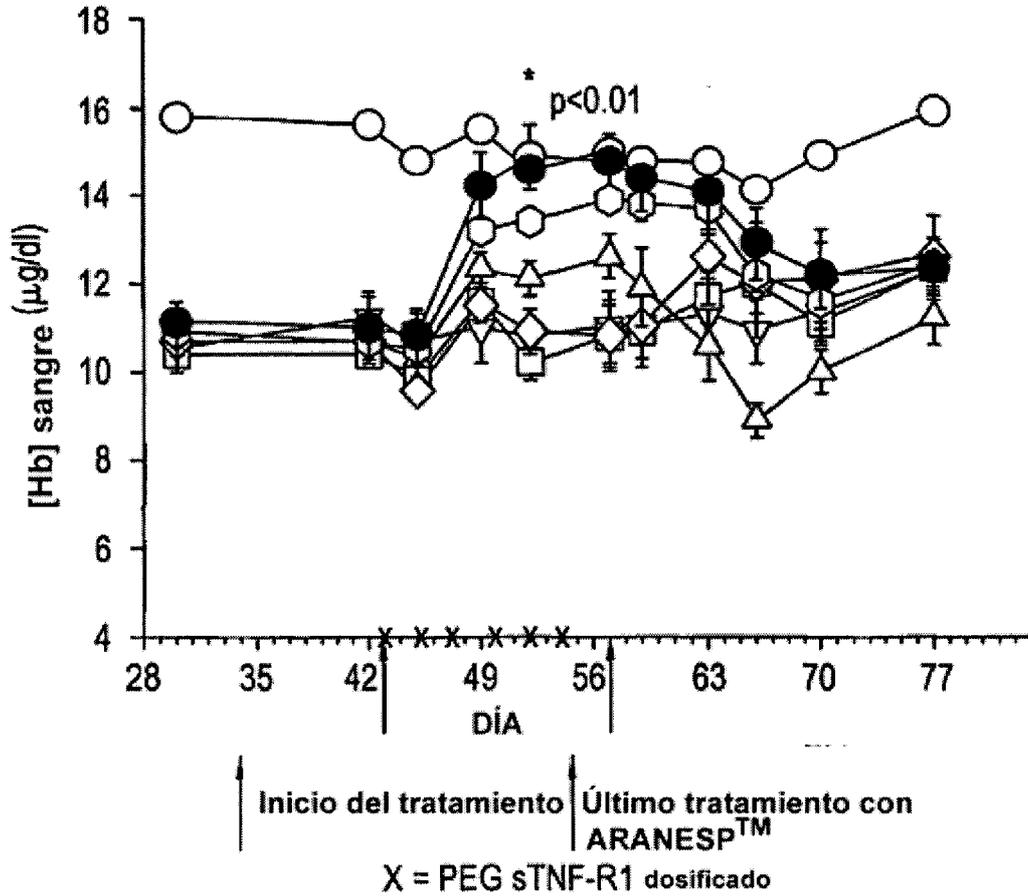
- Control
- ▽ Anémico
- ARANESP 3 mg/kg/2 sem.
- ◇ ARANESP 6 mg/kg/2 sem.
- △ Fc-IL-1RA 100 mgs/kg 3x/sem.
- Fc-IL-1RA 100 mgs/kg 3x/sem. + ARANESP 3 mg/kg/2 sem.
- Fc-IL-1RA 100 mgs/kg 3x/sem. + ARANESP 6 mg/kg/2 sem.

