

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 778**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/505** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 7/00** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 15/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2007 E 12153232 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2450373**

54 Título: **Proteínas de fusión humanas recombinantes de EPO-Fc con vida media prolongada y actividad eritropoyética in vivo mejorada**

30 Prioridad:

**27.01.2006 US 340661**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.07.2015**

73 Titular/es:

**NOVAGEN HOLDING CORPORATION (100.0%)  
2nd Floor, The Grand Pavilion Commercial  
Centre, 802 West Bay Road, P.O. Box 10338  
George Town, Grand Cayman KY1-1003, KY**

72 Inventor/es:

**WANG, HAITAO;  
DU, YONG;  
ZHANG, RUI;  
XU, JING y  
LIU, LONGBIN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 539 778 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

Proteínas de fusión humanas recombinantes de EPO-Fc con vida media prolongada y actividad eritropoyética in vivo mejorada.

5

Campo Técnico

**[0001]** Esta aplicación se refiere a proteínas de fusión de la eritropoyetina humana.

10

Antecedentes

**[0002]** La eritropoyetina humana (EPO por sus siglas en inglés), un miembro de la familia del factor de crecimiento hematopoyético, se sintetiza principalmente en el riñón adulto y el hígado fetal en respuesta a la hipoxia tisular debido a la disminución de la disponibilidad de oxígeno en la sangre [1]. La función principal de la EPO es actuar directamente sobre ciertos progenitores y precursores de glóbulos rojos en la médula ósea para estimular la síntesis de la hemoglobina y los glóbulos rojos maduros. También controla la proliferación, la diferenciación y maduración de los glóbulos rojos. La eritropoyetina humana recombinante tiene la misma secuencia de aminoácidos al igual que la eritropoyetina de origen natural, se ha producido y aprobado para tratar la anemia asociada con la insuficiencia funcional del riñón, cáncer y otras condiciones patológicas [2]. Además de sus propiedades eritropoyéticas, informes de investigación recientes [3] indican que la EPO también actúa sobre células de la médula no ósea tales como las neuronas, lo que sugiere otras posibles funciones fisiológicas / patológicas de la EPO en el sistema nervioso central (CNS por sus siglas en inglés) y otros órganos / sistemas. Dado que los receptores de EPO se han encontrado en muchos órganos diferentes, la EPO puede tener múltiples efectos biológicos, como el de actuar como un agente anti-apoptótico.

25

**[0003]** La eritropoyetina humana es una glicoproteína con un peso molecular de 30,4 kilodaltons. Los hidratos de carbono representan aproximadamente 39% de su masa total. El gen eritropoyético se encuentra en el cromosoma 7q11-22 y se extiende por una región de 5.4kb con cinco exones y cuatro intrones [4]. El precursor de la EPO consiste en 193 aminoácidos. De la escisión de la secuencia líder y el último aminoácido Arg por modificación post-traduccional se obtiene la EPO madura que teniendo esta 165 aminoácidos. La glicosilación, con tres sitios ligados a N en Asn 24, Asn38, Asn83 y un sitio O-ligado en Ser126, juega un papel crucial en la biosíntesis, estructura terciaria y la bioactividad in vivo de la EPO [5]. La EPO funciona uniéndola a un receptor de la eritropoyetina, una transmembrana glicosilada y fosforilada polipéptida con el peso molecular de 72-78 kilodaltons. Esta unión provoca la homodimerización de los receptores que conducen a la activación de varias vías de transducción de señales: JAK2 / STAT5 del sistema, proteínas G, canales de calcio, y quinasas. Se necesitan dos moléculas de proteína EPO para unirse simultáneamente a una molécula de receptor para lograr una óptima activación de receptores[6].

**0004]** Como el primer factor de crecimiento hematopoyético aprobado para la terapia humana, la EPO humana recombinante (rHuEPO por sus siglas en inglés) se ha utilizado para el tratamiento de la anemia resultante de la insuficiencia renal crónica, cánceres (principalmente anemia asociada a la quimioterapia), enfermedades autoinmunes, SIDA, cirugía, trasplante de médula ósea y los síndromes mielodisplásicos, etc. Curiosamente, los estudios recientes han observado también que la rHuEPO tiene funciones que no pertenecen al sistema sanguíneo y muestra el potencial de ser utilizado como un fármaco neuroprotector para la isquemia cerebral, trauma cerebral, enfermedad inflamatoria y trastornos degenerativos neuronales [7].

45

**[0005]** Actualmente, tres tipos de rHuEPO o rHuEPO análogos están disponibles comercialmente, principalmente a rHuEPO alfa, rHuEPO beta, y darbepoetina alfa [8]. Estas tres proteínas recombinantes se unen al mismo receptor de la eritropoyetina, pero difieren en estructura, grado de glicosilación, afinidad de unión al receptor y metabolismo in vivo. Desde la introducción inicial de rHuEPO-alfa en la década de 1980, los médicos reconocieron rápidamente el requisito de dosis / inyección frecuente de la droga como una deficiencia significativa. La media de la vida media in vivo de la rHuEPO alfa y beta administradas por vía intravenosa o subcutánea son sólo 8,5 y 17 horas, respectivamente [9, 10]. Por lo tanto, los pacientes necesitan un horario de inyección diario, dos o tres veces por semana, lo cual impone una carga para los pacientes y profesionales de la salud. Por lo tanto, ha habido una necesidad desde hace mucho tiempo de desarrollar eritropoyetinas recombinantes análogas que tienen una vida media in vivo más larga y / o aumento de la actividad eritropoyética.

55

**[0006]** Se han hecho intentos en la técnica anterior para cambiar genéticamente o modificar químicamente la estructura de la proteína de la eritropoyetina nativa, ya sea ralentizando su metabolismo in vivo o mejorando sus propiedades terapéuticas. Por ejemplo, parece que hay una correlación directa entre las cantidades de hidratos de carbono que contienen ácido siálico de la molécula de EPO y su metabolismo in vivo y la actividad funcional. Si se aumenta el contenido de hidratos de carbono de la molécula de EPO, por consecuencia resultara con una vida media más larga y actividades mejoradas in vivo [11, 12]. Amgen ha diseñado la rHuEPO darbepoetina alfa analógica que incluye 5 ligados a N cadenas de carbohidratos, dos más que la rHuEPO. La darbepoetina alfa, también conocida como la proteína novel estimulante de la eritropoyesis (NESP por sus siglas en inglés) y se vende bajo la marca comercial Aranesp™. Darbepoetina alfa difiere de EPO humana nativa en cinco posiciones (Ala30Asn, His32Thr, Pro87Val, Trp88Asn, Pro90Thr) que permite la unión de dos oligosacáridos adicionales ligados

65

a N en las posiciones de residuos asparagina 30 y 88. La darbepoetina alfa se une al receptor de la EPO en una manera idéntica que la EPO nativa para inducir la señalización intracelular que implica la fosforilación de la tirosina por JAK-2 cinasa y las mismas moléculas intracelulares Ras / MAP-k, P13-k y STAT-5. Debido al mayor contenido en carbohidratos, la vida media de la darbepoetina alfa en animales y seres humanos es casi tres veces más larga que la de la rHuEPO- alfa (25,3 horas frente a 8,5 horas) [9]. La Darbepoetina alfa (Aranesp™) también parece mostrar una mayor bioactividad en comparación con la EPO de origen natural o la EPO humana recombinante in vivo [13] y ha sido aprobada por la FDA como un medicamento rHuEPO de segunda generación; este fármaco sólo necesita ser administrado una vez por semana para alcanzar los efectos terapéuticos iguales que los de inyectarse 2-3 veces por semana de rHuEPO [10, 14, 15].

**[0007]** Otros intentos para prolongar la vida media de la EPO se han centrado en aumentar el peso molecular de la proteína EPO a través de la conjugación química con polietilenglicol y similares. PEGylated- EPO tiene un peso molecular mucho más grande y está protegido de ser eliminado de la circulación y por lo tanto tiene una vida media plasmática más larga [16]. Sin embargo, la PEGilación puede alterar la estructura de la proteína resultante en los cambios imprevistos de la función y la especificidad de la mitad de EPO. También hay informes del aumento del peso molecular de la EPO por otros métodos, tales como enlazar la molécula de EPO a una proteína portadora (albúmina humana), o para formar la homodimerización de dos moléculas completas de EPO mediante el uso de péptidos que unen (de 3 a 17 -aminoácidos) o por químicos reactivos de reticulación [17,18, 19, 20]. Aunque todos estos métodos han logrado cierto éxito en la extensión de la vida media y la mejora de las actividades de la EPO, la combinación de la molécula de EPO con el fragmento Fc de la inmunoglobulina humana (IgG por sus siglas en inglés) en una proteína de fusión como se describe en la presente solicitud logra ventajas únicas.

**[0008]** La inmunoglobulina IgG humana se compone de cuatro polipéptidos enlazados covalentemente por enlaces de disulfuro (dos copias idénticas de la cadena ligera y la cadena pesada). La proteólisis de la IgG molécula por papaína genera dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. El fragmento Fc consta de dos polipéptidos unidos entre sí por enlaces de disulfuro. Cada polipéptido, a partir de N- a C-terminal, se compone de una región bisagra, un dominio de CH2 y un dominio de CH3. La estructura fragmento de Fc es casi la misma entre todos los subtipos de inmunoglobulina humana. La IgG se encuentra entre una de las proteínas más abundantes en la sangre humana y constituye del 70 a 75% de las inmunoglobulinas totales en el suero humano. La vida media de la IgG en la circulación es la más larga entre todos los cinco tipos de inmunoglobulinas y puede llegar a 21 días.

**[0009]** La tecnología de bio-ingeniería moderna se ha aplicado con éxito a la creación de proteínas de fusión que consisten en fragmentos de proteínas terapéuticas, tales como citoquinas y receptores solubles, y el fragmento Fc de la IgG humana [21, 22, 23, 24]. Estas proteínas de fusión tienen una vida in vivo \_ significativamente más larga, reteniendo sus propiedades biológicas y terapéuticas. Hasta ahora dos proteínas de fusión que comprenden un fragmento Fc se han desarrollado con éxito como biomedicina y aprobado por la FDA para el tratamiento de la artritis reumatoide y la psoriasis en placas crónica [25, 26].

**[0010]** Se ha demostrado en la técnica anterior que los dímeros de dos moléculas de EPO con enlaces ya sea por reticulación química o por una exposición polipéptida mejoran las actividades in vivo y prolongan la vida media [17, 19]. La actividad mejorada puede deber a la unión más eficiente del dímero de EPO a un receptor, y la vida media in vivo prolongada se debe al mayor tamaño de la proteína dímero. Sin embargo, el proceso de reticulación química no es eficiente y es difícil de controlar. Por otra parte, el péptido de ligamiento en el dímero de EPO puede alterar la estructura tridimensional de la molécula de EPO y el propio péptido puede estimular respuestas inmunogénicas in vivo. Estas deficiencias menoscaban el potencial terapéutico de los dímeros de EPO, sobre todo porque la terapia de reemplazo de EPO en pacientes renales es de por vida.

**[0011]** Por lo tanto, ha surgido la necesidad de EPO análogas que tienen una vida media significativamente más larga y actividades eritropoyéticas mejoradas in vivo, pero no tienen un aumento de propiedades inmunogénicas.

**[0012]** WO 2005/001025 se refiere a una molécula de eritropoyetina vinculada al dominio Fc de una IgG humana a través de un enlazador. EE.UU. 2004/0175824 se refiere a la producción de proteínas de fusión Fc con EPO. WO 2004/004798 describe una estructura de EPO-Fc en la que una porción de la secuencia bisagra es truncada y se añade un enlazador de aminoácidos. WO 01/03737 describe proteínas de fusión que comprenden una citoquina o factor de crecimiento fusionada a un dominio de inmunoglobulina. US 2003/044423 describe más generalmente las proteínas de fusión de anticuerpos.

#### Resumen de la Invención

**[0013]** De acuerdo con la invención, una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una parte de péptido de eritropoyetina humana de origen natural ligado a una porción de péptido de inmunoglobulina se describe. La proteína de fusión tiene una vida media más prolongada in vivo en comparación con una de origen natural o eritropoyetina humana recombinante nativa. En una realización de la invención, la proteína tiene una vida media in vivo por lo menos tres veces mayor que la eritropoyetina humana nativa. La proteína de fusión también puede exhibir una mayor bioactividad eritropoyética en comparación con la eritropoyetina humana nativa.

**[0014]** La porción de péptido de inmunoglobulina es un fragmento Fc de la IgG1 humana. El fragmento Fc comprende dominios CH2 y CH3 y una región bisagra. La porción de péptido EPO está directamente ligada a la región bisagra. La porción de péptido EPO tiene un residuo de cisteína próximo a la terminal de C del mismo y la región bisagra incluye un residuo de cisteína situado más próximo a la parte de péptido EPO. Estos dos residuos de cisteína están espaciadas al menos por 12 aminoácidos aparte. La porción de péptido EPO comprende una molécula de EPO completa directamente vinculada a la porción de inmunoglobulina (es decir, no hay conectores peptídicos externos que se interpongan entre la OEP y porciones de inmunoglobulina).

**[0015]** La invención también se refiere a constructos de proteínas multiméricas que comprenden múltiples unidades de la proteína de fusión de la invención. Por ejemplo, dos proteínas de fusión se pueden ensamblar como un dímero, en el que las regiones de bisagra de las proteínas están unidas por enlaces de disulfuro. El dímero tiene la forma general de una molécula de IgG y es más estable que moléculas libres de EPO.

**[0016]** La invención también se refiere a secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos que codifican la proteína de fusión y las líneas celulares transfectadas y métodos para la producción de la proteína de fusión. La invención incluye además composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de fusión y métodos de utilización de la proteína de fusión y / o las composiciones farmacéuticas, por ejemplo para estimular la eritropoyesis en sujetos en necesidad de terapia.

#### Breve Descripción de los Dibujos

**[0017]** En los dibujos que ilustran diversas realizaciones de la invención, pero que no están destinados a ser interpretados de manera limitativa:

La figura 1A es un diagrama esquemático que muestra la estructura general de la proteína recombinante humana EPO-Fc de fusión (rHuEPO-Fc) de la invención.

La figura 1B es una lista de secuencias que muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducidos (aa) de la proteína rHuEPO-Fc. La longitud total del ADN es 1281bp. Los 426 aminoácidos en la secuencia de la proteína deducida incluyen 27 aa para el péptido señal y 399 aa para la proteína completa rHuEPO-Fc. La proteína completa rHuEPO-Fc se compone de dominio EPO humano (166aa), la región bisagra (16 aa, subrayado), y CH2 y CH3 (217 aa) del fragmento Fc de la IgG1 humana. El peso molecular calculado del polipéptido de la proteína de fusión Fc rHuEPO- madura es 44.6kDa, compuesto de 18.5kDa (41,4%) de fragmento de EPO y 26.1kDa (58,6%) del fragmento Fc de IgG1. Un homodímero está formado por dos enlaces de disulfuro a través de los dos residuos de cisteína (en caja) dentro de la región de bisagra. En el residuo 172 de la proteína de fusión madura (es decir, el sexto aminoácido de la región de bisagra) el residuo de cisteína nativa ha sido sustituido por glicina (negrita).

La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra la estructura y características del plásmido de expresión de mamífero pCD1 utilizada para insertar la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de la proteína de fusión rHuEPO-Fc, y para transfectar células CHO que expresan la proteína de fusión Fc-rHuEPO.

La figura 3 es una imagen de SDS-PAGE que muestra los tamaños de la forma dimérica de la proteína pura rHuEPO-Fc en condición no reducida y forma monomérica de la proteína pura rHuEPO-Fc en condición reducida por análisis de SDS-PAGE. La proteína rHuEPO-Fc purificada a partir de los sobrenadantes de la línea celular CHO cultivadas que expresan rHuEPO-FC principalmente existe como la forma dimérica y tiene un peso molecular de aproximadamente 180 kDa en 8% Bis-Tris gel en estado no reducido. En condición reducida (ditiotreitól 100 mM, DTT) para romper los enlaces de disulfuro, el dímero se separa en dos unidades monoméricas idénticas con un peso molecular de 75 kDa.

La figura 4A y 4B son gráficas que muestran el aumento dependiente de la dosis de los niveles de hemoglobina (Hb) en los ratones normales tratados con tres veces por semana por inyección subcutánea (sc) de rHuEPO-Fc o rHuEPO. Cada punto representa el nivel medio de Hb del grupo (6 ratones). Los niveles del día 0 representan los niveles de Hb antes del tratamiento. A: Los ratones tratados con rHuEPO-Fc. B: Los ratones tratados con rHuEPO nativa.

