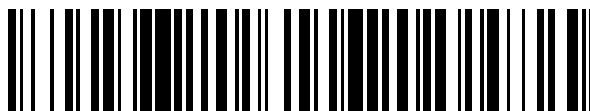


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 552**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/00** (2006.01)

**C07K 14/505** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2001** **E 01987457 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015** **EP 1406922**

54 Título: **Protección, restablecimiento y potenciación de células, tejidos y órganos sensibles a eritropoyetina**

30 Prioridad:

**29.12.2000 US 753132**  
**29.12.2000 US 259245 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.03.2016**

73 Titular/es:

**THE KENNETH S. WARREN INSTITUTE, INC.**  
**(100.0%)**  
**712 KITCHAWAN ROAD**  
**OSSINING, NY 10562, US**

72 Inventor/es:

**BRINES, MICHAEL;**  
**CERAMI, ANTHONY y**  
**CERAMI, CARLA**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 564 552 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

Protección, restablecimiento y potenciación de células, tejidos y órganos sensibles a eritropoyetina

- 5 Solicitud provisional de prioridad n.º 60/259.245 presentada el 29 de diciembre de 2000, como se reivindica conforme al 35 U.S.C. § 119(e)(1).

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Durante muchos años, el único papel fisiológico claro de la eritropoyetina había sido su control de la producción de glóbulos rojos. Recientemente, diversas líneas de pruebas sugieren que la eritropoyetina, como un miembro de la superfamilia de citocinas, realiza otras funciones fisiológicas importantes que están mediadas a través de la interacción con el receptor de eritropoyetina (eritropoyetina-R). Estas acciones incluyen la mitogénesis, la modulación del flujo de calcio en las células musculares lisas y las células neuronales, y los efectos sobre el metabolismo intermediario. Se cree que la eritropoyetina proporciona respuestas de compensación que sirven para mejorar el microentorno celular hipóxico, así como modular la muerte celular programada provocada por la agresión metabólica. Aunque estudios han determinado que la eritropoyetina inyectada por vía intracraneal protege a las neuronas frente a la lesión neuronal hipóxica, la administración intracraneal es una vía de administración impracticable e inaceptable para uso terapéutico, en particular, para individuos normales. Además, los estudios previos de pacientes anémicos a los que se les ha dado eritropoyetina han llegado a la conclusión de que la eritropoyetina administrada por vía periférica no se transporta al cerebro (Marti *et al.*, 1997, *Kidney Int.* **51**:416-8; Juul *et al.*, 1999, *Pediatr. Res.* **46**:543-547; Buemi *et al.*, 2000, *Nephrol. Dial. Transplant.* **15**:422-433.).

- 25 Se han descrito varias formas modificadas de eritropoyetina con actividades dirigidas hacia la mejora de la actividad eritropoyética de la molécula, tales como aquellas con aminoácidos alterados en el extremo carboxi terminal descritas en la patente de EE. UU. 5.457.089 y en la patente de EE. UU. 4.835.260; isoformas de eritropoyetina con varios números de residuos de ácido siálico por molécula, tal como se describe en la patente de EE. UU. 5.856.292; polipéptidos descritos en la patente de EE. UU. 4.703.008; agonistas descritos en la patente de EE. UU. 5.767.078; péptidos que se unen al receptor de eritropoyetina, como se describe en las patentes de EE. UU. 5.773, 569 y 5.830.851; y miméticos de moléculas pequeñas, como se describe en la patente de EE. UU. 5.835.382.

El documento US A 5.955.422 divulga una composición farmacéutica que comprende EPO humana. Este documento tampoco contempla que las EPO no eritropoyéticas sean útiles.

- 35 La presente invención está dirigida hacia el uso de una eritropoyetina específica para proteger, potenciar o restablecer células ve y células, tejidos y órganos asociados *in situ* así como *ex vivo*, y para la administración de una eritropoyetina a través de una barrera de células endoteliales con el propósito de proteger y potenciar células sensibles a eritropoyetina y células, tejidos y órganos asociados distales con respecto a la vasculatura, o para llevar moléculas asociadas.

## BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

- 45 En un aspecto, la presente invención está dirigida al uso de una composición farmacéutica que comprende una eritropoyetina no eritropoyética modificada y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en la protección, potenciación o restablecimiento de la función o viabilidad de un tejido de mamífero neuronal sensible a eritropoyetina que comprende células sensibles a eritropoyetina, en la que dicha eritropoyetina modificada tiene al menos una de las siguientes modificaciones:

- 50 - 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 restos de ácido siálico; o  
- uno o más residuos de lisina carbamilada y/o una carbamilación del grupo amino N-terminal.

- 55 En un aspecto particular, las células de mamífero neuronales sensibles a eritropoyetina y sus células, tejido u órgano asociados son distales con respecto a la vasculatura en virtud de un barrera ocluyente de células endoteliales. En otro aspecto particular, dichas células, tejidos, órganos u otras partes corporales se aíslan a partir de un cuerpo de mamífero, tal como los destinados para trasplante. Dicha célula o tejido sensible a eritropoyetina son células o tejido neuronal.

- 60 En un aspecto, dicha célula sensible a eritropoyetina o sus células, tejidos, u órganos asociados no son células, tejidos u órganos excitables o no comprenden predominantemente células o tejidos excitables. En un modo de realización particular, dicha célula, tejido u órgano de mamífero para los que se usa un derivado de eritropoyetina mencionado anteriormente son aquellos que han pasado o pasarán un periodo de tiempo en al menos una afección adversa a la viabilidad de la célula, tejido u órgano. Dichas afecciones incluyen disfunción metabólica o hipoxia *in situ* traumática, disfunción metabólica o hipoxia *in situ* quirúrgicamente inducida, o exposición a toxinas *in situ*, esta última puede estar asociada con quimioterapia o radioterapia. En un modo de realización, las afecciones adversas son el resultado de circulación extracorporeal (sistema de circulación extracorporeal), como se usa para determinados

procedimientos quirúrgicos.

Las eritropoyetinas como se define en las reivindicaciones son útiles para el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades humanas del SNC o sistema nervioso periférico que tienen principalmente síntomas psiquiátricos o neurológicos, así como enfermedades oftálmicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardiopulmonares, enfermedades respiratorias, enfermedades hepáticas, urinarias y reproductivas, enfermedades gastrointestinales y anomalías endocrinas y metabólicas, siempre que estas impliquen al tejido neuronal como se define en las reivindicaciones.

La invención también está dirigida al uso de composiciones farmacéuticas que comprenden derivados de eritropoyetina particulares como se define en las reivindicaciones para su administración a un animal mamífero, preferentemente un ser humano. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden formular para administración oral, intranasal o parenteral, o en forma de una solución de perfundido para mantener la viabilidad de células, tejidos u órganos *ex vivo*.

Los derivados de eritropoyetina útiles para las composiciones farmacéuticas y los propósitos mencionados anteriormente incluyen tanto las eritropoyetinas naturales como también las eritropoyetinas que se han alterado por al menos una modificación en comparación con la eritropoyetina natural, y preferentemente en comparación con la eritropoyetina humana natural. La al menos una modificación es una modificación como se define en la reivindicación 1. Por supuesto, las moléculas de eritropoyetina útiles para los propósitos en el presente documento pueden tener una pluralidad de modificaciones en comparación con la molécula natural, tales como múltiples modificaciones de parte de aminoácidos de la molécula, múltiples modificaciones de la parte de hidratos de carbono de la molécula, o al menos una modificación de la parte de aminoácidos de la molécula y al menos una modificación de la parte de hidratos de carbono de la molécula. La molécula de eritropoyetina modificada conserva su capacidad de protección, potenciación o restablecimiento de la función o viabilidad de células de mamífero neuronales sensibles a eritropoyetina, pero pueden estar ausentes otras propiedades de la molécula de eritropoyetina no relacionadas con el rasgo deseable mencionado anteriormente en comparación con la molécula natural. El derivado de eritropoyetina es no eritropoyético.

En un modo de realización, la eritropoyetina de la invención al menos no tiene restos de ácido siálico. En un modo de realización preferente, la eritropoyetina modificada es asialoeritropoyetina, y lo más preferentemente, asialoeritropoyetina humana. En otro modo de realización, la eritropoyetina modificada tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 restos de ácido siálico.

En un segundo modo de realización, la eritropoyetina modificada al menos no tiene hidratos de carbono unidos a N ni unidos a O.

En un tercer modo de realización, la eritropoyetina modificada tiene al menos un contenido de hidratos de carbono reducido en virtud del tratamiento de eritropoyetina con sus hidratos de carbono naturales con al menos una glucosidasa.

En un cuarto modo de realización, la parte de hidratos de carbono de la molécula de eritropoyetina modificada tiene al menos un patrón de glucosilación que no es de mamífero en virtud de la expresión de una eritropoyetina recombinante en células que no son de mamíferos. En modos de realización preferentes, las eritropoyetinas modificadas se expresan en células de insectos o células vegetales.

En un quinto modo de realización, la eritropoyetina modificada tiene al menos uno o más hidratos de carbono oxidados que también se pueden reducir químicamente. En un modo de realización preferente, la eritropoyetina modificada es eritropoyetina oxidada con peryodato; en otro modo de realización preferente, la eritropoyetina oxidada con peryodato se reduce químicamente con una sal de borohidruro, tal como borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio.

En un sexto modo de realización, la eritropoyetina modificada para los usos mencionados anteriormente tiene al menos uno o más residuos de arginina modificada. En un modo de realización, la eritropoyetina modificada comprende un resto de glioxal en los uno o más residuos de arginina, tal como un resto de arilglioxal o alquilglioxal. En otro modo de realización, al menos un residuo de arginina se modifica por reacción con una dicetona próxima, tal como, pero sin limitarse a, 2,3-butanodiona o ciclohexanodiona.

En un modo de realización de la reivindicación 1, la eritropoyetina modificada comprende al menos uno o más residuos de lisina modificada o una modificación del grupo amino N-terminal de la molécula de eritropoyetina, dichas modificaciones como las que resultan de la reacción del residuo de lisina o grupo amino N-terminal con un agente modificador del grupo amino. Además, el residuo de lisina modificada se puede reducir químicamente. En un modo de realización preferente, una eritropoyetina está biotinilada o carbamilada por medio de uno o más grupos lisina. En otro modo de realización preferente, se hace reaccionar la lisina con un aldehído o azúcar reductor para formar una imina, que se puede estabilizar por reducción como con cianoborohidruro de sodio para formar una lisina N-alquilada tal como glucitolillisina, o que en el caso de azúcares reductores se puede estabilizar por reordenamiento de

Amadori o Heyns para formar un alfa-desoxi-alfa-aminoazúcar tal como alfa-desoxi-alfa-fructosilisina. En otro modo de realización preferente, se carbamila (carbamoila) el grupo lisina, tal como en virtud de la reacción con ion cianato, o se puede alquilcarbamilar o arilcarbamilar o ariltiocarbamilar con un alquilisocianato o arilisocianato o arilisotiocianato, respectivamente, o se puede acilar por un derivado de ácido alquilarylcarboxílico o arilcarboxílico reactivo, tal como por reacción con anhídrido acético, anhídrido succínico o anhídrido ftálico. Al menos un grupo lisina también se puede modificar con trinitrofenilo por reacción con un ácido trinitrobencenosulfónico o preferentemente sus sales. En otro modo de realización, se pueden modificar residuos de lisina por reacción con un derivado de glioxal, tal como reacción con glioxal, metilglioxal o 3-deoxiglucosona para formar los derivados de alfa-carboxialquilo correspondientes.

En un octavo modo de realización, se puede modificar al menos un residuo de tirosina de una eritropoyetina en una posición de anillo aromático por un reactivo electrófilo, tal como por nitración o yodación.

En un noveno modo de realización, se puede modificar al menos un residuo de ácido aspártico o ácido glutámico de una eritropoyetina, tal como por reacción con una carbodiimida seguido de reacción con una amina, tal como, pero sin limitarse a glicinamida.

En un décimo modo de realización, al menos un residuo de triptófano de una eritropoyetina está modificado, tal como por reacción con n-bromosuccinimida o n-clorosuccinimida.

En un undécimo modo de realización, se proporciona una molécula de eritropoyetina modificada que tiene retirado al menos un grupo amino de eritropoyetina, tal como por reacción con ninhidrina seguido de reducción del grupo carbonilo resultante por reacción con borohidruro.

En un duodécimo modo de realización, se proporciona una eritropoyetina modificada que tiene al menos una abertura de al menos uno de los enlaces cistina en la molécula de eritropoyetina por reacción con un agente reductor, tal como ditiotreitól, seguido de reacción de los sulfhidrilos posteriores con yodoacetamida, ácido yodoacético u otro electrófilo para evitar la reformación de los enlaces disulfuro.

En un decimotercer modo de realización, se proporciona una eritropoyetina modificada que tiene al menos una sustitución de uno cualquiera de varios aminoácidos, tales como una leucina, con al menos uno de los residuos de lisina, arginina, triptófano, tirosina o cisteína de eritropoyetina, usando técnicas de biología molecular.

En un decimocuarto modo de realización, se somete una eritropoyetina modificada a una proteólisis química limitada que se dirige a residuos específicos, por ejemplo, para escindir después de los residuos de triptófano. Dichos fragmentos de eritropoyetina resultantes se abarcan en el presente documento.

Como se destaca anteriormente, una eritropoyetina útil para los propósitos en el presente documento puede tener al menos una de las modificaciones mencionadas anteriormente como se define en la reivindicación 1, pero puede tener más de una de las modificaciones anteriores. A modo de ejemplo de una eritropoyetina modificada con una modificación para la parte de hidratos de carbono de la molécula y una modificación para la parte de aminoácidos, una eritropoyetina modificada es asialoeritropoyetina y tiene sus residuos de lisina biotinilados o carbamilados. La presente invención también abarca composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden una o más de las eritropoyetinas mencionadas anteriormente.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la protección, potenciación o restablecimiento de la función o viabilidad de células de mamífero neuronales sensibles a eritropoyetina y sus células, tejidos y órganos asociados, administrando una cantidad eficaz de una cualquiera o más de las eritropoyetinas mencionadas anteriormente. En un aspecto particular del procedimiento, las células de mamífero sensibles a eritropoyetina y sus células, tejido u órgano asociados son distales con respecto a la vasculatura en virtud de un barrera ocluyente de células endoteliales. En otro aspecto particular, las células, tejidos, órganos u otras partes corporales se aíslan a partir de un cuerpo de mamífero, tal como los destinados para trasplante. La célula o tejido sensible a eritropoyetina son células o tejido neuronal. En un modo de realización en particular, la célula sensible a eritropoyetina o sus células, tejidos, u órganos asociados no son células, tejidos u órganos excitables o no comprenden predominantemente células o tejidos excitables. En otro modo de realización particular, la célula, tejido u órgano de mamífero para los que se puede administrar un derivado de eritropoyetina mencionado anteriormente son aquellos que han pasado o pasarán un periodo de tiempo bajo al menos una afección adversa a la viabilidad de la célula, tejido u órgano. Dichas afecciones pueden incluir disfunción metabólica o hipoxia *in situ* traumática, disfunción metabólica o hipoxia *in situ* quirúrgicamente inducida, o exposición a toxinas *in situ*, esta última puede estar asociada con quimioterapia o radioterapia. En un modo de realización, la invención protege frente a las afecciones adversas que resultan de la circulación extracorporal.