FIG. 14



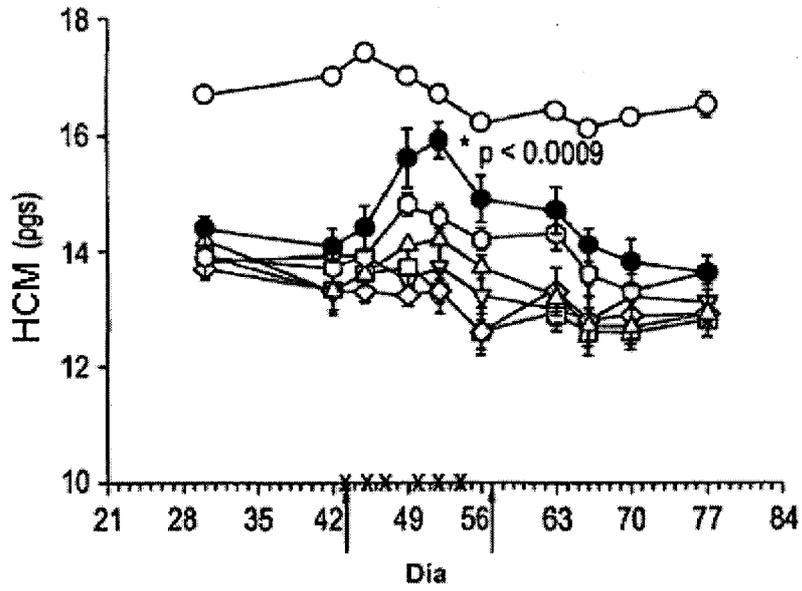
- Control
- ▽ PG-APS
- ARANESP 3 µg/kg/2 sem.
- ◇ ARANESP 6 µg/kg/2 sem.
- △ Fc-IL-1RA 100 mg/kg 3x/sem.
- Fc-IL-1RA + ARANESP 3 µg/kg/2sem.
- Fc-IL-1RA + ARANESP 6 µg/kg/2sem.

FIG. 15



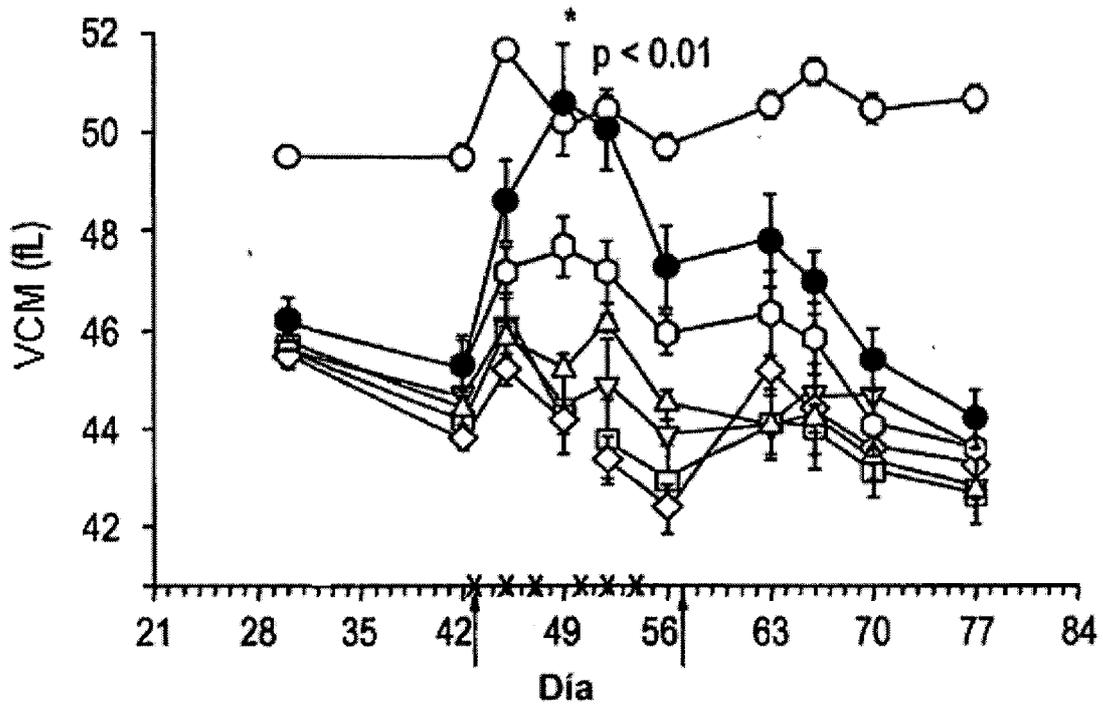
- Portador
- ▽ Anémico
- ARANESP™ 3 µg/kg/2 sem.
- ◇ ARANESP™ 6 µg/kg/2 sem.
- △ PEG sTNF-R1 4 mgs/kg/3x sem.
- PEG sTNF-R1 + ARANESP™ 3 µg/kg
- PEG sTNF-R1 + ARANESP™ 6 µg/kg

