

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 234**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/505** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2007 E 07812992 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2054074**

54 Título: **Eritropoyetina modificada**

30 Prioridad:

**04.08.2006 US 835429 P**

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

**18.02.2015**

73 Titular/es:

**PROLONG PHARMACEUTICALS, LLC (100.0%)  
300B Corporate Court  
South Plainfield, NJ 07080, US**

72 Inventor/es:

**ABUCHOWSKI, ABRAHAM y  
LEE, LIHYSYNG STANFORD**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 529 234 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

Eritropoyetina modificada

## 5 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a conjugados de proteína novedosos, en particular, a proteínas pegiladas novedosas, y a sus procedimientos de fabricación y de uso. Un aspecto de la presente invención se refiere a eritropoyetina pegilada que tiene una mayor eficacia clínica y estabilidad durante el envío y el almacenamiento que las formulaciones de eritropoyetina actuales.

## 2. Antecedentes

En los últimos años, se han usado polímeros solubles en agua no antigénicos, tales como polietilenglicol ("PEG"), para la modificación covalente de polipéptidos de importancia terapéutica y de diagnóstico. El PEG es un polímero que es no tóxico, no inmunógeno, altamente soluble en agua, y se elimina fácilmente del organismo. El PEG tiene muchas aplicaciones y se usa comúnmente en alimentos, cosméticos, bebidas y medicinas de venta con receta. Los PEG de calidad farmacéutica están aprobados para su uso en los Estados Unidos por la FDA y se usan ampliamente como vehículos biofarmacéuticos, dado su alto grado de biocompatibilidad. La PEGilación puede modificar ciertas características de los productos biofarmacéuticos sin alterar su función, potenciando de este modo el efecto terapéutico.

En general, las moléculas de polietilenglicol se conectan a la proteína por medio de un grupo reactivo que se encuentra en la proteína. Los grupos amino, tales como los que están en los residuos de lisina o en el extremo N-terminal, son convenientes para dicha unión. El PEG se puede acoplar a productos biofarmacéuticos activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena usando una variedad de procedimientos químicos. Por ejemplo, se ha informado de que la unión covalente de PEG a polipéptidos terapéuticos tales como interleucinas (Knauf, M. J. *et al.*, J. Biol. Chem. 1988, 263, 15,064; Tsutsumi, Y. *et al.*, J. Controlled Release 1995, 33, 447), interferones (Kita, Y. *et al.*, Drug Des. Delivery 1990, 6, 157), catalasa (Abuchowski, A. *et al.*, J. Biol. Chem. 1977, 252, 3, 582), superóxido dismutasa (Beauchamp, C. O. *et al.*, Anal. Biochem. 1983, 131, 25) y adenosina desaminasa (Chen, R. *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1981, 660, 293), prolonga su semivida *in vivo* y/o reduce su inmunogenicidad y antigenicidad.

Las moléculas de PEG se han unido a través de grupos amino sobre los polipéptidos usando PEG metoxilado PEG ("mPEG") que tiene diferentes restos reactivos. Dichos polímeros incluyen mPEG-succinato de succinimidilo, mPEG-carbonato de succinimidilo, mPEG-imidato, y mPEG-cloruro cianúrico. De forma alternativa, se ha realizado la pegilación específica de sitio en el extremo N-terminal, cadena lateral y extremo C-terminal de un potente análogo del factor liberador de la hormona del crecimiento, a través de síntesis en fase sólida (Felix, A. M. *et al.*, Int. J. Peptide Protein Res. 1995, 46, 253). También se ha realizado la pegilación específica de sitio en el extremo N-terminal usando PEG activado con aldehído; sin embargo, dichas reacciones requieren tiempos de reacción largos y dichas reacciones requieren tiempos de reacción largos y son fuertemente dependientes del pH. Por ejemplo, la reacción requiere de 18 a 36 horas y, en general, es específica sólo a pH ácido, volviéndose aleatoria a pH neutro o mayor pH (véase, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. N.º: 6.077.939 y 5.985.265. Esto limita los péptidos disponibles a los que pueden soportar condiciones ácidas prolongadas.

Un procedimiento adicional usado implicaba unir un péptido a extremidades de cadenas de PEG injertadas en la superficie liposomal de manera específica de sitio a través de un grupo aldehído reactivo en el extremo N-terminal generado por la oxidación de peryodato de sodio de la treonina N-terminal (Zalipsky, S. *et al.*, Bioconj. Chem. 1995, 6, 705). Sin embargo, este procedimiento se limita a polipéptidos con residuos de serina o treonina N-terminales.

También se han descrito procedimientos ayudados con enzimas para introducir grupos activados específicamente en el extremo C-terminal de un polipéptido (Schwarz, A. *et al.*, Methods Enzymol. 1990, 184, 160; Rose, K. *et al.*, Bioconjugate Chem. 1991, 2, 154; Gaertner, H. F. *et al.*, J. Biol. Chem. 1994, 269, 7224). Típicamente, estos grupos activos pueden ser hidracida, aldehído y grupos amino aromáticos para la unión posterior de sondas funcionales a polipéptidos.

La mutagénesis específica de sitio es otro enfoque que se ha usado para preparar polipéptidos para la unión a polímero específica de sitio. El documento WO 90/12874 describe la pegilación dirigida a sitio de proteínas modificadas por la inserción de residuos de cisteína o la sustitución de otros residuos por residuos de cisteína. Esta publicación también describe la preparación de mPEG-eritropoyetina ("mPEG-EPO") haciendo reaccionar un derivado de mPEG específico de cisteína con un residuo de cisteína introducido de forma recombinante sobre la EPO. De forma similar, se pegiló la interleucina 2 en su sitio de glucosilación después de la mutagénesis dirigida a sitio (Goodson, R. J. *et al.*, Bio/Technology 1990, 8, 343).

Las glucoproteínas proporcionan carbohidratos como sitios diana adicionales para la modificación. Se ha modificado la enzima peroxidasa con PEG-diamina a través de su resto carbohidrato (Urrutigoity, M. *et al.*, Biocatalysis 1989, 2,

145). El documento WO 94/28024 describe los procedimientos para preparar mPEG-EPO a través de carbohidrato oxidado con peryodato. La química implicada fue la formación de hidrazona haciendo reaccionar mPEG-hidracida con grupos aldehído del resto carbohidrato sobre la EPO. Este tipo de modificación genera grupos aldehído reactivos a través de una etapa de oxidación, que puede oxidar potencialmente varios tipos de residuos de azúcar en el resto carbohidrato y algunos residuos aminoácidos en el polipéptido, tales como metionina.

#### Eritropoyetina

Una proteína ejemplar que demuestra la necesidad de mejora de los procedimientos de pegilación es la eritropoyetina. La eritropoyesis es la producción glóbulos rojos, que se produce para compensar la destrucción celular. La eritropoyesis es un mecanismo fisiológico controlado que permite que estén disponibles suficientes glóbulos rojos para una oxigenación tisular apropiada. La eritropoyetina humana natural (hEPO) es un polipéptido producido en el riñón y es el factor plasmático humoral que estimula la producción de glóbulos rojos (Carnot, P y Deflandre, C (1906) C.R. Acad. Sci. 143: 432; Erslev, A J (1953 Blood 8: 349; Reissmann, K R (1950) Blood 5: 372; Jacobson, L O, Goldwasser, E, Freid, W y Plzak, L F (1957) Nature 179: 6331-4). La EPO natural estimula la división y diferenciación de los progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea y ejerce su actividad biológica por la unión a receptores sobre precursores eritroides (Krantz, B S (1991) Blood 77: 419).

La eritropoyetina se ha fabricado biosintéticamente usando tecnología de ADN recombinante (Egrie, J C, Strickland, T W, Lane, J *et al.* (1986) Immunobiol. 72: 213-224) y es el producto de un gen de EPO humana clonado insertado en y expresado en las células de tejido de ovario de hámster chino (células CHO). La estructura primaria de la forma predominante, totalmente procesada, de hEPO se ilustra en SEQ ID NO:1. Existen dos puentes disulfuro entre Cys<sup>7</sup>-Cys<sup>161</sup> y Cys<sup>29</sup>-Cys<sup>33</sup>. El peso molecular de la cadena polipeptídica de EPO sin restos de azúcar es de 18,236 Da. En la molécula de EPO intacta (peso molecular de aproximadamente 33 kD), aproximadamente un 40 % del peso molecular está representado por los grupos de carbohidrato que glucosilan la proteína en los sitios de glucosilación sobre la proteína (Sasaki, H, Bothner, B, Dell, A y Fukuda, M (1987) J. Biol. Chem. 262: 12059).

Debido a que la eritropoyetina humana es esencial en la formación de glóbulos rojos, la hormona es útil en el tratamiento de trastornos sanguíneos caracterizados por una producción de glóbulos rojos baja o defectuosa y otras enfermedades para las que la expansión de la producción de glóbulos rojos sería beneficiosa para el paciente. Por ejemplo, la EPO se ha usado en el tratamiento de anemia en pacientes con insuficiencia renal crónica (CRF) (Eschbach, J W, Egri, J C, Downing, M R *et al.* (1987) NEJM 316: 73-78; Eschbach, J W, Abdulhadi, M H, Browne, J K *et al.* (1989) Ann. Intern. Med. 111: 992; Egrie, J C, Eschbach, J W, McGuire, T, Adamson, J W (1988) Kidney Intl. 33: 262; Lim, V S, Degowin, R L, Zavala, D *et al.* (1989) Ann. Intern. Med. 110: 108-114) y en pacientes con sida y cáncer que se están sometiendo a quimioterapia (Danna, R P, Rudnick, S A, Abels, R I In: M B, Garnick, ed. Erythropoietin in Clinical Applications—An International Perspective. New York, N.Y.: Marcel Dekker; 1990: p. 301-324).

Sin embargo, la biodisponibilidad de los productos terapéuticos de proteínas comercialmente disponibles, tales como EPO, está limitada por su corta semivida en plasma y susceptibilidad de degradación por proteasas. Estas deficiencias no les permiten lograr una potencia clínica máxima y, en general, requieren tratamientos más frecuentes o la administración de mayores cantidades de fármaco, lo que puede dar como resultado un incremento en la frecuencia y gravedad de los efectos secundarios y la falta de cumplimiento por parte del paciente con el calendario de tratamiento. Las proteínas, incluyendo EPO natural y sus formas derivatizadas y modificadas, también se formulan, en general, con albúmina (HSA o suero), y se almacenan y se transportan a temperatura reducida para ayudar a mantener la estabilidad del producto con el uso. Las formulaciones que contienen HSA sérica son indeseables debido al riesgo de contaminación por agentes infecciosos humanos y los altos costes asociados con la HSA de calidad farmacéutica y los bioensayos relacionados.

ARANESP® (darbepoyetina alfa) es un derivado de EPO comercialmente disponible. Es una proteína de 165 aminoácidos que difiere de la eritropoyetina humana recombinante en que contiene 5 cadenas de oligosacáridos unidas a N, mientras que la eritropoyetina humana recombinante contiene 3 cadenas. Los dos sitios de N-glucosilación adicionales resultan de las sustituciones aminoácidas en el esqueleto peptídico de la eritropoyetina. Las cadenas de carbohidrato adicionales incrementan el peso molecular aproximado de la glucoproteína de 30.000 a 37.000 daltons. ARANESP® se suministra en dos formulaciones con diferentes excipientes, uno que contiene polisorbato 80 y otro que contiene albúmina (HSA), un derivado de sangre humana.

Se han divulgado proteínas pegiladas, por ejemplo, derivados de EPO (publicaciones de los EE. UU. N.º 2002/0115833, 2003/0120045 y 2003/0166566). Sin embargo, los procedimientos usados para fabricar estas composiciones son difíciles de implementar y controlar, costosos, usan compuestos tóxicos en la síntesis, o tienen otros problemas de control de calidad. Además, no son conocidos por generar conjugados de polipéptidos que tengan actividad biológica mayor que la función natural del polipéptido no modificado.

Como tal, sigue existiendo una gran necesidad de una composición pegilada y/o procedimiento de producción de la misma, que sea más fácil y menos costoso de implementar, lo más importante, más fácil de controlar con el fin de producir un producto previsible y consistente.

En particular, con respecto a la EPO, se requieren formulaciones que tengan una mejora en sus semividas en plasma, incremento en su actividad y disminución en la susceptibilidad para la degradación por proteasas con relación a las formulaciones disponibles actualmente. Además, dichas formulaciones deberían poder envasarse, enviarse y almacenarse óptimamente en formulaciones libres de proteínas y/o bajo condiciones estándar.

El documento WO 2006/089228 A2 se refiere a conjugados de un resto de EPO y un polímero. El documento WO 02/49673 A2 se refiere a conjugados de eritropoyetina.

### 3. Sumario

La invención se define por lo siguiente:

1. Una pluralidad de moléculas de eritropoyetina (EPO), seleccionadas del grupo que consiste en EPO natural y rhuEPO, conjugada cada una con al menos una molécula de polietilenglicol (PEG), estando dicha conjugación de forma predominante en el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal, por medio de un enlace carbamato, con preferencia a estar en los residuos lisinilo de dicha proteína.
2. La pluralidad de moléculas conjugadas del punto 1, en la que dicha proteína EPO está unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG.
3. La pluralidad de moléculas conjugadas del punto 1, en la que dicho polietilenglicol (PEG) es SC-PEG.
4. Una composición farmacéutica que comprende: (a) una pluralidad de moléculas de EPO, seleccionadas del grupo que consiste en EPO natural y rhuEPO, conjugada cada una con al menos una molécula de polietilenglicol (PEG), estando dicha conjugación de forma predominante en el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal, por medio de un enlace carbamato, con preferencia a estar en los residuos lisinilo de dicha proteína, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. La composición del punto 4, en la que dicha proteína EPO está unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG.
6. La composición del punto 4, en la que el polietilenglicol es SC-PEG.
7. La composición del punto 4, en la que la molécula de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kD a aproximadamente 40 kD y es lineal o bien ramificado.
8. La composición del punto 4, en la que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable está libre de proteína.
9. Un procedimiento de conjugación de forma covalente de polietilenglicol (PEG) soluble en agua, activado, con un residuo amino de una proteína EPO que comprende: (a) hacer reaccionar dicha proteína con dicho PEG soluble en agua activado en un tampón de reacción que comprende DMSO de aproximadamente un 10 a aproximadamente un 40 por ciento (v/v), y (b) retirar sustancialmente todo el PEG soluble en agua no conjugado.
10. El procedimiento del punto 9, en el que el tampón de reacción es un tampón estándar libre de amina que comprende DMSO.
11. El procedimiento del punto 9, en el que dicho PEG soluble en agua activado es SC-PEG.
12. El procedimiento del punto 9, en el que dicho tampón de reacción tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5.
13. El uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende (a) una pluralidad de moléculas de EPO, seleccionadas del grupo que consiste en EPO natural y rhuEPO, conjugada cada una con al menos una molécula de polietilenglicol (PEG), estando dicha conjugación de forma predominante en el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal, por medio de un enlace carbamato, con preferencia a estar en los residuos lisinilo de dicha proteína, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una insuficiencia de glóbulos rojos en un paciente que lo necesita.
14. El uso de acuerdo con el punto 13, en el que dicha proteína EPO está unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG.
15. El uso de acuerdo con el punto 13, en el que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable está libre de proteína.

16. La composición del punto 1 o 4, en la que dichas moléculas de EPO están conjugadas con moléculas de PEG de forma predominante en el extremo N-terminal, con preferencia a estar conjugadas en el residuo lisina-52, lisina-116 o lisina-154.
- 5 17. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende (a) una pluralidad de moléculas de EPO, seleccionadas del grupo que consiste en EPO natural y rhuEPO, conjugada cada una con al menos una molécula de polietilenglicol (PEG), estando dicha conjugación de forma predominante en el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal, por medio de un enlace carbamato, con preferencia a estar en los residuos lisinilo de dicha proteína, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una insuficiencia de glóbulos rojos en un paciente que lo necesita.

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de formas novedosas de proteínas mono- y dipegiladas, por ejemplo, eritropoyetina ("EPO"), y mezclas de las mismas. Como se demuestra con el uso de EPO, las formulaciones de la invención presentan una mejora en la actividad *in vivo*, incluyendo una mejora en las semividas en plasma y la estabilidad, con relación a la EPO humana recombinante y/u otros productos terapéuticos de EPO comercialmente disponibles. Las moléculas de EPO y composiciones de la invención presentan además una estabilidad prolongada en formulaciones libres de proteína y/o permanecen estables bajo condiciones de almacenamiento estándar, es decir, almacenamiento a temperatura estándar, por ejemplo, aproximadamente 25 °C.