En otro aspecto de la invención, se puede usar cualquiera de las eritropoyetinas anteriores, así como cualquier otra molécula de eritropoyetina que incluye eritropoyetina humana natural en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento *ex vivo* de células, tejidos y órganos con el propósito de proteger, potenciar o restablecer la función o viabilidad de células de mamífero neuronales sensibles a eritropoyetina y sus células, tejidos

y órganos asociados. Dicho tratamiento *ex vivo* es útil, por ejemplo, para la conservación de células, tejidos u órganos para su trasplante, ya sea autotrasplante o xenotrasplante. Las células, tejido u órgano se pueden bañar en una solución que comprende eritropoyetina, o el perfundido instilado en el órgano a través de la vasculatura u otros medios, para mantener el funcionamiento celular durante el periodo en el que las células, tejido u órgano no está integrado con la vasculatura del donante o receptor. Se puede efectuar la administración del perfundido a un donante antes de la extracción del órgano, así como al órgano extraído y al receptor. Además, el uso de cualquier eritropoyetina mencionado anteriormente es útil cuando se aísla una célula, tejido u órgano a partir de la vasculatura del individuo y, por tanto, existe esencialmente *ex vivo* durante un periodo de tiempo, refiriéndose el término aislado a la restricción o pinzamiento de la vasculatura de o con respecto a la célula, tejido, órgano o parte corporal, tal como se puede realizar durante una intervención quirúrgica, incluyendo, en particular, intervención con circulación extracorporea; evitar la vasculatura de la célula, tejido, órgano o parte corporal; extirpar la célula, tejido, órgano o parte corporal del cuerpo de mamífero, tal como se puede hacer con antelación al xenotrasplante o antes de y durante el autotrasplante; o amputación traumática de una célula, tejido, órgano o parte corporal. Por tanto, este aspecto de la invención hace referencia tanto a la perfusión con una eritropoyetina *in situ* como *ex vivo*. *Ex vivo*, la eritropoyetina se puede proporcionar en una solución de conservación de células, tejidos u órganos. Para cada aspecto, la exposición puede ser por medio de perfusión continua, perfusión pulsátil, infusión, baño, inyección o cateterismo.

Aún en otro aspecto, la invención está dirigida a un procedimiento para proteger, potenciar o restablecer la viabilidad de una célula, tejido, órgano o parte corporal de mamífero neuronal que incluye una célula o tejido sensible a eritropoyetina, en que la célula, tejido, órgano o parte corporal se aísla del cuerpo de mamífero. El procedimiento incluye al menos exponer la célula, tejido, órgano o parte corporal de mamífero aislado a una cantidad de una eritropoyetina durante una duración que es eficaz para proteger, potenciar o restablecer la viabilidad mencionada anteriormente. En ejemplos no limitativos, aislado se refiere a la restricción o pinzamiento de la vasculatura de o con respecto a la célula, tejido, órgano o parte corporal, tal como se puede realizar durante una intervención quirúrgica, en particular, intervención con circulación extracorporea; evitar la vasculatura de la célula, tejido, órgano o parte corporal; extirpar la célula, tejido, órgano o parte corporal del cuerpo de mamífero, tal como se puede hacer con antelación al xenotrasplante o antes de y durante el autotrasplante; o amputación traumática de una célula, tejido, órgano o parte corporal. Por tanto, este aspecto de la invención hace referencia tanto a la perfusión con una eritropoyetina *in situ* como *ex vivo*. *Ex vivo*, la eritropoyetina se puede proporcionar en una solución de conservación de células, tejidos u órganos. Para cada aspecto, la exposición puede ser por medio de perfusión continua, perfusión pulsátil, infusión, baño, inyección o cateterismo.

En el aislamiento mencionado anteriormente o modo de realización *ex vivo*, una eritropoyetina útil puede ser cualquiera de las eritropoyetinas mencionadas anteriormente, incluyendo cualquier eritropoyetina natural no eritropoyética modificada, o un análogo de eritropoyetina, un mimético de eritropoyetina y fragmento de eritropoyetina, una molécula de eritropoyetina híbrida, una molécula de unión al receptor de eritropoyetina, un agonista de eritropoyetina, una eritropoyetina renal, una eritropoyetina cerebral, un oligómero de la misma, un multímero de la misma, una muteína de la misma, un congénere de la misma, una forma de origen natural de la misma, una forma sintética de la misma, una forma recombinante de la misma, una variante de glucosilación de la misma, una variante desglucosilada de la misma, o una combinación de las mismas que se modifica como se define en las reivindicaciones. Otras eritropoyetinas incluyen, pero no se limitan a, asialoeritropoyetina, eritropoyetina N-desglucosilada, eritropoyetina O-desglucosilada, eritropoyetina con una reducción en el contenido en hidratos de carbono, eritropoyetina con patrones de glucosilación alterados, eritropoyetina con hidratos de carbono oxidados y después reducidos, eritropoyetina modificada con arilglixal, eritropoyetina modificada con alquilglixal, eritropoyetina modificada con 2,3-butanodiona, eritropoyetina modificada con ciclohexanodiona, eritropoyetina biotinilada, lisileritropoyetina N-alquilada, glucitolilisinaeritropoyetina, alfa-desoxi-alfa-fructosilisina-eritropoyetina, eritropoyetina carbamilada, eritropoyetina acetilada, eritropoyetina succinilada, alfa-carboxialquileritropoyetina, eritropoyetina nitrada, eritropoyetina yodada por nombrar algunos ejemplos representativos aunque no limitantes en base a las enseñanzas en el presente documento. Es preferente una eritropoyetina humana modificada. En otro modo de realización, es preferente asialoeritropoyetina humana. En otro modo de realización, es preferente fenilglixaleritropoyetina humana.

A modo de ejemplos no limitantes, la célula o tejido sensible a eritropoyetina *ex vivo* mencionado anteriormente es células o tejido neuronal.

Todos los procedimientos anteriores y usos se aplican preferentemente a seres humanos, pero también son útiles para cualquier mamífero, tal como, pero sin limitarse a, animales de compañía, animales domésticos, ganado y animales de zoo. Las vías de administración de las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente incluyen administración oral, intravenosa, intranasal, tópica, intraluminal, por inhalación o parenteral, incluyendo esta última intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, submucosa o intradérmica. Para uso *ex vivo*, es preferente una solución de perfundido o baño. Esto incluye perfundir una parte aislada de la vasculatura *in situ*.

Aún en otro aspecto de la invención, cualquiera de las eritropoyetinas mencionadas anteriormente son útiles en la preparación de una composición farmacéutica para restablecer una célula, tejido u órgano disfuncional cuando se

administra después de la aparición de la enfermedad o afección responsable de la disfunción. A modo de ejemplo no limitante, la administración de una composición farmacéutica que comprende eritropoyetina restablece la función cognitiva en animales que han tenido previamente traumatismo craneoencefálico, incluso cuando se administra mucho después (por ejemplo, tres días, cinco días, una semana, un mes o más) el traumatismo ha desaparecido. Las eritropoyetinas útiles para dichas aplicaciones incluyen cualquiera de las eritropoyetinas particulares mencionadas anteriormente. Es preferente una eritropoyetina humana modificada. En otro modo de realización, es preferente asialoeritropoyetina humana.

Aún en otro modo de realización, la invención proporciona procedimientos para el uso de la eritropoyetina mencionada anteriormente para restablecer una célula, tejido u órgano neuronal disfuncional cuando se administra después de la aparición de la enfermedad o afección responsable de la disfunción. A modo de ejemplo no limitante, los procedimientos para la administración de una composición farmacéutica que comprende eritropoyetina restablecen la función cognitiva en animales que han tenido previamente traumatismo craneoencefálico, incluso cuando se administra mucho después (por ejemplo, tres días, cinco días, una semana, un mes o más) el traumatismo ha desaparecido. Las eritropoyetinas útiles para dichos procedimientos incluyen cualquiera de las eritropoyetinas particulares mencionadas anteriormente. Es preferente una eritropoyetina humana modificada. En otro modo de realización, es preferente asialoeritropoyetina humana.

Estos y otros aspectos de la presente invención se apreciarán mejor por referencia a las siguientes figuras y descripción detallada.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **figura 1** representa la translocación de eritropoyetina administrada por vía parenteral en el líquido cefalorraquídeo.

La **figura 2** muestra la protección del miocardio de daño isquémico por eritropoyetina después de la oclusión vascular temporal.

La **figura 3** muestra el mantenimiento de la función de un corazón preparado para el trasplante por eritropoyetina.

La **figura 4** compara la eficacia *in vitro* de eritropoyetina y asialoeritropoyetina sobre la viabilidad de células P19 privadas de suero.

La **figura 5** es otro experimento que compara la eficacia *in vitro* de eritropoyetina y asialoeritropoyetina sobre la viabilidad de células P19 privadas de suero.

La **figura 6** compara la eficacia *in vitro* de eritropoyetina y eritropoyetina modificada con fenilglioxal sobre la viabilidad de células P19 privadas de suero.

La **figura 7** muestra la protección de eritropoyetina y asialoeritropoyetina en un modelo de isquemia cerebral focal de rata.

La **figura 8** muestra una respuesta a la dosis que compara la eficacia de eritropoyetina humana y asialoeritropoyetina humana en la oclusión de arteria cerebral media en un modelo de apoplejía isquémica.

La **figura 9** muestra el efecto de eritropoyetina y asialoeritropoyetina biotiniladas en el ensayo de P19.

La **figura 10** muestra la actividad de eritropoyetina yodada en el ensayo de P19.

La **figura 11** representa los efectos del tratamiento con eritropoyetina en un modelo de glaucoma de rata.

La **figura 12** muestra el grado de conservación de la función retiniana por eritropoyetina en un modelo de glaucoma de rata.

La **figura 13** representa el restablecimiento de la función cognitiva tras un traumatismo craneoencefálico por la administración de eritropoyetina a los cinco días después del traumatismo.

La **figura 14** representa el restablecimiento de la función cognitiva tras un traumatismo craneoencefálico por la administración de eritropoyetina a los 30 días después del traumatismo.

La **figura 15** representa la eficacia de asialoeritropoyetina humana en un modelo de cainato de toxicidad cerebral.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

“Célula sensible a eritropoyetina” se refiere a una célula de mamífero cuya función o viabilidad se puede mantener,

promover, potenciar, regenerar, o de cualquier otro modo beneficiar, mediante la exposición a una eritropoyetina. Los ejemplos no limitantes de dichas células incluyen células neuronales, retinianas, musculares, de corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino delgado, corteza suprarrenal, médula suprarrenal, endotelio capilar, testículos, ovario y endometrio. Además, dichas células sensibles a eritropoyetina y los beneficios proporcionados a las mismas por una eritropoyetina se pueden extender para indirectamente proporcionar protección o potenciación a otras células que directamente no son sensibles a eritropoyetina, o de tejidos u órganos que contienen dichas células no sensibles a eritropoyetina. Estas otras células, o tejidos u órganos que indirectamente se benefician de la potenciación de células sensibles a eritropoyetina están presentes como parte de las células, tejido u órgano como células, tejidos y órganos "asociados". Por tanto, los beneficios de una eritropoyetina como se describe en el presente documento se pueden proporcionar como resultado de la presencia de un pequeño número o proporción de células sensibles a eritropoyetina en un tejido u órgano, por ejemplo, tejido excitable o neuronal presente en dicho tejido, o las células de Leydig del testículo, que fabrican testosterona. En un aspecto, la célula sensible a eritropoyetina o sus células, tejidos, u órganos asociados no son células, tejidos u órganos excitables o no comprenden predominantemente células o tejidos excitables.

Los procedimientos de la invención proporcionan la protección o potenciación sistémica o local de células, tejidos y órganos dentro de un cuerpo de mamífero, en una amplia variedad de afecciones normales y adversas, o protección de aquellas que están destinadas a la reubicación a otro cuerpo de mamífero. Además, también se proporciona el restablecimiento o regeneración de la disfunción. Como se menciona anteriormente, la capacidad de una eritropoyetina para atravesar una barrera ocluyente de células endoteliales y ejercer sus efectos positivos sobre células sensibles a eritropoyetina (así como otros tipos de células) distales con respecto a la vasculatura ofrece un potencial para prevenir, así como tratar, una amplia variedad de afecciones y enfermedades que de otro modo provocan un daño celular y tisular significativo en un animal, incluyendo humano, y, además, posibilitan el éxito de procedimientos quirúrgicos que no se han podido probar hasta el momento para los que tradicionalmente el riesgo supera a los beneficios. La duración y el grado de afecciones adversas intencionadas inducidas para el beneficio final, tales como quimioterapia en dosis altas, radioterapia, supervivencia al trasplante *ex vivo* prolongada, y períodos prolongados de isquemia quirúrgicamente inducida, se pueden llevar a cabo aprovechando la invención en el presente documento. Sin embargo, la invención no está limitada a eso, sino que incluye, como un aspecto, los procedimientos o composiciones en las que las células sensibles a eritropoyetina objetivo son distales con respecto a la vasculatura en virtud de una barrera de células endoteliales o uniones ocluyentes endoteliales. En general, la invención está dirigida a cualquier célula sensible a eritropoyetina y células, tejidos y órganos asociados que se pueden beneficiar de la exposición a una eritropoyetina. Además, se puede restablecer o regenerar la disfunción celular, de tejidos u órganos después de un acontecimiento adverso agudo (tal como un traumatismo) por exposición a una eritropoyetina.

Por tanto, la invención está dirigida, en general, al uso de las eritropoyetinas modificadas para la preparación de composiciones farmacéuticas para los propósitos mencionados anteriormente en que se promueve, potencia, regenera, o de cualquier otro modo beneficia, la función celular. La invención también está dirigida a procedimientos para potenciar, promover o regenerar la función celular administrando a un mamífero una cantidad eficaz de una eritropoyetina como se describe en el presente documento. La invención además está dirigida a procedimientos para promocionar, potenciar o regenerar la función celular *ex vivo* exponiendo células, un tejido o un órgano a una eritropoyetina. La invención también está dirigida a una composición de perfundido que comprende una eritropoyetina modificada para su uso en la conservación de órganos o tejidos.

Los varios procedimientos de la invención utilizan una composición farmacéutica que incluye al menos dicha eritropoyetina en una cantidad eficaz para la vía particular y duración de exposición para ejercer efectos positivos o beneficios sobre células sensibles a eritropoyetina dentro o retiradas de un cuerpo de mamífero. Cuando la célula, tejidos u órganos objetivo del tratamiento destinado requieren que la eritropoyetina atravesase una barrera de células endoteliales, la composición farmacéutica incluye la eritropoyetina en una concentración que, después de atravesar la barrera de células endoteliales, puede ejercer sus efectos deseables sobre las células sensibles a eritropoyetina. Las moléculas que pueden interaccionar con el receptor de eritropoyetina y modular la actividad del receptor, denominadas en el presente documento moduladores de la actividad del receptor de eritropoyetina o eritropoyetina, son útiles en el contexto de la presente invención. Estas moléculas pueden ser, por ejemplo, formas de origen natural, sintéticas o recombinantes de moléculas de eritropoyetina, como se describe anteriormente, u otras moléculas que no necesariamente se asemejan a eritropoyetina de ninguna manera, excepto para modular la actividad de células sensibles a eritropoyetina, como se describe en el presente documento.

La eritropoyetina es una hormona glucoproteica que en los seres humanos tiene un peso molecular de aproximadamente 34 kDa. La proteína madura comprende 165 aminoácidos, y los residuos de glucosilo comprenden aproximadamente un 40 % del peso de la molécula. Las formas de eritropoyetina útiles en la práctica de la presente invención engloban las eritropoyetinas modificadas definidas anteriormente. Además, las formas de eritropoyetina útiles en la práctica de la presente invención incluyen proteínas que representan productos génicos funcionalmente equivalentes. Dicho producto génico de eritropoyetina equivalente incluye eritropoyetinas mutantes, que pueden contener delecciones, incluyendo delecciones internas, adiciones, incluyendo adiciones que dan lugar a proteínas de fusión, o sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos en y/o adyacentes a la secuencia de aminoácidos, pero que dan como resultado un cambio "inactivo", en que el cambio produce una eritropoyetina

funcionalmente equivalente. Dichas sustituciones de aminoácidos se pueden efectuar en base a la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos apolares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. De forma alternativa, se pueden usar cambios de aminoácidos no conservadores e inserciones y deleciones más grandes para crear mutantes de eritropoyetina funcionalmente alterada. Se pueden usar dichos mutantes para alterar las propiedades de la eritropoyetina en formas deseables. Por ejemplo, en un modo de realización, una eritropoyetina útil para la práctica de la invención puede ser una eritropoyetina mutante alterada en uno o más aminoácidos en los cuatro dominios funcionales de eritropoyetina que afectan a la unión al receptor: VLQRY y/o TKVNFYAW y/o SGLRSLTTL y/o SNFLRG. En otro modo de realización, se pueden usar las eritropoyetinas que contienen mutaciones en las zonas circundantes de la molécula que afectan a las propiedades de unión al receptor o cinética de la molécula.