La figura 5A y 5B son gráficas que muestran el aumento dependiente de la dosis de los niveles de hemoglobina (Hb) en ratones normales tratados con una vez por semana sc de rHuEPO-Fc o rHuEPO. Cada punto representa el nivel medio de Hb del grupo (6 ratones). Los niveles del día 0 representan los niveles de Hb antes del tratamiento. R: Los ratones tratados con EPO-Fc. B: Los ratones tratados con rHuEPO nativa.

La figura 6A y 6B son gráficas que muestran el aumento de los niveles de hemoglobina (Hb) en los ratones normales tratados con inyección por vía intravenosa (iv) de 12,5 mg / kg de rHuEPO-Fc o rHuEPO. Cada punto representa el nivel medio de Hb del grupo (6 ratones). Los niveles del día 0 representan los niveles

de Hb antes del tratamiento. A: Los ratones con tratamiento una vez a la semana. B: Los ratones con tratamiento 3 veces a la semana.

5 La Figura 7 es una gráfica que muestra el aumento dependiente de la dosis de los niveles de hemoglobina (Hb) en 5/6 ratas nefrectomizadas tratadas con una vez por semana sc de rHuEPO-Fc, rHuEPO o darbepoetina alfa (abreviado Darbe.). Cada punto representa el nivel medio de Hb del grupo. Los controles normales eran ratas normales con la inyección de solución portadora. Los controles de modelos fueron las 5/6 ratas nefrectomizadas con inyección de solución portadora. Los niveles de la semana 0 representan los niveles de Hb antes del tratamiento. \*: Semana (s) de tratamiento posterior.

10 La figura 8 es una gráfica que muestra el aumento dependiente de la dosis de los niveles de hemoglobina (Hb) en 5/6 ratas nefrectomizadas tratadas una vez cada dos semanas sc con rHuEPO-Fc, rHuEPO o darbepoetina alfa (abreviado Darbe.). Cada punto representa el nivel medio de Hb del grupo. Los controles normales eran ratas normales con la inyección de solución portadora. Los controles de modelos fueron las 5/6 ratas nefrectomizadas con inyección de solución portadora. Los niveles de la semana 0 representan los niveles de Hb antes del tratamiento. \*: Semana (s) de tratamiento posterior.

15 La Figura 9 es una gráfica que muestra el aumento dependiente de la dosis de los niveles de hemoglobina (Hb) en 5/6 ratas nefrectomizadas tratadas una vez cada dos semanas de manera intravenosa con 62,5 mg / kg de EPO-Fc o darbepoetina alfa (abreviado Darbe.). Cada punto representa el nivel medio de Hb del grupo. Los controles normales eran ratas normales con la inyección de solución portadora. Los controles de modelos fueron las 5/6 ratas nefrectomizadas con inyección de solución portadora. Los niveles de la semana 0 representan los niveles de Hb antes del tratamiento. \*: Semana (s) de tratamiento posterior.

20 Las figuras 10A - 10C muestran las comparaciones de potencia de rHuEPO-Fc, rHuEPO y darbepoetina alfa para estimular la formación de colonias de CFU-E y BFU-E en 5/6 ratas nefrectomizadas tratadas con diferentes dosis y horarios. rHuEPO-Fc y darbepoetina alfa (abreviado Darbe.) de tratamiento mostraron potencias dependientes de la dosis similares para estimular la formación de colonias CFU-E y BFU-E, mientras rHuEPO fue menos potente. A, s.c. una vez cada semana. B, por vía subcutánea una vez cada 2 semanas. C., i.v. una vez cada dos semanas.

25 La Figura 11 es una gráfica que muestra los niveles séricos de rHuEPO-Fc y rHuEPO después de la inyección intravenosa de 5 mg / kg de rHuEPO-Fc o rHuEPO a monos Rhesus (niveles medios de 5 monos).

30 La Figura 12 es una lista de secuencias que muestra la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducidos (aa) de una proteína rHuEPO-FCC tipo salvaje. Los datos de secuencia son los mismos como se muestra en la Figura 1, excepto que un residuo de tipo salvaje cisteína nativa está presente en el residuo 172 de la proteína de fusión madura (es decir, el sexto aminoácido de la región bisagra).

35 La Figura 13 es un aumento dependiente de la dosis que muestra un aumento de hemoglobina (Hb) en los ratones normales tratadas con tres veces por semana por inyección subcutánea (sc) de rHuEPO-Fc (la proteína de fusión mutante de la presente invención), rHuEPO-FCC (la tipo salvaje proteína de fusión) y rHuEPO. Cada punto representa la media nivel de Hb del grupo (8). El control normal eran los ratones normales con la inyección de solución portadora. Los niveles del día 0 representan los niveles de Hb antes del tratamiento.

40 La figura 14 es una grafica mostrando un aumento dependiente de la dosis de hemoglobina (Hb) en ratones normales tratados con inyección subcutánea (sc) una vez por semana de EPO-Fc, rHuEPO-FCC y rHuEPO. Cada punto representa la media del nivel de Hb del grupo (8). El control normal eran los ratones normales con la inyección de solución portadora. Los niveles del día 0 niveles representan los niveles de Hb antes del tratamiento.

#### 55 Descripcion Detallada de la Invencion

60 **[0018]** A lo largo de la siguiente descripción, detalles específicos, se exponen con el fin de proporcionar una comprensión más completa de la invención. Sin embargo, la invención puede ponerse en práctica sin estos detalles. En otros casos, los elementos bien conocidos no se han mostrado o descrito en detalle para evitar oscurecer innecesariamente la presente invención. Por consiguiente, la especificación y los dibujos deben considerarse en un sentido ilustrativo, y no en un sentido restrictivo.

65 **[0019]** Esta solicitud se refiere a una nueva proteína de fusión que tiene propiedades eritropoyéticas. La proteína de fusión, denominada en este documento como rHuEPO-Fc, comprende una molécula de eritropoyetina humana (EPO) recombinante ligada a un fragmento Fc de inmunoglobulina. Como se discute más adelante, la proteína de fusión puede estar en la forma de un dímero que consta de dos subunidades polipeptídicas idénticas. En la

realización mostrada esquemáticamente en la Figura 1A, cada subunidad polipeptídica, desde el N-terminal al C-terminal, se compone de la secuencia polipeptídica de la molécula de EPO humana y la secuencia de polipéptido de la región bisagra, del dominio CH2 y del dominio CH3 del fragmento Fc de inmunoglobulina humana IgG1. Las dos subunidades polipeptídicas están conectadas entre sí por enlaces de disulfuro entre las regiones de bisagra respectivas para formar la estructura de un dímero. Así pues, el dímero tiene la misma forma general que una molécula de IgG y presenta una mejor estabilidad que las moléculas libres de EPO como se discute en los ejemplos siguientes.

**[0020]** Como será evidente para una persona experta en el tema, la región bisagra de una inmunoglobulina intacta proporciona a la proteína flexibilidad suficiente para una eficaz unión de antígeno-anticuerpo. Del mismo modo, en la presente invención la región de bisagra está incluida en el diseño de la proteína de fusión Fc-rHuEPO para mantener su flexibilidad, especialmente cuando la proteína de fusión está en forma de dímero. Como se describe más adelante, esto permite la unión normal de la parte de EPO de la proteína de fusión de EPO-Fc a los receptores de EPO para activar las funciones biológicas de EPO. Se cree que la forma dimérica de la proteína de fusión rHuEPO-Fc, al proporcionar dos moléculas de EPO, es capaz de inducir la activación óptima de los receptores de EPO (por ejemplo, facilitando el receptor de reticulación).

**[0021]** Como se demuestra en los ejemplos que se exponen a continuación, la proteína de fusión de EPO-Fc ha sido exitosamente sintetizada utilizando técnicas de ADN recombinantes. La proteína de fusión se ha mostrado en ratones, ratas y primates para exhibir una vida media in vivo más prolongada y propiedades eritropoyéticas mejoradas en comparación con la EPO recombinante o de origen. Tal como se utiliza en esta solicitud de patente, los términos "eritropoyetina humana nativa" y "eritropoyetina humana nativa" significan EPO, que tiene una estructura de tipo salvaje sin modificar. Como se apreciará por una persona experta en la técnica, EPO humana nativa puede ser de origen natural o producida de manera recombinante (por ejemplo, alfa rHuEPO). El término "EPO humana nativa" no incluye análogos de rHuEPO, como darbepoetina alfa en la estructura de la EPO se ha modificado de manera significativa, como por hiperglicosilación.

**[0022]** La secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión rHuEPO-Fc de la presente invención se muestra en SEQ. ID. No. 1. La secuencia de aminoácidos deducida correspondiente se muestra en SEQ. ID. No. 2. La proteína de fusión completa de rHuEPO-Fc es de 399 aminoácidos de longitud. Como se muestra en la Figura 1B, la proteína de fusión completa rHuEPO-Fc consiste en el dominio EPO (166 aminoácidos), la región de bisagra (16 aminoácidos, subrayado) y los dominios CH2 y CH3 (217 aminoácidos). Una secuencia señal o péptido líder que consta de 27 aminoácidos también se muestra en la Figura 1B. El péptido señal se escinde durante la síntesis de EPO-Fc. Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de rHuEPO-Fc incluyendo la señal o péptido líder se muestran en SEQ. ID. No. 3 y SEC. ID. No. 4, respectivamente.

**[0023]** Como se muestra en la Figura 1B y SEQ. ID. No. 2, el dominio EPO tiene un residuo de cisteína cerca de la C-terminal y de éstos mismos en el aminoácido número 161. La región de bisagra incluye 2 residuos de cisteína, en los aminoácidos números 178 y 181 que están encuadrados en la Figura 1B. Los residuos de cisteína de la región bisagra forman los enlaces de disulfuro entre las subunidades polipeptídicas del homodímero como se discutió anteriormente. La región bisagra de origen natural de un fragmento de la IgG1 humana también tiene una cisteína en el residuo número 6 de la porción de la región bisagra (medido desde el N-terminal). En la presente invención, el residuo de cisteína 6 de la parte de bisagra ha sido sustituido por un residuo que no es cisteína. En particular, en la realización de la Figura 1B y SEQ. ID. No. 2, el aminoácido cisteína se ha sustituido por glicina (en el residuo de aminoácido 172 de rHuEPO-Fc, que corresponde al residuo 6 de la región bisagra). Como será evidente para una persona experta en el tema, otros residuos de no cisteína también podrían ser sustituidos por cisteína en esta ubicación para evitar la formación de un enlace de disulfuro.

**[0024]** Como resultado de la sustitución del aminoácido en el residuo 172, el primer residuo de cisteína de la región bisagra (en el residuo 178) está espaciado 17 aminoácidos desde el residuo de cisteína descrito anteriormente del dominio EPO (en el residuo 161). Los inventores creen que la separación mínima entre la cisteína residuo 161 del dominio EPO y el primer residuo de cisteína de la región bisagra debe ser de al menos 12 aminoácidos para permitir el montaje de éxito y / o el receptor de EPO de unión de un homodímero de rHuEPO-Fc. Es decir, si el residuo 172 es un residuo de cisteína, puede potencialmente formar un enlace de disulfuro no deseado, tal como entre los residuos de cisteína 161 y 172. Esto puede alterar la estructura tridimensional de la molécula de EPO, lo que resulta en la inactividad biológica o actividad biológica reducida.

**[0025]** En una realización de la invención, el dominio EPO está vinculado directamente a la porción del fragmento Fc de la proteína de fusión. Al evitar proporcionar un péptido conector externo, la estructura tridimensional preferida del péptido de fusión rHuEPO-Fc se mantiene y el riesgo de desencadenar una respuesta inmunogénica indeseable se reduce al mínimo. La región bisagra del fragmento Fc es preferiblemente de al menos 9 aminoácidos de longitud y está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10 a 20 aminoácidos de longitud.

Ejemplos

**[0026]** Los siguientes ejemplos ilustrarán adicionalmente la invención con mayor detalle aunque se apreciará que la invención no se limita a los ejemplos específicos.

5

1. Construcción del plásmido recombinante pCdEpo-Fc que codifica la proteína de fusión de de HuEPO-Fc.

**[0027]** La molécula de ADN de longitud completa, que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido de rHuEPO-Fc, se generó mediante PCR de solapamiento usando los siguientes cebadores de oligo (QIAGEN Inc., US):

10

EF5: 5'-ccggaattcgccaccatgggggtgcacgaatgtcctgcct-3';  
 EF3: 5'-ttttcctttgcgccgctatttaccggagacagggagag-3';  
 EFL5: 5'-aggcctgcaggacaggggacaggtgagcccaaatctggtgaca-3';  
 EFL3: 5'-tgtcaccagattgggctcaactctgtcccctgcctgcaggct-3'.

15

**[0028]** Las secuencias de los cebadores indicados anteriormente se enumeran en SEQ. I.D. Nos. 5 - 8 respectivamente.

20

**[0029]** Sitios EcoR I y Not I se introdujeron en EF5 y EF3, respectivamente. Para la expresión óptima de la proteína HuEPO- Fc en células de mamífero, la secuencia de Kozak (GCCACCATGG) también se introdujo en la EF5. EFL5 y EFL3 son secuencias complementarias que consisten en la secuencia de ADN 3'-terminal de Epo (23bp) y la secuencia de ADN 5'-terminal de la bisagra de IgG1 (22 pb).

25

**[0030]** En primer lugar, un fragmento de ADN de EPO de 0,6 kb se amplificó por PCR (Taq ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum) con cebadores EF5 y EFL3 de p9E plásmido que contiene el ADNc de longitud completa de la EPO humana, fragmento Fc de 0,7 kb con los cebadores EF3 y EFL5 a partir del plásmido pD que contiene la longitud completa de la secuencia de ADN de IgG1 humana, respectivamente (p9E y Pd son del propio laboratorio de los inventores). Los dos fragmentos se purificaron a continuación y se mezclaron en igual cantidad. Usando la mezcla como molde, la longitud completa ADN rHuEPO-Fc de 1,3 kb se amplificó por los cebadores EF5 y EF3. El fragmento purificado de 1,3 kb fue digerido por EOCR I y Not I (New England Biolab Inc. EE.UU.) y luego se clonó en el EcoR I / Not vector de expresión de mamífero digerido con pCD1 (Figura 2). El vector recombinante resultante se denominó pCdEpo-Fc y la secuencia de ácido nucleico insertado que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína HuEPO-Fc se confirmó por secuenciación de ADN.

30

35

2. Establecimiento de la línea celular de expresión de rHuEPO-Fc

**[0031]** Las de células de ovario de un hámster chino con deficiencia de dihidrofolato reductasa (DHFR) (CHO / dhfr-, ATCC No.CRL-9096), han sido aprobadas por la FDA para la producción de sustancia biológica, se utilizaron como célula huésped para la expresión rHuEPO-Cf.

40

**[0032]** Las células CHO-dhfr fueron transfectadas con el vector recombinante pCdEpo-Fc utilizando Lipofectamina (Gibco, Cat.No:18292-037, EE.UU.). Los sobrenadantes de la cultura de los clones seleccionados se ensayaron por ELISA (Roche, Cat.No: 1-693 417, Canadá) para la actividad de EPO. Los clones positivos se seleccionaron adicionalmente bajo el aumento de presiones de metotrexato (MTX) . Una línea celular con la más alta expresión de la proteína rHuEPO-Fc fue seleccionada para expresar la línea celular CHO, y adaptado gradualmente a estar en un medio libre de suero (CD CHO Medio, Gibco, Cat.No:10743-029, EE.UU.). Este rHuEPO- Fc expresando la línea celular CHO se utilizó para la producción de proteína rHuEPO-Fc.

45

50

3. Purificación de la proteína rHuEPO-Fc

**[0033]** Las moléculas de proteína rHuEPO-Fc contenidas en los sobrenadantes recogidos de los medios libres de suero que cultivaban las células CHO que expresan rHuEPO-Fc- se aislaron, en primer lugar, por cromatografía de afinidad de la Proteína A (Amersham, Cat.No: 17-0402-01, Canadá). Las proteínas aisladas se purificaron adicionalmente por filtración en gel en HiLoad 16/60 Superdex 200 pg columne (Amersham, Cat.No:17-1069-01, Canadá). La pureza de la proteína rHuEPO-Fc fue de más de 98% según se determinó por electroforesis.