La memoria descriptiva se refiere a una formulación farmacéutica que comprende al menos una población de proteínas eritropoyetina en la que cada proteína eritropoyetina está unida covalentemente a al menos una molécula de polietilenglicol; y un vehículo farmacéutico libre de proteína. En un caso específico, cada proteína eritropoyetina está unida covalentemente a una molécula de polietilenglicol. En otro caso, cada proteína eritropoyetina está unida a dos moléculas de polietilenglicol. En un caso adicional, la al menos una población de proteínas eritropoyetina es una primera y una segunda población, en la que la primera población de proteínas eritropoyetina está unida a una molécula de polietilenglicol y la segunda población está unida a dos moléculas de polietilenglicol. Aún en otro caso, la proporción de la primera con respecto a la segunda población puede variar de menos de aproximadamente 1 a aproximadamente 100; de aproximadamente 10 a aproximadamente 90, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80, de aproximadamente 30 a aproximadamente 70, de aproximadamente 40 a aproximadamente 60, de aproximadamente 50 a aproximadamente 50, de aproximadamente 60 a aproximadamente 40, de aproximadamente 70 a aproximadamente 30, de aproximadamente 80 a aproximadamente 20, de aproximadamente 90 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 100 a menos de aproximadamente 1, en la que menos de aproximadamente 1 incluye una cantidad indetectable usando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

Aún en un caso adicional, cada proteína eritropoyetina está unida covalentemente a al menos una molécula de polietilenglicol a través de un residuo de lisina particular. En determinados casos, se describe una composición que tiene al menos una molécula de eritropoyetina unida covalentemente a al menos una molécula de polietilenglicol por medio de un extremo terminal amino de la proteína eritropoyetina, enlace covalente que no se produce a través de un enlace aldehído. En otros casos, se describe una composición que tiene al menos una molécula eritropoyetina unida covalentemente a al menos una molécula de polietilenglicol a través de un residuo de lisina particular, residuo que es lisina 116. Todavía en otro modo de realización, la formulación se puede almacenar durante un periodo de tiempo prolongado sin degradación sustancial de eritropoyetina en una formulación de vehículo libre de proteína.

La presente memoria descriptiva también se refiere a procedimientos de fabricación y uso de formas novedosas de proteínas pegiladas, por ejemplo, EPO, en particular, para su uso en formulaciones farmacéuticas. Con el uso de los procedimientos de producción proporcionados en el presente documento, la proteína pegilada es un conjugado, en el que la proteína está unida covalentemente a al menos una molécula de polietilenglicol. En un caso específico, la proteína pegilada es una molécula de EPO que está unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG. En un caso, el enlace covalente es por medio de un extremo amino terminal de la proteína. En otro caso, el enlace covalente es por medio de un residuo lisina de la proteína EPO, por ejemplo, lisina 116. En consecuencia, las proteínas pegiladas engloban proteínas conjugadas covalentemente a al menos una molécula de polietilenglicol. En un caso específico, se describe la proteína EPO conjugada covalentemente a una o dos moléculas de polietilenglicol (es decir, EPO mono- o dipegilada, respectivamente), y/o mezclas de la misma. En determinados casos, los conjugados de proteína pegilada incluyen proteína monopegilada. La proteína monopegilada puede ser uniforme ya que, para cada conjugado, la molécula de polietilenglicol ("PEG") está unida covalentemente a la proteína por medio del mismo residuo aminoacídico. En otros casos, la proteína monopegilada comprende una pluralidad de conjugados ya que, para cada conjugado, la molécula individual de PEG está conjugada a la proteína EPO por medio de un residuo aminoacídico diferente o el extremo N-terminal de la proteína (es decir, el grupo  $\alpha$ -amino de la proteína), en la que el dicho residuo aminoacídico es uno de los residuos aminoacídicos adecuados para la conjugación covalente a PEG como se describe en el presente documento. Todavía en otros casos, los conjugados de proteína pegilada engloban proteínas que tienen múltiples sitios de pegilación, por ejemplo, proteínas dipegiladas. Las proteínas múltiple-pegiladas pueden ser uniformes ya que, para cada conjugado, las dos o más moléculas de PEG están unidas covalentemente a cada proteína en los mismos sitios. En otros casos, la proteína múltiple-pegilada comprende una pluralidad de conjugados ya que, para cada conjugado, las dos o más moléculas de PEG están conjugadas a la proteína en cualquiera de dos o más de los residuos aminoacídicos disponibles adecuados para la conjugación covalente a PEG como se describe en el presente documento y/o el extremo amino terminal de la proteína. Por

ejemplo, en casos específicos, los conjugados de EPO comprenden una pluralidad de EPO mono- y dipegiladas, en los que el/los sitio(s) de la conjugación entre la proteína EPO y la molécula de PEG es/son no uniforme(s).

5 En consecuencia, en un caso específico, los procedimientos de producción presentados en el presente documento producen una composición que engloba una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que la pluralidad comprende un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en el extremo amino terminal de la proteína, enlace covalente en dicho extremo amino terminal que no se produce a través de un enlace aldehído. En otro caso, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que la pluralidad comprende un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en el extremo amino terminal de la proteína, enlace covalente en dicho extremo amino terminal que no se produce a través de un enlace aldehído, y uno o más de o todos de: un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 116, un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 52 de la proteína EPO, y/o un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 154 de la proteína EPO. En otros casos, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que la pluralidad comprende un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en el extremo amino terminal de la proteína, enlace covalente en dicho extremo amino terminal que no se produce a través de un enlace aldehído, y un conjugado que tiene uno o dos enlaces covalentes en cualquier sitio adecuado para dicho enlace como se describe en el presente documento o como es conocido en la técnica.

25 En determinados casos, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que la pluralidad comprende un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 116. En otro caso, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que la pluralidad comprende un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 116, y uno o más de o todos de: un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en el extremo amino terminal de la proteína, enlace covalente en dicho extremo amino terminal que no se produce a través de un enlace aldehído, un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 52 de la proteína EPO, un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 154 de la proteína EPO. En otro caso, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que la pluralidad comprende un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 116 y un conjugado que tiene dichos uno o dos enlaces covalentes en cualquier sitio adecuado para dicho enlace como se describe en el presente documento o como es conocido en la técnica.

40 En un caso específico, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que dicha pluralidad comprende una EPO monopegilada que tiene la molécula de PEG unida covalentemente a la proteína EPO por medio de la lisina 116. En otro caso, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que dicha pluralidad comprende una EPO monopegilada que tiene la molécula de PEG unida covalentemente a la proteína EPO por medio de la lisina 116 y uno o más de o todos de: un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en el extremo amino terminal de la proteína EPO, enlace covalente en dicho extremo amino terminal que no se produce a través de un enlace aldehído, un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 52 de la proteína EPO, y un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 154 de la proteína EPO. En otros casos, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que dicha pluralidad comprende una EPO monopegilada que tiene la molécula de PEG unida covalentemente a la proteína EPO por medio del extremo amino terminal de la proteína, enlace covalente en dicho extremo amino terminal que no se produce a través de un enlace aldehído. En otro caso, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que dicha pluralidad comprende una EPO monopegilada que tiene la molécula de PEG unida covalentemente a la proteína EPO por medio del extremo amino terminal de la proteína, enlace covalente en dicho extremo amino terminal que no se produce a través de un enlace aldehído, y uno o más de o todos de: un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 116 de la proteína EPO, un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 52 de la proteína EPO, y un conjugado que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes en la lisina 154 de la proteína EPO. En determinados otros casos, se describe cualquiera de la pluralidad anterior de conjugados de EPO, comprendiendo además un conjugado que tiene dichos uno o dos enlaces covalentes en cualquier sitio adecuado para dicho enlace como se describe en el presente documento o como es conocido en la técnica.

65 En determinados casos, la pluralidad de conjugados de proteína comprende al menos una población de conjugados, en la que dicha al menos una población comprende proteína covalentemente unida a al menos una molécula de PEG. En otros casos, la al menos una población de conjugados de proteína es una primera y una segunda población, en la

que dicha primera población está unida a una molécula de PEG y la segunda población está unida a dos o más moléculas de PEG. En determinados casos, dichos enlaces covalentes incluyen enlaces no aldehídicos en el extremo amino terminal de la proteína. En un caso específico, la al menos una población de conjugados de proteína es al menos una población de conjugados de EPO que es una primera y una segunda población, en la que dicha primera población es EPO-PEG unida covalentemente a una molécula de PEG y la segunda población de EPO-PEG es proteína EPO unida covalentemente a dos moléculas de PEG. En determinados casos, la proporción de la primera población con respecto a la segunda población puede variar de menos de aproximadamente 1 a aproximadamente 100, de aproximadamente 10 a aproximadamente 90, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80, de aproximadamente 30 a aproximadamente 70, de aproximadamente 40 a aproximadamente 60, de aproximadamente 50 a aproximadamente 50, de aproximadamente 60 a aproximadamente 40, de aproximadamente 70 a aproximadamente 30, de aproximadamente 80 a aproximadamente 20, de aproximadamente 90 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 100 a menos de aproximadamente 1, en la que menos de aproximadamente 1 incluye una cantidad indetectable usando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

La memoria descriptiva describe además una pluralidad de conjugados de proteína, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a al menos una molécula de PEG, en la que la administración de dicha pluralidad a un sujeto da como resultado una concentración sérica de dicha pluralidad, o una concentración sérica de uno o más componentes de dicha pluralidad, de al menos aproximadamente un 10 % -700 % mayor que la obtenible por la administración de una cantidad equivalente (por ejemplo en base a la concentración de proteína o las unidades de actividad, por ejemplo, unidades de EPO) de una formulación de control a aproximadamente 24, 36 o 48 horas después de la inyección. En un caso específico con respecto a una pluralidad de conjugados de EPO, las formulaciones de control pueden ser, por ejemplo, EPO humana recombinante (rhuEPO), EPO natural o una formulación de EPO comercial, por ejemplo, ARANESP® (darbopoyetina alfa). En un caso específico, la administración (por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa) de la pluralidad de conjugados de EPO; en ratas Sprague-Dawley da como resultado una concentración sérica de aproximadamente al menos un 5 % a un 700 % mayor que la obtenible por la administración de una formulación de EPO de control a aproximadamente 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 o 72 horas postadministración. La descripción incluye cualquier procedimiento de administración descrito en el presente documento y/o conocido en la técnica adecuado para la administración de una proteína terapéutica, por ejemplo, una proteína pegilada terapéutica, a un sujeto; dichos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, intramuscular, parenteral, pulmonar, nasal y oral. La pluralidad de conjugados de proteína también puede incluir varios materiales adicionales, incluyendo, en particular, cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable descrito en el presente documento y/o conocido en la técnica para su administración a un sujeto.

En otro caso específico, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que la administración de dicha pluralidad a un sujeto da como resultado un incremento de aproximadamente al menos un 5 %-250 % en hematocrito mayor que el obtenible por la administración de una cantidad equivalente (por ejemplo, basado en unidades de EPO) de una formulación de EPO de control (por ejemplo, EPO humana recombinante (rhuEPO), EPO natural o una formulación de EPO comercial, por ejemplo, ARANESP® (darbopoyetina alfa)) a aproximadamente 5, 7, 10, 12, 14, 16, 18 o 21 días postadministración. En un caso específico, la administración (por ejemplo, por vía subcutánea) de la pluralidad de conjugados de EPO a ratas Sprague-Dawley da como resultado un incremento de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 250 % en hematocrito mayor que el obtenible por la administración de una cantidad equivalente (por ejemplo, basado en unidades de EPO) de una formulación de EPO de control (por ejemplo, EPO humana recombinante (rhuEPO), EPO natural o una formulación de EPO comercial, por ejemplo, ARANESP® (darbopoyetina alfa)) a aproximadamente 5, 7, 10, 12, 14, 16, 18 o 21 días postadministración.

La memoria descriptiva describe además formulaciones farmacéuticas que comprenden una pluralidad de los conjugados de proteína descritos en el presente documento, y/o que comprenden uno o más de los componentes de dicha pluralidad (por ejemplo, una población de conjugados de EPO unida covalentemente a una molécula de PEG y/o una población de conjugados de EPO unida covalentemente a dos moléculas de PEG y/o una población de conjugados de EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en las que al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes está en el extremo amino terminal de la proteína, enlace covalente en dicho extremo amino terminal que no se produce a través de un enlace aldehído), y un vehículo farmacéuticamente aceptable libre de proteína (por ejemplo, libre de suero, libre de albúmina, libre de seroalbúmina humana ("libre de HSA")). En determinados casos, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable libre de proteína se pueden almacenar durante un período de tiempo prolongado sin degradación sustancial y/o detectable de eritropoyetina como se determina por procedimientos descritos en el presente documento y/o conocidos en la técnica. En determinados casos, las formulaciones farmacéuticas son estables (es decir, no presentan degradación detectable y/o no presentan degradación sustancial) en dichas formulaciones libres de proteína como se determina al menos 15 meses después del almacenamiento a aproximadamente -20 °C o 4 °C. En otros casos, las formulaciones farmacéuticas son estables (es decir, no presentan degradación detectable y/o no presentan degradación sustancial) en dichas formulaciones libres de proteína como se determina al menos 10 meses después del almacenamiento a aproximadamente 25 °C o aproximadamente 37 °C. La estabilidad de las formulaciones farmacéuticas se puede evaluar por cualquier procedimiento conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento. En determinados casos, la estabilidad de las formulaciones farmacéuticas se evalúa

monitorizando la alteración en la concentración de proteína con el tiempo como se determina por un ensayo de proteína de ácido bicinónico ("BCA"). En otros casos, la estabilidad de las formulaciones farmacéuticas se evalúa por indicación de degradación de proteína (es decir, degradación de conjugado de EPO) con el tiempo como se determina por análisis SDS PAGE. Todavía en otros casos, la estabilidad de las formulaciones farmacéuticas se evalúa monitorizando la actividad de dicha formulación con el tiempo, en la que dicha actividad se determina por cualquier procedimiento *in vitro* o *in vivo* conocido en la técnica para la determinación de la actividad de dicha formulación (por ejemplo, una formulación de EPO). En un ejemplo específico de acuerdo con este caso, se evalúa la actividad de una formulación farmacéutica que comprende una pluralidad de conjugados de EPO por la capacidad de dicha farmacéuticos para inducir la diferenciación de células madre en células eritroides *in vitro*.

Otro aspecto se refiere a un conjugado de proteína fabricado por el procedimiento que comprende, hacer reaccionar una proteína con un polímero soluble en agua activado en un tampón de reacción para unir covalentemente la proteína con el polímero soluble en agua activado y retirar sustancialmente todo el polímero soluble en agua no unido para obtener dicho conjugado de EPO. En casos preferentes, el polímero soluble en agua activado es SC-PEG. En otro caso, el polímero soluble en agua activado es NHS-PEG. En casos preferentes, el tampón de reacción no comprende aldehído-PEG y/o el polímero soluble en agua activado no es aldehído-PEG. En determinados casos, el tampón de reacción tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5. En otros casos, el tampón de reacción tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 7,3, o de aproximadamente 6,7 a aproximadamente 7,1. En casos preferentes, el tampón de reacción tiene un pH neutro de aproximadamente 7,0. En determinados casos, el tampón de reacción puede comprender además DMSO en un 5 %-80 % (v/v), y preferentemente comprende DMSO en un 10 %-40 % (v/v). Los procedimientos pueden permitir que se usen menores cantidades, es decir, menores concentraciones, de PEG en el tampón de reacción con relación a procedimientos estándar conocidos en la técnica mientras que se mejoran o se mantienen eficacias de pegilación similares (es decir, evaluadas como cantidad de producto pegilado con relación a producto no pegilado) de dichos procedimientos conocidos. Los procedimientos también pueden permitir el uso de una reacción a un pH mayor que otros procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, pegilación de una proteína usando aldehído-PEG (véase, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. N.º 6.077.939 y 5.985.265).

Dichas modificaciones relativas a procedimientos conocidos en la técnica pueden proporcionar ventajas de fabricación en términos de costes, eficacia de fabricación y/o facilidad de procesamiento. Aún en un caso adicional, el tampón de reacción comprende una proporción molar de proteína con respecto a polímero soluble en agua activado de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, a aproximadamente 1, a aproximadamente 60. En otros casos, el tampón de reacción comprende una proporción molar de proteína con respecto a polímero soluble en agua activado de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 1 a aproximadamente 6, de aproximadamente 1 a aproximadamente 7, de aproximadamente 1 a aproximadamente 8, de aproximadamente 1 a aproximadamente 9, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, de aproximadamente 1 a aproximadamente 35, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 45, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 55, de aproximadamente 1 a aproximadamente 60. En determinados casos, el tampón de reacción comprende una proporción molar de proteína con respecto a polímero soluble en agua activado de aproximadamente 1 a aproximadamente 7. Todavía en un caso adicional, la retirada de sustancialmente todo el polímero soluble en agua sin reaccionar se puede lograr de forma rutinaria por procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, diálisis, cromatografía).