El término "eritropoyetina" así como "una eritropoyetina" se pueden usar de forma intercambiable o colectiva, y los diversos análogos, fragmentos, moléculas híbridas, agonistas, muteínas, y otras formas descritas anteriormente abarcan las variantes en los grados y sitios de glucosilación de eritropoyetina, incluyendo formas de eritropoyetina nativas, desglucosiladas, asialiladas y otras parcialmente glucosiladas. Los ejemplos no limitantes de dichas variantes se describen en Tsuda *et al.*, 1990, *Eur. J. Biochem.* **188**:405-411, incorporado en el presente documento por referencia. Bacterias, levadura, insecto, planta, mamíferos, incluyendo seres humanos. Además, se puede usar una variedad de sistemas huésped para la expresión y producción de eritropoyetina recombinante, incluyendo, pero sin limitarse a, sistemas celulares de bacterias, levaduras, insectos, plantas y mamíferos, incluyendo seres humanos. Por ejemplo, la eritropoyetina recombinante producida en bacterias, que no glucosila o sialila el producto, se podría usar para producir formas no glucosiladas de eritropoyetina. De forma alternativa, la eritropoyetina recombinante se puede producir en otros sistemas que glucosilan, por ejemplo, plantas, incluyendo células humanas.

Como se destaca anteriormente, la invención en el presente documento abarca cualquiera y todas las moléculas de modulador de la actividad del receptor de eritropoyetina que puede ejercer una actividad positiva sobre células sensibles a eritropoyetina, independientemente de cualquier relación estructural de la molécula con la eritropoyetina.

Además, se puede modificar la propia eritropoyetina para adaptar sus actividades a un tejido o tejidos específicos. Se pueden llevar a cabo diversas estrategias no limitantes para lograr esta especificidad de tejido deseada que incluyen modificaciones que acortan la semivida en circulación y, por tanto, reducen el tiempo que la eritropoyetina puede interaccionar con precursores eritroides, o la modificación de la estructura primaria de la molécula de eritropoyetina. Un enfoque para reducir la semivida en circulación es para retirar o modificar los restos de glucosilación, de los cuales la eritropoyetina tiene tres unidos a N y uno unido a O. Se pueden producir dichas variantes de eritropoyetina glucosilada de una serie de maneras. Por ejemplo, se pueden retirar los ácidos siálicos que finalizan el extremo de las cadenas de azúcar mediante sialidasas específicas dependiendo del enlace químico que conecta el ácido siálico a la cadena de azúcar. De forma alternativa, se puede dismantelar la estructura glucosilada de diferentes formas usando otras enzimas que se escinden en enlaces específicos. Las técnicas para modificar la estructura primaria son innumerables e incluyen la sustitución de aminoácidos específicos, la modificación química de aminoácidos, o la adición de otras estructuras que interfieren con la interacción de eritropoyetina con cualquiera de sus receptores. El uso de dichas formas de eritropoyetina se abarca totalmente en el presente documento. En un modo de realización preferente, se reduce la semivida de la eritropoyetina no eritropoyética de la invención en aproximadamente un 90 % de la de eritropoyetina natural.

No obstante, algunas de estas moléculas imitan las acciones de la propia eritropoyetina en otros tejidos u órganos. Por ejemplo, un 17-mero que contiene la secuencia de aminoácidos de 31-47 de eritropoyetina natural es inactivo para eritropoyesis pero totalmente activo para neuronas *in vitro* (Campana & O'Brien, 1998: *Int. J. Mol. Med.* **1**:235-41).

Además, las moléculas de eritropoyetina derivadas deseables para los usos descritos en el presente documento se pueden generar por guanidinación, amidinación, carbamilación (carbamoilación), trinitrofenilación, acetilación, succinilación, nitración o modificación de residuos de arginina, lisina, tirosina, triptófano o cisteína o grupos carboxilo, entre otros procedimientos, tales como proteólisis limitada, retirada de grupos amino y/o sustitución mutacional de residuos de arginina, lisina, tirosina, triptófano o cisteína por técnicas de biología molecular para producir eritropoyetinas que mantienen un nivel adecuado de actividades para órganos y tejidos específicos, pero no para otros, tales como eritrocitos (por ejemplo, Satake *et al.*, 1990, *Biochim. Biophys. Acta* **1038**:125-9; incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad). Un ejemplo no limitante como se describe a continuación en el presente documento es la modificación de residuos de arginina de eritropoyetina por reacción con un glioxal, tal como fenilglioxal (de acuerdo con el protocolo de Takahashi, 1977, *J. Biochem.* **81**:395-402). Como se observará a continuación, dicha molécula de eritropoyetina conserva totalmente su efecto neurótrofo. Dichas moléculas de eritropoyetina se abarcan totalmente para los diversos usos y composiciones descritos en el presente documento.

Se proporcionan en el presente documento moléculas sintéticas y recombinantes, tales como eritropoyetina cerebral

y eritropoyetina renal, formas de eritropoyetina de mamífero recombinantes, así como sus isoformas de origen natural, derivadas de tumor y recombinantes, tales como moléculas expresadas de forma recombinante y las preparadas por recombinación homóloga. Además, la presente invención incluye moléculas que incluyen péptidos que se unen al receptor de eritropoyetina, así como construcciones recombinantes u otras moléculas que poseen parte o todas de las propiedades estructurales y/o biológicas de eritropoyetina, incluyendo fragmentos y multímeros de eritropoyetina o sus fragmentos. La eritropoyetina en el presente documento abarca moléculas con actividades de unión a receptor de eritropoyetina alterada, preferentemente con afinidad incrementada por el receptor, en particular, como se hace referencia para potenciar el transporte a través de barreras de células endoteliales. En el presente documento se incluyen muteínas que comprenden moléculas que tienen números adicionales o reducidos de sitios de glucosilación. Como se destaca anteriormente, en el presente documento se usan de forma intercambiable los términos "eritropoyetina" y "miméticos" así como los demás términos para referirse a las moléculas potenciadoras y protectoras de células sensibles a eritropoyetina relacionadas con eritropoyetina, así como las moléculas que pueden atravesar barreras de células endoteliales.

Además, en el presente documento también se engloban moléculas producidas por animales transgénicos. Cabe destacar que las moléculas de eritropoyetina abarcadas en el presente documento no necesariamente se asemejan estructuralmente a eritropoyetina o de cualquier otra manera, excepto por la capacidad para interactuar con el receptor de eritropoyetina o modular la actividad del receptor de eritropoyetina o activar cascadas de señalización activadas por eritropoyetina, como se describe en el presente documento.

A modo de ejemplos no limitativos, las formas de eritropoyetina útiles para la práctica de la presente invención incluyen muteínas de eritropoyetina, tales como aquellas con aminoácidos alterados en el extremo carboxi terminal descritas en la patente de EE. UU. 5.457.089 y en la patente de EE. UU. 4.835.260; isoformas de asialoeritropoyetina y eritropoyetina con varios números de residuos de ácido siálico por molécula, tal como se describe en la patente de EE. UU. 5.856.298; los polipéptidos descritos en la patente de EE. UU. 4.703.008; agonistas descritos en la patente de EE. UU. 5.767.078; péptidos que se unen al receptor de eritropoyetina como se describe en la patente de EE. UU. 5.773.569 y 5.830.851; miméticos de moléculas pequeñas que activan el receptor de eritropoyetina, como se describe en la patente de EE. UU. 5.835.382; y análogos de eritropoyetina descritos en los documentos WO 9505465, WO 9718318 y WO 9818926. Todas las citas mencionadas anteriormente se incorporan en el presente documento en la medida en que dichas divulgaciones se refieran a los diversas formas o procedimientos alternativos para preparar dichas formas de las eritropoyetinas de la presente invención.

La eritropoyetina se puede obtener comercialmente, por ejemplo, bajo las marcas comerciales de PROCRT, disponible de Orto Biotech Inc., Raritan, NJ y EPOGEN, disponible de Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA.

La actividad (en unidades) de eritropoyetina (eritropoyetina) y moléculas similares a eritropoyetina tradicionalmente se define en base a su eficacia en la estimulación de la producción de glóbulos rojos en modelos de roedores (y obtenida por normas internacionales de eritropoyetina). Una unidad (U) de eritropoyetina regular (PM de ~ 34.000) es ~ 8 ng de proteína (1 mg de proteína es aproximadamente 125.000 U). Sin embargo, como el efecto sobre la eritropoyesis es inherente a las actividades deseadas en el presente documento y necesariamente puede no ser una propiedad detectable de determinadas eritropoyetinas de la invención, la definición de la actividad basada en la actividad eritropoyética no es apropiada. Por tanto, como se usa en el presente documento, la unidad de actividad de eritropoyetina o moléculas relacionadas con eritropoyetina se define como la cantidad de proteína requerida para obtener la misma actividad en sistemas celulares sensibles a eritropoyetina o neuronales que se obtiene mediante la eritropoyetina de la norma internacional de la OMS en el mismo sistema. El experto en la técnica determinará fácilmente las unidades de una eritropoyetina no eritropoyética o molécula relacionada después de la orientación en el presente documento.

Además de las modificaciones de eritropoyetina mencionadas anteriormente útiles en el presente documento, el siguiente análisis se extiende a las diversas eritropoyetinas de la invención.

Una eritropoyetina de la invención al menos puede no tener ningún resto de ácido siálico, al que se hace referencia como asialoeritropoyetina. Preferentemente, una eritropoyetina de la invención es una asialoeritropoyetina humana. En modos de realización alternativos, la eritropoyetina de la invención al menos puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 residuos de ácido siálico. También se puede preparar por desialilación de eritropoyetina usando una sialidasa, tal como se describe en el envase del fabricante para Sialydase A de ProZyme Inc., San Leandro, California. Típicamente, se usa SIALYDASE A™ de grado de secuenciación de PROZYME® GLYCOPRO® (N-acetilneuraminato glicohidrolasa, EC 3.2.1.18) para escindir todos los residuos de ácido siálico terminales no reductores de glucoproteínas e hidratos de carbono complejos, tales como eritropoyetina. También escindirán ácidos siálicos ramificados(unido a un residuo interno). Sialydase A se aísla a partir de un clon de *Arthrobacter ureafaciens*.

Adicionalmente a las modificaciones de la reivindicación 1, pueden existir las siguientes modificaciones:

Una eritropoyetina puede tener al menos un número reducido de hidratos de carbono unidos a N. Para retirar los hidratos de carbono unidos a N, se puede tratar la eritropoyetina con hidracina, de acuerdo con, por ejemplo, los procedimientos descritos por Hermentin *et al.*, 1996, Glycobiology 6(2):217-30. Como se destaca anteriormente, la

eritropoyetina tiene tres restos de hidrato de carbono unido a N; la presente invención abarca las eritropoyetinas con dos, uno o ningún hidrato de carbono unido a N.

Una eritropoyetina de la invención puede tener al menos una reducción en el contenido en hidratos de carbono en virtud del tratamiento de eritropoyetina natural con al menos una glucosidasa. Por ejemplo, se puede seguir el procedimiento de Chen y Evangelista, 1998, *Electrophoresis* 19(15):2639-44. Además, se puede lograr la retirada del hidrato de carbono unido a O siguiendo los procedimientos descritos en Hokke *et al.*, 1995, *Eur. J. Biochem.* 228(3):981-1008.

La parte de hidratos de carbono de una molécula de eritropoyetina puede tener al menos un patrón de glucosilación que no es de mamífero, en virtud de la expresión de una eritropoyetina recombinante en células que no son de mamíferos. Preferentemente, las eritropoyetinas se expresan en células de insectos o vegetales. A modo de ejemplo no limitante, se puede llevar a cabo la expresión de eritropoyetina en células de insectos usando un sistema de expresión de baculovirus de acuerdo con Quelle *et al.*, 1989, *Blood* 74(2):652-657. Otro procedimiento se describe en la patente de los EE. UU. 5.637.477. Se puede llevar a cabo la expresión en un sistema vegetal de acuerdo con el procedimiento de Matsumoto *et al.*, 1993, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(8):1249-1252. De forma alternativa, la expresión en bacterias dará como resultado formas no glucosiladas de eritropoyetina. Estos son meramente ejemplos de procedimientos útiles para la producción de una eritropoyetina de la invención que no son, en modo alguno, limitantes.

Una eritropoyetina de la invención puede tener al menos uno o más hidratos de carbono oxidados que también se pueden reducir químicamente. Por ejemplo, la eritropoyetina puede ser eritropoyetina oxidada con peryodato; la eritropoyetina oxidada con peryodato también se puede reducir químicamente con una sal de borohidruro tal como borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio. Se puede llevar a cabo la oxidación con peryodato de la eritropoyetina, por ejemplo, por los procedimientos descritos por Linsley *et al.*, 1994, *Anal. Biochem.* 219(2):207-17. Se puede llevar a cabo la reducción química después de la oxidación con peryodato siguiendo los procedimientos de Tonelli y Meints, 1978, *J. Supramol. Struct.* 8(1):67-78.

Una eritropoyetina para los usos mencionados anteriormente puede tener al menos uno o más residuos de arginina modificada. Por ejemplo, la eritropoyetina modificada puede comprender un resto R-glioxal en el uno o más residuos de arginina, en el que R puede ser un grupo arilo, heteroarilo, alquilo inferior, alcoxi inferior o cicloalquilo, o un grupo alfa-desoxiglicitolilo. Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" inferior quiere decir un grupo hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal o ramificada que contiene preferentemente de 1-6 átomos de carbono. Representativos de dichos grupos son metilo, etilo, isopropilo, isobutilo, butilo, pentilo, hexilo y similares. El término "alcoxi" quiere decir un grupo alquilo inferior como se define anteriormente unido al resto de la molécula por oxígeno. Los ejemplos de alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi y similares. El término "cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo cíclicos con de tres hasta aproximadamente 8 carbonos, incluyendo, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo y similares. El término arilo se refiere a grupos fenilo y naftilo. El término heteroarilo se refiere a grupos heterocíclicos que contienen 4-10 miembros de anillo y 1-3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a isoxazolilo, fenilisoxazolilo, furilo, pirimidinilo, quinolilo, tetrahidroquinolilo, piridilo, imidazolilo, pirrolidinilo, 1,2,4-triazolilo, tiazolilo, tienilo y similares. El grupo R puede estar sustituido, como por ejemplo, el grupo 2,3,4-trihidroxibutilo de 3-desoxiglucosona. Los ejemplos típicos de compuestos de R-glioxal son glioxal, metilglioxal, 3-desoxiglucosona y fenilglioxal. Los compuestos de R-glioxal preferentes son metilglioxal o fenilglioxal. Se pueden encontrar un procedimiento ejemplar para dicha modificación en Werber *et al.*, 1975, *Isr. J. Med. Sci.* 11(11): 1169-70, usando fenilglioxal.

En otro ejemplo, se puede modificar al menos un residuo arginina por reacción con una dicetona próxima tal como 2,3-butanodiona o ciclohexanodiona, preferentemente en tampón borato ca. 50 milimolar a pH 8-9. Se puede llevar a cabo un procedimiento para la última modificación con 2,3-butanodiona de acuerdo con Riordan, 1973, *Biochemistry* 12(20): 3915-3923; y esa con ciclohexanona de acuerdo con Patthy *et al.*, 1975, *J. Biol. Chem* 250(2): 565-9.