55

4. Determinación de los tamaños de la proteína rHuEPO-Fc pura

**[0034]** En primer lugar, SDS-PAGE se llevó a cabo para determinar los tamaños de la proteína rHuEPO-Fc pura. Como se muestra en la Figura 3, una única banda con un peso molecular de aproximadamente 180 kDa fue visto en 8% Bis-Tris gel en el estado no reducido, que mide el tamaño global de la proteína con la existencia de enlaces de disulfuro. Esto indicó que la mayoría de las moléculas de proteína rHuEPO- Fc se produjeron como la forma dimérica, como se esperaba desde el diseño de la proteína de fusión. Cuando se llevó a cabo el análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras (100 mM ditiotreitól, DTT) para romper los enlaces de disulfuro, se identificó sólo la

60

65

banda con un peso molecular de 75 kDa, de acuerdo con el peso molecular estimado de una única cadena de polipéptidos HuEPO-bisagra región-CH2-CH3.

**[0035]** El peso molecular exacto de la proteína de fusión pura EPO-Fc con glicosilación, determinada por el Espectro de Masas (MALDI-TOF-MS), era 111.099 daltons (111,1 kDa). En este ensayo, sólo se observó un único pico de proteína, lo que indica que la proteína rHuEPO-Fc purificada fue de casi del 100% de pureza. Los 15 aminoácidos de la N-terminal de la proteína rHuEPO-Fc pura se determinaron por análisis de secuencia de proteína como: APPRLICDSRVLERY. Esto fue consistente con la secuencia de los primeros 15 aminoácidos del polipéptido EPO humana nativa, y confirma que la proteína Fc purificada rHuEPO- tiene la correcta y completa secuencia de molécula de EPO según lo predicho por la secuencia de ADN que codifica las secuencias de aminoácidos de la proteína de fusión de EPO-Fc.

#### 5. Actividades de eritropoyetina mejoradas de rHuEPO-Fc en ratones normales

**[0036]** Experimentos in vivo se llevaron a cabo en ratones para confirmar la retención de la actividad eritropoyética de la proteína rHuEPO- Fc y determinar su eficacia en comparación con rHuEPO y darbepoetina alfa. Para fines de comparación, todas las dosis de tres EPOs utilizadas en los experimentos con animales descritos de la invención: nuestra rHuEPO-Fc, rHuEPO (es decir, EPO humana nativa) y darbepoetina alfa, eran las cantidades de moléculas de EPO basadas en la base molar. En lo que respecta a la proteína rHuEPO-Fc, la porción EPO contribuye a 41,4% del peso molecular total rHuEPO-Fc como calculó por la relación del peso de los aminoácidos de la EPO en el peso de los aminoácidos totales de la rHuEPO molécula de Fc (166 bis entre 399 bis). La cantidad de EPO EPO-Fc luego se decidió que el 41,4% del importe total de la proteína EPO-Fc.

**[0037]** rHuEPO-Fc (concentración de almacén: 0.5mg / ml, la pureza del 98,6%) y rHuEPO humano nativo (ewith estructura EPO humana natural) (6000IU / 0,5 ml, fabricada por Kirin Brewery Co., Japón) se diluyeron en la solución del portador (2,5 mg / ml de albúmina de suero humano, 5,8 mg / ml de citrato de sodio, 0,06 mg / ml de ácido cítrico y 5,8 mg / ml de cloruro de sodio, pH5.5-5.6). La dosis de rHuEPO en cantidad se calculó de acuerdo a su actividad / cantidad de racionamiento. Los ratones BALB / c (de 6 a 8 semanas de edad, con un peso 18-22g, un número igual de machos y hembras, comprados a Experiment Animal Center, AMMS, China) se agruparon al azar con 6 en cada grupo. Cada grupo de ratones fue tratado con una combinación de una dosis (0,1, 0,5, 2,5,12.5, 62,5 mg / kg), una ruta de inyección (iv a través de la vena de la cola o sc) y un programa de inyecciones (tres veces por semana o una vez por semana). El grupo de control de ratones se inyectó con el volumen igual con la de la solución del transportador. El tratamiento se prolongó durante 3 semanas y los tiempos totales de observación eran 5 semanas. Las muestras de sangre periférica (vena de la cola) para la medición se tomaron antes del tratamiento, en el cuarto día y el séptimo día de cada semana durante 5 semanas. La Hb se midió como el índice por absorciometría. McAn  $\pm$  SD fue calculada a partir de los datos de cada grupo de prueba y t se llevó a cabo entre los diferentes grupos.

**[0038]** La administración de EPO tres veces por semana a ratones, a condición de que del EPOs tienen actividad eritropoyética normales, sería inducir la estimulación de la eritropoyesis saturada. Como se muestra en la Figura 4, ambos grupos tratados con 3 veces por semana sc tuvieron elevación significativa de los niveles de Hb incluso a la dosis de 2.5 $\mu$ g / kg. Este experimento demostró que rHuEPO-Fc mostró una actividad eritropoyética in vivo tan eficaz como rHuEPO. La elevación de los niveles de Hb en el grupo tratado fue dosis-dependiente. Sin embargo, la elevación saturada de los niveles de Hb fue inducida en ratones a la dosis de 12.5 $\mu$ g / kg de rHuEPO-Fc, mientras que la elevación saturada similar de niveles de Hb se logró solamente a la dosis de 62.5 $\mu$ g / kg de rHuEPO. La elevación de los niveles de Hb inducidos por 2.5 $\mu$ g / kg de EPO-Fc fue también mayor que esa por 2.5 $\mu$ g / kg de rHuEPO. Estos resultados sugieren que la estimulación eritropoyética más potente fue por EPO-Fc que de rHuEPO.

**[0039]** La potencia eritropoyética de rHuEPO-Fc fue explorada aún más mediante la reducción de los tiempos de inyección a una vez por semana vía subcutánea. Como se muestra en la Figura 5, los grupos tratados con rHuEPO-Fc mostraron elevación de los niveles de Hb-dependiente de la dosis a las dosis de 12,5, o 62,5 mg / kg. Ambas dosis de 12,5 y 62,5 mg / kg de rHuEPO también indujeron la elevación de los niveles de Hb en la medida similar, que era mucho menor que la de 62,5 mg / kg de rHuEPO-Fc. Esto indica claramente que rHuEPO- Fc ha mejorado la actividad eritropoyética in vivo. Es presumiblemente debido a ya sea la vida media prolongada de la rHuEPO-Fc in vivo o mejorado receptor EPO de unión / activación por las moléculas de EPO dímero en la proteína rHuEPO-Fc, o por los efectos combinados de ambos.

**[0040]** Cuando las mismas dosis (12.5 $\mu$ g / kg) de rHuEPO-Fc o rHuEPO se administraron por vía intravenosa ya sea tres veces por semana o una vez por semana, se observó la elevación de los niveles de Hb para todos los grupos tratados (Figura. 6). Sin embargo, la administración i.v. una vez por semana de EPO-Fc inducida mayor y persistentemente de los niveles de Hb, que continuaron tiempo después que el tratamiento termino. Estos datos proporcionan apoyo adicional a las propiedades mejoradas eritropoyéticas de la proteína EPO-Fc en comparación con rHuEPO que tiene la estructura de la proteína de origen natural EPO.

#### 6. Actividades eritropoyética mejoradas de rHuEPO-Fc en 5 de 6 ratas nefrectomizadas

**[0041]** Los experimentos en ratones normales demostraron actividades eritropoyéticas mejoradas de rHuEPO-Fc in vivo. Para observar aún más la eficacia de la rHuEPO-Fc en la estimulación de la eritropoyesis, se realizaron



estudios farmacodinámicos en ratas con anemia renal experimental que fue hecha por 5/6 nefrectomías. La eficacia de la rHuEPO-Fc se comparó con los de rHuEPO y darbepoetina alfa (60 mg / ml, mucho. No.N079, fabricado por Kirin Brewery Co., Japón).

5 **[0042]** Ratas Wistar (machos y hembras en igual número, con un peso de 160-180g, compradas a Vitalriver Experiment Animal Inc., Beijing, China. Licencia N° SCXK11-00-0008) fueron utilizadas en esta invención para crear el modelo de anemia debido a la función renal fallida por una nefrectomía en dos etapas [27]. 5/6 nefrectomías se hicieron para ratas con anestesia general por dos operaciones separadas bajo condiciones estériles. Después de que 2/3 del riñón izquierdo se resecó, se les permitió a las ratas recuperarse durante veinte días. El riñón derecho fue resecado con cuidadosamente. Los antibióticos se administran para prevenir la infección después de cada operación. En total 5/6 del tejido renal finalmente fue resecado. Las ratas nefrectomizadas desarrollaron gradualmente insuficiencia de la función renal y anemia. Las ratas entraron en un estado estable de anemia 50 días después de la nefrectomía, y luego se agruparon al azar (9 / grupo) para iniciar la administración de las EPOs. Cada grupo de ratas fue tratado con una combinación de una dosis (2,5,12,5, 62,5µg / kg), una ruta de inyección (iv a través de la vena de la cola o sc) y un programa de inyecciones (una vez por semana o una vez cada 2 semanas). El grupo de control y grupo de modelo de ratas se inyectaron con el volumen igual con la de la solución del transportador. El tratamiento se prolongó durante 4 semanas y el tiempo total de observación era de 6 semanas.

20 **[0043]** Todas las dosis (2,5, 12,5, 62,5 mg / kg) de EPO-Fc, administradas por vía subcutánea una vez por semana, inducidas por dosis-dependiente de la elevación de los niveles de Hb en comparación con el grupo control modelo que no recibieron tratamiento con EPO. Ambos 12,5 y 62,5mg / kg de rHuEPO o darbepoetina, administrados por vía subcutánea una vez por semana también inducen elevación de los niveles de Hb. El aumento de los niveles de Hb en ambos grupos tratados con 12,5 o 62,5 mg / kg de rHuEPO-Fc fueron significativamente más altos que aquellos en los grupos tratados con 12,5 o 62,5 mg / kg de rHuEPO respectivamente. Los niveles de Hb en 25 62,5 mg / kg de rHuEPO-Fc tratados con grupos fueron también ligeramente más altos que en 62,5 mg / kg que de grupos de darbepoetina-tratada. Después de suspender el tratamiento, la disminución de los niveles de Hb en 62,5 mg / grupo tratados con EPO-Fc kg era mucho más lento y los niveles de Hb se mantuvieron más altos que los de los dos grupos de control y de control modelo normales hasta el final de la observación (dos semanas después del tratamiento), lo que indica una fuerte y/o una estimulación erythropoyetica prolongada (que se resume en la Figura 7).

30 **[0044]** Para el tratamiento de inyección subcutánea una vez cada dos semanas, sólo el 12,5 o 62,5 mg / kg de los tres EPOs se administraron (Figura 8). 12,5 mg / kg de rHuEPO apenas aumentaron los niveles de Hb en comparación con el grupo de control de modelo, y la débil respuesta eritropoyética en los 62,5 mg / kg del grupo tratado rHuEPO no lograron los niveles de Hb a la normalidad en comparación con el grupo de control normal. 35 Tratamientos de cualquiera de rHuEPO-Fc o darbepoetina a las dosis de 12,5 o 62,5 mg / kg indujeron elevaciones significativas de los niveles de Hb que fue mayor que la del grupo de control normal, indicando la corrección efectiva del estado de anemia por ambos, rHuEPO-Fc y darbepoetina. No se observaron diferencias significativas entre las mismas dosis de rHuEPO-Fc y darbepoetina en términos de eficacia. La alta dosis de 62,5 mg / kg dio como resultado el aumento persistente de la eritropoyesis hasta la terminación de la observación (dos semanas post-tratamiento). Esto sugiere además que rHuEPO-Fc y darbepoetina exhiben la propiedad de estimulación de larga duración de la eritropoyesis in vivo, que a su vez podría transferirse a la reducción de las frecuencias de administración a pacientes clínicamente.

45 **[0045]** Mientras la darbepoetina ha sido aprobada para uso clínico con inyecciones menos frecuentes para aumentar el cumplimiento del paciente y reducir la carga de trabajo de los profesionales de la salud, estos datos experimentales indican claramente que rHuEPO- Fc da a conocer en la presente invención que tiene beneficios potenciales similares. Como se discutió anteriormente, la darbepoetina, como un análogo mutante de la molécula de EPO humana que contiene compuestos de azúcar adicionales (aumento de la glicosilación), puede tener un mayor riesgo de inducir inmunogénesis in vivo debido a las estructuras tridimensionales alteradas. Sólo la observación a largo plazo de los pacientes sometidos a tratamiento con darbepoetina dará una respuesta decisiva a los riesgos inmunogénicas de darbepoetina. En contraste, rHuEPO-Fc, sin la modificación de la porción de molécula de EPO, tiene un contenido de hidratos de carbono idéntica o muy parecida a la de la EPO humana nativa. Las cantidades de ácidos siálico en pura proteína rHuEPO-Fc de los inventores estaban alrededor de 10,0 mmol / mmol EPO, en consonancia con los parámetros reportados de rHuEPO. La parte Fc de rHuEPO- Fc, con ningún aminoácido externo (s) / péptido que une, representa la estructura general de la IgG1 humana, y teóricamente no conduciría a una respuesta inmunogénica. Si es aprobado clínicamente, rHuEPO-Fc puede proporcionar una mejor opción para los pacientes que actualmente disponibles análogos rHuEPO y EPO, especialmente aquellos que necesitan la administración a largo plazo.

60 **[0046]** Una vez inyectado por vía intravenosa una vez cada dos semanas, tanto rHuEPO-Fc y darbepoetina (62,5 mg / kg) fueron capaces de inducir aumentos de niveles idénticos de Hb en las ratas con anemia renal muy por encima de los niveles normales de Hb en las ratas de control normales (Figura 9). Esto demuestra una vez más la estimulación persistente de la eritropoyesis por EPO-Fc, como la eficacia de darbepoetina ha sido clínicamente probada.

65

**[0047]** Los datos derivados de experimentos de cultivo celular de células de médula ósea recogidas de las 5/6 ratas nefrectomizadas después de los tratamientos (una vez por semana o cada dos semanas, sc o iv) mostró que rHuEPO-Fc, rHuEPO y darbepoetina todas estimularon la formación de CFU-E y BFU-E. Las potencias de rHuEPO-Fc y darbepoetina fueron similares y más fuerte que la de rHuEPO (Figura 10).

**[0048]** Nitrógeno ureico en sangre (BUN, por sus siglas en inglés) y los niveles de Crea fueron similares en el grupo de los grupos tratados y de control de modelo. Los niveles de suero de Fe en todos los grupos tratados eran más altos que la del grupo de control de modelo. Exámenes patológicos observaron el aumento de la distribución de relacionados células con los glóbulos rojos (RBC) en la médula ósea y el bazo de todas las ratas tratadas con EPO.

#### 7. Estudios farmacocinéticos de rHuEPO-Fc en monos Rhesus

**[0049]** Como se discutió anteriormente, los inventores han diseñado rHuEPO-Fc de tal manera que la porción EPO de la proteína de fusión conserve las propiedades funcionales de EPO naturales, tales como la estimulación de la eritropoyesis, y el fragmento Fc de la IgG1 humana permite la existencia estable de la proteína de fusión en la circulación, extendiendo así su vida media in vivo. Los estudios en animales han demostrado las anteriores actividades eritropoyéticas de rHuEPO-Fc se han mejorado en comparación con rHuEPO. Los inventores también han llevado a cabo estudios farmacocinéticos para determinar la vida media in vivo in de rHuEPO-Fc en comparación con la de rHuEPO. Primates se utilizaron para generar los datos, ya que son biológicamente muy similar a los seres humanos.

**[0050]** El diseño del estudio se basó en los informes de la literatura y los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices generales de farmacocinética. Dos grupos de monos Rhesus con 5 monos en cada grupo (3-5kg, adquiridos a partir del Experiment Center Animal, AMMS, China) fueron inyectados por vía intravenosa con 5 mg / kg de rHuEPO-Fc o rHuEPO, respectivamente. Las muestras de sangre fueron tomadas antes y en 0,017, 0,167, 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96, 168, 240 h después de la inyección. Los sueros se recogieron por centrifugación y el suero rHuEPO-Fc o los niveles de rHuEPO se determinaron mediante el uso de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) kits de eritropoyetina humana (adquirido de R & D Systems, Minneapolis, MN). La vida media promedio (tl / 2) de rHuEPO-Fc y rHuEPO inyecta por vía intravenosa fue 35,24 +/- 5,15 h y 8,72 +/- 1,69 h respectivamente (que se resumen en la Figura 11).