Otro aspecto se refiere al tratamiento de un paciente que lo necesita con una cantidad farmacéuticamente eficaz de las formulaciones o conjugados mencionados anteriormente. En un caso, se describe el uso de composiciones, en particular composiciones farmacéuticas, que comprenden la pluralidad de conjugados de EPO o uno o más componentes de dicha pluralidad, en concentraciones terapéuticamente eficaces para incrementar la producción de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita. En determinados casos, las composiciones farmacéuticas se administran para tratar o gestionar una enfermedad o trastorno asociado con una producción de glóbulos rojos aberrante o deficitaria, o para aliviar los síntomas de los mismos, en dicho sujeto. En determinados casos, el sujeto que se va a tratar no se ha diagnosticado con una enfermedad o trastorno asociado con la producción de glóbulos rojos aberrante o deficitaria, pero se determina que tiene una predisposición a desarrollar dicha enfermedad o trastorno. Todavía en otros casos, al sujeto que se va a tratar no se le ha diagnosticado con una enfermedad o trastorno asociado con la producción de glóbulos rojos aberrante o deficitaria, pero por criterios de la técnica se evalúa como que obtiene beneficio a partir de dicho tratamiento. En determinados casos, el paciente recibe una dosis al menos aproximadamente una vez a la semana. En otros casos, el paciente recibe una dosis al menos aproximadamente una vez cada dos semanas, al menos aproximadamente una vez cada tres semanas, o al menos aproximadamente una vez cada mes.

#### 4. Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 Secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina humana ("hEPO") completamente procesada, predominante (SEQ ID NO:1).

FIG. 2 Secuencia de aminoácidos de eritropoyetina, con residuo Arg terminal (SEQ ID NO:2).

FIG. 3A-B. FIG. 3A: El carril 1 es el marcador de peso molecular. El carril 2 es la muestra después de 5 meses de almacenamiento a 4 °C en el tampón de formulación. El carril 3 es el control de la muestra almacenada en estado congelado a -20 °C durante 5 meses, y el carril 4 es la EPO sin modificar.

FIG. 3B Comenzando desde el lado izquierdo: Carril 1: Muestra inmediatamente después de la producción. Carril 2: EPO natural. Carril 3: marcador de peso molecular.

FIG. 4A-B. A: Digestión tripsínica de ejemplo de EPO natural. B: Digestión tripsínica de ejemplo del conjugado de EPO preparado de acuerdo con el ejemplo 1.

FIG. 5: Análisis SDS-PAGE de conjugados de EPEG almacenados a altas temperaturas durante varios periodos de tiempo. Carril 1: estándar de peso molecular en kD (200, 116,3, 97,4, 66,3, 55,4, 36,5, 31, 21,5 y 14,4); carril 2: -20 °C, 15 meses; carril 3: 4 °C, 16 meses; carril 4: 25 °C 10,5 meses; carril 5: 37 °C, 10,5 meses.

FIG. 6: Comparación de la actividad del estándar (EPREX® (epoyetina alfa)) y conjugado de EPO ('EPEG') sobre la proliferación de progenitores eritroides en MethCult™ -4230 (sin citocinas).

FIG. 7: Perfiles farmacocinéticos de EPO, EPEG y ARANESP® (darbopoyetina alfa) en inyección intravenosa en ratas Sprague-Dawley macho.

FIG. 8 Comparación de la actividad *in vivo* de conjugados de EPO de la invención. Se comparó el nivel de hematocrito con el tiempo de tres muestras de PEG-EPO con el de la EPO natural a una dosificación de 5 µg/rata. Y501P: EPO modificada por NHS-PEG de cadena ramificada (20.000 KD) que tiene 1PEG-EPO. Y502P: EPO modificada por NHS-PEG de cadena ramificada (20.000 KD) que tiene 2PEG-EPO. Y5012: EPO modificada por NHS-PEG (20.000 KD) de cadena ramificada que tiene cantidades equivalentes de 1PEG-EPO y 2PEG-EPO.

FIG. 9. Curva de evolución temporal de la comparación de 3 EPEG diferentes (L33, Y5012 y X6012) y EPO natural para determinar la actividad en la inducción del incremento de hematocrito en ratas.

FIG. 10: Evolución temporal del incremento en hematocrito en ratas Sprague-Dawley macho después de inyección intravenosa rápida de EPEG o rhu-EPO (2,5 µg o 5 µg por animal) o vehículo (PBS).

FIG. 11: Evolución temporal del incremento en hematocrito en ratas Sprague-Dawley macho después de una o dos inyecciones intravenosas rápidas ("no inyectado" o "inyectado", respectivamente) de EPEG, rhu-EPO (2,5 µg o 5 µg por animal) o vehículo (PBS). La segunda administración de EPEG o control se produjo 14 días después de la primera administración.

## 5. Descripción detallada

Es un objetivo de la invención proporcionar conjugados de polipéptidos (por ejemplo, conjugados de EPO) que son clínicamente superiores al polipéptido no conjugado en su forma natural o de referencia. Además, un beneficio añadido de dichos polipéptidos conjugados es que se puede administrar menos proteína (en comparación con el polipéptido natural o de referencia), incluyendo en una base menos frecuente, lograr el efecto terapéutico deseado. Esto, a su vez, da como resultado menores costes de materias primas e incidencia de efectos secundarios puesto que la cantidad de proteína por dosis se reduce sustancialmente. En determinados modos de realización, la invención se refiere a eritropoyetina conjugada con polímeros solubles en agua. En modos de realización preferentes, la invención se refiere a polipéptidos conjugados con polietilenglicol (PEG). Lo más preferentemente, se refiere a eritropoyetina conjugada con PEG (EPEG).

En un ejemplo específico, en comparación con la EPO natural (es decir, EPO sin un PEG unido; convencionalmente eritropoyetina glucosilada), los conjugados de EPO de la invención, es decir, EPEG, tienen un incremento en la semivida en circulación y tiempo de permanencia en plasma, una disminución en la tasa de eliminación, y un incremento en la actividad clínica *in vivo*. Los conjugados de la presente invención tienen los mismos usos que la EPO. En particular, los conjugados de la presente invención son útiles para incrementar las producciones de glóbulos rojos en un sujeto que lo necesita estimulando la división y diferenciación de los progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea de la misma manera que se usa la EPO para tratar a los mismos sujetos o sujetos similares. Además, los inventores han descubierto sorprendentemente que los conjugados de la invención no requieren seroalbúmina humana (HSA) en su formulación para la estabilidad durante el almacenamiento. Como tales, las formulaciones de la invención tienen la ventaja de una estabilidad prolongada, menor coste y fabricación, envío, almacenamiento y control de calidad simplificados con relación a los productos terapéuticos a base de EPO disponibles actualmente.

Como se usa en el presente documento, el término "extremo N-terminal", "extremo amino terminal" o términos análogos, cuando se usan en el contexto de un enlace covalente de una proteína con otra molécula se refieren a un enlace covalente por medio del grupo  $\alpha$ -amino amino terminal de la proteína.

5 Como se usa en el presente documento, el término "natural" o "de referencia" se refiere a una proteína o polipéptido en su forma operativa o funcional, preferentemente como se encuentra en funcionamiento de modo natural en el cuerpo. Estos términos también se refieren a la proteína en una forma en la que no se ha modificado o alterado artificialmente. Por lo tanto, los términos pueden hacer referencia a proteínas recombinantes. En consecuencia, los  
10 términos pueden hacer referencia a una proteína con un patrón de glucosilación alterado, incluyendo falta de glucosilación, con relación a la que se produce en el animal a partir del que se derivó originalmente la secuencia de ácido nucleico y/o de aminoácidos de la proteína.

Como se usa en el presente documento, la "función natural" de un polipéptido quiere decir su función antes de una modificación covalente con un polímero soluble en agua. Las funciones naturales incluyen, por ejemplo, actividad  
15 enzimática, unión a receptor (por ejemplo, anticuerpos), unión a ligando e inmunogenicidad. Preferentemente, la función natural de la eritropoyetina se refiere a la actividad biológica *in vivo* que provoca que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos.

Como se usa en el presente documento, el término "eritropoyetina" o "EPO" se refiere a una glucoproteína, que tiene  
20 la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 (FIG. 1) o SEQ ID NO: 2 (FIG. 2) o una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la misma, con propiedades biológicas relacionadas con la estimulación de la producción de glóbulos rojos y/o la estimulación de la división y diferenciación de progenitores eritroides comprometidos en la médula ósea. Como se usa en el presente documento, estos términos incluyen dichas proteínas modificadas de forma deliberada, como por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio o de forma accidental a través de  
25 mutaciones; de modo que tienen adiciones, deleciones o sustituciones de residuos aminoácidos con respecto a la EPO natural. Estos términos incluyen la eritropoyetina humana producida tanto de forma natural como recombinante. EPO se refiere a la proteína tanto natural como recombinante, preferentemente humana, como se obtiene a partir de cualquier fuente convencional tal como tejidos, síntesis proteica, cultivo celular con células naturales o recombinantes.

Los polipéptidos sustancialmente homólogos a la EPO son equivalentes funcionales que incluyen polipéptidos con  
30 secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (FIG. 1) o SEQ ID NO: 2 (FIG. 2). "Sustancialmente la misma" en referencia a una secuencia de aminoácidos se define en el presente documento como una secuencia con una homología de al menos un 70 %, preferentemente de al menos  
35 aproximadamente un 80 %, y más preferentemente de al menos aproximadamente un 90 % con otra secuencia de aminoácidos, como se determina por el procedimiento de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988). Preferentemente, los homólogos de EPO presentan una actividad equivalente o mayor en comparación con la de la EPO natural o de referencia, como se evalúa por los procedimientos descritos en el presente documento y/o procedimientos estándar conocidos en la técnica.

También está englobada cualquier proteína que tiene la actividad de EPO, tal como mutélicas o proteínas modificadas  
40 de otro modo. La EPO recombinante se puede preparar por medio de la expresión en líneas celulares de CHO, BHK, COS, HeLa o PER.C6 u otras líneas celulares apropiadas de origen animal o humano, por tecnología de ADN recombinante o por activación génica endógena. La expresión de proteínas, incluyendo EPO, por activación génica endógena es bien conocida en la técnica y se divulga, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. N.º 5.733.761,  
45 5.641.670, 5.733.746, 5.994.122, 5.733.761, 5.641.670, 5.981.214 y 5.272.071, y la publicación de patente internacional WO 90/11354. Su preparación y aplicación terapéutica se describen en detalle por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. N.º 5.547.933 y 5.621.080, EP-B 0 148 605, Huang, S. L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 2708-2712, EP-B 0 205 564, EP-B 0 209 539 y EP-B 0 411 678 así como Lai, P. H. *et al.*, J. Biol. Chem. 261 (1986)  
50 3116-3121, y Sasaki, H. *et al.*, J. Biol. Chem. 262 (1987) 12059-12076. La eritropoyetina para usos terapéuticos se puede producir por medios recombinantes (EP-B 0 148 605, EP-B 0 209 539 y Egrie, J. C, Strickland, T. W., Lane, J. *et al.* (1986) Immunobiol. 72: 213-224), el contenido de cada una de las referencias mencionadas anteriormente se incorpora en el presente documento por referencia. Las especies de EPO preferentes para la preparación de  
55 productos de glucoproteína eritropoyetina son especies de EPO humana. Más preferentemente, la especie de EPO es la EPO humana que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 (FIG. 1) o SEQ ID NO:2 (FIG. 2), y lo más preferentemente, la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 1 (FIG. 1).

Los procedimientos para la expresión y preparación de eritropoyetina en medio libre de suero se describen, por  
60 ejemplo, en el documento WO 96/35718, para Burg publicado el 14 de noviembre de 1996, y en la publicación de patente europea n.º 513 738, para Koch publicada el 12 de junio de 1992. Además de las publicaciones mencionadas anteriormente, se sabe que se puede realizar una fermentación libre de proteína de células CHO recombinantes que contienen un gen EPO. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en los documentos EP-A 0 513 738, EP-A 0 267 678 y, de forma general, en Kawamoto, T. *et al.*, Analytical Biochem. 130 (1983) 445-453, documento EP-A 0 248 656, Kowar, J *et al.* Methods in Enzymology 421 (1986) 277-292, Bavister, B., Expcology 271 (1981) 45-51,  
65 documentos EP-A 0 481 791, EP-A 0 307 247, EP-A 0 343 635, WO 96/35718 y WO 88/00967.

En el documento EP-A 0 267 678 se describen la cromatografía de intercambio aniónico en S-Sepharose, una HPLC de fase inversa preparativa en una columna C<sub>8</sub> y una cromatografía de filtración en gel, para la purificación de EPO producido en cultivo libre de proteína después de diálisis. En este sentido, la etapa de cromatografía de filtración en gel se puede reemplazar por cromatografía de intercambio iónico en flujo rápido de S-Sepharose. También se propone que se lleve a cabo una cromatografía con colorante en una columna con Blue Trisacryl antes de la cromatografía de intercambio iónico.

También se describe un procedimiento para la purificación de EPO recombinante por Nobuo, I. *et al.*, J. Biochem. 107 (1990) 352-359. En este procedimiento, sin embargo, se trata la EPO con una solución de Tween-20, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, etilmaleimida, pepstatina A, sulfato de cobre y ácido oxámico antes de las etapas de purificación.

Como se usa en el presente documento, el término "conjugado" en referencia a una proteína o polipéptido es una proteína o polipéptido o población del mismo, que funciona en interacción con uno o más de otros grupos químicos unidos por enlaces covalentes. Preferentemente, la proteína es eritropoyetina o un homólogo de la misma y el grupo químico es un polímero soluble en agua. Lo más preferentemente, la proteína es eritropoyetina o un homólogo de la misma y el polímero soluble en agua es PEG. Los conjugados de la invención tienen al menos una o dos moléculas de PEG unidas a cada proteína EPO. Aún más preferentemente, los conjugados de la invención se fabrican de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento.

Las proteínas pegiladas de la invención fabricadas preferentemente de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, en general se denominan "conjugados de proteína". En un ejemplo específico en el que la proteína es eritropoyetina ("EPO"), las moléculas de la invención se denominan "conjugados de EPO", "conjugados de EPEG" y/o términos análogos, términos que se usan de manera intercambiable. Estos términos "conjugado de proteína" y/o "conjugados de proteína" de la invención también se refieren a una mezcla de proteínas conjugadas según la invención, es decir, una pluralidad de la proteína conjugada según la invención, por ejemplo, EPO. Por ejemplo, conjugado de EPEG y/o conjugado de EPO puede hacer referencia a una población sustancialmente homogénea de proteínas EPO con cada proteína EPO en la misma unida con una ("1PEG-EPO"; EPO monopegilado) o dos ("2PEG-EPO", EPO dipegilado) de PEG, y o combinaciones de las anteriores.

La mayoría de los polipéptidos tienen una pluralidad de sitios de enlace a PEG potenciales. Por lo tanto, aunque una población homogénea de conjugados 1PEG-proteína tenga una molécula de PEG unida a cada molécula de proteína, puede que ese enlace no esté necesariamente en la misma localización en cada proteína en la población. De forma similar, aunque una población homogénea de los conjugados 2PEG-proteína tenga dos moléculas de PEG unidas a cada molécula de proteína, puede que esos enlaces no estén necesariamente en las mismas localizaciones en cada proteína en la población. En casos específicos, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que dicha pluralidad comprende un conjugado de EPO que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes a moléculas de PEG por medio de lisina 116. En otros casos, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que dicha pluralidad comprende un conjugado de EPO que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes a moléculas de PEG por medio del extremo amino terminal de la proteína EPO, enlace covalente en dicho extremo amino terminal que no se produce a través de un enlace aldehído. Todavía en otros casos, se describe una pluralidad de conjugados de EPO, comprendiendo cada conjugado una proteína EPO unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG, en la que dicha pluralidad comprende un conjugado de EPO que tiene al menos uno de dichos uno o dos enlaces covalentes a moléculas de PEG por medio de lisina 52 o lisina 154. En otros casos, se describe cualquiera de la pluralidad anterior de conjugados de EPO y un conjugado unido covalentemente a dichas una o dos moléculas de PEG por medio de cualquier sitio conocido en la técnica por ser adecuado para dicho enlace.

En determinados modos de realización, la pluralidad de conjugados de proteína (por ejemplo, la mezcla heterogénea de conjugados de EPEG) que comprende los conjugados 1PEG-proteína y 2PEG-proteína se refiere a una mezcla de las dos poblaciones mencionadas anteriormente, en la que cada población puede o no ser heterogénea. En casos específicos, la proporción de la mezcla de conjugado 1PEG-proteína con respecto a conjugado 2PEG-proteína es de menos de aproximadamente 1 a aproximadamente 100, de aproximadamente 10 a aproximadamente 90, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80, de aproximadamente 30 a aproximadamente 70, de aproximadamente 40 a aproximadamente 60, de aproximadamente 50 a aproximadamente 50, de aproximadamente 60 a aproximadamente 40, de aproximadamente 70 a aproximadamente 30, de aproximadamente 80 a aproximadamente 20, de aproximadamente 90 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 100 a menos de aproximadamente 1, en la que menos de aproximadamente 1 incluye una cantidad indetectable usando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

Los "polímeros solubles en agua" incluyen, pero no se limitan a, polialquilenglicol y derivados del mismo, incluyendo PEG, PEG metoxilado ("mPEG"), homopolímeros de PEG, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol con propilenglicol, en los que dichos homopolímeros y copolímeros están insustituídos o sustituidos en un extremo con un grupo alquilo. En casos preferentes, el polímero es mPEG y lo más preferentemente PEG monometoxilado. Los polímeros solubles en agua pueden ser lineales, ramificados o con forma de estrella con un

amplio intervalo de pesos moleculares. El tamaño del PEG puede variar de 10 a aproximadamente 100 kD. En modos de realización específicos, el tamaño del PEG es de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kD.