FIG. 16A



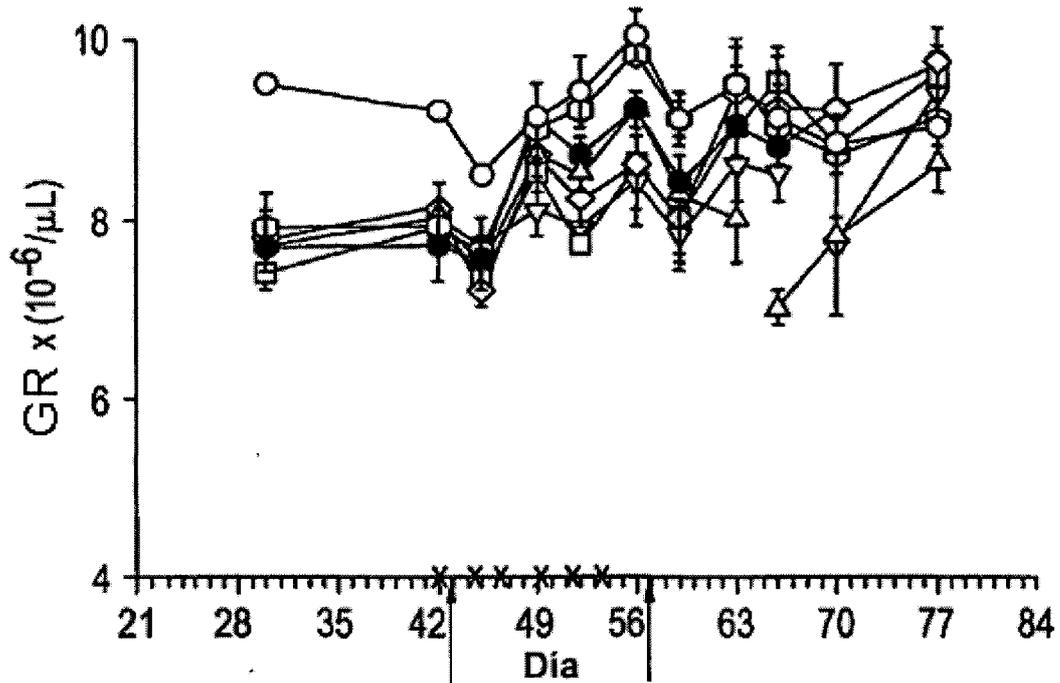
- Portador
- ▽ PG-APS
- ARANESPTM 3 μg/kg/2 sem.
- ◇ ARANESPTM 6 μg/kg/2 sem.
- △ PEG sTNF-R1 4 mgs/kg/3x sem.
- PEG sTNF-R1 + ARANESPTM 3 μg/kg
- PEG sTNF-R1 + ARANESPTM 6 μg/kg