**[0051]** Para observar la biodisponibilidad de rHuEPO-Fc, 5 ug / kg de EPO-Fc se inyecta por vía subcutánea a 5 monos Rhesus. Las muestras de sangre fueron tomadas antes y 1, 2, 5, 8, 10, 12, 15, 24, 48, 72, 96, 168, 240 h después de la inyección, y los niveles séricos de rHuEPO-Fc se determinaron por el kit de I + D . El índice de biodisponibilidad se calculó como 35,71 +/- 5,37% con la inyección subcutánea. Esto es idéntico a las figuras de biodisponibilidad reportados de darbepoetina alfa (Aranesp™) en pacientes con insuficiencia renal crónica [9, 15].

**[0052]** Estos datos demuestran que rHuEPO-Fc tiene una vida media prolongada significativamente en primates, y la vida media in vivo de rHuEPO-Fc es al menos cuatro veces mayor que la de rHuEPO fabricado por Kirin Beer Brewing Co. de Japón. La vida media prolongada in vivo contribuye probablemente a la mayor actividad eritropoyética de rHuEPO-Fc.

#### 8. Inmunogenicidad de rHuEPO-Fc en *Macaca fascicularis*

**[0053]** Como se indicó anteriormente, se prestó atención en el diseño de proteína de fusión rHuEPO-Fc para evitar intencionadamente o minimizar los cambios de las propiedades inmunogénicas de la proteína de fusión Fc-rHuEPO. Los inventores evitaron incluir/agregar cualquier amino ácido externo (s) o vincular de secuencias de péptidos en la proteína de fusión. La proteína de fusión HuEPO-Fc inventada de la realización de la Figura 1B sólo contiene las secuencias de polipéptidos de la proteína natural EPO y el fragmento Fc (región bisagra, CH2, CH3) de la IgG1 humana, y teóricamente no induciría una respuesta inmunogénica y la producción de anticuerpos contra la proteína rHuEPO-Fc.

**[0054]** Se realizaron los siguientes estudios de primates para observar la inmunogenicidad de la proteína rHuEPO-Fc. Diez macacos que se alimentan de cangrejos (*Macaca fascicularis*) (masculino / femenino = 05.05, ~ 5 años de peso, promedio de 4.060.3kg masculina, femenina es 2.960.4kg, adquirido de Laboratory Animal Center, AMMS, China) se inyectaron por vía subcutánea con 5 mg / kg de rHuEPO-Fc purificadas 3 veces por semana durante 4 semanas, y dos fueron inyectados con un volumen igual de la solución del transportador como a los animales de control. Los sueros se recogieron una vez a la semana durante 5 semanas (1 semana después del tratamiento) y la prueba de los anticuerpos específicos contra rHuEPO-Fc por ELISA utilizando el purificada rHuEPO-Fc (5 mg / ml) como antígeno de recubrimiento. Además, el recuento de RBC y los niveles de Hb en la sangre periférica también se determinaron dentro del período experimental. Los datos resultantes muestran que, mientras que se observó mejora de la eritropoyesis estimulada en los macacos tratados con rHuEPO-Fc (los números medios de RBC aumentaron de 4.74x10<sup>9</sup> / ml a 6.67x10<sup>9</sup> niveles de Hb / ml y la media de 12,2 g / dl a 13,7 g / dl), rHuEPO-Fc fallaron en inducir anticuerpos específicos detectables contra la proteína de fusión. Estos resultados indican que la proteína de fusión Fc-rHuEPO no causa inmunogenicidad en primates.

### 9. Los estudios de toxicidad aguda de rHuEPO-Fc en ratones normales

**[0055]** Para evaluar la seguridad de la proteína de fusión rHuEPO-Fc, se realizaron estudios de toxicidad aguda en animales.

**[0056]** Dos grupos de ratones BALB / c (n = 20, un número igual de hombres y mujeres, de 5-6 semanas de edad, el peso medio femenino es de 15.860.4g, masculino es de 15.960.6g, adquirido de la Academia China de Medicina, China) fueron inyectados por vía intravenosa una vez con una excesiva cantidad de rHuEPO-Fc purificado (masculino = 13,3 mg / kg, mujer = 13.2mg / kg) o igual volumen de la solución transportadora a través de su cola venas respectivamente. Además de observar la reacción inmediata después de la inyección, el comportamiento general y el estado, las actividades, comer y los patrones de defecación y los cambios fueron monitoreadas y grabadas al día durante 14 días. Todos los ratones también se pesaron en el día 7 y el día 14. En el día 15 después de la inyección, se llevo a cabo el examen anatómico de los principales órganos de los ratones. El examen patológico se llevaría a cabo si no se observaron cambios inusuales o cambios sospechosos en los órganos.

**[0057]** Todos los ratones en los 2 grupos no tenían ninguna reacción instantánea evidente después de la inyección. Dentro del plazo de 14 días, no se observaron cambios evidentes de comportamiento, actividades, patrones de alimentación y defecación. Por otra parte, el peso de los ratones en ambos grupos aumentó de forma constante durante el período de pruebas, y no se encontraron diferencias aparentes entre los 2 grupos en el día 7 o el día 14 después de la inyección. No se detectaron cambios anormales o patológicas en los tejidos de cerebro, pulmón, corazón, hígado y riñón. Estos resultados indican que la administración de una cantidad excesiva de rHuEPO-Fc, mucho más de lo requerido para la exposición de la función normal de la eritropoyesis, es seguro y no tiene efectos tóxicos aparentes.

### 10. Comparación entre EPO salvaje y mutada

**[0058]** También se llevaron a cabo investigaciones para comparar tipo salvaje y versiones mutadas de proteínas EPO. Como se ha descrito anteriormente, en una realización, la invención incluye una única mutación de aminoácidos en el residuo de aminoácido 172 (C172G). Para fines de comparación, una proteína de tipo salvaje de fusión se preparó teniendo un aminoácido de cisteína en el residuo 172 (Figura 12). La proteína de tipo salvaje de fusión se preparó de la misma manera que en los Ejemplos 1 - 3 más arriba. Con respecto a la construcción del plásmido recombinante, se utilizaron los siguientes cebadores oligo (QIAGEN Inc., US) (los aminoácidos alterados en EFL5w y EFL3w en comparación con los cebadores del Ejemplo 1 están en negrita):

EF5: 5'-ccggaattcgccaccatgggggtgcacgaatgtcctgcct-3';  
 EF3: 5'-ttttcctttgcccgcctattaccggagacagggagag-3';  
 EFL5w: 5'-aggcctgcaggacagggacagagttgagcccaaatcttgtagaca-3';  
 EFL3w: 5'-tgtcacaagattgggctcaactctgtcccctgtcctgcaggcct-3'.

**[0059]** Las secuencias de cebadores EFL5w y EFL3w se enumeran en SEQ. I.D. Nos. 9-10, respectivamente.

**[0060]** Experimentos in vivo se llevaron a cabo en ratones para comparar la actividad eritropoyética de la proteína de fusión de tipo salvaje (aquí referido como rHuEPO-FCC) con la proteína de fusión mutado (es decir, la proteína rHuEPO-Fc de la presente invención se ha descrito anteriormente) y con EPO humana recombinante (rHuEPO). Para fines de comparación, todas las dosis de las tres proteínas usadas en este ejemplo, a saber, rHuEPO-Fc, rHuEPO-FCC y rHuEPO, fueron las cantidades de la porción de molécula de EPO solo en una base molar. Con respecto a las proteínas rHuEPO-Fc y rHuEPO-FCC, la porción EPO contribuye a 41,4% del peso molecular total calculado por la relación del peso de los aminoácidos de la EPO al peso de los aminoácidos totales de la rHuEPO - Fc y rHuEPO-FCC moléculas (es decir, 166 aa entre 399 bis).

**[0061]** rHuEPO-Fc (concentración de almacén: 300mg / ml), rHuEPO-FCC (concentración de almacén: 90 mg / ml) y rHuEPO con la estructura natural de EPO humana (6000IU / 0,5 ml, fabricada por Kirin Brewery Co., Japón) se diluyeron en solución transportadora (2,5 mg / ml de albúmina de suero humano, 5,8 mg / ml de citrato de sodio, 0,06 mg / ml de ácido cítrico y 5,8 mg / ml de cloruro de sodio, pH5.5-5.6). La dosis de rHuEPO en cantidad se calculó de acuerdo a su relación actividad / cantidad. Los ratones BALB / c (de 9 a 10 semanas de edad, con un peso 18-22g, un número igual de hombres y mujeres, comprados a Experiment Animal Center, AMMS, China) se agruparon al azar con 8 en cada grupo. Cada grupo de ratones fue tratado con una combinación de una dosis (2.5,12.5, 62,5 mg / kg), una ruta de inyección (sc) y un programa de inyecciones (tres veces por semana o una vez por semana). El grupo de control de ratones se inyectó con el volumen igual de solución transportadora. El tratamiento duró 26 días. Muestras de sangre periférica (vena de la cola) para la medición se tomaron antes del tratamiento, en el segundo, sexto, noveno, 13, 16a, 19a, 22a y 26a días de tratamiento. Hb se midió como el índice por absorciometría. Mean6SD se calcula a partir de los datos de cada grupo de prueba y t se llevó a cabo entre los diferentes grupos.

**[0062]** Como se muestra en la Figura 13, la administración de las tres proteínas de EPO a intervalos de tres veces por semana estimula la eritropoyesis. En cualquiera de las dosis de 2,5 mg / kg o 12,5 mg / kg, rHuEPO-Fc induce mayor elevación de los niveles de Hb que rHuEPO. La elevación más alta de los niveles de Hb se logró mediante la

- dosis / kg 12,5 mg de rHuEPO-Fc. Tanto el 2,5 mg / kg y 12,5 mg / kg dosis de rHuEPO-FCC inducida eritropoyesis mucho más débil que dosis equivalentes de rHuEPO y rHuEPO-Fc como indica la elevación significativa baja de los niveles de Hb en los grupos tratados con rHuEPO-FCC. De hecho, 12,5 mg / kg de rHuEPO-FCC inducen elevación más baja de los niveles de Hb de 2,5 mg / kg de rHuEPO. Estos resultados sugieren que la rHuEPO-FCC ha deteriorado la actividad eritropoyética in vivo en comparación con rHuEPO que tiene la secuencia molecular EPO natural. Por el contrario, la proteína de fusión rHuEPO-Fc de la presente invención exhibió las funciones erythropietic más potentes. La administración de las tres proteínas de EPO a intervalos de tres veces por semana excluido en gran medida el impacto de las diferencias en la vida media de las proteínas.
- 5
- 10 **[0063]** La potencia eritropoyética de rHuEPO-Fc y rHuEPO-FCC se evaluó mediante la reducción de los tiempos de inyección a una vez por semana por vía subcutánea. Como se muestra en la Figura 14, los grupos tratados con rHuEPO-Fc mostraron mayor elevación de los niveles de Hb que los tratados con rHuEPO a las dosis de 12,5 mg / kg o 62,5 mg / kg. Por el contrario, rHuEPO-FCC indujo elevación mucho más débil de los niveles de Hb que la inducida por EPO. Por ejemplo, el 12,5 mg/kg de rHuEPO indujo mayor elevación de los niveles de Hb que la inducida por 62,5 mg / kg de rHuEPO-FCC en la mayoría de los puntos de tiempo. Esto indica además que mediante la reducción de los tiempos de administración para incluir los efectos de la vida media, exposiciones rHuEPO-FCC mucho más débiles funciones eritropoyética in vivo en comparación con rHuEPO que tienen la secuencia molecular natural de EPO y en comparación con la proteína de fusión Fc de la rHuEPO- presente invención.
- 15
- 20 **[0064]** En resumen, estos resultados demuestran que rHuEPO-FCC, formado por la fusión de las secuencias moleculares naturales de ambos EPO humano y un fragmento Fc humano (bisagra, CH2 y CH3), exciben funciones eritropoyéticas in vivo mucho más débiles en comparación con la rHuEPO que tienen la natural secuencia molecular EPO. En particular, las actividades eritropoyética de la proteína de fusión de EPO-FCC están a menos de un quinto de los de molécula natural EPO. Esto indica que la fusión entre molécula de EPO y la secuencia natural del fragmento Fc humano deteriora las propiedades funcionales de la molécula de EPO. Por la sustitución de un solo aminoácido en la primera residuo de cisteína en la región bisagra del fragmento Fc, la proteína de fusión rHuEPO-Fc de la presente invención comprende la secuencia de molécula natural EPO y el fragmento Fc mutante muestra las funciones eritropoyéticas más potentes in vivo en comparación con la molécula de EPO natural.
- 25
- 30 **Referencias**
- [0065]**
- 35 1. Cohen J, et al. La eritropoyetina y su receptor: la señalización y las manifestaciones clínicas. IMAJ 4, pp1072-1076 (2002)
2. Blackwell K, et al. rHuEPO y resultados de los tratamientos mejorados: los posibles modos de acción. The Oncologist 9 (suppl 5), pp41-47 (2004).
- 40 3. Lappin TR, et al. De EPO alter ego: erythropoietin tiene múltiples acciones. Células madre 20, pp485-492 (2002).
4. Maiese K, et al. Nuevas vías de exploración de la eritropoyetina. JAMA 293 (1), pp90-95 (2005).
- 45 5. Fisher JW. Eritropoyetina: fisiológica y aspectos farmacológicos. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 216, pp358-369 (1997).
6. biología Jelkmann W. Molecular de la eritropoyetina. Med Interna. 43 (8), pp649-659 (2004).
- 50 7. Ng T, et al. Eritropoyetina recombinante en la práctica clínica. Posgrado. Med. J. 79, pp367-376 (2005).
8. Weiss G, et al. Anemia por enfermedad crónica. N. Engl. J. Med. 352 (10), pp1011-1023 (2005).
9. Macdougall IC. Una visión general de la eficacia y seguridad de la nueva proteína estimulante de la eritropoyesis (NESP). Nephrol. Dial. Transplant. 16 (suppl 3), pp14-21 (2001).
- 55 10. Alegría MS. La darbepoetina alfa: una nueva proteína estimulante de la eritropoyesis. Ann. Pharmacother. 36, pp1183-1192 (2002).
- 60 11. Ellitt S, et al. Mejora de la proteína terapéutica en las actividades in vivo a través glicoingeniería. Nature Biotechnology 21, pp414-421 (2003).
12. Elliott S, et al. Control de la actividad biológica rHuEPO: el papel de los hidratos de carbono. Hematología Experimental 32, pp1146-1155 (2004).
- 65 13. Egrie JC, et al. Darbepoetina alfa-tiene una circulación más prolongada vida media y una mayor potencia in vivo de la eritropoyetina humana recombinante. Exp. Hematol. 31, pp290-299 (2003).