Para lograr la unión covalente de polietilenglicol (PEG) y poli(óxidos de alquileo) similares a una molécula, en particular, una proteína, los grupos terminales hidroxilo se deben convertir en primer lugar en grupos funcionales reactivos. Este procedimiento se denomina en el presente documento "activación" y el producto se denomina "PEG activado". Por ejemplo, el PEG metoxilado ("mPEG") se puede activar para la posterior unión covalente a grupos amino por procedimientos bien conocidos en la técnica, es decir, el mPEG se puede modificar para que contenga restos reactivos variables adecuados para la posterior unión a proteínas por medio de residuos aminoácidos que contienen residuos amino disponibles, por ejemplo, residuos lisinilo. Dichos polímeros de mPEG activado incluyen mPEG-succinato de succinimidilo, mPEG-carbonato de succinimidilo, mPEG-imidato y mPEG-cloruro cianúrico. Por ejemplo, el metoxipolietilenglicol-succinato de succinimidilo ("SS-PEG") se puede formar a partir de succinato de mPEG por reacción con hidroxisuccinimida en presencia de diciclohexilcarbodiimida (véase, por ejemplo, Abuchowski *et al.* (1984), *Cancer Biochem. Biophys.* 7:175-186. El PEG se puede activar por cualquier procedimiento conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento. En determinados modos de realización, se usa N-hidroxi-succinimidil-PEG como el PEG activado. En modos de realización preferentes, se usa poli(etilenglicol)-carbonato de succinimidilo ("SC-PEG") como el PEG activado (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 5.122.614. En un caso preferente, la reacción para la unión covalente de SC-PEG con una proteína da como resultado la liberación de un grupo N-hidroxisuccinidilo y una cadena de PEG unida al polipéptido a través de un enlace carbamato por medio de un grupo amino de la proteína (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 5.122.614). Sin embargo, a diferencia de los procedimientos previos conocidos en la técnica, y como se demuestra en el presente documento usando los procedimientos descritos, la reacción de conjugación se puede controlar de modo que el sitio de pegilación se puede seleccionar preferencialmente (por ejemplo, selección preferencial entre un grupo  $\alpha$ -amino amino terminal y un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo lisinilo).

En determinados casos, los procedimientos de activación de PEG en el que se genera *in situ* cloroformiato de PEG por tratamiento del polímero (PEG) con fosgeno. El cloroformiato resultante se hace reaccionar a continuación con N-hidroxisuccinimida (HOSu) seguido de trietilamina (TEA) para proporcionar los derivados activados deseados de PEG. Las preparaciones de polímero activadas se pueden purificar a continuación a partir de los reactivos de bajo peso molecular y se pueden evaluar para determinar la presencia de las cantidades teóricas de grupos activos.

Aunque se puede pegar cualquier proteína de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, esto incluye, en particular, la pegilación de polipéptidos terapéuticos. En determinados casos, la proteína terapéutica para su uso de acuerdo con los procedimientos de la invención puede ser, por ejemplo, una proteasa, inhibidor de proteasa, hormona hipofisaria, poyetina, factor estimulador de colonias, hormona, factor de coagulación, factor anticoagulante, factor neurotrópico, factor reumatoide, proteína CD, factor osteoinductivo, interleucina, factor de crecimiento, interferón, citocina, somatomedina, quimiocina, inmunoglobulina, gonadotropina, interleucina, quimiotactina, interferón, alérgeno de proteína de unión a lípidos, o una combinación de los anteriores. Los ejemplos no limitantes específicos de dichas proteínas terapéuticas incluyen, interferón- $\alpha$ 2A, interferón- $\alpha$ 2B, interferón  $\beta$ , interferón- $\gamma$ , factor de crecimiento insulinoide 1 (IGF-1), factor de crecimiento insulinoide 2 (IGF-2), insulina, hormona de crecimiento humano (hGH), factor de crecimiento transformante (TGF), eritropoyetina (EPO), factor transformante neurotrópico ciliar (CNTF), trombotropina (TPO), factor neurotrópico derivado de cerebro (BDNF), IL-1, insulintropina, IL-2, factor neurotrópico derivado neuroglial (GDNF), IL-1 RA, activador tisular del plasminógeno (tPA), superóxido dismutasa (SOD), urocinasa, catalasa, estreptocinasas, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), hemoglobina, factores de crecimiento neurotrópico, adenosina desaminasa (NGF), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), hormona de crecimiento bovino (BGH), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), calcitonina, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína incrementadora de la permeabilidad bacteriana (BPI), L-asparaginasa, arginasa, uricasa,  $\gamma$ -interferón, fenilalanina amonio liasa, hormona estimuladora de folículo, proinsulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento nervioso (NGF), factores de necrosis tumoral, calcitonina, hormona paratiroidea (PTH, incluyendo PTH humana), proteína morfogénica ósea, factores de crecimiento hemopoyético, hormona luteinizante, glucagón, péptido similar a glucagón 1 (GLP-1), péptido YY (PYY), factor VIIIc, factor IX, factor tisular, y factor von Willebrand, proteína C, factor natriurético auricular, tensioactivo pulmonar, bombesina, trombina, encefalinasa, agente antimülleriano, cadena A de relaxina, cadena B de relaxina, prorrelaxina, Dnasa, inhibina, activina, factor de crecimiento endotelial vascular, integrina, proteína A o D, factor neurotrópico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), CD-3, CD-4, CD-8, CD-19, M-CSF, GM-CSF, G-CSF, fragmentos biológicamente activos de cualquiera de los anteriores o combinaciones de los anteriores. En casos preferentes, la proteína o polipéptido es EPO natural.

Los conjugados preferentes se fabrican haciendo reaccionar la proteína o polipéptido natural con un polímero soluble en agua activado. Preferentemente, el polímero soluble en agua es PEG. Aún más preferentemente, el PEG soluble en agua es mPEG. Preferentemente, el mPEG tiene un peso molecular de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 kD, más preferentemente, de aproximadamente 10 kD a aproximadamente 50 kD, aún más preferentemente de aproximadamente 10 kD a aproximadamente 25 kD y lo más preferentemente, de aproximadamente 12 kD. En determinados modos de realización, el PEG activado es N-hidroxi-succinimida-PEG ("NHS-PEG"). En modos de

realización preferentes, el PEG activado es éster de carbonato de succinimidilo ("SC-PEG"). Preferentemente, el PEG activado y el EPO natural reaccionan en un tampón de reacción.

5 Las formulaciones de EPEG variables (es decir, EPO conjugado) se produjeron usando múltiples especies de PEG activado. Todas las formulaciones sometidas a prueba, exceptuando la fabricada usando PEG ramificado de 40 kD, demostraron una actividad mayor que la EPO natural en un modelo de rata *in vivo* de inducción de hematocrito. Este resultado fue independiente de si se usó SC-PEG o NHS-PEG o de si el peso molecular del PEG era de 12 kD o de 20 kD, o de si la conformación del PEG era lineal o ramificada.

10 El "tampón de reacción" como se usa en el presente documento, es un tampón estándar libre de componentes amina, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS). Preferentemente, el tampón de reacción tiene una concentración de sal, por ejemplo, Na, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 100 mM, lo más preferentemente, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, y aún más preferentemente, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM. En determinados modos de realización, el polipéptido se mezcla con el polímero soluble en agua activado seco, con agitación. Preferentemente, el tampón de reacción tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5 o de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 7,5. En casos preferentes, el tampón de reacción tiene un pH neutro de aproximadamente 7,0. En determinados modos de realización, la proporción molar de proteína (por ejemplo, EPO) con respecto a polímero soluble en agua activado en el tampón de reacción es de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, a aproximadamente 1, a aproximadamente 60. En otros casos, el tampón de reacción comprende una proporción molar de proteína (por ejemplo) con respecto a polímero soluble en agua activado de aproximadamente 1 a aproximadamente 6, a aproximadamente 1 a aproximadamente 60. En casos preferentes, el tampón de reacción comprende una proporción molar de proteína eritropoyetina con respecto a polímero soluble en agua activado de aproximadamente 1 a aproximadamente 7. La condición de reacción preferente es un tampón de reacción neutro de aproximadamente pH 7,0 y que comprenda una proporción molar de polímero soluble en agua con respecto a polipéptido de aproximadamente 7 a aproximadamente 1.

30 En otros casos determinados, el tampón de reacción puede comprender además un disolvente orgánico. En dichos casos, el disolvente orgánico preferente es dimetilsulfóxido ("DMSO"). El DMSO puede estar presente en la mezcla de reacción en una concentración de un 5-80 % y, preferentemente de un 10-40 % (v/v). El DMSO se usa ampliamente como disolvente general, pero no para que afecte a las reacciones de pegilación, en particular, para que afecte preferencialmente los sitios de pegilación resultantes de dicha reacción. Las condiciones de reacción descritas en el presente documento parece que dirigen específicamente la conjugación covalente del PEG activado hacia los sitios de lisina particulares. Además, ahora se ha descubierto que la adición de DMSO al tampón de reacción altera los sitios de pegilación. En particular, la adición de DMSO al tampón de reacción como se describe en el presente documento dirige la reacción hacia la pegilación preferencial de la proteína a su extremo amino terminal, es decir, el grupo  $\alpha$ -amino amino terminal. En consecuencia, los procedimientos permiten la modificación selectiva de grupos amino específicos de la proteína de interés, en particular, la modificación del extremo amino terminal de la proteína. Esta modificación selectiva de dichas proteínas es beneficiosa ya que, en general, se entiende que la asociación de polímeros solubles en agua, por ejemplo, PEG, con proteínas por medio de grupos amino da como resultado una pérdida de actividad. Se cree que la pérdida de actividad comúnmente asociada con la pegilación era debida a las reacciones dirigidas por lisina, aleatorias, de la técnica anterior. La modificación aleatoria de residuos de lisina puede alterar de forma involuntaria la función de la proteína alterando sustancialmente la estructura terciaria o la morfología de dicha proteína. Aún sin desear quedar limitado por ninguna teoría en modo alguno, las condiciones de reacción divulgadas en el presente documento parece que permiten la modificación selectiva de una proteína en residuos seleccionados o en su extremo amino terminal, que en general, no se cree que contribuya a la actividad de una proteína. En un ejemplo específico, los procedimientos de la invención se usan para unir de una a dos moléculas de PEG específicamente a esos residuos de lisina de EPO con un enlace a PEG que no da como resultado una pérdida de la actividad biológica con relación a la EPO natural sino que más bien da como resultado conjugados de EPO que, sorprendentemente son clínicamente más eficaces que la EPO natural.

55 Previamente, se ha informado de la pegilación específica amino terminal de proteínas usando PEG activado por aldehído. Sin embargo, dicha reacción sólo era específica a pH bajo, perdiendo especificidad a un pH de 7 o mayor (véase, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. N.º 6.077.939 y 5.985.265. En consecuencia, los procedimientos de la presente invención pueden ser de uso particular en la pegilación y/o conjugación de proteínas sensibles al pH.

60 En las reacciones preferentes, el polímero soluble en agua activado estará presente en exceso molar y como tal, será necesario retirar el exceso sin reaccionar de polímero soluble en agua activado de los conjugados de proteína recién formados. Como se usa en el presente documento, "retirar sustancialmente todo el polímero soluble en agua no unido" se refiere, en general a procedimientos conocidos para llevar a cabo una separación de este tipo, por ejemplo, a través de diálisis. En general, se retira aproximadamente un 80 % de polímero soluble en agua no unido, preferentemente se retira aproximadamente un 90 %, más preferentemente se retira aproximadamente un 95 % y lo más preferentemente se retira aproximadamente un 99 %.

65 La memoria descriptiva describe conjugados de proteína, en particular, conjugados de EPO, comprendiendo dichos conjugados una glucoproteína eritropoyetina que tiene al menos un polímero soluble en agua unido a la misma y que

tiene la actividad biológica *in vivo* de provocar que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos. En casos preferentes, la glucoproteína EPO es una eritropoyetina humana y/o análogos de la misma que tienen la secuencia de eritropoyetina humana (por ejemplo, SEQ ID NO:1 (FIG. 1); SEQ ID NO:2 (FIG. 2)) o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma.

La actividad específica de los conjugados de EPO o EPEG se puede determinar por procedimientos descritos en el presente documento o ensayos estándar conocidos en la técnica. La actividad biológica de los conjugados de EPO purificados es tal que la administración de las formulaciones (por ejemplo, una pluralidad de conjugados de EPO, o uno o más componentes de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable) a pacientes humanos da como resultado que las células de la médula ósea incrementan la producción de reticulocitos y glóbulos rojos con relación a la de los grupos de sujetos no inyectados o de control. La actividad biológica de los conjugados de EPO, o fragmentos de la misma, obtenidos y purificados de acuerdo con los procedimientos se puede someter a prueba por procedimientos, por ejemplo, de acuerdo con Annable, *et al.*, Bull. Wild. Hlth. Org. (1972) 47: 99-112 y Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2).

Como se usa en el presente documento, "que puede alcanzar un nivel sérico al menos aproximadamente un 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % mayor que la eritropoyetina natural, aproximadamente 36 horas después de la inyección en ratas Sprague-Dawley", se refiere al hecho de que los conjugados de EPEG de la invención se eliminan del sujeto en un ensayo *in vivo* usando ratas Sprague-Dawley, a una tasa sustancialmente más lenta que la EPO natural o la EPO glucosilada comercialmente disponible dando como resultado un perfil de PK mayor y más amplio con relación al de los compuestos de control. Los niveles séricos de los conjugados de EPEG según la invención se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica usando procedimientos rutinarios en la técnica, por ejemplo, pero sin limitarse a, radiomarcado e inmunoensayo. Preferentemente, los niveles séricos se determinan de acuerdo con la metodología descrita en el ejemplo 4 *infra*.

El ejemplo 4 demuestra que la EPO natural alcanza su mayor concentración sérica (es decir, logra la mayor actividad de transmisión hemática del conjugado de EPO radiomarcado) poco después de que se inyecte y a continuación se elimina dentro de 13 horas. Una EPO glucosilada terapéutica actualmente disponible, ARANESP® (darbopoyetina alfa) (Amgen, Thousand Oaks, GA), tiene una radioactividad de transmisión hemática máxima a las 12-18 horas después de la inyección y presenta una semivida mayor que la EPO natural. Sin embargo, ARANESP® (darbopoyetina alfa) no logra alcanzar concentraciones significativamente mayores en sangre que la EPO natural. Por el contrario, la concentración de actividad de transmisión hemática de los conjugados de EPEG de la invención es similar tanto a EPO como a ARANESP® (darbopoyetina alfa) sobre aproximadamente las 12 horas iniciales; sin embargo, después de aproximadamente 12 horas, la concentración de actividad de los conjugados de EPEG en suero continuó incrementando y se alcanzó un nivel máximo aproximadamente un 50 % mayor que EPO o bien ARANESP® (darbopoyetina alfa) a las 36 horas postinyección. La EPEG se elimina del cuerpo de aproximadamente un 26 % a aproximadamente un 38 % más lentamente que ARANESP® (darbopoyetina alfa). Como resultado, los conjugados de EPEG proporcionan un incremento en la exposición a fármaco total, en términos del área bajo la curva, que la EPO de control o bien ARANESP® (darbopoyetina alfa). De hecho, la EPEG tiene un área bajo la curva (AUC) de aproximadamente un 25 % a aproximadamente un 45 % mayor que ARANESP® (darbopoyetina alfa); y un AUC 4 veces mayor que la EPO natural (véase el ejemplo 4). Como resultado, la EPEG se puede administrar con menos frecuencia que la EPO natural u otras formulaciones de eritropoyetina glucosiladas, por ejemplo, ARANESP® (darbopoyetina alfa), mientras que todavía se logran niveles de actividad biológica mayores.

Los ejemplos de trabajo proporcionados en el presente documento demuestran además que se pueden usar los conjugados de la misma manera que los polipéptidos no modificados.

Específicamente, los conjugados de EPEG divulgados en el presente documento se pueden usar de la misma manera que la EPO natural. Sin embargo, los conjugados tienen al menos dos propiedades superiores inesperadas con relación a los polipéptidos pegilados previos conocidos en la técnica. Específicamente, los conjugados de EPEG tienen una potencia inesperadamente alta con relación a las formulaciones de control y se puede almacenar durante periodos de tiempo prolongados en una formulación libre de proteína (es decir, almacenar en un vehículo farmacéuticamente aceptable libre de proteína). Los resultados experimentales divulgados en el presente documento demuestran que los conjugados tienen un incremento en la semivida en circulación y en el tiempo de permanencia en plasma, una disminución en las tasas de eliminación y un incremento en la actividad clínica *in vivo* con relación a las formulaciones de control.