Una eritropoyetina de la invención puede comprender al menos uno o más residuos de lisina modificada o una modificación del grupo amino N-terminal de la molécula de eritropoyetina, dichas modificaciones como las que resultan de la reacción del residuo de lisina con un agente modificador del grupo amino. En otro modo de realización, se pueden modificar residuos de lisina por reacción con derivados de glioxal, tal como reacción con glioxal, metilglioxal y 3-deoxiglucosona para formar derivados de alfa-carboxialquilo. Los ejemplos son reacción con glioxal para formar carboximetil lisina como en Glomb y Momier, 1995, *J. Biol. Chem.* 270(17):10017-26, o con metilglioxal para formar (1-carboxietil)lisina como en Degenhardt *et al.*, 1998, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 44(7):1139-45. El residuo de lisina modificada además se puede reducir químicamente. Por ejemplo, la eritropoyetina se puede biotinilar por medio de grupos lisina, tal como de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 5, en el que se hizo reaccionar éster N-hidroxisuccinimídico del ácido D-biotinoil-ε-aminocaproico con eritropoyetina, seguido de la retirada de biotina sin reaccionar por filtración en gel en una columna Centricon 10, como se describe por Wojchowski y Caslake, 1989, *Blood* 74(3):952-8. En ese artículo, los autores usan tres procedimientos diferentes de biotinilación de eritropoyetina, de los que cualquiera se puede usar para la preparación de las eritropoyetinas para los usos en el presente documento. Se puede añadir biotina a (1) los restos de ácido

siálico (2) grupos carboxilato o (3) grupos amino.

En otro modo de realización preferente, se puede hacer reaccionar la lisina con un aldehído o azúcar reductor para formar una imina, que se puede estabilizar por reducción como con cianoborohidruro de sodio para formar una lisina N-alquilada tal como glucitolilisina, o que en el caso de azúcares reductores se puede estabilizar por reordenamiento de Amadori o Heyns para formar un alfa-desoxi-alfa-aminoazúcar tal como alfa-desoxi-alfa-fructosilisina. Como ejemplo, se describe la preparación de una proteína modificada con fructosilisina por incubación con glucosa 0,5 M en tampón fosfato de sodio a pH 7,4 durante 60 días por Makita *et al.*, 1992, J. Biol. Chem. 267:5133-5138. En otro ejemplo, se puede carbamilar el grupo lisina, tal como en virtud de la reacción con ion cianato, o se puede alquil- o arilcarbamilar o -tiocarbamilar con un alquil- o arilisocianato o -isotiocianato, o se puede acilar por un derivado de ácido alquil- o arilcarboxílico reactivo, tal como por reacción con anhídrido acético o anhídrido succínico o anhídrido ftálico. Son ejemplares la modificación de grupos lisina con 4-sulfopenilisotiocianato o con anhídrido acético, ambos como se describe en Gao *et al.*, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91(25): 12027-30. Los grupos lisina también se pueden modificar con trinitrofenilo por reacción con ácido trinitrobenzenosulfónico o preferentemente sus sales. Dichos procedimientos se describen a continuación en el ejemplo 5.

Se puede modificar al menos un residuo de tirosina de una eritropoyetina en una posición de anillo aromático por un reactivo electrófilo, tal como por nitración o yodación. A modo de ejemplo no limitante, se puede hacer reaccionar la eritropoyetina con tetranitrometano (Nestler *et al.*, 1985, J. Biol. Chem. 260(12):7316-21; o se puede yodar como se describe en el ejemplo 5.

Se puede modificar al menos un residuo de ácido aspártico o ácido glutámico de una eritropoyetina, tal como por reacción con una carbodiimida seguido de reacción con una amina tal como pero sin limitarse a glicinamida. Se pueden encontrar ejemplos de dichas modificaciones en el ejemplo 5.

En otro ejemplo, se puede modificar un residuo de triptófano de una eritropoyetina, tal como por reacción con n-bromosuccinimida o n-clorosuccinimida, siguiendo procedimientos tales como se describe en Josse *et al.*, Chem Biol Interact 1999, 14 mayo;119-120.

Aún en otro ejemplo, se puede preparar una molécula de eritropoyetina retirando al menos un grupo amino, esto se puede lograr por reacción con ninhidrina seguido de reducción del grupo carbonilo posterior por reacción con borohidruro.

Aún en otro ejemplo, se proporciona una eritropoyetina que tiene al menos una abertura de al menos uno de los enlaces cistina en la molécula de eritropoyetina por reacción con un agente reductor tal como ditiotreitól, seguido de reacción de los sulfhidros posteriores con yodoacetamida, ácido yodoacético u otro electrófilo para evitar la reformación de los enlaces disulfuro.

Se proporciona una eritropoyetina que tiene al menos una sustitución de uno cualquiera de varios aminoácidos, tales como una leucina, con al menos uno de los residuos de lisina, arginina, triptófano, tirosina o cisteína de eritropoyetina, usando técnicas de biología molecular.

Se puede preparar una eritropoyetina modificada sometiendo una eritropoyetina a una proteólisis química limitada que se dirige a residuos específicos, por ejemplo, para escindir después de los residuos de triptófano. Dichos fragmentos de eritropoyetina resultantes se abarcan en el presente documento.

Como se destaca anteriormente, una eritropoyetina útil para los propósitos en el presente documento puede tener al menos una de las modificaciones mencionadas anteriormente, pero puede tener más de una de las modificaciones anteriores. A modo de ejemplo de una eritropoyetina modificada con una modificación para la parte de hidratos de carbono de la molécula y una modificación para la parte de aminoácidos, una eritropoyetina modificada puede ser asialoeritropoyetina y tener sus residuos de lisina biotinilados o carbamilados.

Por tanto, se abarcan diversas moléculas de eritropoyetina y composiciones farmacéuticas que las contienen para los usos descritos en el presente documento. Dichas moléculas de eritropoyetina incluyen, pero no se limitan a, asialoeritropoyetina, eritropoyetina N-desglucosilalada, eritropoyetina O-desglucosilada, eritropoyetina con una reducción en el contenido en hidratos de carbono, eritropoyetina con patrones de glucosilación alterados, eritropoyetina con hidratos de carbono oxidados y después reducidos, eritropoyetina modificada con arilglioxal, eritropoyetina modificada con alquilglioxal, eritropoyetina modificada con 2,3-butanodiona, eritropoyetina modificada con ciclohexanodiona, eritropoyetina biotinilada, lisileritropoyetina N-alquilada, glucitolilisinaeritropoyetina, alfa-desoxi-alfa-fructosilisina-eritropoyetina, eritropoyetina carbamilada, eritropoyetina acetilada, eritropoyetina succinilada, alfa-carboxialquileritropoyetina, eritropoyetina nitrada, eritropoyetina yodada, por nombrar algunos ejemplos representativos aunque no limitantes en base a las enseñanzas en el presente documento. Son preferentes las formas modificadas mencionadas anteriormente a base de eritropoyetina humana.

Además, varias de las eritropoyetinas mencionadas anteriormente son nuevas, y la invención se refiere a dichos compuestos así como a composiciones farmacéuticas que los comprenden. Dichas nuevas eritropoyetinas incluyen

asialoeritropoyetina carbamylada.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de huésped-vector de expresión para producir las eritropoyetinas y moléculas relacionadas con eritropoyetinas de la invención. Dichos sistemas de huésped-vector de expresión representan vehículos por los que se pueden producir y posteriormente purificar las eritropoyetinas de interés, pero también representan células que pueden presentar, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, el producto génico de eritropoyetina modificada *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, bacterias, insecto, planta, mamífero, incluyendo sistemas de huésped humano, tal como, pero sin limitarse a, sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificantes del producto de eritropoyetina modificada; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen las secuencias codificantes de moléculas relacionadas con eritropoyetinas; o sistemas de células de mamíferos, incluyendo sistemas de células humanas (por ejemplo, HT1080, COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de virus de la variolovacuna 7,5K).

Además, se puede elegir una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y el procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteínas pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación postraduccionales de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína exógena expresada. Para este fin, se pueden usar células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para un procesamiento apropiado de la transcripción, glucosilación y fosforilación primarias del producto génico. Dichas células huésped de mamíferos, incluyendo células huésped humanas, incluyen, pero no se limitan a, HT1080, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 y WI38.

Para una producción de larga duración y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, es preferente una expresión estable. Por ejemplo, se pueden genomanipular líneas celulares que expresan de forma estable el producto génico de moléculas relacionadas con eritropoyetinas. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación víricos, se pueden transformar las células huésped con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN exógeno, se puede dejar que las células genomanipuladas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y a continuación se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecen para formar focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este procedimiento se puede usar ventajosamente para genomanipular líneas celulares que expresan el producto génico de moléculas relacionadas con eritropoyetinas. Dichas líneas celulares genomanipuladas pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de compuestos que afectan a la actividad endógena del producto génico de moléculas relacionadas con eritropoyetinas.

De forma alternativa, la expresión característica de un gen de eritropoyetina endógeno dentro de una línea celular o microorganismo se puede modificar insertando un elemento regulador de ADN heterólogo en el genoma de una línea celular estable o microorganismo clonado de modo que el elemento regulador insertado esté unido funcionalmente con el gen de eritropoyetina endógeno. Por ejemplo, un gen de eritropoyetina endógeno que normalmente es "transcripcionalmente inactivo", es decir, un gen de eritropoyetina que normalmente no se expresa, o se expresa sólo a niveles muy bajos en una línea celular, se puede activar insertando un elemento regulador que puede promover la expresión de un producto génico expresado normalmente en esa línea celular o microorganismo. De forma alternativa, un gen de eritropoyetina endógeno, transcripcionalmente inactivo, se puede activar por inserción de un elemento regulador promiscuo que actúa a través de tipos de células.

Se puede insertar un elemento regulador heterólogo en una línea celular estable o microorganismo clonado, de modo que se una de forma funcional con un gen de eritropoyetina endógeno, usando técnicas, tales como recombinación homóloga dirigida, que son bien conocidas por los expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la patente francesa n.º 2646438 para Institut Pasteur, patente de los EE. UU. n.º 4.215.051 para Chappel; patente de los EE. UU. n.º 5.578.461 para Sherwin *et al.*; solicitud internacional n.º. PCT/US92/09627 (WO93/09222) por Selden *et al.*; y la solicitud internacional n.º. PCT/US90/06436 (WO91/06667) por Skoultchi *et al.*, de las que cada una se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad.

En un modo de realización de la invención, se puede producir una molécula relacionada con eritropoyetina deficitaria en residuos siálicos, o que carece completamente de residuos siálicos, en una célula de mamífero, incluyendo una célula humana. Dichas células se pueden genomanipular para que sean deficitarias en, o que carezcan de, las enzimas que añaden ácidos siálicos, es decir, la actividad de la  $\beta$ -galactósido  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa (" $\alpha$ -2,3-

sialiltransferasa”) y  $\beta$ -galactósido  $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa (“ $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa”). En un modo de realización, se usa una célula de mamífero en la que se elimina cualquiera o ambos el gen de  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa y/o el gen de  $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa. Dichas deleciones se pueden construir usando técnicas de inactivación génica bien conocidas en la técnica. En otro modo de realización, se usan células de ovario de hámster chino (CHO) deficitarias en dihidrofolato reductasa (DHFR) como célula huésped para la producción de moléculas relacionadas con eritropoyetina recombinante. Las células CHO no expresan la enzima  $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa y, por lo tanto, no añaden ácido siálico en el enlace 2,6 a los oligosacáridos unidos a N de las glucoproteínas producidas en estas células. Como resultado, las proteínas recombinantes producidas en células CHO carecen de ácido siálico en el enlace 2,6 a galactosa (Sasaki *et al.* (1987; Takeuchi *et al. supra*; Mutsaers *et al.*, Eur. J. Biochem. 156, 651 (1986); Takeuchi *et al.* J. Chromatogr. 400, 207 (1987). En un modo de realización, para producir una célula huésped para la producción de asialoeritropoyetina, se elimina el gen que codifica  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa en células CHO. Dichas células CHO inactivadas con  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa carecen completamente de actividad sialiltransferasa, y como resultado, son útiles para la expresión y producción recombinantes de asialoeritropoyetina.

En otro modo de realización, se pueden producir asialoglucoproteínas interfiriendo con el transporte de ácido siálico en el aparato de Golgi por ejemplo, Eckhardt *et al.*, 1998, J. Biol. Chem. 273:20189-95). Usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, Oelmann *et al.*, 2001, J. Biol. Chem. 276:26291-300), se puede llevar a cabo la mutagénesis del transportador de CMP-ácido siálico de azúcar nucleotídico para producir mutantes de células de ovario de hámster chino. Estas células no pueden añadir residuos de ácido siálico a glucoproteínas tales como eritropoyetina y solo producen asialoeritropoyetina. Las células de mamífero transfectadas que producen eritropoyetina también producen sialidasa citosólica que si se filtra en el medio de cultivo degrada la sialoeritropoyetina con una eficacia alta (por ejemplo, Gramer *et al.*, 1995 Biotechnology 13:692-698). Usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, a partir de información proporcionada en Ferrari *et al.*, 1994, Glycobiology 4:367-373), las líneas celulares se pueden transfectar, mutar o provocar de otro modo que produzcan constitutivamente sialidasa. De esta manera, se puede producir asialoeritropoyetina durante la fabricación de asialoeritropoyetina.

En la práctica de un aspecto de la presente invención, una composición farmacéutica como se describe anteriormente que contiene una eritropoyetina puede ser administrable a un mamífero por cualquier vía que proporcione un nivel suficiente de una eritropoyetina en la vasculatura para permitir la translocación a través de una barrera de células endoteliales y efectos beneficiosos sobre células sensibles a eritropoyetina. Cuando se usa con el propósito de perfundir un tejido u órgano, se desean resultados similares. En el caso en el que se use la eritropoyetina para perfusión *ex vivo*, la eritropoyetina puede ser cualquier forma de eritropoyetina, tal como las eritropoyetinas mencionadas anteriormente pero no se limita a esto y puede incluir eritropoyetinas naturales incluyendo eritropoyetina humana natural. En el caso en el que las células o tejido no esté vascularizado y/o la administración es por baño de las células o tejido con la composición de la invención, la composición farmacéutica proporciona una cantidad beneficiosa de células sensibles a eritropoyetina eficaz de una eritropoyetina. Las barreras de células endoteliales a través de las que se puede translocar una eritropoyetina incluyen uniones ocluyentes, uniones perforadas, uniones fenestradas, y cualquier otro tipo de barreras endoteliales presentes en un mamífero. Una barrera preferente es una unión ocluyente de células endoteliales, pero la invención no es tan limitante.

Las eritropoyetinas mencionadas anteriormente son útiles, en general, para el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades humanas del sistema nervioso central o sistema nervioso periférico que tienen principalmente síntomas neurológicos o psiquiátricos, enfermedades oftálmicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardiopulmonares, enfermedades respiratorias, enfermedades hepáticas, urinarias y reproductivas, enfermedades gastrointestinales y anomalías endocrinas y metabólicas, pero solo en lo que afecta a células/tejido neuronales. En particular, dichas afecciones y enfermedades incluyen afecciones hipóxicas, que afectan de forma adversa a tejidos excitables, tales como tejidos excitables en el tejido del sistema nervioso central, tejido del sistema nervioso periférico, o tejido cardíaco o tejido retiniano tal como, por ejemplo, cerebro, corazón, o retina/ojo. Por lo tanto, la invención se puede usar para tratar o evitar el daño al tejido excitable que resulta de afecciones hipóxicas en una variedad de afecciones y circunstancias. Los ejemplos no limitantes de dichas afecciones y circunstancias se proporcionan en la tabla a continuación en el presente documento.

En el ejemplo de la protección de patologías del tejido neuronal tratables de acuerdo con la presente invención, dichas patologías incluyen las que resultan de una reducción en la oxigenación de tejidos neuronales. Cualquier afección que reduce la disponibilidad de oxígeno al tejido neuronal, dando como resultado estrés, daño, y por último, muerte celular neuronal, se puede tratar por los procedimientos de la presente invención. Denominadas en general como hipoxia y/o isquemia, estas afecciones surgen de o incluyen, pero no se limitan a apoplejía, oclusión vascular, privación de oxígeno prenatal o posnatal, asfixia, ahogo, casi ahogamiento, intoxicación por monóxido de carbono, inhalación de humo, traumatismo, incluyendo cirugía y radioterapia, asfixia, epilepsia, hipoglucemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, choque hipotensivo, choque séptico, choque anafiláctico, choque insulínico, crisis drepanocítica, paro cardíaco, disritmia, narcosis por nitrógeno, y deficiencias neurológicas provocadas por procedimientos de circulación extracorporeal.