14. Egrie JC, et al. Desarrollo y caracterización de nueva proteína estimulante de la eritropoyesis (NESP). *British J. Caner.* 84 (Suppl 1), pp3-10 (2001).
- 5 15. Macdougall IC, et al. Farmacocinética de la nueva proteína estimulante de la eritropoyesis en comparación con epoetina alfa en pacientes en diálisis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, pp2392-2395 (1999).
16. Jolling K, et al. Población análisis farmacocinético de peglated eritropoyetina humana en ratas. *J. Pharm. Sci.* 93 (12), pp3027-3038 (2004)
- 10 17. Dalle B, et al. Proteína de fusión dimérica eritropoyetina con actividad eritropoyética mejorada en VTRO e in vivo. *Blood* 97 (12), pp3776-3782 (2001).
18. Kochendoerfer GG, et al. Diseño y síntesis química de una proteína de la eritropoyesis modificado con polímeros homogénea. *Ciencia* 299 pp884-887 (2003).
- 15 19. Sytkowski AJ, et al. Dimers eritropoyetina humana con marcadamente mejorado actividad in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95, pp1184-1188 (1998).
- 20 20. Sytkowski AJ, et al. Una proteína de fusión que comprende eritropoyetina de dominios de repetición idénticas exhibe mejorada proterties biológicos. *J. Biol. Chem.* 274 (35), pp24773-24778 (1999).
21. Jones TD, et al. El desarrollo de un IFN-2b humano modificado ligado a la porción Fc de la IgG1 humana como una novela terapéutico potencial para el tratamiento de la infección por virus de la hepatitis C. *J. Interferon. Citoquinas. Res.* 24, pp560-572 (2004).
- 25 22. Lo KM, et al. Alto nivel de expresión y secreción de proteínas de fusión Fc-X en células de mamífero. *La ingeniería de proteínas* 11 (6), pp495-500 (1998).
23. Mohler KM, et al. Factor de necrosis tumoral soluble (TNF), los receptores son agentes terapéuticos eficaces en endo- toxemia letal y funcionar simultáneamente como ambos portadores de TNF y TNF antagonists. *J. Immunol.* 151 (3), pp1548-1561 (1993).
- 30 24. Camino JC, et al. Mejora de la estructura Fc-eritropoyetina y la farmacocinética por modificación en un enlace disulfuro. *Ingeniería de Proteínas, Diseño y Selección* 18 (3), pp111-118 (2005).
- 35 25. Goldenberg MM. El etanercept, un fármaco novedoso para el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide activa, grave. *Clin. El R.* 21 (1), pp75-87 (1999)
26. Wong VK, et al. El uso de alefacept en el tratamiento de la psoriasis. *Piel Terapia Lett.* 8 (6), pp1-2 (2003)
- 40 27. Chanutin A, et al. Insuficiencia renal experimental producida por la nefrectomía parcial. *Arch. Intern. Med.* 49, pp767-787 (1932).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 **[0066]**
- <110> Novagen Holding Corporation
- 50 <120> PROTEINAS DE FUSION HUMANAS RECOMBINANTES DE EPO-FC CON VIDA MEDIA PROLONGADA Y ACTIVIDAD ERITROPOYÉTICA IN VIVO MEJORADA
- <130> N240 0077
- 55 <150> Estados Unidos 11 / 340,661
- <151> 2006-01-27
- <160> 10
- 60 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1200
- <212> ADN
- 65 <213> Artificial

ES 2 539 778 T3

<220>

<223> ADN que codifica la proteína de fusión de EPO-Fc

<400> 1

5  
 gccccaccac gcctcatctg tgacagccga gtctctggaga ggtacctctt ggaggccaag 60  
 gaggccgaga atatcacgac gggctgtgct gaacactgca gcttgaatga gaatatcact 120  
 10 gtcccagaca ccaaagttaa tttctatgcc tgggaagagga tggaggtcgg gcagcaggcc 180  
 gtagaagtct ggcagggcct ggccctgctg tcggaagctg tcctgcgggg ccaggccctg 240  
 15 ttggtcaact cttcccagcc gtgggagccc ctgcagctgc atgtggataa agccgtcagt 300  
 ggccttcgca gcctcaccac tctgcttcgg gctctgcgag cccagaagga agccatctcc 360  
 cctccagatg cggcctcagc tgctccactc cgaacaatca ctgctgacac tttccgcaaa 420  
 20 ctcttccgag tctactccaa tttcctccgg ggaaagctga agctgtacac aggggaggcc 480  
 tgcaggacag gggacagagt tgagoccaaa tctggtgaca aaactagtac atgccaccg 540  
 tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 600  
 25 gacaccctca tgatctcccg gaccocctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac 660  
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 720  
 30 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 780  
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 840  
 ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 900  
 35 tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgctg 960  
 gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1020  
 40 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gccccttctt cctctacagc 1080  
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 1140  
 45 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1200

<210> 2

<211> 399

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión EPO-Fc

55 <400> 2

60

65

1 Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu  
 5                   5                   10  
 5 Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His  
                  20                   25                   30  
 10 Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe  
          35                   40                   45  
 15 Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp  
       50                   55                   60  
 20 Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu  
   65                   70                   75                   80  
 25 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp  
                  85                   90                   95  
 30 Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu  
          100                   105                   110  
 35 Arg Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala  
       115                   120                   125  
 40 Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val  
       130                   135                   140  
 45 Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala  
   145                   150                   155                   160  
 50 Cys Arg Thr Gly Asp Arg Val Glu Pro Lys Ser Gly Asp Lys Thr Ser  
          165                   170                   175  
 55 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
          180                   185                   190  
 60 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
       195                   200                   205  
 65 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
       210                   215                   220

ES 2 539 778 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 225 230 235 240

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 245 250 255

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 260 265 270

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 275 280 285

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 290 295 300

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 305 310 315 320

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 325 330 335

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 340 345 350

Asp Gly Pro Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 355 360 365

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 370 375 380

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 385 390 395

50  
 55  
 60  
 65

<210>3  
 <211> 1281  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADN que codifica la proteína de fusión de EPO-Fc con el péptido señal de 27 aminoácidos

<400> 3



ES 2 539 778 T3

atgggggtgc acgaatgtcc tgcctggetg tggettctcc tgtccctgct gtcgctccct 60  
 5 ctgggcctcc cagtccctggg cgccccacca cgcctcatct gtgacagccg agtcctggag 120  
 aggtacctct tggaggccaa ggaggccgag aatatcacga cgggctgtgc tgaacactgc 180  
 10 agcttgaatg agaatatcac tgtcccagac accaaagtta atttctatgc ctggaagagg 240  
 atggaggtcg ggcagcaggc cgtagaagtc tggcagggcc tggccctgct gtcggaagct 300  
 15 gtccctgcggg gccaggccct gttggtcaac tcttcccagc cgtgggagcc cctgcagctg 360  
 catgtggata aagccgtcag tggccttcgc agcctcacca ctctgcttcg ggctctgca 420  
 gcccagaagg aagccatctc ccctccagat gcggcctcag ctgctccact ccgaacaatc 480  
 20 actgctgaca ctttccgcaa actcttccga gtctactcca atttcctccg gggaaagctg 540  
 aagctgtaca caggggaggc ctgcaggaca ggggacagag ttgagcccaa atctggtgac 600  
 25 aaaactagta catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 660  
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 720  
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 780  
 30 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 840  
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 900  
 35 aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaa ccatctcaa agccaaaggg 960  
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccateccc gggatgagct gaccaagaac 1020  
 40 caggtcagcc tgacctgect ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1080  
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1140  
 ggccccctct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1200  
 45 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1260  
 tcctgtctc cgggtaaata a 1281

50 <210> 4  
 <211> 426  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

55 <220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de EPO-Fc con el péptido señal de 27 aminoácidos

<400> 4

60

65

ES 2 539 778 T3

5 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu  
 1 5 10 15  
 10 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu  
 20 25 30  
 15 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu  
 35 40 45  
 20 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu  
 50 55 60  
 25 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg  
 65 70 75 80  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

ES 2 539 778 T3

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu  
85 90 95

5 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser  
100 105 110

10 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly  
115 120 125

15 Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Gln Lys Glu  
130 135 140

20 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile  
145 150 155 160

25 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu  
165 170 175

30 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp  
180 185 190

35 Arg Val Glu Pro Lys Ser Gly Asp Lys Thr Ser Thr Cys Pro Pro Cys  
195 200 205

40 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
210 215 220

45 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
225 230 235 240

50 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
245 250 255

55 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
260 265 270

60 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
275 280 285

65 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
290 295 300

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
305 310 315 320

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
325 330 335

ES 2 539 778 T3

5           Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                           340                                   345                                   350

10          Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
                           355                                   360                                   365

15          Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Pro Phe Phe  
                           370                                   375                                   380

20          Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
                           385                                   390                                   395                                   400

25          Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
                           405                                   410                                   415

30          Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                           420                                   425

30          <210> 5  
                 <211> 40  
                 <212> ADN  
                 <213> Artificial

35          <220>  
                 <223> cebador de oligonucleótido

40          <400> 5  
                 ccggaattcg ccaccatggg ggtgcacgaa tgtcctgctt 40

45          <210> 6  
                 <211> 42  
                 <212> ADN  
                 <213> Artificial

50          <220>  
                 <223> cebador de oligonucleótido

55          <400> 6  
                 tttcctttt gcggccgctt atttaccgg agacaggag ag 42

60          <210> 7  
                 <211> 45  
                 <212> ADN  
                 <213> Artificial

65          <220>  
                 <223> cebador de oligonucleótido

70          <400> 7  
                 aggcctgcag gacaggggac agagttgagc ccaaactggtg tgaca                   45

75          <210> 8  
                 <211> 45  
                 <212> ADN  
                 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador de oligonucleótido

5 <400> 8  
tgtcaccaga ttgggctca actctgtccc ctgtcctgca ggcct 45

<210> 9  
<211> 45  
10 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador de oligonucleótido

15 <400> 9  
aggcctgcag gacaggggac agagttgagc ccaaattctg tgaca 45

<210> 10  
<211> 45  
20 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador de oligonucleótido

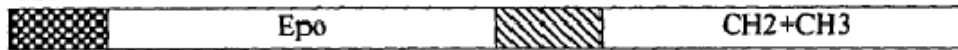
25 <400> 10  
tgtcacaaga ttgggctca actctgtccc ctgtcctgca ggcct 45

30

**REIVINDICACIONES**

- 5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50
1. Una proteína de fusión que tiene una vida media prolongada in vivo en comparación con origen natural o recombinante humana nativa que comprende eritropoyetina:
    - (a) una parte de péptido de eritropoyetina que tiene un residuo cisteína en la proximidad de un terminal C de la misma, directamente ligado a
    - (b) un fragmento humano de Fc IgG1 que comprende una región bisagra y los dominios CH2 y CH3, en donde dicha región bisagra tiene
      - (i) la secuencia de aminoácidos VEPKSGDKTSTCPPCP o
      - (ii) una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la misma y que tiene un residuo de no-cisteína en el aminoácido 6 medido desde el N-terminal de dicha región bisagra,
 mediante el cual el residuo de cisteína de dicha región bisagra situada más cerca de dicha porción de péptido de eritropoyetina está separado al menos 12 aminoácidos aparte de dicho residuo de cisteína de dicha porción de péptido de eritropoyetina.
  2. La proteína tal como se define en la reivindicación 1, en el que la vida media de dicha proteína es al menos tres veces mayor que dicha eritropoyetina humana nativa, y preferiblemente tiene una mayor bioactividad eritropoyética en comparación con dicho eritropoyetina humana nativa.
  3. Un constructo de proteína dimérica que comprende dos proteínas de fusión como se define en la reivindicación 1.
  4. El constructo de proteína dimérica de la reivindicación 3 donde las dos proteínas de fusión donde cada uno comprende la secuencia de aminoácidos presente en SEQ ID No: 2.
  5. Una composición farmacéutica que comprende una proteína como se define en la reivindicación 1 junto con un vehículo aceptable, adyuvante o diluyente farmacéuticamente.
  6. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la reivindicación 1.
  7. Una línea de células transfectadas con una molécula de ADN recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 6.
  8. Un método para producir una proteína como se define en la reivindicación 1, que comprende cultivar una línea celular transfectada con una molécula de ADN recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico como se define en la reivindicación 7 y purificar el polipéptido codificado por el mismo.
  9. La proteína tal como se define en la reivindicación 1 o la composición farmacéutica como se define en la reivindicación 5 para la estimulación de la eritropoyesis en un mamífero.
  10. La proteína de fusión como se define en la reivindicación 1, en el que dicho residuo no-cisteína es un aminoácido neutro, preferiblemente glicina.
  11. Un dímero que comprende la primera y segunda proteína de fusión cada uno como se define en la reivindicación 1, en donde dicha región bisagra de dicha primera proteína de fusión se une a dicha región de bisagra de dicha segunda proteína de fusión por enlaces disulfuro.

**1A**



Péptido señal

Bisagra

**1B**

ATGGGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTGCTCCCT 60  
 M G V H E C P A W L W L L L S L L S L P  
 CTGGGCCTCCCAGTCTGGGCGCCCCACCACGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGGAG 120  
 L G L P V L G A P P R L I C D S R V L E  
 AGGTACCTCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGC 180  
 R Y L L E A K E A E N I T T G C A E H C  
 AGCTTGAATGAGAATCACTGTCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGG 240  
 S L N E N I T V P D T K V N F Y A W K R  
 ATGGAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAGCT 300  
 M E V G Q Q A V E V W Q G L A L L S E A  
 GTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTCTTCCCAGCCGTGGGAGCCCCTGCAGCTG 360  
 V L R G Q A L L V N S S Q P W E P L Q L  
 CATGTGGATAAAGCCGTCAGTGGCCTTCGACGCCTCACCCTCTGCTTCGGGCTCTGCGA 420  
 H V D K A V S G L R S L T T L L R A L R  
 GCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATC 480  
 A Q K E A I S P P D A A S A A P L R T I  
 ACTGCTGACACTTCCGCAAACCTCTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGGAAAGCTG 540  
 T A D T F R K L F R V Y S N F L R G K L  
 AAGCTGTACACAGGGGAGGCCCTGCAGGACAGGGGACAGAGTTGAGCCCAAATCTGGTGAC 600  
 K L Y T G E A C R T G D R V E P K S G D  
 AAAACTAGTACATGCCACCCGTGCCACGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC 660  
 K T S T C P P C P A P E L L G G P S V F  
 CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC 720  
 L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGC 780  
 V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G  
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT 840  
 V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R  
 GTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC 900  
 V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C  
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGG 960  
 K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G  
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC 1020  
 Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N  
 CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG 1080  
 Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W  
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC 1140  
 E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D  
 GGCCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC 1200  
 G P F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N  
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC 1260  
 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L  
 TCCCTGTCTCCGGGTAAATAA 1320  
 S L S P G K \*