Aunque sin desear quedar ligado o limitado a ninguna teoría específico en modo alguno, se teoriza que el incremento en la actividad *in vivo* de las formulaciones de EPEG con relación a las formulaciones de control se puede deber al incremento de la semivida en plasma. En la unión a receptor, la EPO natural y su receptor son conocidos porque se procesan y se internalizan por la célula. Una vez que los receptores de la EPO se unen y se internalizan, la señalización de EPO se ha maximizado y las células se vuelven insensibles a cualquier exceso de EPO natural aún presente en el cuerpo. Como se demuestra en los ejemplos de trabajo en el presente documento, a continuación el exceso de EPO natural se excreta rápidamente por el cuerpo. Se cree que el incremento en la actividad biológica de la pluralidad de conjugados de EPO, o uno o más componentes de los mismos, puede ser entonces una función del incremento en la biodisponibilidad y del incremento en la semivida (es decir, incremento en el tiempo en circulación)

en comparación con el tiempo de recambio del receptor. Una vez que se internaliza el receptor de EPO, se requiere un periodo de tiempo para que ocupe su lugar un nuevo receptor. La vida en circulación de la pluralidad de conjugados de EPO de la invención, o uno o más componentes de los mismos, puede ser suficientemente larga para unirse a múltiples generaciones de receptores antes de su eliminación. Los conjugados de EPO incrementan de este modo la actividad *in vivo*, por ejemplo, incrementan la inducción de hematocrito, con relación a la de la EPO natural o formulaciones de EPO glucosilada actualmente disponibles.

Debido a la mejora de estas propiedades, los conjugados de la presente invención se pueden administrar en dosificaciones reducidas y/o pautas reducidas con relación a los de la EPO no modificada o formulaciones a base de EPO actualmente disponibles, por ejemplo, una vez a la semana en lugar de tres veces a la semana, respectivamente. Los conjugados de EPO de la invención también se pueden administrar a un sujeto que lo necesite al menos una vez al día, al menos una vez cada dos días o al menos una vez cada tres días. Sin embargo, es preferente que una formulación de conjugados de EPO se pueda administrar a un paciente que lo necesita, al menos una vez a la semana. Más preferentemente, una formulación de conjugados de EPO de la invención se puede administrar a un paciente al menos una vez cada dos semanas. Lo más preferentemente, la formulación de conjugados de EPO de la invención se puede administrar a un paciente al menos una vez al mes o al menos de una vez cada 6 semanas a dos meses.

Se espera que la disminución en la frecuencia de administración dé como resultado una mejora en el cumplimiento por parte del paciente, dando lugar a una mejora en la respuesta al tratamiento, así como una mejora en la calidad de vida del paciente. En comparación con la EPO glucosilada convencional, se ha descubierto que los conjugados que tienen el peso molecular y la estructura enlazadora de los conjugados de la invención tienen una mejora en la potencia, estabilidad, AUC en circulación, semivida en circulación y coste del perfil de mercancía.

## 5.1 Procedimientos profilácticos y terapéuticos

Los conjugados de proteína se pueden usar como se usa la proteína natural. Por ejemplo, las formulaciones de EPEG se pueden usar como se usa la EPO, por ejemplo, en el tratamiento de anemia debida a enfermedades renales, complicaciones por cáncer, quimioterapia o tratamientos contra el VIH. Otras aplicaciones potenciales específicas de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen todas las enfermedades para las que la expansión de glóbulos rojos serían beneficiosas para los pacientes (por ejemplo, anemia). La cantidad exacta de conjugado es una cuestión de preferencia sujeta a factores tales como el tipo de afección exacta que se está tratando, la afección del paciente que se está tratando, así como otros ingredientes en la composición.

La cantidad terapéuticamente eficaz es esa cantidad de conjugado necesaria para que la actividad biológica *in vivo* provoque que las células de la médula ósea incrementen la producción de reticulocitos y glóbulos rojos. La cantidad exacta de conjugado es una cuestión de preferencia sujeta a factores tales como el tipo de afección exacta que se está tratando, la afección del paciente que se está tratando, así como los otros ingredientes en la composición. Las composiciones farmacéuticas que contienen el conjugado se pueden formular a una potencia eficaz para su administración por varios medios a un paciente humano que experimenta trastornos sanguíneos caracterizados por una producción de glóbulos rojos baja o defectuosa. El promedio de las cantidades terapéuticamente eficaces del conjugado puede variar y en particular se debe basar en las recomendaciones y la prescripción de un médico cualificado. Por ejemplo, se puede administrar de 0,01 a 10 µg por kg de peso corporal, preferentemente de 0,1 a 3 µg por kg de peso corporal, por ejemplo, una vez a la semana. De forma alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden contener diferentes cantidades de EPEG, por ejemplo de aproximadamente 10 a aproximadamente 1000 µg/ml, preferentemente de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 400 µg/ml.

Sin embargo, el experto en la técnica reconocerá que las composiciones farmacéuticas que contienen los conjugados se pueden formular a una potencia eficaz para su administración por varios medios a un paciente humano que experimenta trastornos sanguíneos caracterizados por una producción de glóbulos rojos baja o defectuosa. El promedio de las cantidades terapéuticamente eficaces del conjugado puede variar y se debe basar en las recomendaciones y la prescripción de un médico cualificado.

### 5.1.1 Composiciones farmacéuticas

Las composiciones, por ejemplo, la pluralidad de conjugados de proteína o glucoproteína eritropoyetina, o uno o más componentes de los mismos, preparadas de acuerdo con esa memoria descriptiva, se pueden volver además adecuadas para inyección por mezcla o combinación con un vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable por procedimientos conocidos en la técnica. Entre los vehículos farmacéuticamente aceptables para formular los productos de la invención están solución salina, seroalbúmina humana, proteínas plasmáticas humanas, etc. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado como se describe anteriormente y un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo medios tamponados y solución salina. Los vehículos parenterales incluyen solución

de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en la dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antibióticos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

5 Los conjugados de proteína se pueden formular en composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección con un vehículo o transportador farmacéuticamente aceptable por procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, los documentos WO97/09996, WO97/40850, WO98/58660 y WO99/07401. Los compuestos se pueden formular, por ejemplo, en tampón fosfato de sodio/potasio 10 mM a pH 7 que contiene un agente de tonicidad, por ejemplo cloruro de sodio 132 mM. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede contener un conservante.

10 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas comprenden un conjugado de EPO como se define anteriormente, un anión inorgánico de carga múltiple en un tampón farmacéuticamente aceptable adecuado para mantener el pH de la solución en el intervalo de desde aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0, y opcionalmente uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, la composición puede comprender de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 1000 µg de conjugado de eritropoyetina por ml, 10-200 mmol/l de sulfato, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mmol/l de fosfato, pH de 6,0 a 6,5, opcionalmente CaC<sub>2</sub> hasta aproximadamente 1 mM y opcionalmente, aproximadamente un 1-5 % de un poliol.

15 Se ha demostrado que los conjugados de EPEG son resistentes a la degradación o pérdida de la actividad de EPEG después de al menos 15 meses de almacenamiento a baja temperatura (por ejemplo, -20 °C, 4 °C) o al menos 10 meses de almacenamiento a temperatura elevada (por ejemplo, 25 °C, 37 °C) en solución libre de proteína y se espera que retenga dicha estabilidad durante un periodo de tiempo prolongado. Los conjugados de EPEG en dichas formulaciones libres de proteína también pueden ser suficientemente estables para su envío y almacenamiento bajo condiciones normales, tales como a temperatura ambiente. En comparación, la EPO comercialmente disponible, por ejemplo, EPREX® (epoyetina alfa), requiere seroalbúmina humana (HSA) al 0,2 % para su protección y se envía y almacena a temperatura reducida. Las formulaciones farmacéuticas que contienen ingredientes derivados de suero o biológicos humanos tales como HSA se someten a requisitos de fabricación más rigurosos y al cumplimiento de la normativa; y, como resultado, están asociadas con costes sustancialmente mayores. Sin embargo, es posible formular los conjugados de proteína, por ejemplo, conjugados de EPO, en un tampón salino libre de proteína sin pérdida del ingrediente farmacéutico activo. Como tal, la capacidad de suministrar un fármaco (por ejemplo, EPEG) en un vehículo farmacéuticamente aceptable libre de proteína es una gran ventaja económica.

20 Por lo tanto, en el caso más preferente, la composición farmacéutica está compuesta de conjugado de EPEG y un vehículo farmacéuticamente aceptable libre de proteína. Opcionalmente, el vehículo farmacéuticamente aceptable libre de proteína puede incluir excipientes no proteínicos para potenciar además las propiedades farmacológicas de los conjugados de EPEG. Estos incluyen, pero no se limitan a, azúcares tales como manitol, aminoácidos tales como histidina, o un bajo nivel de tensioactivos convencionales tales como tween-80, etc.

25 La invención se entenderá mejor por referencia a los siguientes ejemplos que ilustran pero no limitan la invención descrita en el presente documento.

## 6. Ejemplos

### 45 6.1 Ejemplo 1: Pegilación de EPO por SC-PEG-12K

Se usó PEG monometoxilado (peso molecular 12.000 KD) activado como éster de carbonato de succinimidilo (SC-PEG-12K) como reactivo de pegilación. Se usó EPO producido en células CHO como polipéptido. Se preparó la proteína EPO (50 mg) a una concentración de 0,61 mg/ml en un tampón de reacción que contenía NaCl 0,15 mM, y fosfato de sodio 10 mM, a pH 6,9. Para determinados experimentos, el tampón de reacción también contenía DMSO al 15 %.

50 Se mezcló la solución de polipéptido con el reactivo de PEG seco mientras se agitaba hasta alcanzar la proporción molar PEG/EPO final de 7:1. Se separaron los productos de la reacción, incluyendo DMSO, y las moléculas de PEG sin reaccionar por diálisis usando una membrana que tiene un límite de peso molecular de 25.000 BCD. Independientemente de la composición del tampón de reacción, es decir, con o sin DMSO, el producto final contenía una mezcla de EPO monopegilada y EPO dipegilada de proporción aproximadamente igual, como se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) (véase, por ejemplo, la FIG. 3B). El producto preparado de esta forma se designó como EPEG.

60

## 6.2 Ejemplo 2: Sitios de pegilación

Se usó SC-PEG (12 kD) para pegar la EPO de acuerdo con el protocolo de ejemplo 1, y las formulaciones de EPEG resultantes o EPO (control) se sometieron a digestión tripsínica como estándar en la técnica: se digirieron 100 pico-moles de la proteína con tripsina tratada con TPCK (Sigma, MO), a un 4 % del peso del sustrato en fosfato de sodio 100 mM pH 8,4 a 37 °C durante 18 horas. Se analizó la digestión en una columna de fase inversa C18 (Apollo C-18, partícula de 5 u, 4,6X100 mm). Se eluyeron los fragmentos usando un gradiente lineal de 50 minutos de un 100 % de TFA al 0,125 % (ácido trifluoroacético) a un 75 % de acetonitrilo/TFA al 0,125 %. Se analizaron los fragmentos eluidos por longitud de onda UV a 230 nm. Los cromatogramas de ejemplo se muestran en las FIG. 3A y 3B para EPO y PEG-EPO, respectivamente. Los picos que estaban presentes en el cromatograma de EPO pero que disminuían o estaban ausentes en el perfil de elución de PEG-EPO indican la modificación de PEG y se caracterizaron por sus sitios de pegilación.

Se analizaron las fracciones que contenían PEG por secuenciación de proteína de acuerdo con el procedimiento estándar usando el sistema ABI Procise. (ABI, CA). Se determinaron los sitios de pegilación haciendo coincidir la secuencia detectada con la secuencia amino de EPO. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Sitios de pegilación de múltiples lotes de PEG-EPO preparados de acuerdo con el ejemplo 1, con y sin DMSO en la mezcla de reacción

N.º Lote de PEG-EPO	Sitios de pegilación (como % de sitios modificados totales)				Presencia de DMSO
	N terminal	lisina-52	lisina-116	lisina-154	
5d29-ty	20	36,4	36,4	7,2	no
5012V	41	36	23		no
501P-c	16	54	30		no
x6012	22	68	5	5	no
L33	14	86			no
7517A	92	8			sí
68291	87	13			sí
6213V	81	19			sí
6214Ty	79	7,5	10	3,5	sí

Sorprendentemente, se descubrió que la presencia de DMSO en el tampón de reacción desplazó la reacción de pegilación para pegilar de forma preferencial, y predominante, el extremo N-terminal (es decir, el grupo  $\alpha$ -amino) de la proteína. En particular, la presencia de DMSO desplazó la reacción de la pegilación de lisina 116. Informes previos habían demostrado la pegilación del extremo N-terminal de proteínas usando sólo PEG activado con aldehído y pH ácido (véase, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. N.º 6.077.939 y 5.985.265).

La pegilación preferencial permitida por la adición de DMSO al tampón de reacción se confirmó usando la secuenciación N-terminal. La EPO no digerida o su homólogo EPEG preparado de acuerdo con el ejemplo 1 (con DMSO) se sometieron a secuenciación N-terminal de acuerdo con procedimientos estándar. Cuando se comparó más de un 50 % de la cantidad esperada de la alanina N terminal no se pudo detectar en la muestra de EPEG, lo que confirma los resultados anteriores. También se lograron resultados similares con el análisis de protección proteolítica usando proteasas tales como proteasa V8 de *Staphylococcus*, quimotripsina o tripsina.

Los datos preliminares también indican que los procedimientos de pegilación de la invención también permiten la pegilación selectiva de otras proteínas, incluyendo la pegilación selectiva del extremo N-terminal de la proteína. Por ejemplo, cuando se pegiló el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) de acuerdo con los procedimientos del ejemplo 1, usando SC-PEG y DMSO, y posteriormente se purificó en una columna SP, el PEG-GCSF se eluyó al mismo tiempo, es decir, en la misma fracción que la de las especies modificadas en el extremo N-terminal de la invención; en ausencia de DMSO, se desplazó el tiempo de elución. Los resultados sugieren que los procedimientos de la invención probablemente permiten la pegilación selectiva de proteínas y, en particular, la pegilación dirigida del grupo  $\alpha$ -amino.

## 6.3 Ejemplo 3: Formulación y estabilidad de PEG-EPO

Se preparó la EPEG de acuerdo con los procedimientos del ejemplo 1, usando un tampón de reacción que contenía DMSO. Se filtró el producto a través de una membrana de 0,2  $\mu$ M para reducir la carga biológica, y a continuación se diluyó con PBS (solución salina tamponada con fosfato pH 6,9) hasta una concentración final de 50  $\mu$ g/ml como se determina por un ensayo de proteína de BCA descrito *infra*. Se filtró de forma estéril el producto en viales de 1 ml para su almacenamiento. Se sometió a prueba el producto terminado por la prueba de LAL (ensayo de pirógeno del lisado de amebocitos de *Limulus*, Cambrex, MD) y tenía un nivel de endotoxinas de menos de 0,1 EU por ml. Se

almacenaron estos viales a 37 °C, 25 °C, 4 °C o -20 °C para las posteriores pruebas de estabilidad y/o actividad. Periódicamente, se sometieron a prueba las muestras para determinar su integridad física por PAGE, el contenido en proteína por ensayo de proteína de BCA, y la actividad de EPO por estimulación del crecimiento de células madre y la producción de hematocrito. (Véase el ejemplo 3 para los ensayos de actividad).

No existen pruebas de degradación o pérdida de EPEG después de 15 meses de almacenamiento a -20 °C o 4 °C por SDS PAGE (véase, por ejemplo, la FIG. 5, carriles 2 y 3, respectivamente). Sorprendentemente, SDS PAGE tampoco indicó una pérdida detectable de integridad física después del almacenamiento durante al menos 10 meses a 25 °C o bien 37 °C (FIG. 5, carriles 4 y 5, respectivamente), aún cuando no existían proteínas transportadoras tales como HSA (seroalbúmina humana) presentes como excipiente para proteger el fármaco. En comparación, la EPO comercial, EPREX® (epoyetina alfa), requiere HSA al 0,2 % para protección. Por lo tanto, es posible formular los conjugados de proteína según la invención en un tampón salino libre de proteína sin pérdida del ingrediente farmacéutico activo, EPEG. También se evaluó la estabilidad de la muestra por el ensayo de contenido de proteína de BCA.

También se evaluó la estabilidad de la muestra por el ensayo de contenido de proteína de BCA. Se seleccionaron muestras representativas almacenadas a 37 °C, 25 °C, 4 °C o -20 °C para un ensayo de proteína de BCA (Pierce Chemical Co, MN) para cuantificar las concentraciones de proteína total. Se incubaron 50 µl de muestra o control in 175 µl de solución de reactivo de trabajo durante 2 horas a 37 °C y se determinó la absorbancia a 650 nm. Se realizó una regresión de 4 parámetros para determinar las concentraciones de proteína. Se generó una curva estándar con BSA (seroalbúmina bovina) y tenía un coeficiente de correlación de 0,999. Después de 12 semanas de almacenamiento, el ensayo determinó unas concentraciones de 50,5 µg/ml para las muestras almacenadas a 37 °C, y de 51,3 µg/ml para las muestras almacenadas a 25 °C. Después de 47 semanas de almacenamiento, el ensayo determinó concentraciones de proteína de 51,4 µg/ml para la muestra almacenada a -20 °C y 49,5 µg/ml para la muestra almacenada a 4 °C. Al comienzo del experimento, las muestras tenían concentraciones de aproximadamente 50 µg/ml determinadas por BCA. Por lo tanto, no se produjo pérdida de proteína con el tiempo. Cabe señalar que no se puede usar EPREX® (epoyetina alfa) como estándar en el ensayo de BCA porque contiene HSA al 0,2 %.