FIG. 16B



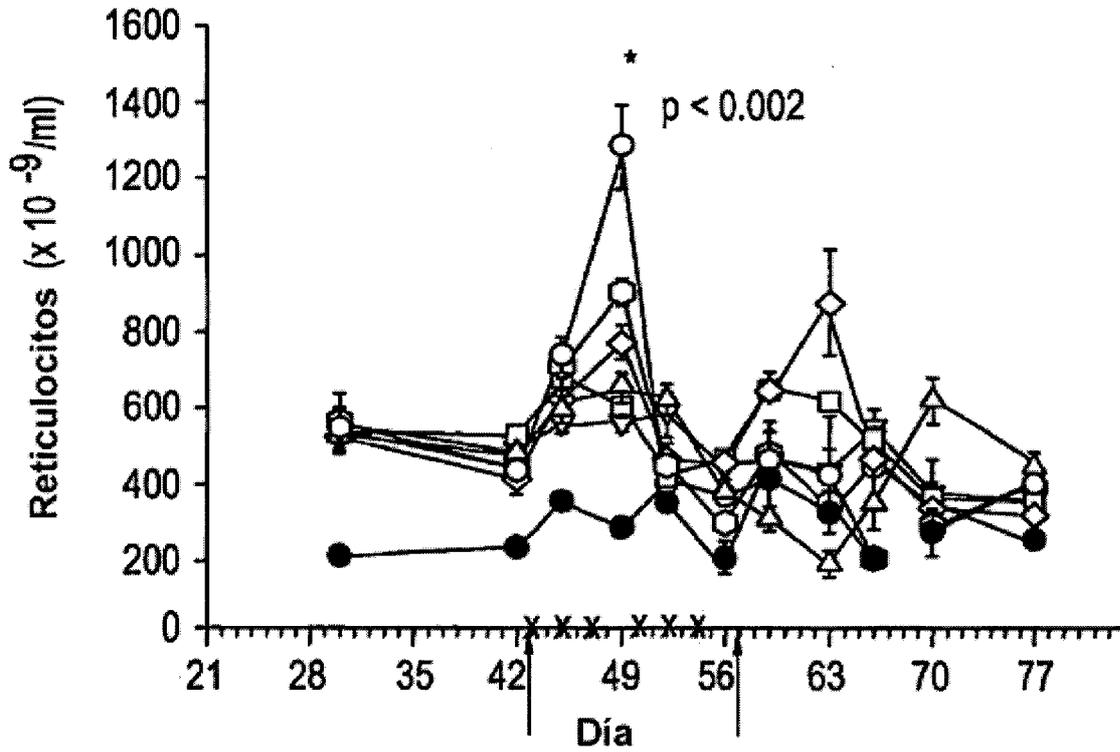
- Portador
- ▽ PG-APS
- ARANESPTM 3 µg/kg/2 sem.
- ◇ ARANESPTM 6 µg/kg/2 sem.
- △ PEG sTNF-R1 4 mgs/kg/3x sem.
- PEG sTNF-R1 + ARANESPTM 3 µg/kg
- PEG sTNF-R1 + ARANESPTM 6 µg/kg