En un modo de realización, por ejemplo, las composiciones de EPO específicas se pueden administrar para evitar la lesión o daño tisular que resulta del riesgo de lesión o daño tisular durante procedimientos quirúrgicos, tales como,

por ejemplo, resección tumoral o reparación de aneurisma. Otras patologías provocadas por o que resultan de la hipoglucemia que son tratables por los procedimientos descritos en el presente documento incluyen sobredosis de insulina, también denominado hiperinsulinemia iatrogénica, insulinoma, insuficiencia de la hormona del crecimiento, hipocortisolismo, sobredosis de fármacos y ciertos tumores.

Otras patologías que resultan del daño de tejido neuronal excitable incluyen trastornos epilépticos, tales como epilepsia, convulsiones o trastornos epilépticos crónicos. Otras afecciones y enfermedades tratables incluyen enfermedades tales como apoplejía, esclerosis múltiple, hipotensión, paro cardíaco, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis cerebral, traumatismo de cerebro o médula espinal, demencia sídica, pérdida de la función cognitiva senil, la pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, trastornos convulsivos, alcoholismo, isquemia retiniana, daño del nervio óptico que resulta de glaucoma, y pérdida neuronal.

Las composiciones y procedimientos específicos de la invención se pueden usar para tratar infecciones de, y daño de, tejido retiniano. Dichos trastornos incluyen, pero no se limitan a isquemia retiniana, degeneración macular, desprendimiento de retina, retinitis pigmentosa, retinopatía arteriosclerótica, retinopatía hipertensiva, bloqueo de arteria retiniana, bloqueo de vena retiniana, hipotensión y retinopatía diabética.

En otro modo de realización, los principios de procedimientos de la invención se pueden usar para proteger o tratar la lesión que resulta del daño por radiación al tejido excitable. Otra utilidad de los procedimientos de la presente invención es en el tratamiento de intoxicación por neurotoxinas, tal como intoxicación por marisco con ácido domoico, neurolatirismo, y enfermedad de Guam, esclerosis lateral amiotrófica, y enfermedad de Parkinson.

Como se menciona anteriormente, la presente invención también se refiere a un procedimiento para potenciar la función de tejido excitable en un mamífero, por administración periférica de una eritropoyetina como se describe anteriormente. Diversas enfermedades y afecciones se pueden tratar usando este procedimiento, y además, este procedimiento es útil para potenciar la función cognitiva en ausencia de cualquier afección o enfermedad. Estos usos de la presente invención se describen con más detalle a continuación e incluyen la potenciación del aprendizaje y entrenamiento tanto en seres humanos como mamíferos no humanos.

Las afecciones y enfermedades tratables por los procedimientos de este aspecto de la presente invención dirigidas al sistema nervioso central incluyen pero no se limitan a trastornos del estado de ánimo, trastornos de ansiedad, depresión, autismo, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, y disfunción cognitiva. Estas afecciones se benefician de la potenciación de la función neuronal. Otros trastornos tratables de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen alteración del sueño, por ejemplo, apnea del sueño y trastornos relacionados con el viaje; sangrados subaracnoideos y aneurismáticos, choque hipotensivo, lesión conmocional, choque septicémico, choque anafiláctico, y secuelas de varias encefalitis y meningitis, por ejemplo, encefalitis relacionadas con la enfermedad del tejido conjuntivo tales como lupus. Otros usos incluyen la prevención de o protección frente a la intoxicación por neurotoxinas, tal como intoxicación por marisco con ácido domoico, neurolatirismo, y enfermedad de Guam, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson; tratamiento posoperatorio para lesión embólica o isquémica; irradiación cerebral total; crisis drepanocítica; y eclampsia.

Otro grupo de afecciones tratables por los procedimientos de la presente invención incluyen la disfunción mitocondrial, de naturaleza hereditaria o bien adquirida, que son la causa de una variedad de enfermedades neurológicas tipificadas por lesión neuronal y muerte. Por ejemplo, la enfermedad de Leigh (encefalopatía necrosante subaguda) se caracteriza por pérdida de visión progresiva y encefalopatía, debido a colapso neuronal, y miopatía. En estos casos, el metabolismo mitocondrial defectuoso no puede suministrar suficientes sustratos de energía alta para abastecer el metabolismo de las células excitables. Un modulador de la actividad del receptor de eritropoyetina optimiza la función defectuosa en una variedad de enfermedades mitocondriales. Como se menciona anteriormente, las afecciones hipóxicas afectan de forma adversa a los tejidos excitables. Los tejidos excitables incluyen, pero no se limitan a, tejido del sistema nervioso central, tejido del sistema nervioso periférico, y tejido cardíaco. Además de las afecciones descritas anteriormente, los procedimientos de la presente invención son útiles en el tratamiento de intoxicación por inhalación tal como inhalación de monóxido de carbono y humo, asma grave, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, y ahogo y casi ahogamiento. Otras afecciones que crean afecciones hipóxicas o inducen por otros medios daño del tejido excitable incluyen hipoglucemia que se puede producir en una dosificación inapropiada de insulina, o con neoplasias productoras de insulina (insulinoma).

Varios trastornos neuropsicológicos que se cree que se originan a partir del daño de tejido excitable son tratables por los presentes procedimientos. Los trastornos crónicos en los que está implicado el daño neuronal y para los que se proporciona la presente invención incluyen trastornos relacionados con el sistema nervioso central y/o sistema nervioso periférico incluyendo pérdida de la función cognitiva senil y demencia senil, trastornos convulsivos crónicos, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, demencia, pérdida de memoria, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, esclerosis tuberosa, enfermedad de Wilson parálisis supranuclear cerebral y progresiva, enfermedad de Guam, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedades priónicas, tales como encefalopatías espongiiformes, por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, distrofia miotónica, ataxia de Friedrich y otras ataxias, así como síndrome de Gilles de la Tourette, trastornos convulsivos tales como epilepsia y trastorno convulsivo crónico, apoplejía, traumatismo de cerebro o médula espinal, demencia sídica,

- 5 alcoholismo, autismo, isquemia retiniana, glaucoma, trastornos de función autónoma tales como hipertensión y trastornos del sueño, y trastornos neuropsiquiátricos que incluyen, pero no se limitan a esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, trastorno por déficit de atención, trastorno distímico, trastorno depresivo grave, manía, trastorno obsesivo-compulsivo, trastornos por consumo de sustancias psicoactivas, ansiedad, trastorno de angustia, así como trastornos afectivos unipolares y bipolares. Trastornos neuropsiquiátricos y neurodegenerativos adicionales incluyen, por ejemplo, los enumerados en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (*Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders*, DSM) de la Asociación estadounidense de psiquiatría, de la que su versión más actual se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.
- 10 En otro modo de realización, se pueden usar moléculas de toxinas quiméricas recombinantes que comprenden eritropoyetina para la administración terapéutica de toxinas para tratar un trastorno proliferativo, tal como cáncer, o trastorno vírico, tal como panencefalitis esclerosante subaguda.
- 15 La siguiente tabla recoge indicaciones no limitantes ejemplares adicionales, para las diversas afecciones y enfermedades que se pueden tratar por las eritropoyetinas mencionadas anteriormente.

| <b>Célula, tejido u órgano</b> | <b>Disfunción o patología</b>     | <b>Afección o enfermedad</b>                                                                    | <b>Tipo</b>                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Corazón                        | Isquemia                          | Arteriopatía coronaria                                                                          | Aguda, crónica<br>Estable, inestable                                                                                                                                           |
|                                |                                   | Infarto de infarto                                                                              | Síndrome de Dressler                                                                                                                                                           |
|                                |                                   | Angina                                                                                          |                                                                                                                                                                                |
|                                |                                   | Cardiopatía congénita                                                                           | Valvular<br>Miocardiopatía                                                                                                                                                     |
|                                |                                   | Angina de Prinzmetal                                                                            |                                                                                                                                                                                |
|                                |                                   | Rotura cardíaca                                                                                 | Aneurismática<br>Perforación septal                                                                                                                                            |
|                                |                                   | Vasculitis                                                                                      |                                                                                                                                                                                |
|                                | Arritmia                          | Taquicardia,<br>Bradiarritmia<br>Supraventricular,<br>ventricular<br>Anomalías en la conducción | Estable, inestable<br>Nodo sinusal carotídeo hipersensible                                                                                                                     |
|                                |                                   |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                |
|                                | Insuficiencia cardíaca congestiva | Izquierda, derecha, bi-ventricular                                                              | Miocardiopatías, tales como idiopática familiar, infecciosa, metabólica, tesarismosis, deficiencias, trastorno del tejido conjuntivo, infiltración y granulomas, neurovascular |
|                                |                                   | Miocarditis                                                                                     | Autoinmunitario, infeccioso, idiopático                                                                                                                                        |
|                                |                                   | Cardiopatía pulmonar                                                                            |                                                                                                                                                                                |
|                                | Traumatismo cerrado y penetrante  |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                |
|                                | Toxinas                           | Cocaína                                                                                         |                                                                                                                                                                                |
| Vascular                       | Hipertensión                      | Primaria, secundaria                                                                            |                                                                                                                                                                                |
|                                | Enfermedad por descompresión      |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                |
|                                | Hiperplasia fibromuscular         |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                |
|                                | Aneurisma                         | Disecante, roto, en crecimiento                                                                 |                                                                                                                                                                                |
|                                |                                   |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                |
| Pulmones                       | Obstruktiva                       | Asma<br>Bronquitis crónica,<br>Enfisema y obstrucción de las vías aéreas                        |                                                                                                                                                                                |

| <b>Célula, tejido u órgano</b> | <b>Disfunción o patología</b>                                                              | <b>Afección o enfermedad</b>                                             | <b>Tipo</b>                                                                                                                  |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                | Neumopatía isquémica                                                                       | Embolia pulmonar,<br>Trombosis pulmonar,<br>Embolia grasa                |                                                                                                                              |
|                                | Neumopatía ambiental                                                                       |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                | Neumopatía isquémica                                                                       | Embolia pulmonar,<br>Trombosis pulmonar                                  |                                                                                                                              |
|                                | Neumopatía intersticial                                                                    | Fibrosis pulmonar idiopática                                             |                                                                                                                              |
|                                | Congénita                                                                                  | Fibrosis quística                                                        |                                                                                                                              |
|                                | Cardiopatía pulmonar                                                                       |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                | Traumatismo                                                                                |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                | Neumonía y neumonitis                                                                      | Infecciosa, parasitaria,<br>tóxica, traumática,<br>quemadura, aspirativa |                                                                                                                              |
|                                | Sarcoidosis                                                                                |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                |                                                                                            |                                                                          |                                                                                                                              |
| Páncreas                       | Endocrina                                                                                  | Diabetes mellitus,<br>tipo I y II                                        | Insuficiencia de células beta,<br>disfunción, Neuropatía diabética                                                           |
|                                |                                                                                            | Otra insuficiencia celular<br>endocrina del páncreas                     |                                                                                                                              |
|                                | Exocrina                                                                                   | Insuficiencia pancreática<br>exocrina                                    | pancreatitis                                                                                                                 |
|                                |                                                                                            |                                                                          |                                                                                                                              |
| Hueso                          | Osteopenia                                                                                 | Primaria<br>secundaria                                                   | Hipogonadismo<br>inmovilización                                                                                              |
|                                |                                                                                            |                                                                          | Posmenopáusica<br>Senil<br>Hiperparatiroidismo<br>Hipertiroidismo<br>Carencia de calcio, magnesio,<br>fósforo y/o vitamina D |
|                                | Osteomielitis                                                                              |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                | Necrosis avascular                                                                         |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                | Traumatismo                                                                                |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                | Enfermedad de Paget                                                                        |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                |                                                                                            |                                                                          |                                                                                                                              |
| Piel                           | Alopecia                                                                                   | Areata<br>Totalis                                                        | Primaria<br>Secundaria<br>Calvicie masculina                                                                                 |
|                                | Vitiligo                                                                                   | Localizada<br>Generalizada                                               | Primaria<br>Secundaria                                                                                                       |
|                                | Ulceración diabética                                                                       |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                | Vasculopatía periférica                                                                    |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                | Lesiones por quemadura                                                                     |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                |                                                                                            |                                                                          |                                                                                                                              |
| Trastornos<br>autoinmunitarios | Lupus eritematoso,<br>Sjogren,<br>Artritis reumatoide,<br>Glomerulonefritis,<br>Vasculitis |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                | Histiocitosis de Langerhan                                                                 |                                                                          |                                                                                                                              |
|                                |                                                                                            |                                                                          |                                                                                                                              |
| Ojo                            | Neuritis óptica                                                                            |                                                                          |                                                                                                                              |

| <b>Célula, tejido u órgano</b>    | <b>Disfunción o patología</b>                                                                                                                       | <b>Afección o enfermedad</b>                                                                                                | <b>Tipo</b>                                                                                         |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                   | Lesiones cerradas y penetrantes, infecciones, sarcoidosis, enfermedad drepanocítica, desprendimiento de retina, arteritis temporal                  |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   |                                                                                                                                                     |                                                                                                                             |                                                                                                     |
| Trastornos embrionarios y fetales | Asfixia                                                                                                                                             |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Isquemia                                                                                                                                            |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   |                                                                                                                                                     |                                                                                                                             |                                                                                                     |
| SNC                               | Síndrome de fatiga crónica, síndrome hiposmolar y hiperosmolar agudo y crónico, demencia sídica, electrocución                                      |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Encefalitis                                                                                                                                         | Rabia, herpes                                                                                                               |                                                                                                     |
|                                   | Meningitis                                                                                                                                          |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Hematoma subdural                                                                                                                                   |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Tabaquismo                                                                                                                                          |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Drogadicción y abstinencia                                                                                                                          | Cocaína, heroína, crack, marihuana, LSD, PCP, politoxicomanía, éxtasis, opioides, sedantes hipnóticos, anfetaminas, cafeína |                                                                                                     |
|                                   | Trastornos obsesivo-compulsivos                                                                                                                     |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Estenosis del conducto vertebral, Mielitis transversa, Guillian Barré, traumatismo, compresión del nervio raquídeo, compresión tumoral, termoplejía |                                                                                                                             |                                                                                                     |
| ORL                               | Acúfenos, Síndrome de Meunier, Pérdida auditiva                                                                                                     |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Lesión traumática, barotraumatismo                                                                                                                  |                                                                                                                             |                                                                                                     |
| Riñón                             | Insuficiencia renal                                                                                                                                 | Aguda, crónica                                                                                                              | Enfermedad intersticial vascular/isquémica, nefropatía diabética, síndromes nefróticos, infecciones |
|                                   | Púrpura de Schoenlein Henoch                                                                                                                        |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   |                                                                                                                                                     |                                                                                                                             |                                                                                                     |
| Músculo estriado                  | Trastornos autoinmunitarios                                                                                                                         | Miastenia grave, Dermatomiositis, Polimiositis                                                                              |                                                                                                     |
|                                   |                                                                                                                                                     |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Miopatías                                                                                                                                           | Heredada metabólica, endocrina y tóxica                                                                                     |                                                                                                     |
|                                   | Termoplejía                                                                                                                                         |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Lesión por aplastamiento                                                                                                                            |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Rabdomiólisis                                                                                                                                       |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Enfermedad mitocondrial                                                                                                                             |                                                                                                                             |                                                                                                     |
|                                   | Infección                                                                                                                                           | Fascitis necrosante                                                                                                         |                                                                                                     |
|                                   |                                                                                                                                                     |                                                                                                                             |                                                                                                     |
| Disfunción sexual                 | Central y periférica                                                                                                                                | Impotencia derivada de la medicación                                                                                        |                                                                                                     |

| <b>Célula, tejido u órgano</b> | <b>Disfunción o patología</b>         | <b>Afección o enfermedad</b>                                                    | <b>Tipo</b> |
|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------|
|                                |                                       |                                                                                 |             |
| Hígado                         | hepatitis                             | Vírica, bacteriana, parasitaria                                                 |             |
|                                | Enfermedad isquémica                  |                                                                                 |             |
|                                | Cirrosis, esteatosis hepática         |                                                                                 |             |
|                                | Enfermedades infiltrantes/metabólicas |                                                                                 |             |
|                                |                                       |                                                                                 |             |
| Gastrointestinal               | Enteropatía isquémica                 |                                                                                 |             |
|                                | Enteropatía inflamatoria              |                                                                                 |             |
|                                | Enterocolitis necrosante              |                                                                                 |             |
|                                |                                       |                                                                                 |             |
| Trasplante de órganos          | Tratamiento de donante y receptor     |                                                                                 |             |
|                                |                                       |                                                                                 |             |
| Aparato reproductor            | Esterilidad                           | Vascular<br>Autoinmunitaria<br>Anomalías uterinas<br>Trastornos de implantación |             |
|                                |                                       |                                                                                 |             |
| Endocrino                      | Hiper- e hipofunción glandular        |                                                                                 |             |

En consecuencia, la presente invención proporciona en general un tratamiento terapéutico o profiláctico de las consecuencias de traumatismo mecánico o de enfermedades humanas. Es preferente el tratamiento terapéutico o profiláctico para enfermedades, trastornos o afecciones del SNC y/o sistema nervioso periférico. Se proporciona el tratamiento terapéutico o profiláctico para enfermedades, trastornos o afecciones que tienen un componente psiquiátrico. Se proporciona el tratamiento terapéutico o profiláctico para enfermedades, trastornos o afecciones incluyendo, pero sin limitarse a las que tienen un componente oftálmico, cardiovascular, cardiopulmonar, respiratorio, renal, urinario, reproductivo, gastrointestinal, endocrino o metabólico.