Figura 1

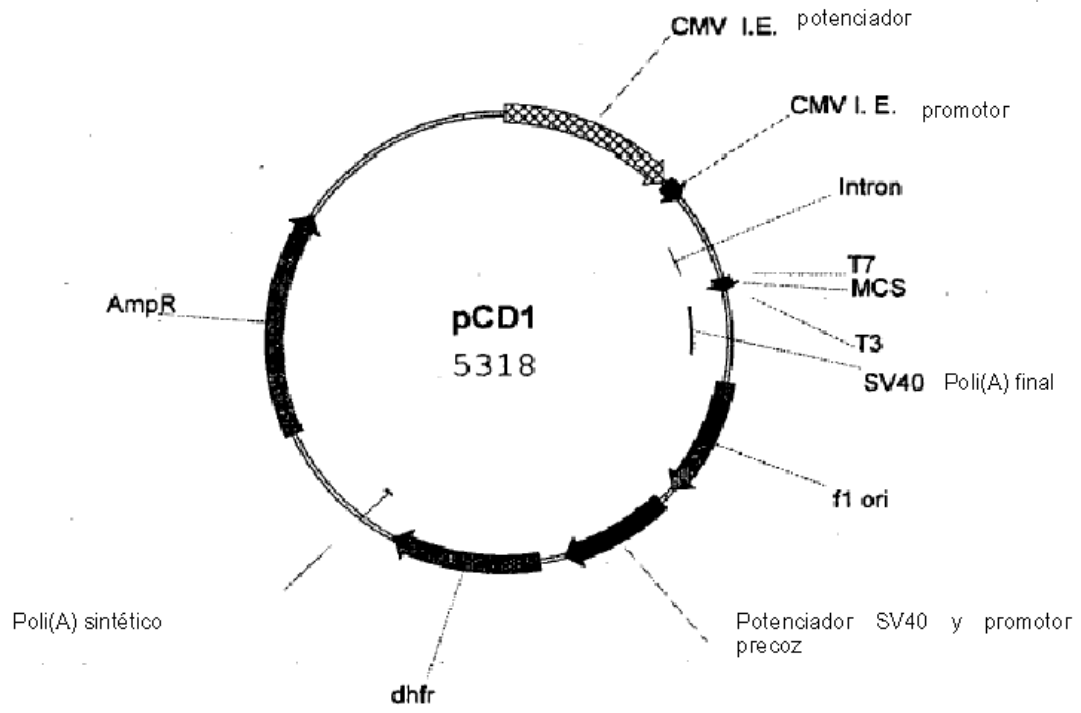


Figura 2



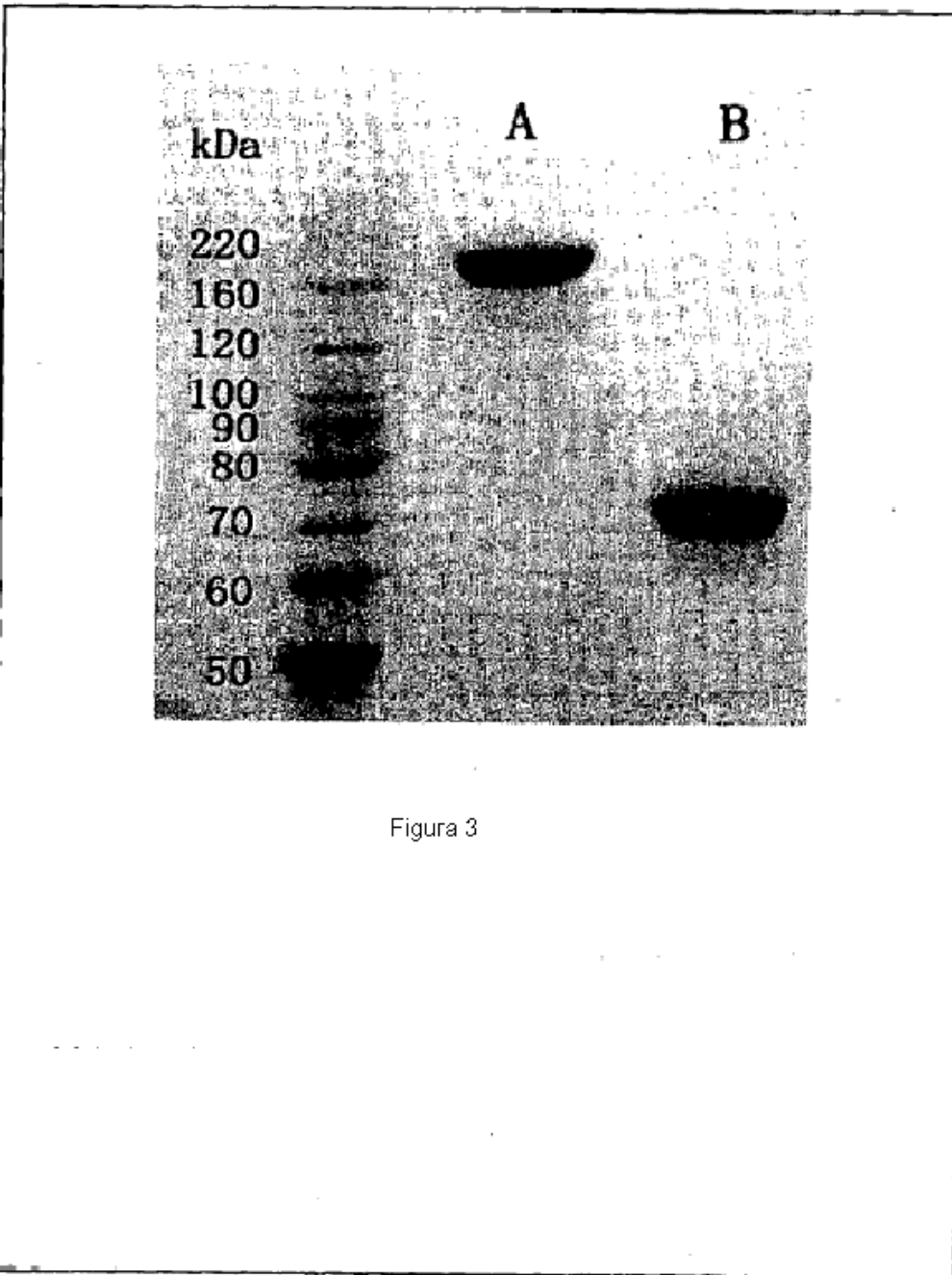
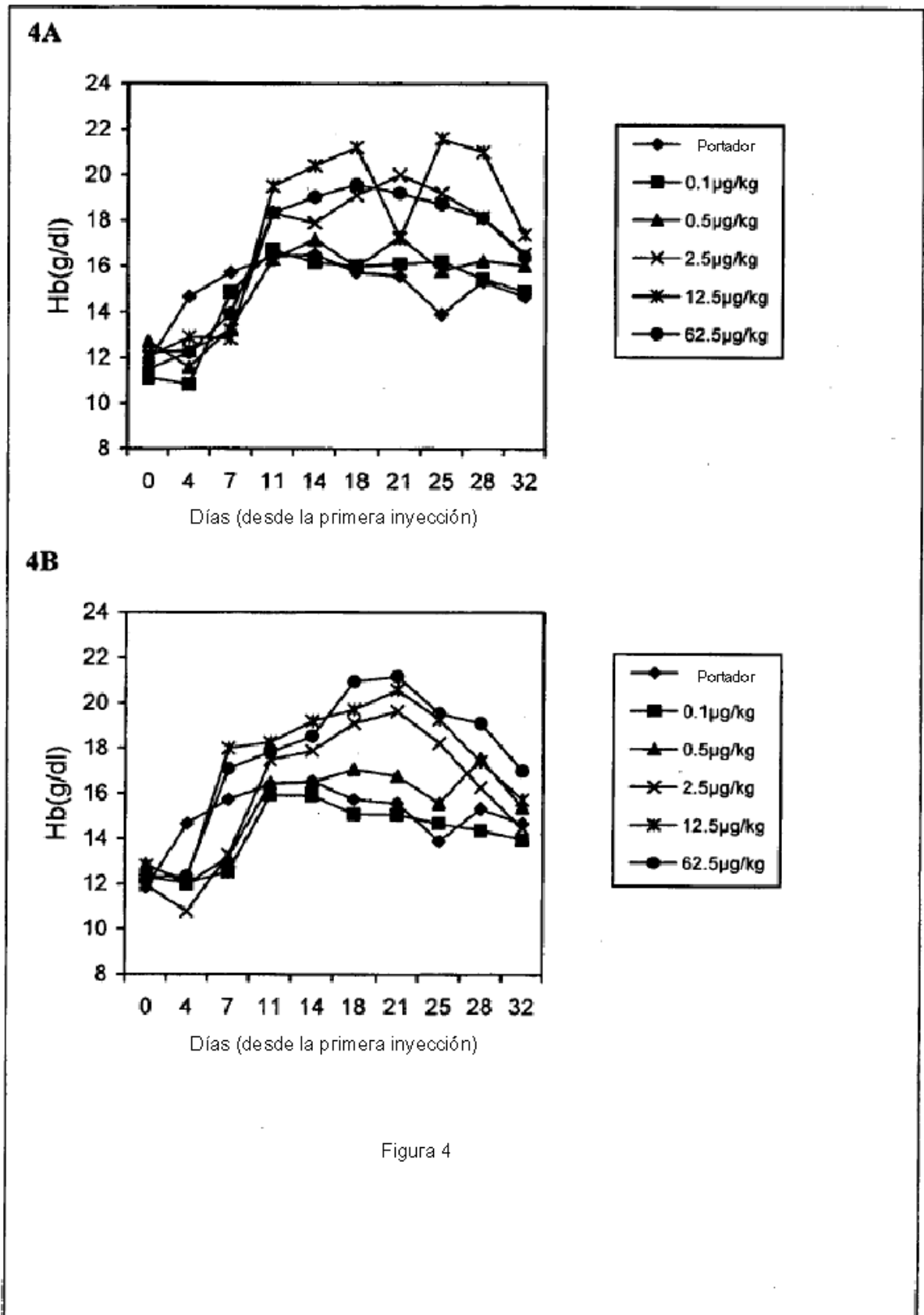


Figura 3



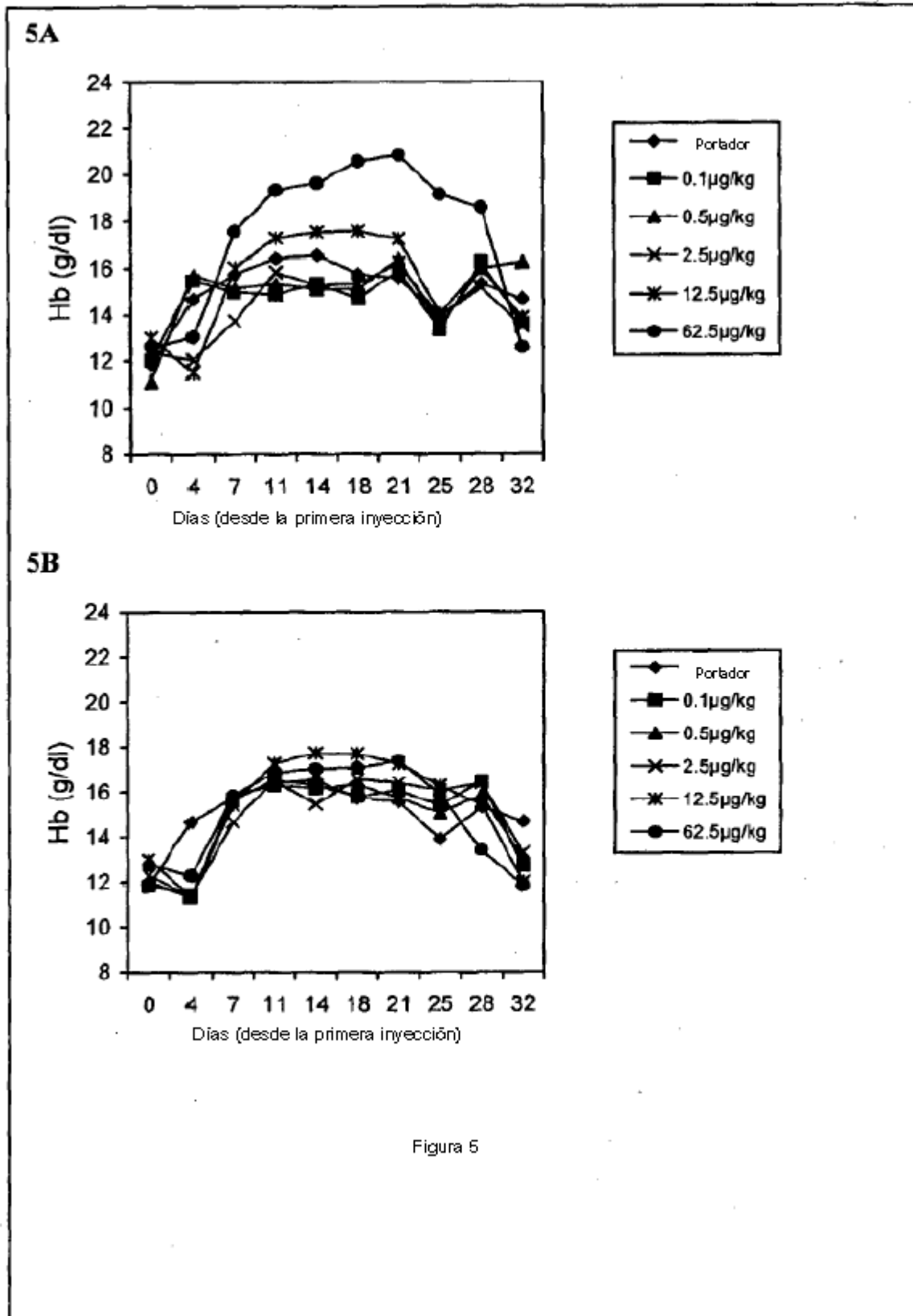