FIG. 17A



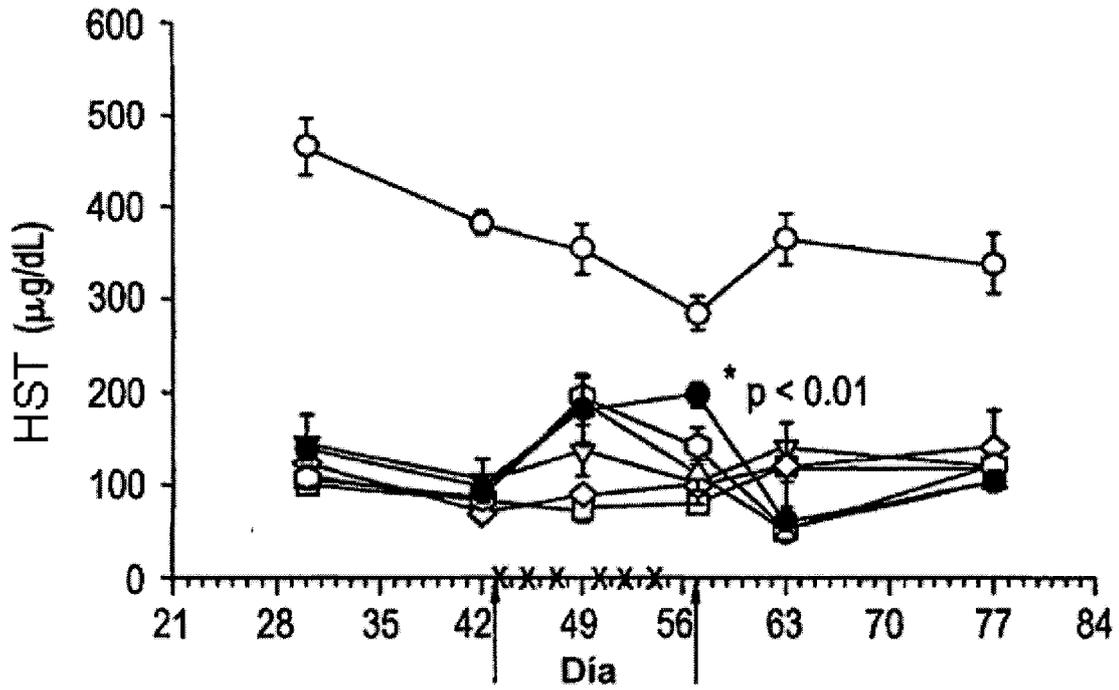
- Portador
- ▽— Anémico
- ARANESPTM 3 μg/kg/2 sem.
- ◇— ARANESPTM 6 μg/kg/2 sem.
- △— PEG sTNF-R1 4 mg/kg/3x sem.
- PEG sTNF-R1 + ARANESPTM 3 μg/kg
- PEG sTNF-R1 + ARANESPTM 6 μg/kg

FIG. 17B



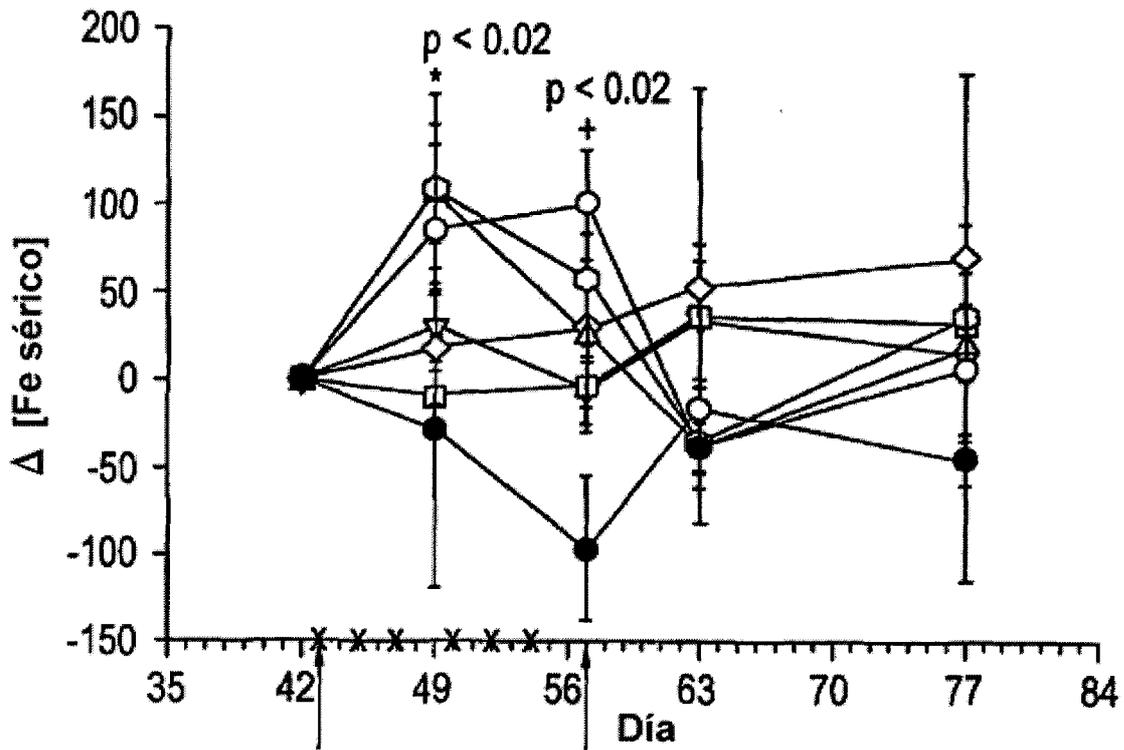
- Portador
- ▽ Anémico
- ARANESP™ 3 μg/kg/2 sem.
- ◇ ARANESP™ 6 μg/kg/2 sem.
- △ PEG sTNF-R1 4 mg/kg/3x sem.
- PEG sTNF-R1 + ARANESP™ 3 μg/kg
- PEG sTNF-R1 + ARANESP™ 6 μg/kg