En un modo de realización, una composición farmacéutica de este tipo de una eritropoyetina se puede administrar por vía sistémica para proteger o potenciar las células, tejido u órgano objetivo. Dicha administración puede ser por vía parenteral, por vía de inhalación, o por vía transmucosa, por ejemplo, por vía oral, por vía nasal, por vía rectal, por vía vaginal, por vía sublingual, por vía submucosa o por vía transdérmica. Preferentemente, la administración es parenteral, por ejemplo, por medio de inyección intravenosa o intraperitoneal, y también incluyendo, pero no se limita a, administración intraarterial, intramuscular, intradérmica y subcutánea.

Para otras vías de administración, tales como por el uso de un perfundido, inyección en un órgano, u otra administración local, una se puede proporcionar una composición farmacéutica que da como resultado niveles similares de una eritropoyetina como se describe anteriormente. Es preferente un nivel de aproximadamente 15 pM – 30 nM.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un modo de realización específico, el término "farmacéuticamente aceptable" quiere decir aprobado por una agencia reguladora de la Administración federal o de un Estado o enumerado en la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea extranjera generalmente reconocida para su uso en animales, y más en particular, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como soluciones salinas en agua y aceites, incluyendo los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Una solución salina es un vehículo preferente cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones de glicerol y dextrosa acuosas como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Si se desea, la composición también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Se puede formular la composición en forma de supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Los compuestos de la invención se pueden formular como formas neutras o de sal. Las sales

farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debería ser adecuada para el modo de administración.

Se pueden proporcionar composiciones farmacéuticas adaptadas para administración oral como cápsulas o comprimidos; como polvos o gránulos; como soluciones, jarabes o suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos); como espumas o batidos comestibles; o como emulsiones. Los comprimidos o cápsulas de gelatina dura pueden comprender lactosa, almidón o derivados de los mismos, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, ácido esteárico o sales de los mismos. Las cápsulas de gelatina blanda pueden comprender aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos, etc. Las soluciones y jarabes pueden comprender agua, polioles y azúcares.

Un agente activo destinado para administración oral se puede recubrir con o mezclar con un material que retrasa la desintegración y/o absorción del agente activo en el tubo gastrointestinal (se puede usar, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo). Por tanto, se puede lograr la liberación sostenida de un agente activo durante muchas horas y, en caso necesario, se puede proteger el agente activo de que se degrade dentro del estómago. Se pueden formar composiciones farmacéuticas para administración oral para facilitar la liberación de un agente activo en una ubicación gastrointestinal particular debido a condiciones enzimáticas o de pH específicas.

Se pueden proporcionar composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Se pueden proporcionar composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizadores, aerosoles o aceites. Para administración tópica en la piel, boca, ojo u otros tejidos externos se usa preferentemente una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, se puede emplear el ingrediente activo con una base de pomada parafínica o bien miscible con agua. De forma alternativa, se puede formular el ingrediente activo en una crema con una base de aceite en agua o una base de agua en aceite. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en el ojo incluyen colirios. En estas composiciones, se puede disolver o suspender el ingrediente activo en un vehículo adecuado, por ejemplo, en un disolvente acuoso. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, pastillas y enjuagues bucales.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración nasal y pulmonar pueden comprender vehículos sólidos tales como polvos (preferentemente que tengan un tamaño de partícula en el intervalo de 20 a 500 micrómetros). Se pueden administrar polvos de la manera en la que se toma el rapé, es decir, por inhalación rápida a través de la nariz desde un recipiente de polvo mantenido próximo a la nariz. De forma alternativa, las composiciones adoptadas para administración nasal pueden comprender vehículos líquidos, por ejemplo, pulverizadores nasales o gotas nasales. De forma alternativa, se puede llevar a cabo la inhalación directamente en los pulmones por inhalación de forma profunda o instalación a través de una boquilla en la orofaringe. Estas composiciones pueden comprender soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Se pueden suministrar composiciones para su administración por inhalación en dispositivos especialmente adaptados incluyendo, pero sin limitarse a, aerosoles presurizados, nebulizadores o insufladores, que pueden estar contruidos para proporcionar dosificaciones predeterminadas del ingrediente activo. En un modo de realización preferente, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran en la cavidad nasal directamente o en los pulmones a través de la cavidad nasal u orofaringe.

Se pueden proporcionar composiciones farmacéuticas adaptadas para administración rectal como supositorios o enemas. Se pueden proporcionar composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente isotónicas con la sangre de un receptor destinado. Otros componentes que pueden estar presentes en dichas composiciones de incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Se pueden presentar las composiciones adaptadas para administración parenteral en recipientes de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en una condición criodesecada (liofilizada) que requiere sólo la adición de un vehículo líquido estéril, por ejemplo, solución salina estéril para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones de inyección sin preparación previa a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. En un modo de realización, se puede proporcionar un autoinyector que comprende una solución inyectable de una eritropoyetina para uso de urgencia por ambulancias, salas de urgencias, y situaciones del campo de batalla, e incluso para la

autoadministración en un entorno doméstico, en particular en el que se pueda producir la posibilidad de amputación traumática, tal como por uso imprudente de un cortacésped. La probabilidad de que las células y tejidos en un pie o dedo amputado sobrevivan después de su reinserción se puede incrementar administrando una eritropoyetina en múltiples sitios en la parte amputada tan pronto como sea viable, incluso antes de la llegada del personal médico al lugar, o la llegada del individuo afectado con el dedo amputado que se trae a la sala de urgencias.

En un modo de realización preferente, se formula la composición de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o bien mezclados juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobre indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por perfusión, se puede administrar con un frasco de perfusión que contiene a o solución salina de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de solución salina estéril de modo que se puedan mezclar los ingredientes antes de su administración.

Los supositorios, en general, contienen el ingrediente activo en el intervalo de un 0,5 % a un 10 % en peso; las formulaciones orales contienen preferentemente de un 10 % a un 95 % de ingrediente activo.

Se puede proporcionar una composición perfundida para su uso en baños de órganos trasplantados, para perfusión *in situ*, o para administración a la vasculatura de un donante de órganos antes de la extracción del órgano. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender niveles de una eritropoyetina o una forma de una eritropoyetina no adecuada para administración local o sistémica, aguda o crónica, a un individuo, pero servirán las funciones destinadas en el presente documento en un cadáver, baño de órgano, perfundido de órgano, o perfundido *in situ* antes de retirar o reducir los niveles de la eritropoyetina contenida en el mismo antes de exponer o devolver el órgano o tejido tratado a circulación regular. La eritropoyetina para este aspecto de la invención puede ser cualquier eritropoyetina, tal como formas naturales tales como eritropoyetina humana, o cualquiera de las eritropoyetinas descritas anteriormente en el presente documento, tales como asialoeritropoyetina y fenilglixaleritropoyetinas, como ejemplos no limitantes.

La memoria descriptiva también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente, asociado a dicho(s) recipiente(s) puede estar un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, aviso que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para su administración a seres humanos.

En otro modo de realización, por ejemplo, se puede administrar eritropoyetina en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, se puede administrar el polipéptido usando perfusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En un modo de realización, se puede usar una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald *et al.*, 1980, Surgery 88:507; Saudek *et al.*, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otro modo de realización, se puede administrar el compuesto en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); documento WO 91/04014; patente de los EE. UU. n.º 4,704,355; Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; véase en general *ibid.*). En otro modo de realización, se pueden usar materiales poliméricos [véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Press: Boca Raton, Florida, 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley: New York (1984); Ranger y Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61, 1953; véase además Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105].

Aún en otro modo de realización, se puede disponer un sistema de liberación controlada en proximidad del objetivo terapéutico, es decir, las células, tejido u órgano objetivo, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, p. 115-138 en *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, *supra*, 1984). Se analizan otros sistemas de liberación controlada en la revisión por Langer (1990, *Science* 249:1527-1533).

En otro modo de realización, se puede administrar la eritropoyetina, formulada de forma apropiada, por administración nasal, oral, rectal, vaginal o sublingual.

En un modo de realización específico, puede ser deseable administrar las composiciones de eritropoyetina de la invención por vía local al área que necesita tratamiento; esto se puede lograr por, por ejemplo, y no a modo de limitación, perfusión local durante intervención quirúrgica, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de una intervención quirúrgica, por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como las membranas silásticas, o fibras.

La selección de la dosis eficaz preferente se determinará por un experto en la técnica en base a la consideración de diversos factores que serán conocidos para un experto en la técnica. Dichos factores incluyen la forma particular de eritropoyetina, y sus parámetros farmacocinéticos tales como biodisponibilidad, metabolismo, semivida, etc., que se habrán establecido durante los procedimientos de desarrollo habituales empleados típicamente en la obtención de la aprobación reguladora para un compuesto farmacéutico. Otros factores para la consideración de la dosis incluyen la afección o enfermedad que se va a tratar o el beneficio que se va a lograr en un individuo normal, la masa corporal del paciente, la vía de administración, ya sea administración aguda o crónica, las medicaciones concomitantes, y otros factores bien conocidos que afectan a la eficacia de los agentes farmacéuticos administrados. Por tanto, la dosificación precisa se debe decidir de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente, por ejemplo, dependiendo de la afección y el estado inmunitario del paciente individual, de acuerdo con técnicas clínicas estándar.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una perfundido o solución de perfusión para perfusión y almacenamiento de órganos para trasplante, incluyendo la solución de perfusión una cantidad de una eritropoyetina eficaz para proteger las células sensibles a eritropoyetina y células, tejidos u órganos asociados. Trasplante incluye pero no se limita a xenotrasplante, en el que se extrae un órgano (incluyendo células, tejido u otra parte corporal) de un donante y se trasplanta en un receptor diferente; y autotrasplante, en el que se toma el órgano de una parte de un cuerpo y se reemplaza en otra, incluyendo procedimientos quirúrgicos de banco, en los que se puede retirar un órgano, y mientras *ex vivo*, se resecciona, se repara o se manipula de otro modo, tal como para retirada tumoral, y a continuación se devuelve a la ubicación original. En un modo de realización, la solución de perfusión es la solución de la Universidad de Wisconsin (UW) (patente de los EE. UU. N.º 4.798.824) que contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 U/ml de eritropoyetina, hidroxietilalmidón al 5 % (que tiene un peso molecular de desde aproximadamente 200.000 a aproximadamente 300.000 y está sustancialmente libre de etilenglicol, etilenclorohidrina, cloruro de sodio y acetona);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM; glutatión 3 mM; adenosina 5 mM; glucosa 10 mM; tampón HEPES 10 mM; gluconato de magnesio 5 mM;  $\text{CaCl}_2$  1,5 mM; gluconato de sodio 105 mM; 200.000 unidades de penicilina; 40 unidades de insulina; 16 mg de dexametasona; 12 mg de rojo de fenol; y tiene un pH de 7,4-7,5 y una osmolalidad de aproximadamente 320 mOSm/l. Se usa la solución para mantener riñones y páncreas procedentes de cadáver antes del trasplante. Usando la solución, se puede extender la conservación más allá del límite de 30 horas recomendado para la conservación de riñones procedentes de cadáver. Este perfundido particular es meramente ilustrativo de varias de dichas soluciones que se pueden adaptar para el presente uso por inclusión de una cantidad eficaz de una eritropoyetina. En otro modo de realización, la solución de perfundido contiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 U/ml de eritropoyetina, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 U/ml de eritropoyetina.

Aunque el receptor preferente de una eritropoyetina para los propósitos en todo el presente documento es un ser humano, los procedimientos en el presente documento se aplican igualmente a otros mamíferos, en particular animales domésticos, ganado, animales de compañía y de zoológico. Sin embargo, la invención no es tan limitante y los beneficios se pueden aplicar a cualquier mamífero.

En otros aspectos de la invención *ex vivo*, se puede usar cualquier eritropoyetina descrita anteriormente, combinaciones de las mismas.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos y composiciones para potenciar la viabilidad de células, tejidos u órganos que no se aíslan de la vasculatura por una barrera de células endoteliales exponiendo las células, tejidos u órganos directamente a una composición farmacéutica que comprende una eritropoyetina, o administrando o poniendo en contacto una composición farmacéutica que contiene eritropoyetina a la vasculatura del tejido u órgano. La potenciación de la actividad de las células sensibles a eritropoyetina en el tejido u órgano tratado es responsable de los efectos positivos ejercidos.

Como se describe anteriormente, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las moléculas de eritropoyetina se pueden transportar desde la superficie luminal a la superficie de la membrana basal de células endoteliales de los capilares de órganos con uniones ocluyentes de células endoteliales, incluyendo, por ejemplo, el cerebro, retina, y testículos. Por tanto, las células sensibles a eritropoyetina a través de la barrera son objetivos susceptibles para los efectos beneficiosos de eritropoyetina, y otros tipos de células o tejidos u órganos que contienen y dependen en todo o en parte, de las células sensibles a eritropoyetina por eso son objetivos para los procedimientos de la invención. Aunque sin desear quedar ligados a ninguna teoría en particular, después de la transición de eritropoyetina, la eritropoyetina puede interactuar con un receptor de eritropoyetina en una célula sensible a eritropoyetina, por ejemplo, célula neuronal, retiniana, de músculo, corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino delgado, corteza suprarrenal, médula suprarrenal, endotelial capilar, testículos, ovario, o endometrial, y la unión a receptor puede iniciar una cascada de transducción de señales dando como resultado la activación de un programa de expresión génica en la célula o tejido sensible a eritropoyetina, dando como resultado la protección de la célula o tejido, u órgano, del daño, tal como por toxinas, agentes quimioterápicos, radioterapia, hipoxia, etc. Por tanto, los procedimientos para proteger el tejido que contiene células sensibles a eritropoyetina de lesión o estrés hipóxico, y potenciar la función de dicho tejido se describen en detalle a continuación en el presente documento.

En la práctica de un modo de realización de la invención, un paciente mamífero está sometido a quimioterapia sistémica para tratamiento del cáncer, incluyendo radioterapia, que normalmente tiene efectos adversos tales como daño nervioso, pulmonar, cardíaco, ovárico o testicular. La administración de una composición farmacéutica que comprende una eritropoyetina como se describe anteriormente se realiza antes de y durante la quimioterapia y/o radioterapia, para proteger los tejidos y órganos neuronales del daño por el agente quimioterápico, tal como para proteger los testículos. El tratamiento se puede continuar hasta que los niveles circulantes del agente quimioterápico hayan quedado por debajo de un nivel de daño potencial al cuerpo del mamífero.