Se observaron pruebas adicionales de la estabilidad de las muestras cuando se evaluaron las muestras para determinar su potencia para inducir la diferenciación de células madre (como se describe en el ejemplo 4) en un estudio acelerado. Se evaluó la actividad a 3 unidades/ml producto y se expresa como porcentaje de formación de colonias inducida por la misma dosis de EPREX® (epoyetina alfa). Las muestras almacenadas a 37 °C durante 12 semanas tenían un 76,3 % de actividad de control, las almacenadas a 25 °C durante 17 semanas tenían un 76,5 %, las almacenadas a 4 °C durante 54 semanas tenían un 85,3 %, y las almacenadas a -20 °C durante 47 semanas tenían un 77,9 %. La muestra a tiempo 0 tenía un 76,5 % de actividad de control; lo que indica que aproximadamente un 100 % de la actividad original se preservó durante el almacenamiento en formulaciones de vehículos libres de proteína.

#### 6.4 Ejemplo 4: Evaluación de los efectos funcionales de PEG-EPO sobre la proliferación de progenitores eritroides usando ensayos de colonias *in vitro* a base de metilcelulosa

Se preparó la EPEG de acuerdo con los procedimientos del ejemplo 1, usando un tampón de reacción sin DMSO. Se evaluó la potencia de EPEG por la capacidad para estimular la diferenciación de células madre en células eritroides. Se usó médula ósea humana normal como fuente de células madre. Se obtuvieron células de baja densidad después de la separación de Ficoll, (kit de Poietics Inc). Se resuspendieron las células en 10 ml de medio Iscove que contenía FBS al 2 % y se comprobó su viabilidad con azul de tripano. Las muestras de prueba de EPEG a (50 µg/ml) y las muestras de control se convirtieron en unidades/ml para su comparación asumiendo el estándar de 125.000 unidades/mg de EPO posterior a la determinación de la concentración de proteína por el ensayo de proteína de BCA como se describe en la sección 6.2. Para el ensayo de células formadoras de colonias (CFC), se fabricó una solución madre de 300 unidades/ml y se prepararon diluciones en serie en medio Iscove que contenía FBS al 2 %. Como control, también se preparó para plaquear una solución madre similar de EPREX® (epoyetina alfa) (20.000 IU/ml, lote n.º 58B097). Se añadieron EPO estándar (EPREX® (epoyetina alfa)) y EPEG a una concentración final de 3, 1, 0,3, 0,1 y 0,03 unidades/ml. Se iniciaron los ensayos de colonias hematopoyéticas con 20.000 células de médula ósea por cultivo. Se establecieron todos los cultivos por triplicado y se incubaron durante 14 días. El día 14, se puntuaron los números de colonias. Se dividieron las colonias en las siguientes categorías, en base a la morfología, CFU-E, BFU-E y CFU-GM como es rutinario en la técnica. CFU-E es una colonia eritroide derivada de un progenitor más maduro y contiene menos de 200 eritroblastos. BFU-E es una colonia eritroide derivada de una célula primitiva y contiene más de 200 eritroblastos. CFU-GM es la colonia derivada de una célula formadora de colonias (CFC) que puede producir colonias con 40 o más granulocitos y/o células macrófagas. Se cuantificaron los eritroides totales (CFU-E + BFU-E) así como las CFC totales (eritroides totales + CFU-GM). El ensayo usando medios únicamente no generó ninguna colonia eritroide detectable. Esto valida que las colonias observadas se deben a las muestras de prueba. El resultado muestra en el ensayo de progenitores un efecto dependiente de la dosis sobre el crecimiento de progenitores eritroides tanto para el EPREX® (epoyetina alfa) de control como para la EPEG de prueba, en ausencia de citocinas añadidas. A las concentraciones de saturación de 3 u/ml, EPEG A, B, y C inducen un 78-82 % de crecimiento de EPREX® (epoyetina alfa) de control. Los niveles son menores a las concentraciones de sub-saturación (1 y 3 unidades/ml), como se muestra en la FIG. 6. El gráfico muestra el promedio en número de 3 lecturas. El coeficiente de

variación promedio es de un 11 % para 3 unidades/ml, 25 % para 1 unidad/ml, 30 % para 0,3 unidades/ml, y 50 % para 0,1 unidades/ml. Los valores de p para los niveles de confianza eran de  $P < 0,01$ . Después de cinco meses de almacenamiento en un medio libre de proteína, las muestras de EPEG mantuvieron su actividad completa. Los resultados del ensayo se sometieron a análisis estadístico. Se realizaron pruebas de la t estándar para evaluar la diferencia en el número de colonias generadas entre los cultivos sometidos a prueba con EPO y el PEG-EPO a concentraciones equivalentes. Un valor p de menos de 0,01 se considera significativo. Los datos observados indican que el resultado está dentro de este nivel de significación. Se obtuvieron resultados similares usando la EPEG preparada en tampón de reacción que contiene DMSO.

#### 6.5 Ejemplo 5: Estudio farmacocinético de EPEG (PEG-EPO)

Se prepararon dos lotes diferentes de EPEG (EPO-PEG201 y EPO-PEG202) de acuerdo con la metodología del ejemplo 1 usando el tampón de reacción sin DMSO (es decir, se modificó la EPO natural por SC-PEG-12K en los sitios de lisina) y se determinaron las concentraciones de proteína resultantes de las muestras por ensayo de BCA como se describe en la sección 6.3. Se usaron estos compuestos de EPEG para comparar el perfil farmacocinético para la EPO natural, no modificada naturalmente funcional y la EPO-hiperglucosilada aprobada por la FDA (ARANESP® (darbopoyetina alfa), de Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA). Se usó ARANESP® (darbopoyetina alfa) como punto de referencia porque es un producto aprobado por la FDA y tiene una semivida prolongada debido a la hiperglucosilación de la proteína. Para detectar las proteínas en la sangre, se marcaron las cuatro muestras (EPO-natural, EPO-PEG201, EPO-PEG202 y ARANESP® (darbopoyetina alfa)) con  $^{125}\text{I}$  en sus sitios de tirosina usando el procedimiento de cloramina T como es conocido en la técnica. Cada molécula tenía aproximadamente 1-2  $^{125}\text{I}$  unidos. Se marcó cada muestra (80  $\mu\text{g}$ ) y se separó del  $^{125}\text{I}$  no unido residual usando una columna de desalación. Se detectó la actividad de las proteínas y se verificó sobre gel de poliacrilamida y una columna de fase inversa. Se evaluaron las muestras pegiladas para determinar la subpoblación de EPO que está conjugada con una molécula de PEG (1PEG-EPO), o la subpoblación de EPO que está conjugada con 2 moléculas de PEG (2PEG-EPO). Las proporciones de 1PEG-EPO con respecto a 2PEG-EPO fueron 54:46 en EPO-PEG201; y 45:55 en EPO-PEG202. Para analizar el perfil farmacocinético de los cuatro lotes de proteína radiomarcados, se inyectaron por vía subcutánea soluciones de proteína a la dosificación de 4 Ci/kg de peso corporal en ratas Sprague-Dawley macho. Se dividieron las ratas en 5 subgrupos con 4 animales cada uno para evitar más de 3 muestras de sangre para cada animal. Se tomaron muestras de sangre a diferentes puntos temporales después de la inyección (0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 horas). Se determinó la cantidad de proteína radiomarcada en la muestra de sangre usando un contador de centelleo y se evaluaron estadísticamente los datos generados. Los resultados se muestran en la FIG. 7. EPO-PEG201 y EPO-PEG202 tienen perfiles farmacocinéticos similares. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que ambos tienen un perfil PK mayor y más amplio que ARANESP® (darbopoyetina alfa) o bien EPO natural. La tabla 2 muestra los resultados del análisis de los parámetros PK usando un modelo de un compartimento y acumulación de dosificación.

Tabla 2: Parámetros farmacocinéticos de cuatro EPREX® (epoyetina alfa) y EPO-PEG

	Tmáx. (h)	Cmáx (pCi/ml)	AUC (pCi*h/ml)	semivida
EPO	8,84	3208	96240	12,84
EPO-PEG201	21,69	4139	333400	32,53
EPO-PEG202	20,02	5199	386600	30,03
ARANESP®	15,8	4072	267300	23,64

La EPO natural alcanzó un nivel alto tan pronto como se inyectó y se eliminó dentro de 13 horas. ARANESP® (darbopoyetina alfa), la forma de acción prolongada actualmente aprobada de EPO, alcanzó un máximo a las 12-18 horas y presentó una semivida mayor que la EPO pero no logró alcanzar concentraciones significativamente mayores en la sangre. Los niveles sanguíneos de EPEG fabricada de acuerdo con los procedimientos divulgados en el presente documento, fueron similares tanto a EPO como a ARANESP® (darbopoyetina alfa) durante las 12 horas iniciales, después de este tiempo la concentración de actividad continuó incrementando y alcanzó un nivel máximo aproximadamente un 50 % mayor que EPO o bien ARANESP® (darbopoyetina alfa) a las 36 horas. La EPEG se eliminó del cuerpo de aproximadamente un 26 % a aproximadamente un 38 % más lentamente que ARANESP® (darbopoyetina alfa). Esto da como resultado una exposición total superior, en términos del área bajo la curva, a la EPO de control o bien a ARANESP® (darbopoyetina alfa). De hecho, la EPEG tiene un área bajo la curva (AUC) de aproximadamente un 25 % a aproximadamente un 45 % mayor que ARANESP® (darbopoyetina alfa); y 4 veces mayor que la EPO natural.

#### 6.6 Ejemplo 6: Producción de varias formas de PEG-EPO

Se prepararon múltiples lotes de EPEG de acuerdo con los procedimientos del ejemplo 1, usando un tampón de reacción sin DMSO y usando diferentes variedades de PEG activado. Se ajustó la cantidad de PEG activado usando en la reacción de pegilación de modo que el producto final contenía aproximadamente cantidades iguales de 1 PEG-EPO y 2PEG-EPO. Se purificaron 1 PEG-EPO y 2PEG-EPO usando cromatografía en columna de DEAE. Se

equilibró la columna con un tampón que contenía NaCl 75 mM, fosfato de sodio 5 mM a pH 6,75. Después de la reacción, se dializó la muestra frente al mismo tampón y a continuación se cargó sobre la columna para su purificación. Cantidades pequeñas de PEG-EPO altamente modificado no se unieron a la columna y se eluyeron en el lavado. Se eluyeron las muestras con un gradiente a NaCl 97,5 mM, fosfato de sodio 5 mM pH 6,75. Se eluyó cualquier EPO natural con NaCl 150 mM en tampón fosfato de sodio a pH 6,75. Se evaluaron las fracciones eluidas por electroforesis en gel de poliacrilamida. Se separaron las fracciones en 3 grupos: 1PEG-EPO, 2-PEG-PEG y una mezcla igual de los dos. Se produjeron cinco muestras representativas: Y501P, EPO modificada por NHS-PEG de cadena ramificada (20 kD) con 1PEG-EPO; Y502P, EPO modificada con NHS-PEG de cadena ramificada (20 kD) con 2PEG-EPO; Y5012, EPO modificada por NHS-PEG de cadena ramificada (20 kD) con cantidad igual de 1PEG-EPO y 2PEG-EPO; L33, EPO modificada con SC-PEG de cadena lineal (12 kD) con cantidad igual de 1 PEG-EPO y 2PEG-EPO; y X6012, EPO modificada con NHS-PEG de cadena ramificada (40 kD) con cantidad igual de 1 PEG-EPO y 2PEG-EPO. Se determinaron las concentraciones de proteína de las muestras finales como se describe en la sección 6.3.

#### 15 **6.7 Ejemplo 7: Estudios farmacocinéticos de variantes de PEG-EPO**

Se administraron muestras de EPEG producidas como se indica en el ejemplo 6 a ratas para comparar y evaluar la actividad : Y501P (1PEG-EPO), Y502P (2PEG-EPO) y Y5012 (mezcla de 1 PEG-EPO y 2PEG-EPO).

20 Se alojaron ratas Sprague-Dawley (libres de patógenos específicos, 5 semanas de edad, machos) en jaulas con parte superior de filtro en una instalación para animales con aire acondicionado. Se proporcionó agua a voluntad. Las ratas se adaptan durante una semana después de su llegada antes del estudio. Se diluyeron muestras de EPEG con PBS antes de su inyección. Las ratas (cada una de aproximadamente 250 g) se inyectan por vía subcutánea con 5 µg de proteína total en 1 ml de tampón (PBS) o 1 ml de PBS (control) y se monitorizó el hematocrito durante 25 días. Se determinó el hematocrito extrayendo sangre de la vena de la cola en un tubo capilar heparinizado (Marienflid, Alemania). Después del sellado, se centrifugaron los tubos capilares con una centrifuga para hematocrito (Hanil Science Industrial, Corea) durante 10 minutos con velocidad máxima. Se determinaron los niveles de hematocrito por cálculo del porcentaje de concentrado de eritrocitos usando procedimientos estándar (FIG. 8). Sorprendentemente, 2PEG-EPO tuvo una actividad similar a 1PEG-EPO.

#### 30 **6.8 Ejemplo 8: Inducción de hematocrito por varias formas de PEG-EPO**

Se sometieron a prueba adicionalmente las variantes de EPEG producidas como se describe en el ejemplo 6 en el modelo de ratón de inducción de hematocrito indicada en el ejemplo 7. Las formulaciones de EPEG seleccionadas para este ensayo comprendían cada una aproximadamente cantidades iguales de 1PEG-EPO y 2PEG-EPO: L33, Y5012 y X6012 (véase el ejemplo 5). Se comparó su actividad *in vivo* en términos de incremento de hematocrito con la de PBS y EPO natural. Como se describe *supra*, cada animal recibió aproximadamente 5 µg de agente activo, es decir, proteína total. Como se muestra en la FIG. 9, L33 y Y5012 tienen un efecto similar, siendo Y5012 ligeramente más activo. Los pesos moleculares mayores de PEG no incrementaron adicionalmente esta actividad. Todas las formulaciones de EPEG sometidas a prueba, excepto PEG-EPO modificada con PEG ramificado de 40 kD (X6012), demostraron una actividad mayor que la EPO natural. El incremento observado en la actividad con relación a la EPO natural era independiente del uso de SC-PEG o de NHS-PEG, independiente del uso de PEG de 12 kD o 20 kD e independiente del uso de PEG lineal o ramificado.

#### 45 **6.9 Ejemplo 9: PEG-EPO es más potente que la EPO natural**

Se preparó L33 EPEG (es decir, SC-PEG-12K lineal como PEG activado) de acuerdo con el ejemplo 6 y se cuantificó la concentración de proteína como se describe en la sección 6.3. Se evaluó la formulación de EPEG para determinar la actividad *in vivo* de acuerdo con el modelo de rata de acuerdo con los ejemplos 7 y 8. Se evaluaron los niveles de hematocrito a 0, 2, 5, 7, 10 y 14 días. La EPO natural para control fue una EPO humana recombinante (rhu-EPO) producida en un sistema de expresión baculovírico (como es conocido comúnmente en la técnica, Rhu-EPO tiene las mismas secuencias de aminoácidos que la EPO humana original, pero el patrón de glucosilación es diferente). Se administró EPEG o rhuEPO a las ratas como una única inyección a una dosificación de 2,5 o 5 µg por animal (cada una de aproximadamente 250 gramos).

55 El hematocrito durante un periodo de 14 días se muestra en la FIG 10. La administración de EPEG a 2,5 µg de proteína por rata presentó el mismo efecto que una dosificación de 5 µg del control, rhu-EPO, lo que sugiere que la EPEG de la invención es dos veces más potente que el control. Con una dosificación de 5 µg, la EPEG indujo un nivel de hematocrito de aproximadamente un 80 %, casi dos veces el inducible por la EPO no modificada, es decir, no pegilada. Cabe destacar que el control, rhu-EPO a una dosis de 5 µg ejerció un nivel de inducción de hematocrito similar a la dosis de 2,5 µg. El resultado sugiere que la EPO de control ya había alcanzado una meseta en la inducción de hematocrito a las dosificaciones sometidas a prueba. Estos resultados no fueron sorprendentes ya que publicaciones previas han reivindicado que las formulaciones de EPO no logran presentar efectos de respuesta a la dosis a una dosificación mayor que la de 2,5 µg sometida a prueba. Por el contrario, la formulación de EPEG de la invención presentó un efecto de respuesta a la dosis a la mayor dosificación, dando como resultado una inducción de hematocrito sustancialmente mayor que la lograda usando el compuesto de control. En consecuencia, las

formulaciones de EPEG de la invención prolongan tanto las propiedades farmacéuticas como el potencial del fármaco como se entiende actualmente en la técnica.