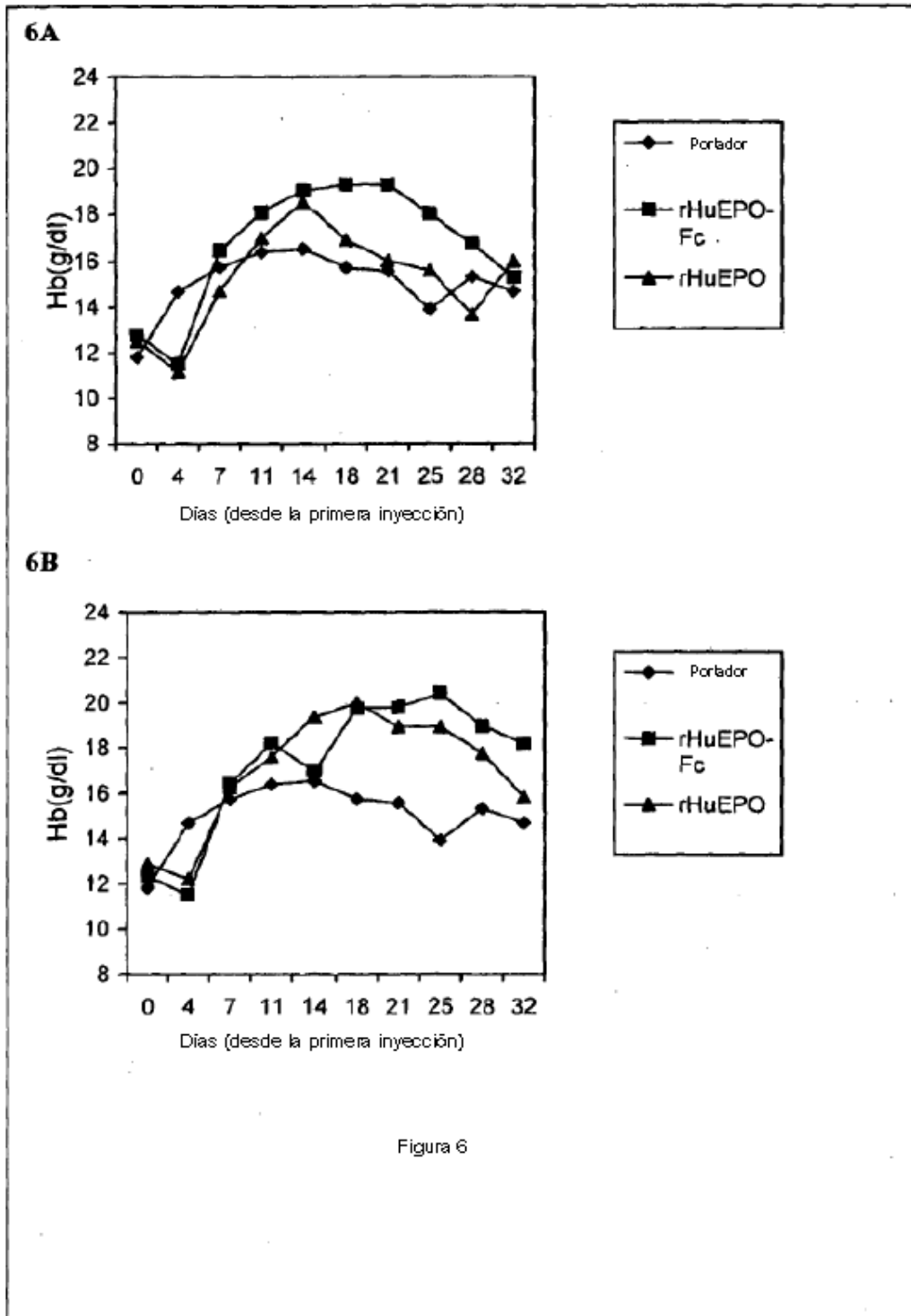
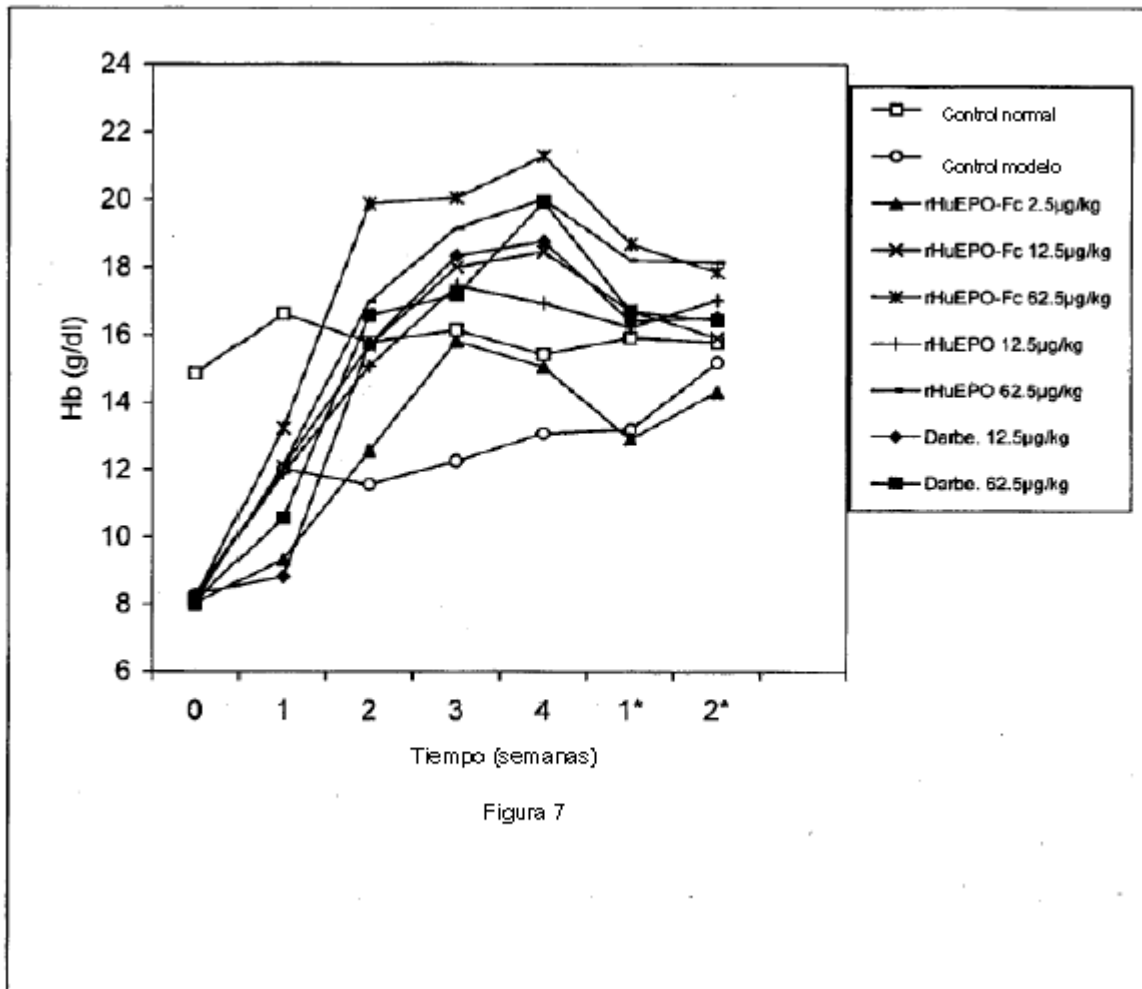
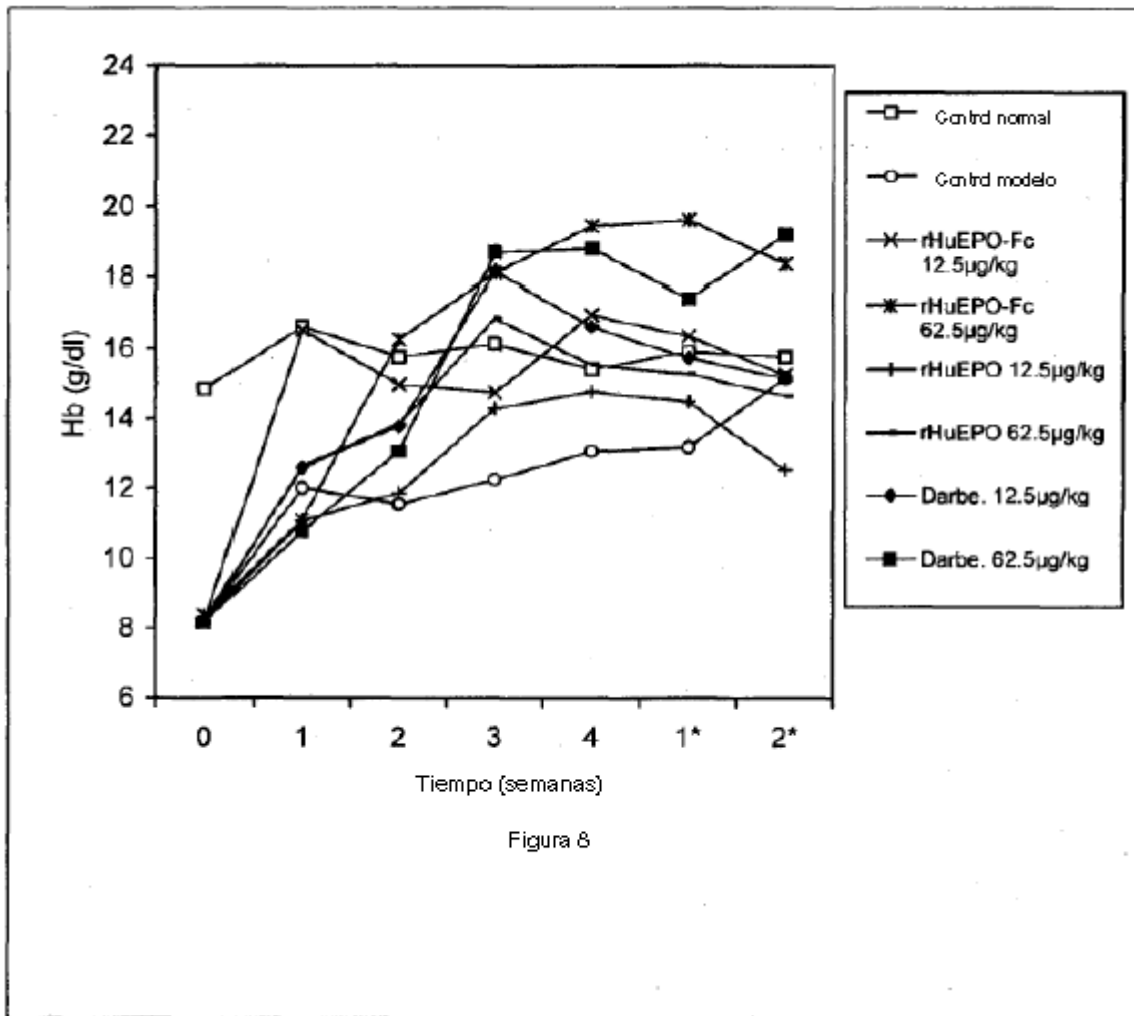
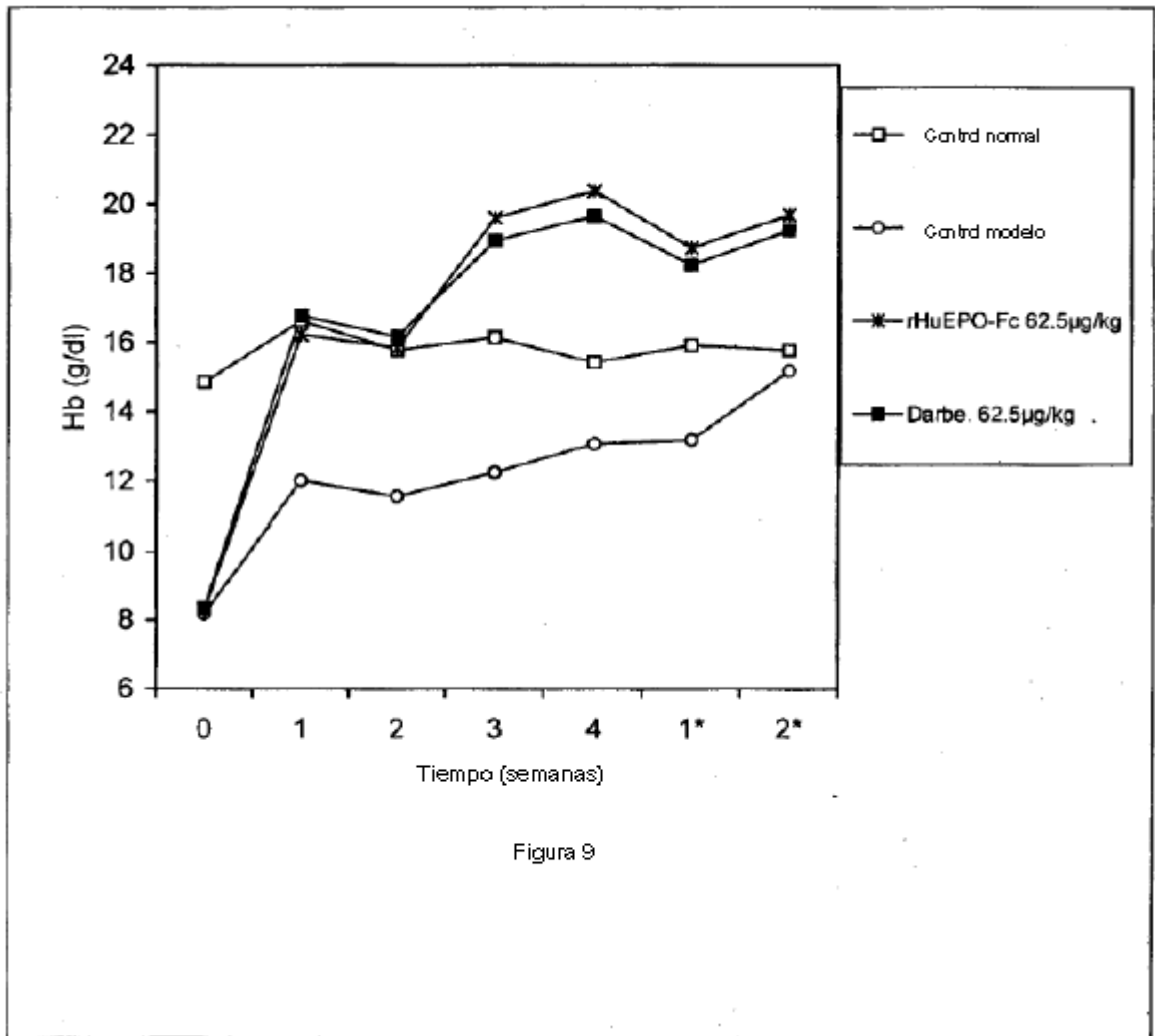