En la práctica de otro modo de realización de la invención, se planea extraer varios órganos de un víctima de un accidente de automóvil para su trasplante a varios receptores, y de los que algunos requieren un transporte a una distancia y periodo de tiempo prolongados. Antes de la extracción de los órganos, se perfunde a la víctima con una composición farmacéutica que comprende una eritropoyetina como se describe en el presente documento. Se perfundieron los órganos extraídos para su envío con un perfundido que contenía eritropoyetina como se describe en el presente documento, y se almacenaron en un baño que comprendía eritropoyetina. Se perfundieron de forma continua determinados órganos con un dispositivo de perfusión pulsátil, utilizando un perfundido que contenía una eritropoyetina de acuerdo con la presente invención. Se produjo un deterioro mínimo de la función de los órganos durante el transporte y tras el implante y la revascularización de los órganos *in situ*.

En otro modo de realización de la invención, un procedimiento quirúrgico para reparar una válvula cardíaca requirió cardioplejía temporal y oclusión arterial. Antes de la intervención quirúrgica, se perfundió al paciente con 500 U de eritropoyetina por kg de peso corporal. Dicho tratamiento evitó el daño celular isquémico hipóxico, en particular después de la revascularización.

En otro modo de realización de la invención, en cualquier procedimiento quirúrgico, tal como en intervención con circulación extracorporea, se puede usar una eritropoyetina natural o cualquier eritropoyetina de la invención. En un modo de realización, la administración de una composición farmacéutica que comprende una eritropoyetina como se describe anteriormente se realiza antes de, durante, y/o después del procedimiento de derivación, para proteger la función del tejido neuronal cerebro, corazón, y otros órganos.

En los ejemplos anteriores en los que se usa una eritropoyetina de la invención, a saber dicha eritropoyetina modificada, para aplicaciones *ex vivo*, o para tratar células sensibles a eritropoyetina tales como tejido neuronal, la invención proporciona una composición farmacéutica en forma de unidad de dosificación adaptada para la protección o potenciación de células, tejidos u órganos sensibles a eritropoyetina alejados de la vasculatura que comprenden, por unidad de dosificación, una cantidad no tóxica eficaz dentro del intervalo de aproximadamente 50.000 a 500.000 Unidades, de 60.000 a 500.000 Unidades, de 70.000 a 500.000 Unidades, de 80.000 a 500.000 Unidades, de 90.000 a 500.000 Unidades, de 100.000 a 500.000 Unidades, de 150.000 a 500.000 Unidades, de 200.000 a 500.000 Unidades, de 250.000 a 500.000 Unidades, de 300.000 a 500.000 Unidades, de 350.000 a 500.000 Unidades, de 400.000 a 500.000 Unidades, o de 450.000 a 500.000 Unidades de dicha eritropoyetina, vehículo farmacéuticamente aceptable. En un modo de realización preferente, la cantidad no tóxica eficaz de eritropoyetina está dentro del intervalo de aproximadamente 50.000 a 500.000 Unidades. La eritropoyetina en la composición mencionada anteriormente no es eritropoyética.

En otro aspecto de la invención, se descubrió que la administración de eritropoyetina restablece la función cognitiva en animales que han sufrido traumatismo craneoencefálico. Después de un retraso de 5 días o 30 días, la administración de eritropoyetina todavía podía restablecer la función en comparación con animales del grupo quirúrgico de referencia, lo que indica la capacidad de una eritropoyetina para regenerar o restablecer la actividad cerebral. Por tanto, la invención también se refiere al uso de una eritropoyetina para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de traumatismo craneoencefálico y otras disfunciones cognitivas, incluyendo el tratamiento bien después de la lesión (por ejemplo, tres días, cinco días, una semana, un mes, o más). La invención también se refiere a un procedimiento para el tratamiento de la disfunción cognitiva después de lesión administrando una cantidad eficaz de una eritropoyetina. Se puede usar cualquier eritropoyetina como se describe en el presente documento para este aspecto de la invención.

Además, este aspecto restablecedor de la invención se refiere al uso de cualquiera de las eritropoyetinas en el presente documento para la preparación de una composición farmacéutica para el restablecimiento de disfunción neuronal celular, de tejido u órgano, en el que el tratamiento se inicia después de, y bien después de, la lesión inicial responsable de la disfunción. Además, el tratamiento usando eritropoyetinas de la invención puede abarcar la evolución de la enfermedad o afección durante la fase aguda, así como una fase crónica.

La eritropoyetina útil para los propósitos en el presente documento es no eritropoyética, es decir, puede ejercer las actividades descritas en el presente documento, pero sin provocar un incremento en la concentración de hemoglobina o hematocrito. Dicha forma no eritropoyética de eritropoyetina es preferente en casos en los que los procedimientos de la presente invención están destinados a proporcionarse de forma crónica. En otro modo de realización, se administra una eritropoyetina a una dosis mayor que la necesaria para como estimular de forma máximo la eritropoyesis. Como se destaca anteriormente, una eritropoyetina de la invención no tiene necesariamente actividad eritropoyética, y por lo tanto, las dosificaciones anteriores expresadas en unidades

hematopoyéticas es meramente ejemplar para eritropoyetinas que sean eritropoyéticas; anteriormente en el presente documento se proporcionan equivalentes para dosificaciones que son aplicables para cualquier eritropoyetina.

- 5 Un aspecto de referencia se refiere además a un procedimiento para facilitar el transporte de una molécula a través de una barrera de células endoteliales en un mamífero administrando una composición que comprende una molécula particular en asociación con una eritropoyetina como se describe anteriormente en el presente documento. Como se describe anteriormente, las uniones ocluyentes entre las células endoteliales en determinados órganos en el cuerpo crean una barrera para la entrada de determinadas moléculas. Para el tratamiento de diversas afecciones dentro del órgano con barrera, se desea un medio para facilitar el paso de agentes farmacéuticos. Una eritropoyetina de la memoria descriptiva es útil como vehículo para administrar otras moléculas a través de la barrera hematoencefálica y otras barreras similares. Se prepara una composición que comprende una molécula que desea atravesar la barrera con eritropoyetina, y la administración periférica de la composición da como resultado la transcitosi de la composición a través de la barrera. La asociación entre la molécula que se va a transportar a través de la barrera y la eritropoyetina puede ser un enlace covalente lábil, caso en el que se libera la molécula de la asociación con la eritropoyetina después de atravesar la barrera. Si la actividad farmacológica deseada de la molécula se mantiene o no se ve afectada por la asociación con eritropoyetina, se puede administrar un complejo de este tipo.
- 10 20 El experto en la técnica será consciente de varios medios para asociar moléculas con una eritropoyetina de la invención y los otros agentes descritos anteriormente, por enlace covalente, no covalente, y otros medios; además, se puede determinar fácilmente la evaluación de la eficacia de la composición en un sistema experimental. Se puede lograr la asociación de moléculas con una eritropoyetina por varios medios, incluyendo unión covalente, lábil, reticulación, etc. Se pueden emplear interacciones de biotina/avidina. Como se menciona anteriormente, se puede preparar una molécula híbrida por medios recombinantes o sintéticos, por ejemplo, que incluye tanto el dominio de la molécula con la actividad farmacológica deseada como el dominio responsable de la modulación de la actividad del receptor de eritropoyetina.
- 25 30 Se puede conjugar una molécula a una eritropoyetina a través de una molécula polifuncional, es decir, un reticulador polifuncional. Como se usa en el presente documento, el término "molécula polifuncional" abarca moléculas que tienen un grupo funcional que puede reaccionar más de una vez sucesivamente, tal como formaldehído, así como moléculas con más de un grupo reactivo. Como se usa en el presente documento, el término "grupo reactivo" se refiere a un grupo funcional en el reticulador que reacciona con un grupo funcional en una molécula (por ejemplo, péptido, proteína, hidrato de carbono, ácido nucleico, en particular una hormona, antibiótico, o agente antineoplásico que se va a administrar a través de una barrera de células endoteliales) para formar un enlace covalente, entre el reticulador y esa molécula. El término "grupo funcional" mantiene su significado estándar en química orgánica. Las moléculas polifuncionales que se pueden usar son preferentemente enlazadores biocompatibles, es decir, son no cancerígenas, no tóxicas y sustancialmente no inmunógenas *in vivo*. Los reticuladores polifuncionales tales como los conocidos en la técnica y descritos en el presente documento se pueden someter a prueba fácilmente en modelos animales para determinar su biocompatibilidad. La molécula polifuncional es preferentemente bifuncional. Como se usa en el presente documento, el término "molécula bifuncional" se refiere a una molécula con dos grupos reactivos. La molécula bifuncional puede ser heterobifuncional o homobifuncional. Un reticulador heterobifuncional permite la conjugación vectorial. Es particularmente preferente que la molécula polifuncional sea suficientemente soluble en agua para que se produzcan las reacciones de reticulación en soluciones acuosas tales como en soluciones acuosas tamponadas a pH 6 a 8, y para que el conjugado resultante se mantenga soluble en agua para una biodistribución más eficaz. Típicamente, la molécula polifuncional se une covalentemente con un grupo funcional amino o sulfhidrilo. Sin embargo, las moléculas polifuncionales reactivas con otros grupos funcionales, tales como ácidos carboxílicos o grupos hidroxilo, se contemplan en la presente invención.
- 35 40 45 50 Las moléculas homobifuncionales tienen al menos dos grupos funcionales reactivos, que son el mismo. Los grupos funcionales reactivos en una molécula homobifuncional incluyen, por ejemplo, grupos aldehído y grupos éster activos. Las moléculas homobifuncionales que tienen grupos aldehído incluyen, por ejemplo, glutaraldehído y subaraldehído. El uso de glutaraldehído como agente de reticulación se divulga por Posnansky *et al.*, Science 223.1304-1306 (1984). Las moléculas homobifuncionales que tienen al menos dos unidades éster activas incluyen ésteres de ácidos carboxílicos y N-hidroxisuccinimida. Algunos ejemplos de dichos ésteres de N-succinimidilo incluyen suberato de disuccinimidilo y propionato de ditio-bis-(succinimidilo), y su ácido bis-sulfónico y sales de bis-sulfonato solubles tales como sus sales de sodio y potasio. Estos reactivos homobifuncionales están disponibles de Pierce, Rockford, Illinois.
- 55 60 Las moléculas heterobifuncionales tienen al menos dos grupos reactivos diferentes. Los grupos reactivos reaccionan con diferentes grupos funcionales, por ejemplo, presentes en la eritropoyetina y la molécula. Estos dos grupos funcionales diferentes que reaccionan con el grupo reactivo en el reticulador heterobifuncional son normalmente un grupo amino, por ejemplo, el grupo amino épsilon de lisina; un grupo sulfhidrilo, por ejemplo, el grupo tiol de cisteína; un ácido carboxílico, por ejemplo, el carboxilato en ácido aspártico; o un grupo hidroxilo, por ejemplo, el grupo hidroxilo en serina.
- 65

Obviamente, las diversas moléculas de eritropoyetina de la invención puede que no tengan grupos reactivos adecuados disponibles para su uso con determinados agentes de reticulación; sin embargo, un experto en la técnica será muy consciente de la elección de los agentes de reticulación en base a los grupos disponibles para reticulación en una eritropoyetina de la invención.

Cuando un grupo reactivo de una molécula heterobifuncional forma un enlace covalente con un grupo amino, el enlace covalente será normalmente un enlace amido o imido. El grupo reactivo que forma un enlace covalente con un grupo amino puede ser, por ejemplo, un grupo carboxilato activado, un grupo halocarbonilo, o un grupo éster. El grupo halocarbonilo preferente es un grupo clorocarbonilo. Los grupos éster son preferentemente grupos éster reactivos tales como, por ejemplo, un grupo éster N-hidroxisuccinimídico.

El otro grupo funcional típicamente es un grupo tiol, un grupo que se puede convertir en un grupo tiol, o un grupo que forma un enlace covalente con un grupo tiol. El enlace covalente será normalmente un enlace tioéter o un disulfuro. El grupo reactivo que forma un enlace covalente con un grupo tiol puede ser, por ejemplo, un doble enlace que reacciona con grupos tiol o un disulfuro activado. Un grupo reactivo que contiene un doble enlace que puede reaccionar con un grupo tiol es el grupo maleimido, aunque también son posibles otros, tales como acrilonitrilo. Un grupo disulfuro reactivo puede ser, por ejemplo, un grupo 2-piridilditio o un grupo ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico). Algunos ejemplos de reactivos heterobifuncionales que contienen enlaces disulfuro reactivos incluyen 3-(2-piridil-ditio)propionato de N-succinimido (Carlsson, *et al.*, 1978, *Biochem J.*, 173:723-737), S-4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metilbenciltiosulfato de sodio, y 4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-(2-piridilditio)tolueno. Es preferente 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimido. Algunos ejemplos de reactivos heterobifuncionales que comprenden grupos reactivos que tienen un doble enlace que reacciona con un grupo tiol incluyen 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimido y m-maleimidobenzoato de succinimido.

Otras moléculas heterobifuncionales incluyen 3-(maleimido)propionato de succinimido, 4-(p-maleimido-fenil)butirato de sulfosuccinimido, 4-(N-maleimidometil-ciclohexano)-1-carboxilato de sulfosuccinimido, éster maleimidobenzoil-N-hidroxi-succinimídico. Es preferente la sal de sulfonato de sodio de m-maleimidobenzoato de succinimido. Muchos de los reactivos heterobifuncionales mencionados anteriormente y sus sales de sulfonato están disponibles de Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois USA.

La necesidad de que el conjugado descrito anteriormente sea reversible o lábil se puede determinar fácilmente por el experto en la técnica. Se puede someter a prueba un conjugado *in vitro* para determinar tanto la eritropoyetina como la actividad farmacológica deseable. Si el conjugado mantiene ambas propiedades, a continuación se puede someter a prueba su idoneidad *in vivo*. Si la molécula de conjugado requiere la separación de la eritropoyetina para determinar la actividad, será preferente un enlace lábil o asociación reversible con eritropoyetina. Las características de labilidad también se pueden someter a prueba usando procedimientos *in vitro* estándar antes de la prueba *in vivo*.

Se puede obtener información adicional sobre cómo fabricar y usar estos así como otros reactivos polifuncionales de las siguientes publicaciones u otras disponibles en la técnica:

Carlsson, J. et al., 1978, *Biochem. J.* 173:723-737.

Cumber, J.A. et al., 1985, *Methods in Enzymology* 112:207-224.

Jue, R. et al., 1978, *Biochem* 17:5399-5405.

Sun, T.T. et al., 1974, *Biochem.* 13:2334-2340.

Blattler, W.A. et al., 1985, *Biochem.* 24:1517-152.

Liu, F.T. et al., 1979, *Biochem.* 18:690-697.

Youle, R.J. and Neville, D.M. Jr., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:5483-5486.

Lerner, R.A. et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3403-3407.

Jung, S.M. and Moroi, M., 1983, *Biochem. Biophys. Acta* 761:162.

Caulfield, M.P. et al., 1984, *Biochem.* 81:7772-7776.

Staros, J.V., 1982, *Biochem.* 21:3950-3955.

Yoshitake, S. et al., 1979, *Eur. J. Biochem.* 101:395-399.

Yoshitake, S. et al., 1982, *J. Biochem.* 92:1413-1424.

Pilch, P.F. and Czech, M.P., 1979, J. Biol. Chem. 254:3375-3381.

Novick, D. et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:8483-8487.

5 Lomant, A.J. and Fairbanks, G., 1976, J. Mol. Biol. 104:243-261.

Hamada, H. and Tsuruo, T., 1987, Anal. Biochem. 160:483-488.

10 Hashida, S. et al., 1984, J. Applied Biochem. 6:56-63.

Adicionalmente, los procedimientos de reticulación se revisan por Means y Feeney, 1990, Bioconjugate Chem. 1:2-12.