**6.10 Ejemplo 10: Inyecciones dobles que demuestran el efecto de acción prolongada de EPEG**

- 5 Se sometió a ensayo el efecto de la administración en serie de las formulaciones de EPEG preparadas de acuerdo con el ejemplo 1, usando un tampón de reacción que contenía DMSO, para determinar la actividad *in vivo* de acuerdo con el modelo de rata de los ejemplos 7 y 8.
- 10 Las ratas Sprague-Dawley macho se dividieron en grupos que recibieron una (día 0) o bien una serie de dosis (día 0, 14) de formulaciones de EPEG ("no inyectado" o "inyectado", respectivamente en la FIG. 11). Se monitorizaron los niveles de hematocrito durante 21 días (FIG. 11). Con relación a los sorprendentes niveles de hematocrito obtenibles con una única inyección de 5 µg (FIG. 9 y FIG. 10), la actividad de las formulaciones de EPEG, es decir, inducción de hematocrito, se vuelve más pronunciada usando un esquema de dosificación de inyección en serie (FIG. 10; EPEG 5
- 15 inyectado). Usando el esquema de dosificación de administración en serie (cada dosis de 5 µg), el nivel de hematocrito se acercó al nivel inesperado del 90 %, lo que demuestra una mejora en la actividad con relación a los compuestos de control.

Listado de secuencias

- <110> Abuchowski, Abraham  
Lee, Lihsyng Stanford
- 5 <120> Eritropoyetina modificada
- <130> 13939-105001
- 10 <150> US 60/835.429
- <151> 04/08/2006
- <160> 2
- 15 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 165
- <212> PRT
- 20 <213> Homo sapiens
- <400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Arg Thr Gly Asp  
 165

- <210> 2
- <211> 166
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Arg Thr Gly Asp Arg  
 165

10

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una pluralidad de moléculas de eritropoyetina (EPO), seleccionadas del grupo que consiste en EPO natural y rhuEPO, conjugada cada una con al menos una molécula de polietilenglicol (PEG), estando dicha conjugación de forma predominante en el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal, por medio de un enlace carbamato, con preferencia a estar en los residuos lisinilo de dicha proteína.
2. La pluralidad de moléculas conjugadas de la reivindicación 1, en la que dicha proteína EPO está unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG.
- 10 3. La pluralidad de moléculas conjugadas de la reivindicación 1, en la que dicho polietilenglicol (PEG) es SC-PEG.
4. Una composición farmacéutica que comprende: (a) una pluralidad de moléculas de EPO, seleccionadas del grupo que consiste en EPO natural y rhuEPO, conjugada cada una con al menos una molécula de polietilenglicol (PEG), estando dicha conjugación de forma predominante en el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal, por medio de un enlace carbamato, con preferencia a estar en los residuos lisinilo de dicha proteína, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 5. La composición de la reivindicación 4, en la que dicha proteína EPO está unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG.
- 20 6. La composición de la reivindicación 4, en la que el polietilenglicol es SC-PEG.
7. La composición de la reivindicación 4, en la que la molécula de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kD a aproximadamente 40 kD y es lineal o bien ramificado.
- 25 8. La composición de la reivindicación 4, en la que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable está libre de proteína.
9. Un procedimiento de conjugación de forma covalente de polietilenglicol (PEG) soluble en agua, activado, con un residuo amino de una proteína EPO que comprende: (a) hacer reaccionar dicha proteína con dicho PEG soluble en agua activado en un tampón de reacción que comprende DMSO de aproximadamente un 10 a aproximadamente un 40 por ciento (v/v), y (b) retirar sustancialmente todo el PEG soluble en agua no conjugado.
- 30 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el tampón de reacción es un tampón estándar libre de amina que comprende DMSO.
- 35 11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho PEG soluble en agua activado es SC-PEG.
- 40 12. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho tampón de reacción tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5.
- 45 13. El uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende (a) una pluralidad de moléculas de EPO, seleccionadas del grupo que consiste en EPO natural y rhuEPO, conjugada cada una con al menos una molécula de polietilenglicol (PEG), estando dicha conjugación de forma predominante en el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal, por medio de un enlace carbamato, con preferencia a estar en los residuos lisinilo de dicha proteína, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una insuficiencia de glóbulos rojos en un paciente que lo necesita.
- 50 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha proteína EPO está unida covalentemente a una o dos moléculas de PEG.
- 55 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable está libre de proteína.
- 60 16. La composición de la reivindicación 1 o 4, en la que dichas moléculas de EPO están conjugadas con moléculas de PEG de forma predominante en el extremo N-terminal, con preferencia a estar conjugadas en el residuo lisina-52, lisina-116 o lisina-154.
- 65 17. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende (a) una pluralidad de moléculas de EPO, seleccionadas del grupo que consiste en EPO natural y rhuEPO, conjugada cada una con al menos una molécula de polietilenglicol (PEG), estando dicha conjugación de forma predominante en el grupo  $\alpha$ -amino del extremo N-terminal, por medio de un enlace carbamato, con preferencia a estar conjugada en los residuos lisinilo de dicha proteína, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una insuficiencia de glóbulos rojos en un paciente que lo necesita.

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu  
Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr  
Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile  
Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys  
Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln  
Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln  
Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu  
Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser  
Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu  
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu  
Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg  
Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr  
Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp (SEQ ID NO:1)

FIG. 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu  
 Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr  
 Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile  
 Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys  
 Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln  
 Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln  
 Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu  
 Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser  
 Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu  
 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu  
 Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg  
 Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr  
 Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg  
 (SEQ ID NO:2)

FIG. 2

1 2 3 4

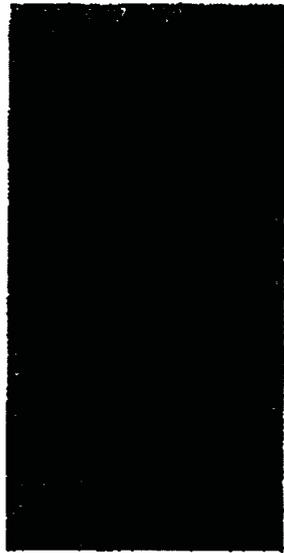


FIG. 3A

1 2 3

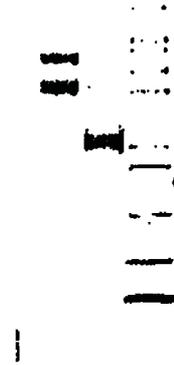


FIG. 3B

Mapa tripsínico de EPO

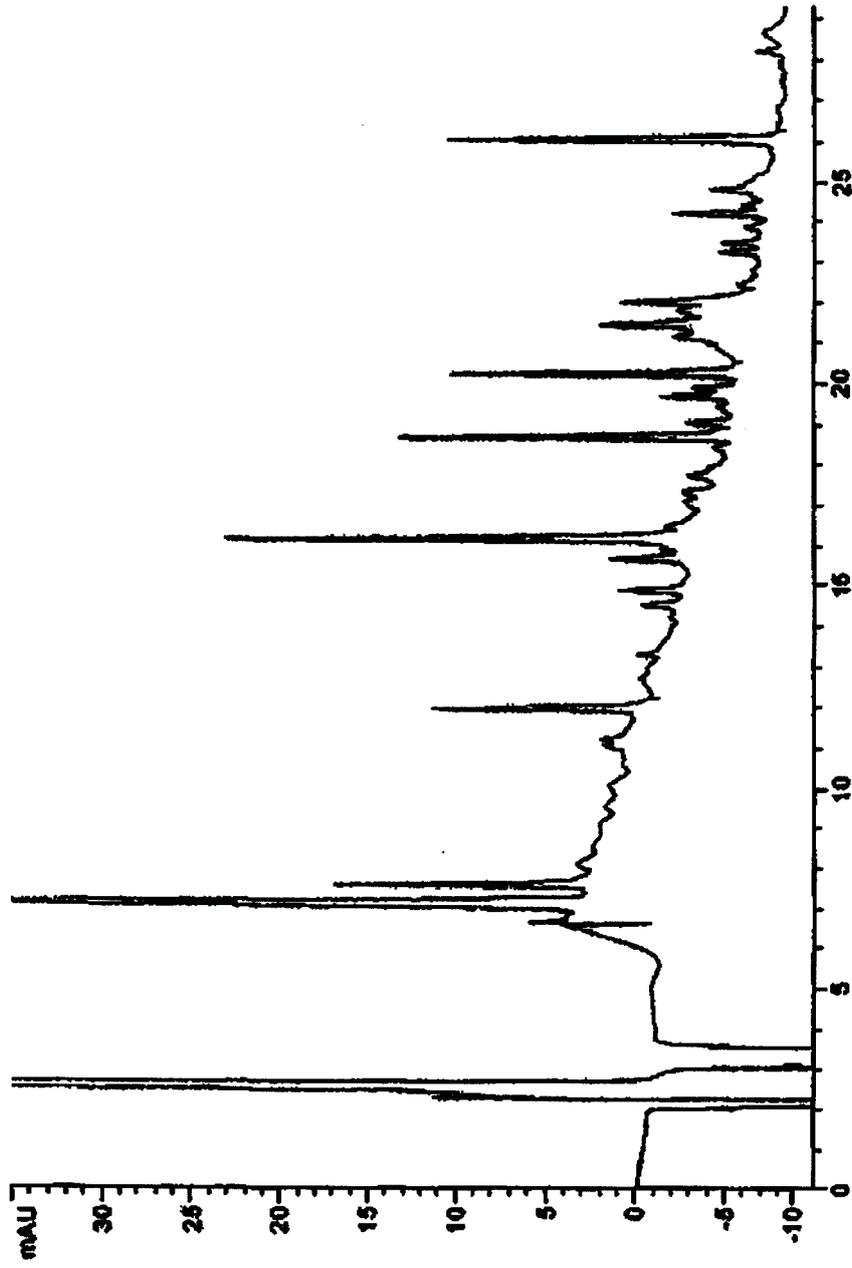


FIG. 4A

Mapa tripsínico de EPEG

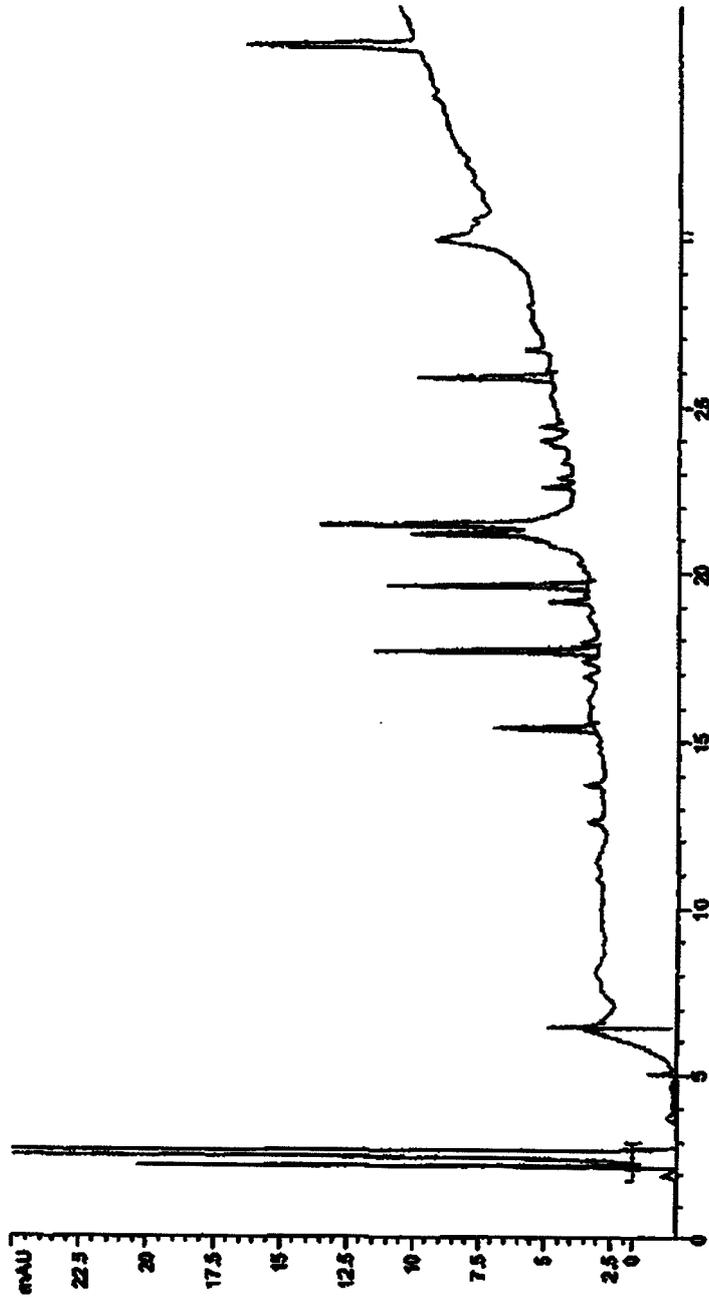


FIG. 4B

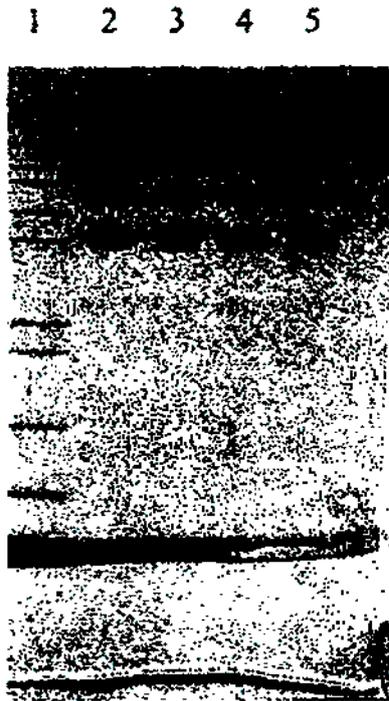
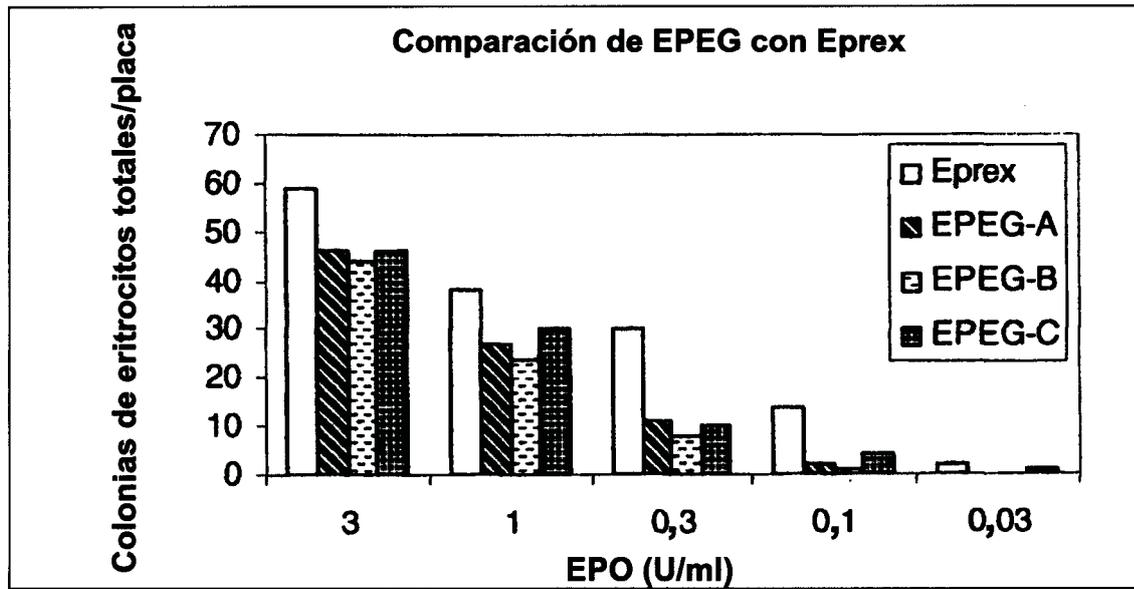