FIG. 18A



- Portador
- ▽ Anémico
- ARANESPTM 3 µg/kg/2 sem.
- ◇ ARANESPTM 6 µg/kg/2 sem.
- △ PEG sTNF-R1 4 mg/kg/3x sem.
- PEG sTNF-R1 + ARANESPTM 3 µg/kg
- PEG sTNF-R1 + ARANESPTM 6 µg/kg

FIG. 18B



- Portador
- ▽ Anémico
- ARANESPTM 3 μg/kg/2 sem.
- ◇ ARANESPTM 6 μg/kg/2 sem.
- △ PEG sTNF-R1 4 mg/kg/3x sem.
- PEG sTNF-R1 + ARANESPTM 3 μg/kg
- PEG sTNF-R1 + ARANESPTM 6 μg/kg

FIG. 19

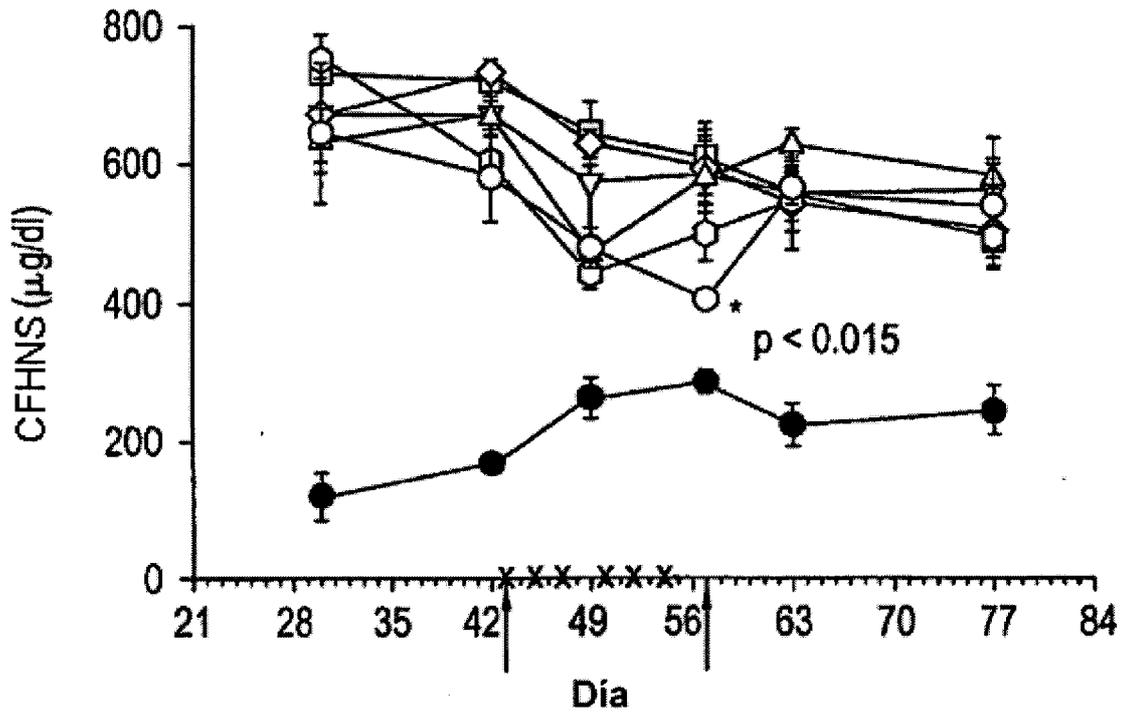
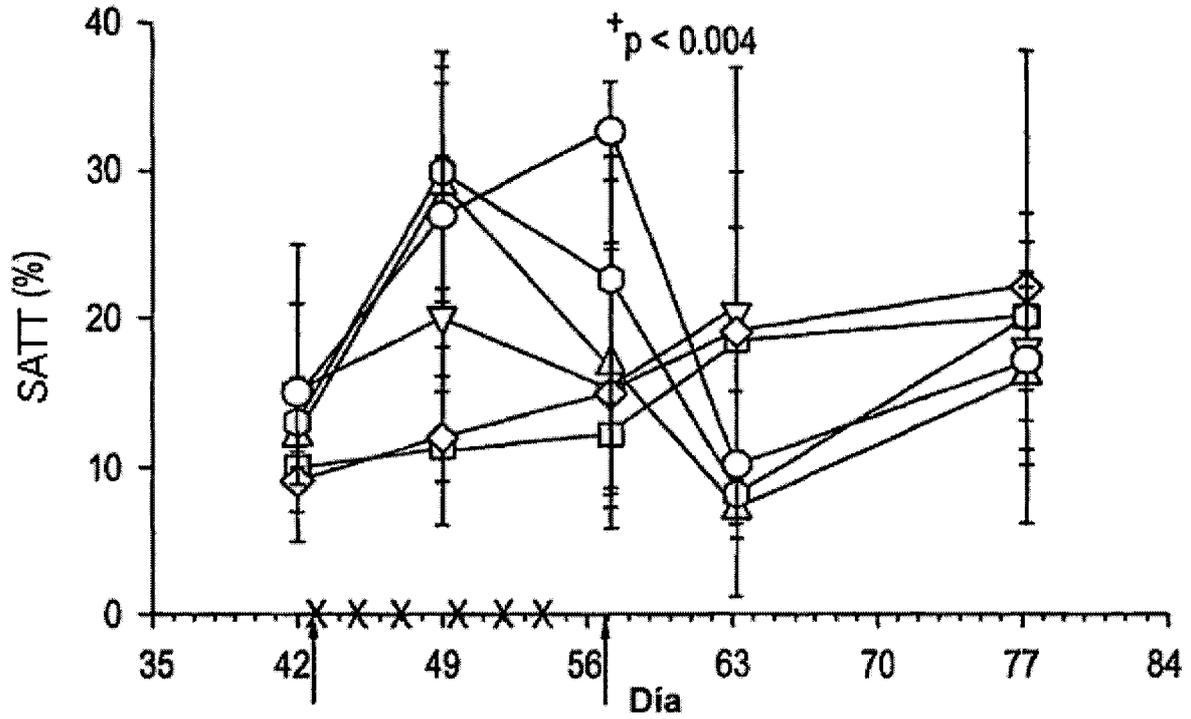


FIG. 20



- ▽— Anémico
- ARANESP™ 3 μg/kg/2 sem.
- ◇— ARANESP™ 6 μg/kg/2 sem.
- △— PEG sTNF-R1 4 mgs/kg/3x sem.
- PEG sTNF-R1 + ARANESP™ 3 μg/kg/2 sem.
- PEG sTNF-R1 + ARANESP™ 6 μg/kg/2 sem.