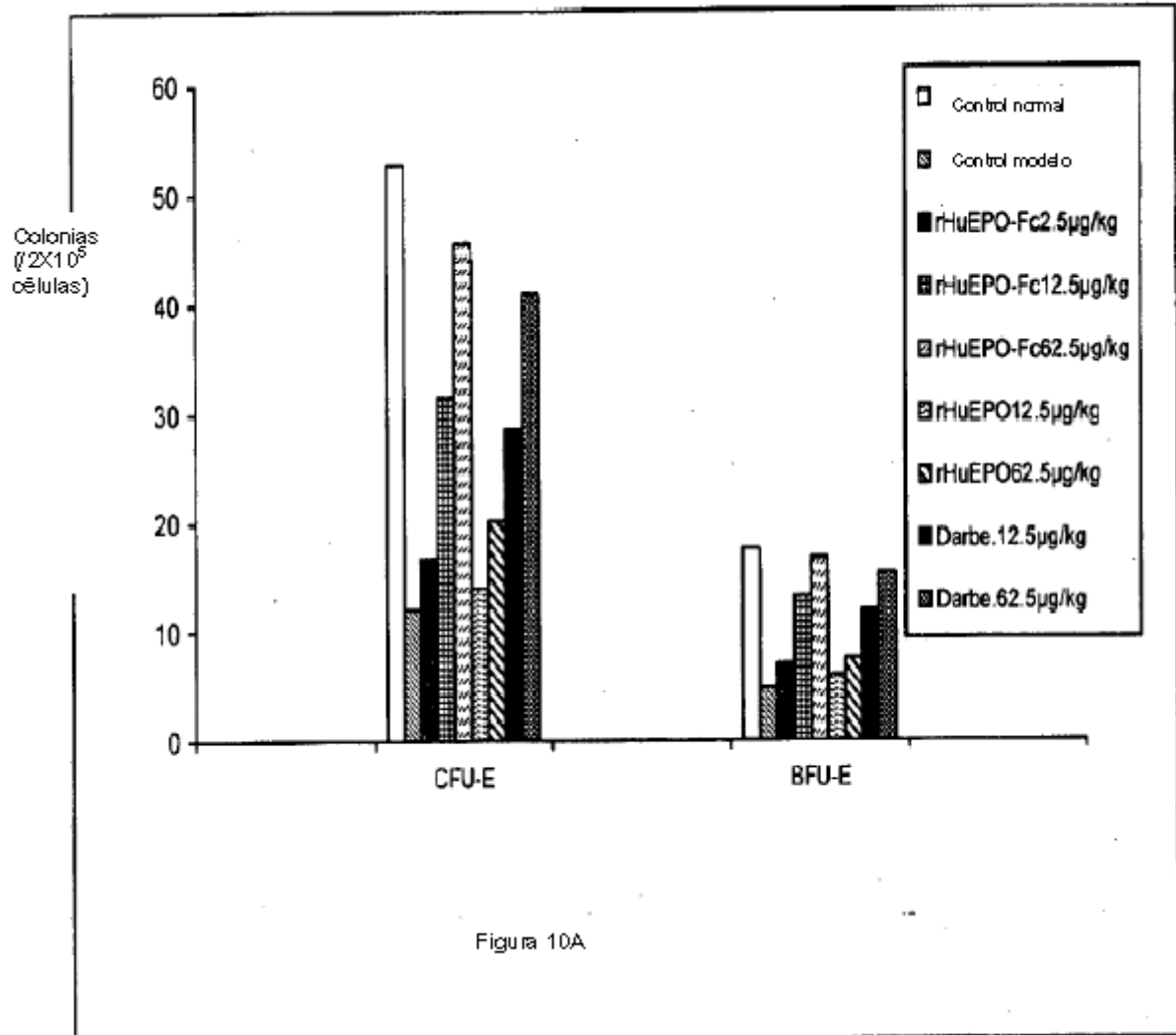
Figura 5



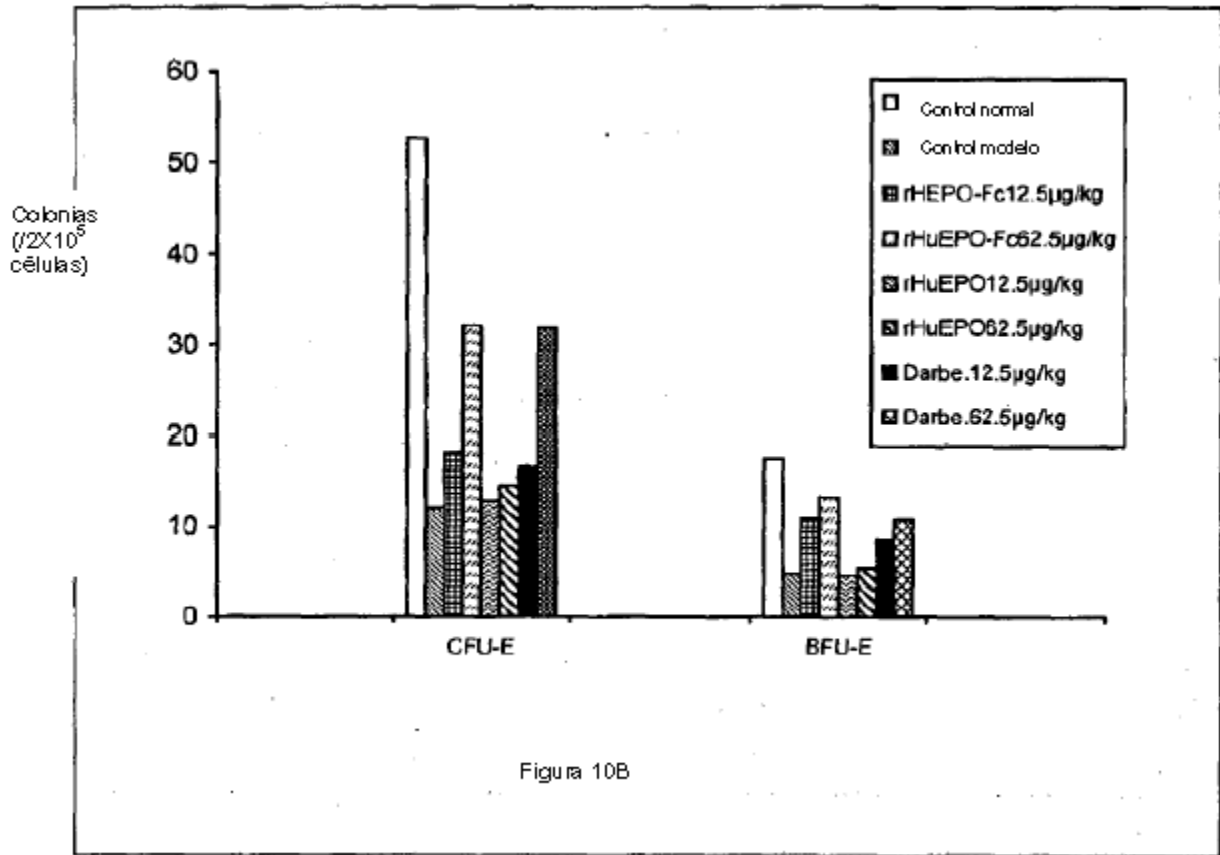


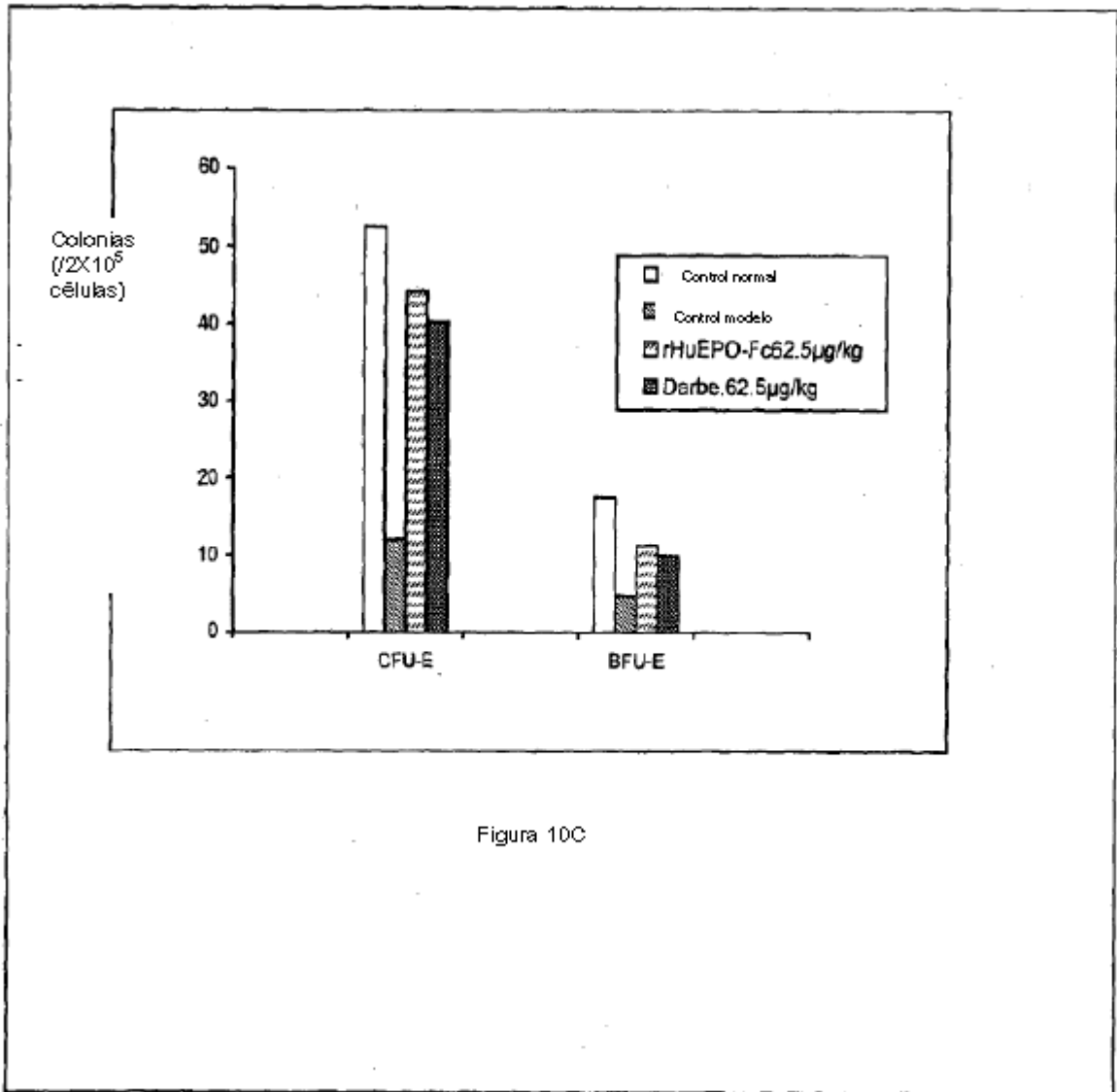












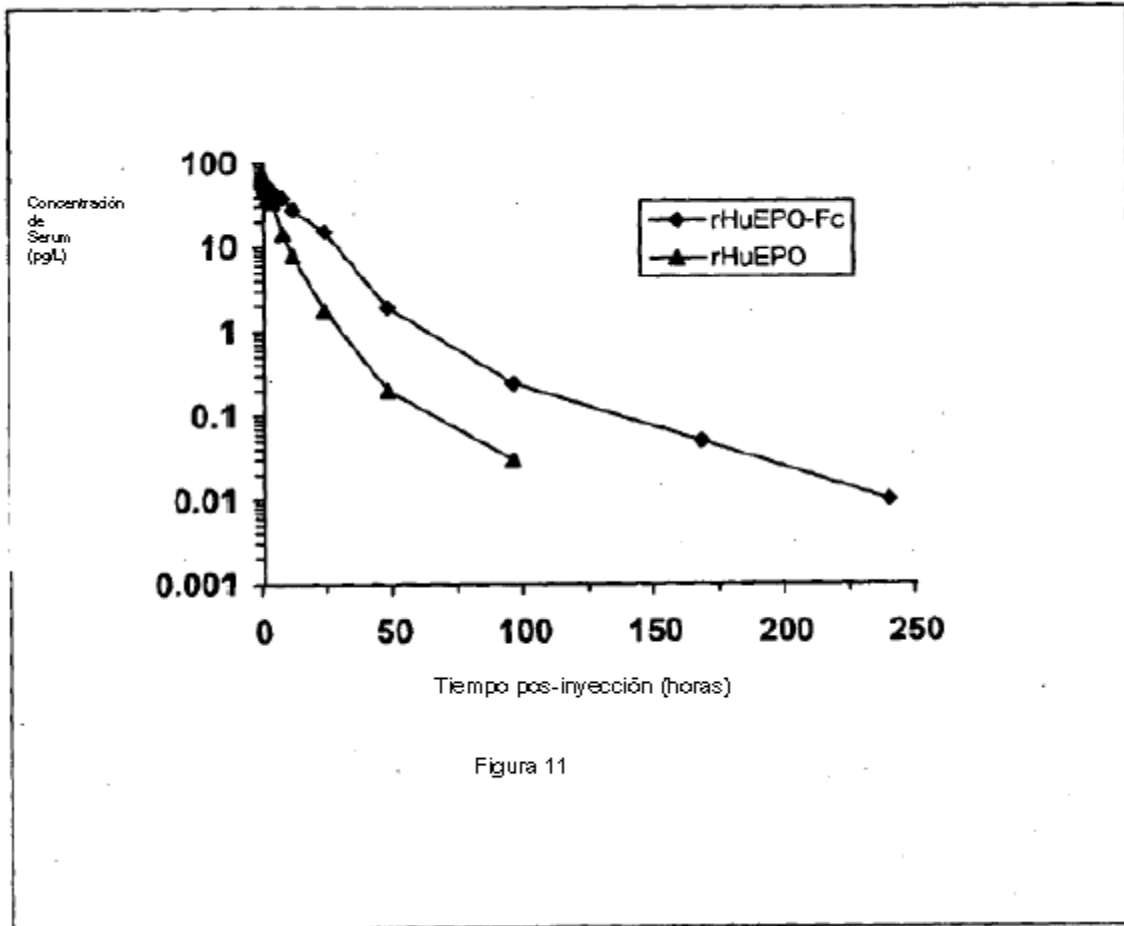


Figura 11

ATGGGGGTGCACGAATGTCTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTGCTCCCT 60  
 M G V H E C P A W L W L L L S L L S L P  
 CTGGGCTCCAGTCTGGGCGCCCCACCAGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGGAG 120  
 L G L P V L G A P P R L I C D S R V L E  
 AGGIACCTCTGGAGGCAAGGAGGCCGAGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGC 180  
 R Y L L E A K E A E N I T T G C A E H C  
 AGCTTGAATGAGAATATCACTGTCCCAGACACCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGG 240  
 S L N E N I T V P D T K V N F Y A W K R  
 ATGGAGGTCGGGCAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGGGCCTGGCCCTGCTGTGCGAAAGCT 300  
 M E V G Q Q A V E V W Q G L A L L S E A  
 GTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTTTCCCAGCCGTGGGAGCCCTGCAAGCTG 360  
 V L R G Q A L L V N S S Q P W E P L Q L  
 CATGTGGATAAAGCCGTGAGTGGCCTTCGAGCCTCACCCTGCTGCTTCGGGCTCTGCGA 420  
 H V D K A V S G L R S L T T L L R A L R  
 GCCCAGAAGGAAGCCATCTCCCCTCCAGATGCGGCCTCAGCTGCTCCACTCCGAACAATC 480  
 A Q K E A I S P P D A A S A A P L R T I  
 ACTGCTGACACTTTCGCAAACTCTTCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGGAAAGCTG 540  
 T A D T F R K L F R V Y S N F L R G K L  
 AAGCTGTACACAGGGGAGGCCTGCAGGACAGGGACAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC 600  
 K L Y T G E A C R T G D R V E P K S C D  
AAAAGTACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCACTTTC 660  
K T S T Q P P Q P A P E L L G G P S V F  
 CTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC 720  
 L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C  
 GTGGTGGTGGAGTGGCCAGCAAGACCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGC 780  
 V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G  
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCOT 840  
 V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R  
 GIGGTGAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC 900  
 V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C  
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG 960  
 K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G  
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC 1020  
 Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N  
 CAGGTGAGCCTGCTGCTGCAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG 1080  
 Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W  
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGAC 1140  
 E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D  
 GGCCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC 1200  
 G P F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N  
 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC 1260  
 V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L  
 TCCCTGTCTCCGGGTAATAA 1320  
 S L S P G K \*

Figura 12

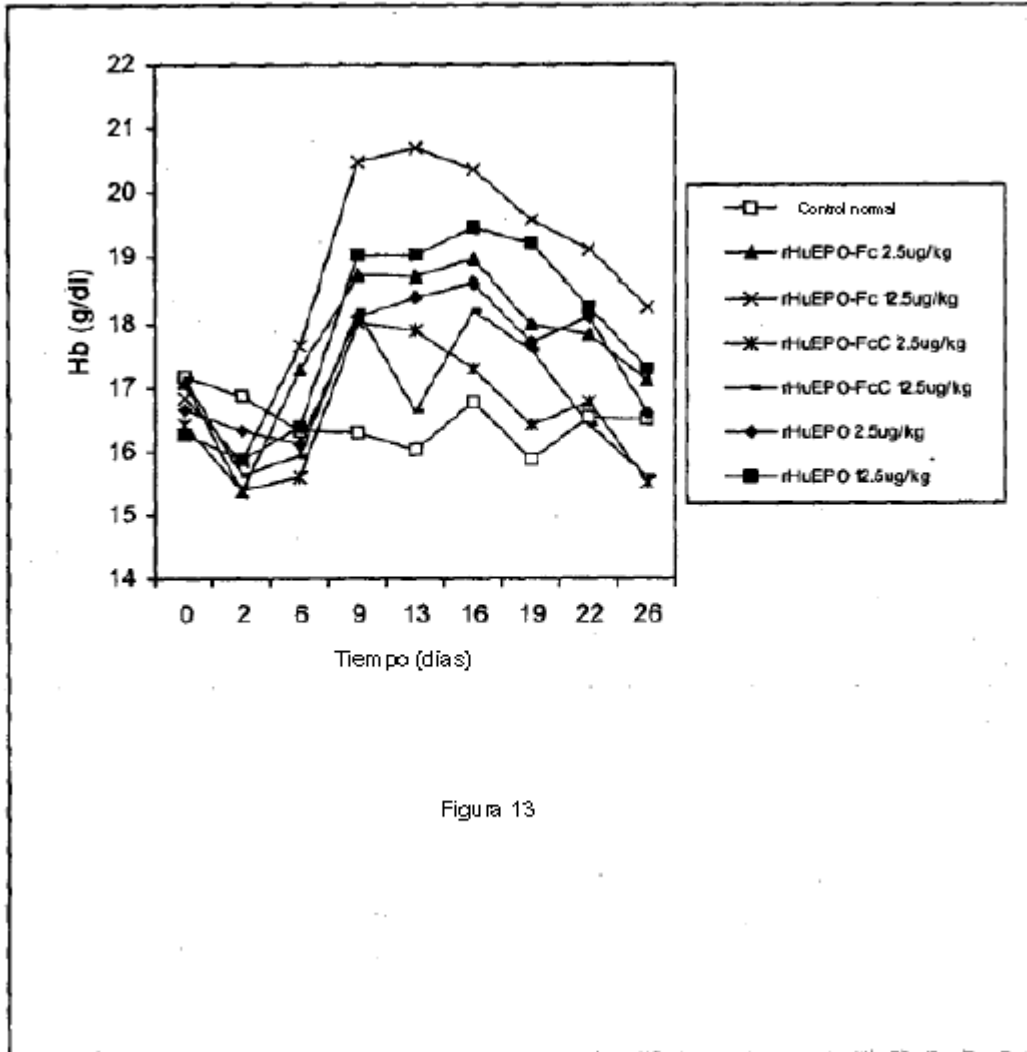


Figura 13

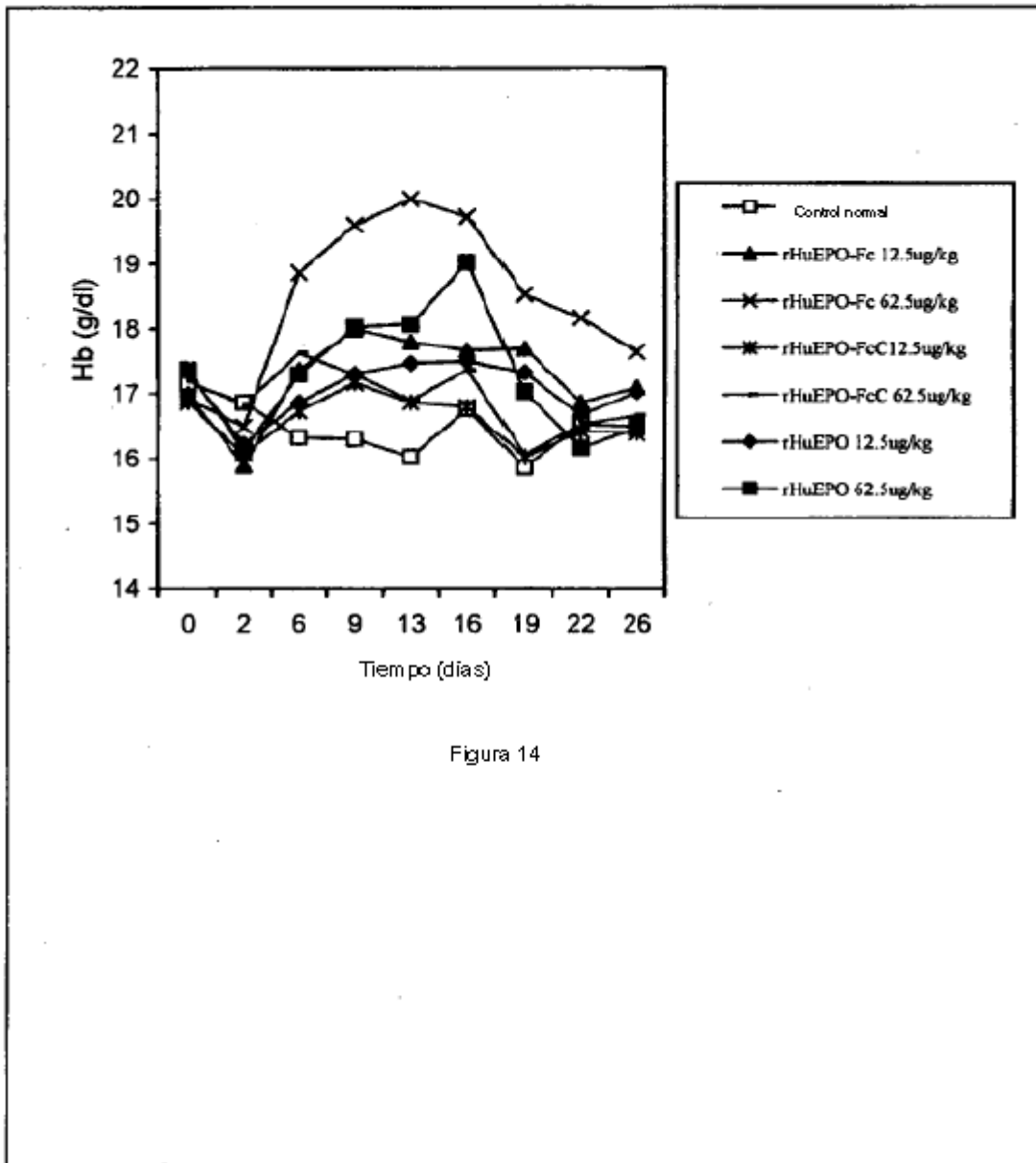


Figura 14