FIG. 5



**FIG. 6**

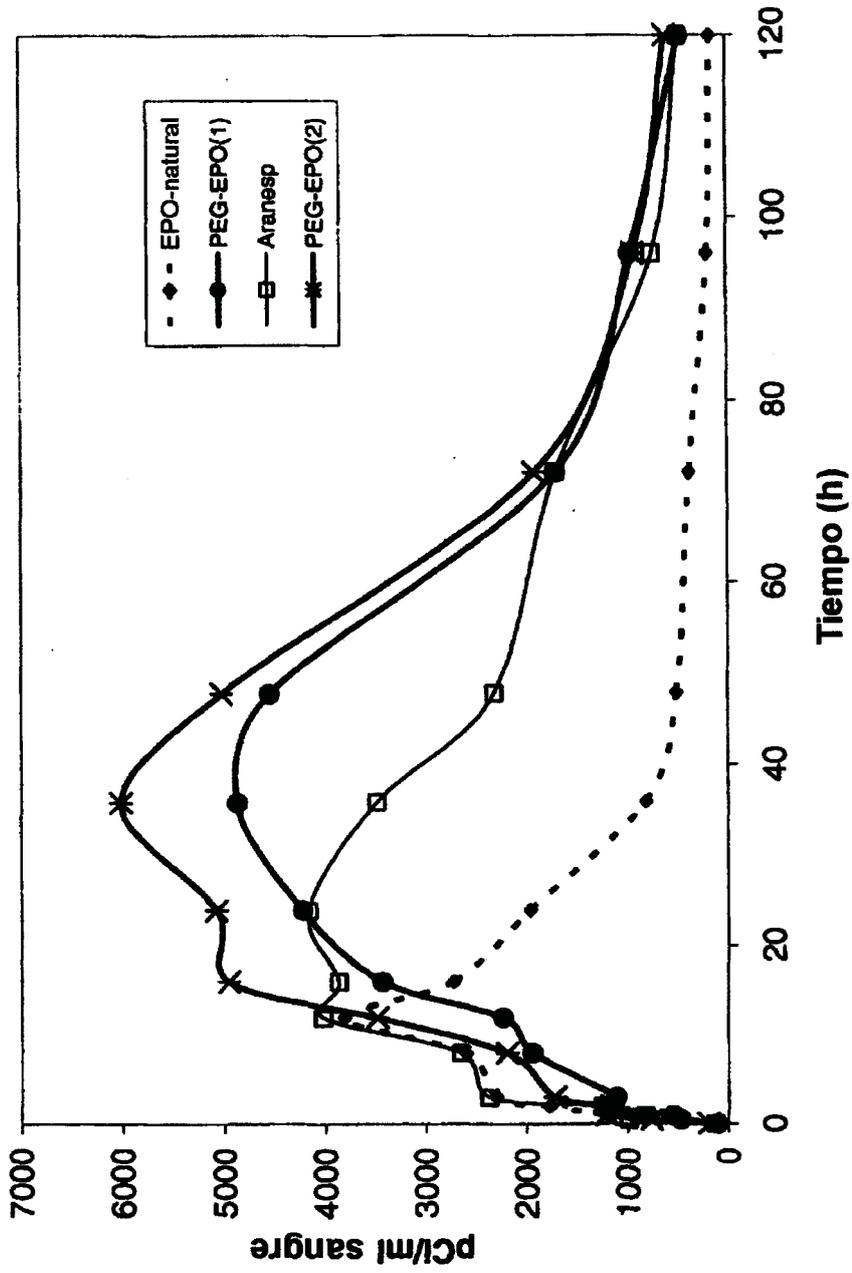


FIG. 7

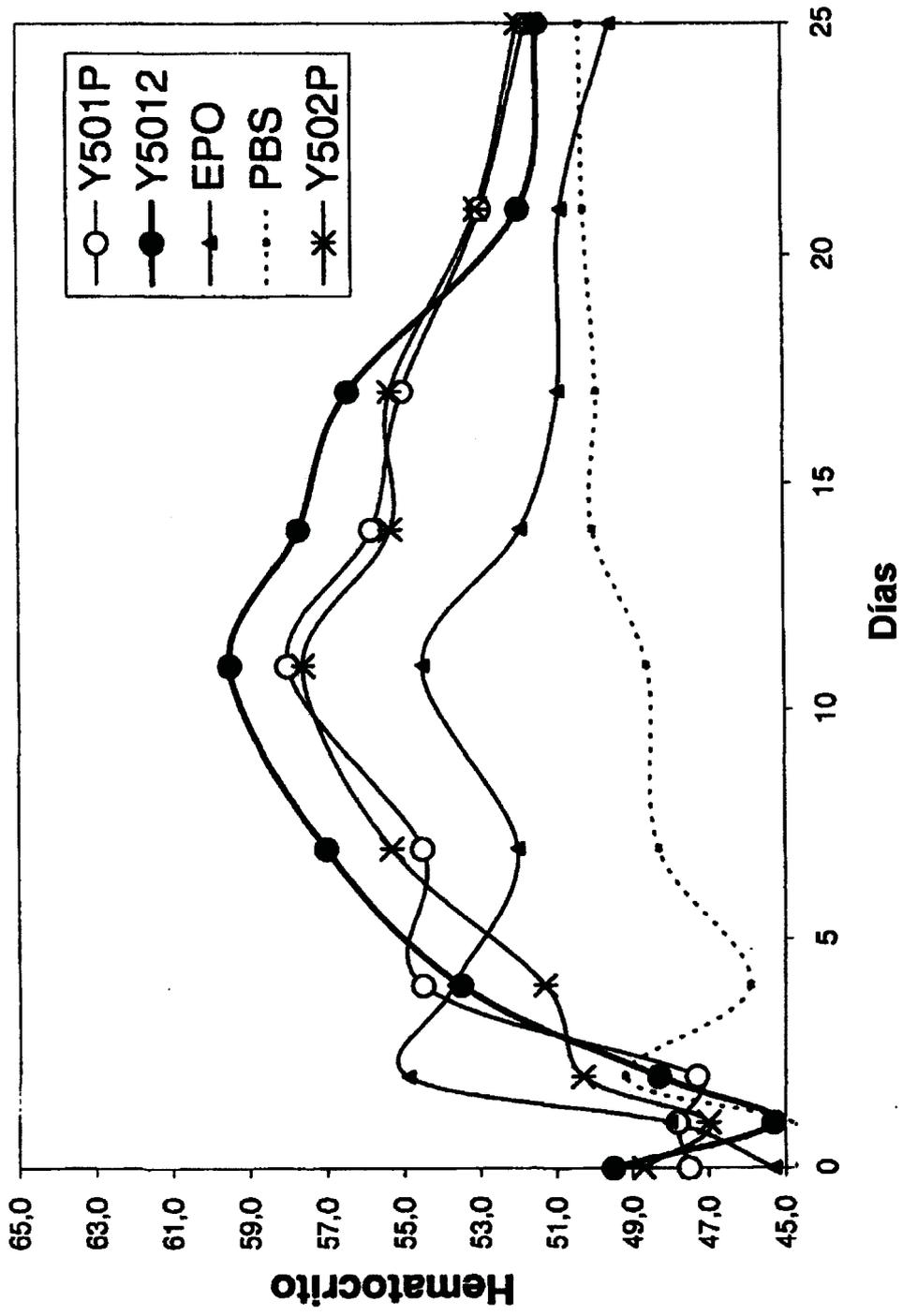


FIG. 8

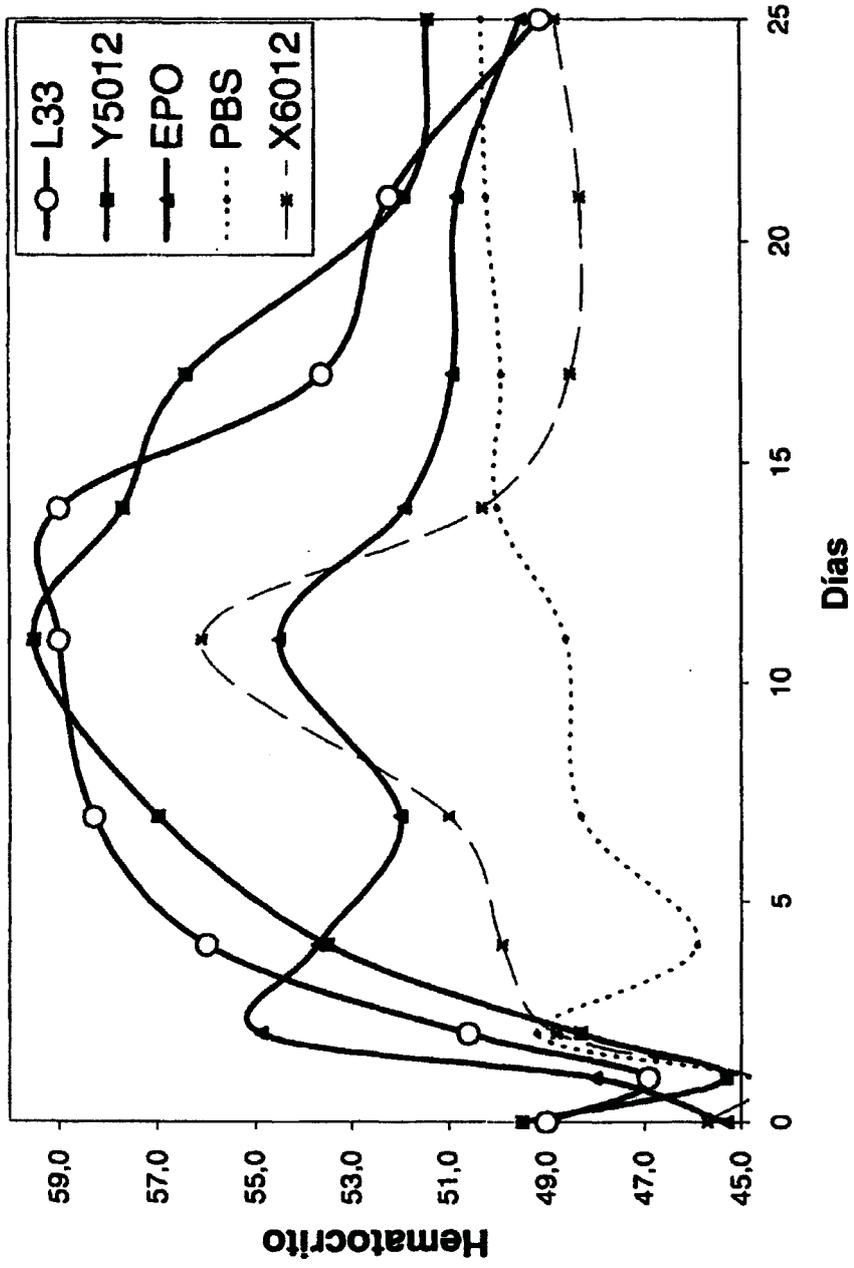


FIG. 9

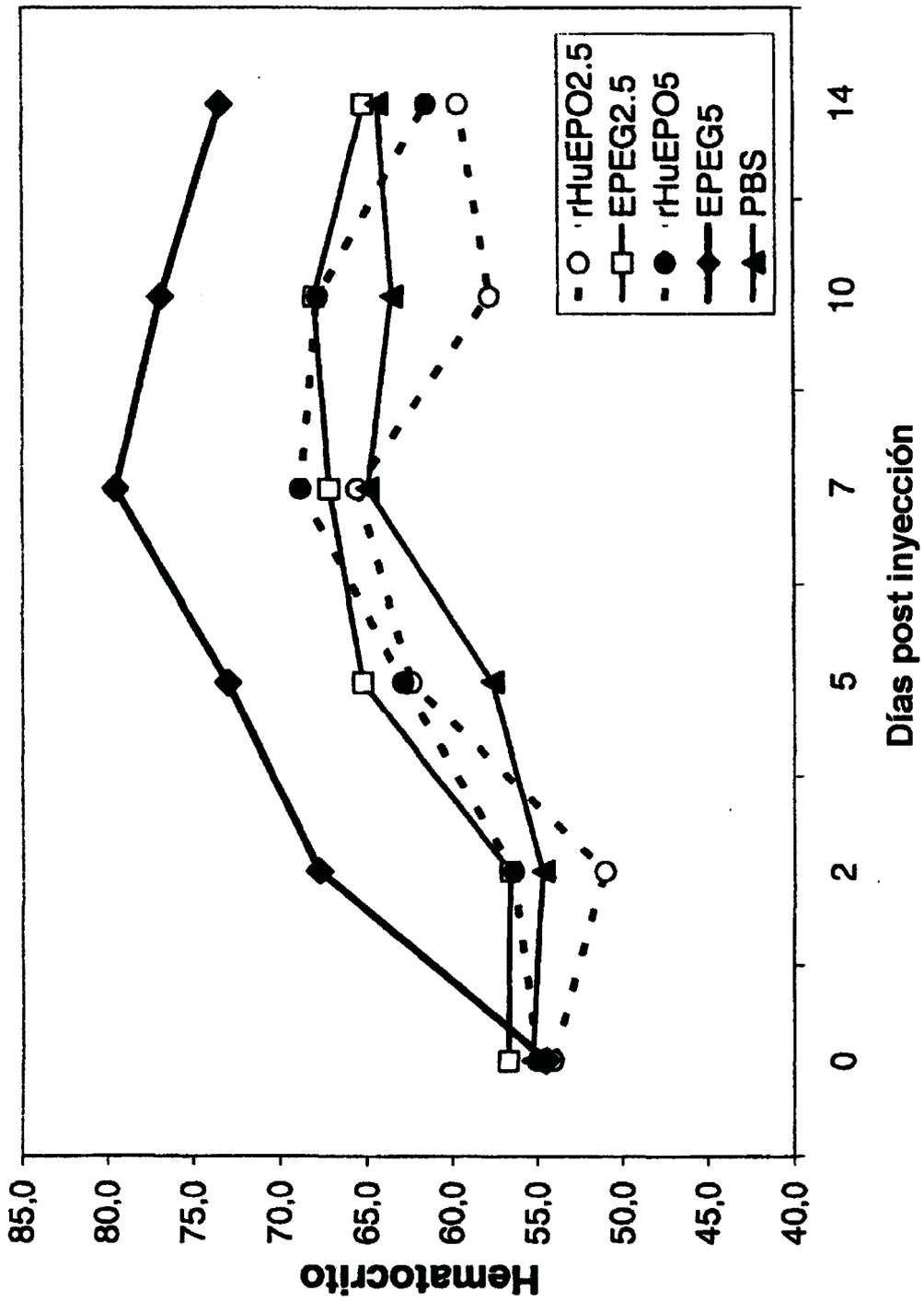


FIG. 10

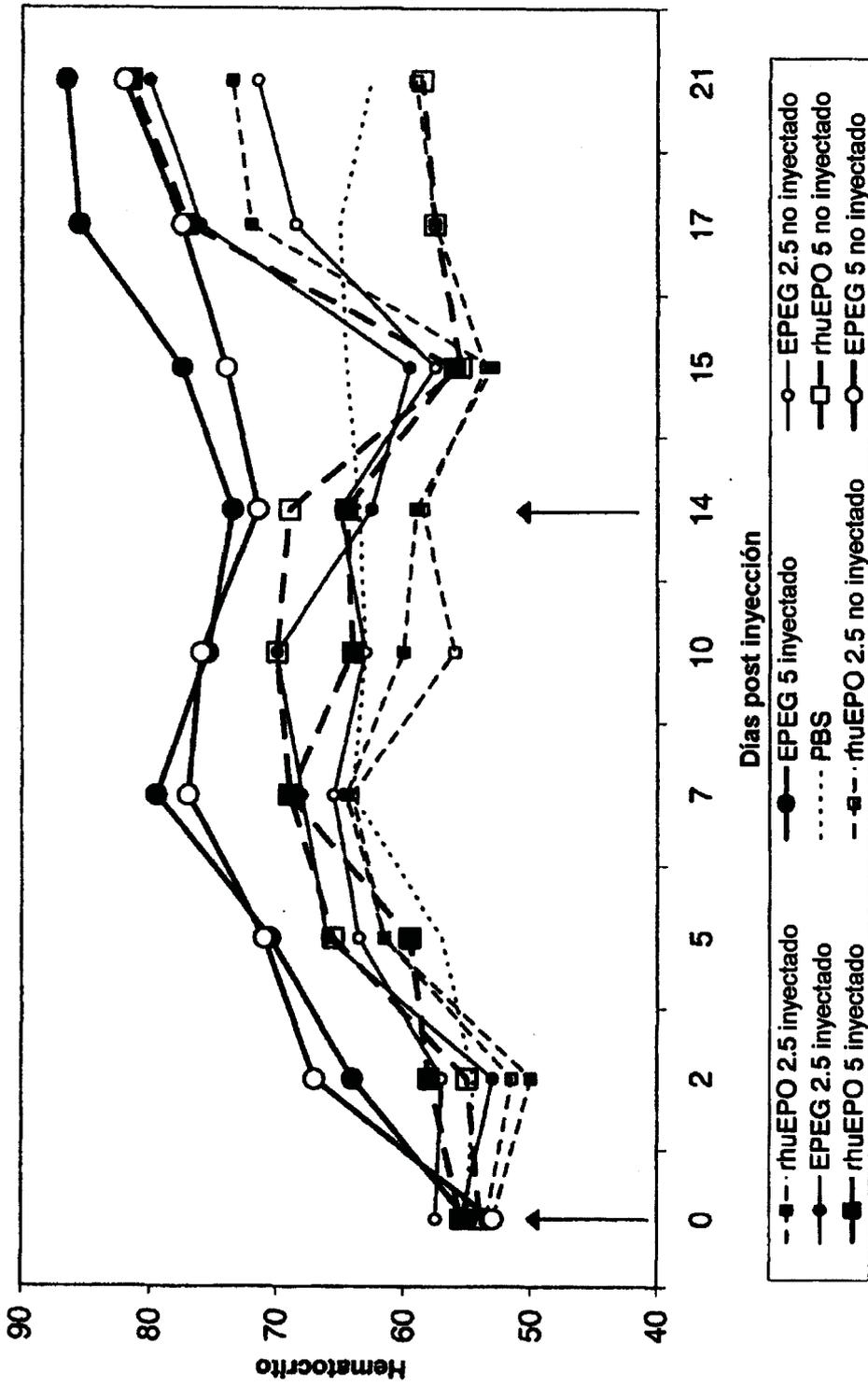


FIG. 11