15 Las barreras que se atraviesan por los procedimientos descritos anteriormente y las composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a la barrera hematoencefálica, la barrera hematoocular, la barrera hematotesticular, la barrera hematoovárica, y la barrera hematouterina.

20 Las moléculas candidatas para el transporte a través de una barrera de células endoteliales incluyen, por ejemplo, hormonas tales como hormona del crecimiento, factores neurotróficos, antibióticos o antifúngicos tales como los que se excluyen normalmente del cerebro y otros órganos con barrera, radiofármacos peptídicos, fármacos antisentido, anticuerpos frente a agentes biológicamente activos, productos farmacéuticos, y agentes antineoplásicos. Los ejemplos no limitantes de dichas moléculas incluyen hormona del crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ), factor de crecimiento transformante  $\beta 2$  (TGF $\beta 2$ ), factor de crecimiento transformante  $\beta 3$  (TGF $\beta 3$ ), interleucina 1, interleucina 2, interleucina 3, e interleucina 6, AZT, anticuerpos frente al factor de necrosis tumoral, y agentes inmunosupresores tales como ciclosporina.

30 La presente memoria descriptiva también se refiere a una composición que comprende una molécula que se va a transportar por medio de transcitos a través de una barrera de unión ocluyente de células endoteliales y una eritropoyetina como se describe anteriormente. La memoria descriptiva se refiere además al uso de un conjugado entre una molécula y una eritropoyetina como se describe anteriormente para la preparación de una composición farmacéutica para la administración de la molécula a través de una barrera como se describe anteriormente.

35 La presente invención se puede entender mejor por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se proporcionan como ejemplares de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más plenamente los modos de realización preferentes de la invención. De ningún modo se deben interpretar, sin embargo, como limitativos del amplio alcance de la invención.

#### 40 Ejemplo 1

##### LA ERITROPOYETINA ATRAVIESA LA BARRERA OCLUYENTE HEMATOENCEFÁLICA

45 Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley macho adultas y se les administró eritropoyetina humana recombinante por vía intraperitoneal. Se muestreó el líquido cefalorraquídeo desde la cisterna magna a intervalos de 30 minutos hasta 4 h y se determinó la concentración de eritropoyetina usando un inmunoensayo ligado a enzimas sensible y específico. Como se ilustra en la **figura 1**, la concentración de eritropoyetina de referencia en el LCR es de 8 mU/ml. Después de un retraso de varias horas, los niveles de eritropoyetina medidos en el LCR comienzan a aumentar y a las 2,5 horas y después son significativamente diferentes de la concentración de referencia en el nivel  $p < 0,01$ . El nivel máximo de aproximadamente 100 mU/ml está dentro del intervalo que se sabe que ejerce efectos protectores *in vitro* (0,1 a 100 mU/ml). El tiempo para el máximo se produce aproximadamente a 3,5 h, que se retrasa significativamente de los niveles séricos máximos (menos de 1 h). Los resultados de este experimento ilustran que se pueden lograr niveles significativos de eritropoyetina a través de una unión celular ocluyente por administración parenteral intravenosa rápida de eritropoyetina a concentraciones apropiadas.

#### 55 Ejemplo 2

##### MANTENIMIENTO DE LA FUNCIÓN EN EL CORAZÓN PREPARADO PARA TRASPLANTE

60 A ratas macho Wistar que pesas de 300 a 330 g se les administra eritropoyetina (5000 U/kg de peso corporal) o vehículo 24 h antes de la extirpación del corazón para estudios *ex vivo*, realizado de acuerdo con el protocolo de Delcayre *et al.*, 1992, *Amer. J. Physiol.* **263**:H1537-45. Se sacrificaron los animales con pentobarbital (0,3 ml), y se heparinizaron por vía intravenosa (0,2 ml). Se dejó que se equilibraran los corazones durante 15 min. A continuación se infló el globo ventricular izquierdo hasta un volumen que da una presión telediastólica de 8 mm Hg. Se construye una curva de presión-volumen ventricular izquierda por insuflación creciente del volumen del globo con alícuotas de 0,02 ml. Se define el volumen cero como el punto en el que la presión telediastólica ventricular izquierda es cero. Al finalizar la curva de presión-volumen, se desinfla el globo ventricular izquierdo para fijar la presión telediastólica de

nuevo a 8 mmHg y se sigue con el periodo de control durante 15 min, después de comprobar el flujo coronario. A continuación, se para el corazón con 50 ml de Celsior + molécula para dejarlo a 4 °C bajo una presión de 60 cm de H<sub>2</sub>O. A continuación, se extirpa el corazón y se almacena 5 horas a 4 °C en un recipiente de plástico lleno con la misma solución y rodeado con hielo picado.

Al finalizar el almacenamiento, se transfiere el corazón a un aparato Langendorff. Se reinserta el catéter con globo en el ventrículo izquierdo y se vuelve a inflar hasta el mismo volumen que durante el periodo preisquémico. Se revasculariza el corazón durante al menos 2 horas a 37 °C. Se ajusta la presión de revascularización a 50 cm de H<sub>2</sub>O durante 15 min de reflujo y a continuación se vuelve a 100 cm H<sub>2</sub>O durante las siguientes 2 horas. Se restablece la estimulación eléctrica (320 latidos por minuto). Se toman medidas isovolumétricas de índices contráctiles y presión diastólica por triplicado a 25, 45, 60, 120 min de la revascularización. En este punto, se realizan curvas de presión-volumen y se recoge el efluente coronario durante los 45 min de revascularización para medir la pérdida de creatina-cinasa. Se comparan los dos grupos de tratamiento usando una prueba de la t para datos independientes, y se usa una regresión lineal usando los datos de presión telediastólica para diseñar las curvas de cumplimiento. Como se muestra en la figura 2, se produce una mejora significativa de la presión ventricular izquierda desarrollada después del tratamiento con eritropoyetina, así como una mejora en la curva de volumen-presión, disminución de la presión ventricular diastólica izquierda y disminución de la pérdida de creatina-cinasa.

### Ejemplo 3

#### LA ERITROPOYETINA PROTEGE EL MIOCARDIO DE LA LESIÓN ISQUÉMICA.

Se anestesia a las ratas macho adultas a las que se les administró eritropoyetina humana recombinante (5000 U/kg de peso corporal) 24 h previamente y se preparan para la oclusión de la arteria coronaria. Se administra una dosis adicional de eritropoyetina al comienzo del procedimiento y a continuación se libera la arteria coronaria principal izquierda ocluida durante 0 minutos. Se administra la misma dosis de eritropoyetina diariamente durante una semana después del tratamiento. A continuación, se estudian los animales para determinar la función cardíaca. Como ilustra la **figura 3**, los animales que recibieron una inyección simulada (solución salina) demostraron un gran incremento en la presión telesistólica izquierda, indicativo de un corazón rígido, dilatado, derivado de un infarto de miocardio. En contraposición, los animales que recibieron eritropoyetina no sufrieron ninguna disminución en la función cardíaca, en comparación con los controles con operación simulada (diferencia significativa en el nivel  $p < 0,01$ ).

### Ejemplo 4

#### MOLÉCULAS DE ERITROPOYETINA

Se puede modificar la eritropoyetina natural para adaptar sus actividades a un tejido o tejidos específicos. Varias estrategias no limitantes que se pueden llevar a cabo para lograr esta especificidad de tejido deseada incluyen modificaciones que retiran o modifican los de glucosilación, de los que la eritropoyetina tiene tres unidos a N y uno unido a O. Se pueden producir dichas variantes de eritropoyetina glucosilada de una serie de maneras. Por ejemplo, se pueden retirar los ácidos siálicos que finalizan el extremo de las cadenas de azúcar mediante sialidasas específicas dependiendo del enlace químico que conecta el ácido siálico a la cadena de azúcar. De forma alternativa, se puede dismantelar la estructura glucosilada de diferentes formas usando otras enzimas que se escinden en enlaces específicos. Para validar estos principios, se desializó la eritropoyetina humana recombinante usando Sialydase A (Prozyme Inc.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se confirmó la modificación química exitosa preparando el producto de reacción en un gel de poliácridamida de SDS y tiñendo las bandas resultantes lo que mostró que la eritropoyetina químicamente modificada poseía un peso molecular aparente de ~ 31 kD como se esperaba, en comparación con la eritropoyetina no modificada que era de ~ 34 kD y midiendo los residuos de ácido siálico restantes por medios químicos que son de  $< 0,1$  mol/mol de eritropoyetina.

En otra modificación en la que se modifican los residuos de aminoácidos de eritropoyetina, se modificaron los residuos de arginina usando fenilglioxal de acuerdo con el protocolo de Takahashi (1977, *J. Biochem.* **81**:395-402) que se llevó a cabo durante periodos de tiempo variables que variaban de 0,5 a 3 h a temperatura ambiente. Se terminó la reacción dializando la mezcla de reacción frente a agua. El uso de dichas formas modificadas de eritropoyetina se abarca totalmente en el presente documento.

Asialoeritropoyetina y fenilglioxaleritropoyetina fueron tan eficaces como la eritropoyetina natural para células neuronales *in vitro* como se muestra en las **figuras 4-6**. Se llevó a cabo la prueba *in vitro* usando células de carcinoma embrionario de tipo neuronal (P19) que sufren apoptosis después de la retirada de suero. Veinticuatro horas antes de la retirada de suero, se añadió a los cultivos 1-1000 ng/ml de eritropoyetina o una eritropoyetina modificada. Al día siguiente se retiró el medio, se lavaron las células con medio que no contenían suero, recién preparado, y se volvió a añadir medio que contenía la sustancia de prueba (sin suero) a los cultivos durante 48 horas adicionales. Para determinar el número de células viables, se realizó un ensayo de reducción de tetrazolio (CellTiter 96; Promega, Inc.). Como ilustra la **figura 4-5**, parece que la asialoeritropoyetina tiene la misma potencia que la

propia eritropoyetina para prevenir la muerte celular. Se sometió a prueba la eritropoyetina modificada con fenilgloxal usando el ensayo celular de P19 de tipo neuronal descrito anteriormente. Como ilustra la **figura 6**, esta eritropoyetina químicamente modificada mantiene totalmente sus efectos neuroprotectores.

Se confirmó la retención de la actividad neuroprotectora *in vivo* usando un modelo de isquemia focal de rata en el que se realiza una lesión reversible en el territorio de la arteria media cerebral como se describe previamente (Brines *et al.*, 2000, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:10526-31). A las ratas Sprague-Dawley macho adultas se les administró asialoeritropoyetina o eritropoyetina (5000 U/kg pc por vía intraperitoneal) o vehículo al inicio de la oclusión arterial. Veinticuatro horas después, se sacrificaron los animales y se extirparon cerebros para el estudio. Se cortaron secciones en serie y se tiñeron con sales de tetrazolio para identificar las regiones vivas del cerebro. Como se muestra en la **figura 7**, la asialoeritropoyetina fue igual de eficaz que la eritropoyetina natural para proporcionar neuroprotección de 1 hora de isquemia. La **figura 8** muestra los resultados de otro modelo de isquemia focal en el que se realizó una respuesta a la dosis comparativa con eritropoyetina y asialoeritropoyetina. A la dosis más baja de 250 U/kg, la asialoeritropoyetina proporcionó protección mientras que la eritropoyetina no modificada no la proporcionó.

### Ejemplo 5

#### MODIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE ERITROPOYETINA Y EFICACIA EN LA PROTECCIÓN NEURONAL

Se han descrito varias moléculas de eritropoyetina mutantes que no se unen al receptor de eritropoyetina de eritrocitos y por tanto no apoyan la eritropoyesis *in vivo* o *in vitro*. No obstante, algunas de estas moléculas imitan las acciones de la propia eritropoyetina en otros tejidos u órganos. Por ejemplo, un 17-mero que contiene la secuencia de aminoácidos de 31-47 de eritropoyetina natural es inactivo para eritropoyesis pero totalmente activo para neuronas *in vitro* (Campana & O'Brien, 1998: *Int. J. Mol. Med.* **1**:235-41).

Se pueden generar eritropoyetinas deseables para los usos descritos en el presente documento por guanidinación, amidinación, trinitrofenilación, acetilación, succinilación, nitración, o modificación de residuos de arginina o grupos carboxilo, entre otros procedimientos como se menciona anteriormente en el presente documento, para producir eritropoyetinas que mantienen sus actividades para órganos y tejidos específicos pero no para otros, tales como eritrocitos. Cuando la eritropoyetina se somete a las reacciones anteriores, se ha descubierto que, en general, la molécula resultante carece de actividad eritropoyética tanto *in vivo* como *in vitro* (por ejemplo, Satake *et al.*; 1990, *Biochim. Biophys. Acta* **1038**:125-9). Algunos ejemplos de la preparación de eritropoyetinas modificadas se describen a continuación.

Biotinilación en grupos amino libres de eritropoyetina. Se disolvieron 0,2 mg de éster N-hidroxisuccinimídico del ácido D-biotinoil-e-aminocaproico (Boehringer Mannheim n.º 1418165) en 100 µl de DMSO. Se combinó esta solución con 400 µl de PBS que contenía aproximadamente 0,2 mg de eritropoyetina en un tubo cubierto de aluminio. Después de la incubación durante 4 horas a temperatura ambiente, se separó la biotina sin reaccionar por filtración en gel en una columna Centricon 10. Como se muestra en la figura 10, esta eritropoyetina biotinilada protege a las células P19 de la retirada de suero.

En "Biotinylated recombinant human erythropoietins: Bioactivity and Utility as a receptor ligand" por Wojchowski *et al.* Blood, 1989, 74(3):952-8, los autores usan tres procedimientos diferentes de biotinilación de eritropoyetina. Se añade biotina a (1) los restos de ácido siálico (2) grupos carboxilato o (3) grupos amino. Los autores usan un ensayo de proliferación de células del bazo de ratón para demostrar que (1) la adición de biotina a los restos de ácido siálico no inactiva la actividad biológica de eritropoyetina (2) la adición de biotina a grupos carboxilato da lugar a una inactivación biológica sustancial de la eritropoyetina (3) la adición de biotina a grupos amino da como resultado una inactivación biológica completa de la eritropoyetina. Estos procedimientos y modificaciones están totalmente abarcados en el presente documento. La **figura 9** muestra la actividad de eritropoyetina biotinilada y asialoeritropoyetina biotiniladas en el ensayo de P19 privadas de suero.

Yodación de eritropoyetina. Procedimiento 1 – Perlas de yodo. Se incubó una perla de yodo (Pierce, Rockford, IL) en 100 µl de PBS (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,15 M, a pH 7,5) que contenía 1 mCi de Na<sup>125</sup>I libre durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 100 µg de eritropoyetina en 100 µl de PBS a la mezcla. Después de un período de incubación de diez minutos a temperatura ambiente, se detuvo la reacción retirando la solución de 200 µl del recipiente de reacción (dejando atrás la perla de yodo). Se retiró el exceso de yodo por filtración en gel en una columna Centricon 10. Como se muestra en la figura 11, la yodo-eritropoyetina producida de esta manera es eficaz para la protección de células P19 de la retirada de suero.

Procedimiento 2 – Cloramina T. Se mezclaron 100 µg de eritropoyetina en 100 µl de PBS a 500 µCi de Na<sup>125</sup>I conjuntamente en un tubo Eppendorf. A continuación, se añadieron 25 µl de cloraminas T (2 mg/ml) y se incubó la mezcla durante 1 minuto a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 50 µl de tampón de detención de cloramina T (2,4 mg/ml de metabisulfito de sodio, 10 mg/ml de tirosina, glicerol al 10 %, xileno al 0,1 % en PBS). A continuación, se separaron la yodotirosina y eritropoyetina yodada por filtración en gel en una columna Centricon 10.

Modificaciones de lisina: Carbamilación: se modificó la eritropoyetina (100 ug) con cianato de potasio como se describe en Plapp *et al.*, ("Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups" 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845).

5 Trinitrofenilación: se modificó la eritropoyetina (100 ug) con 2,4,6-trinitrobencenosulfonato como se describe en Plapp *et al.*, ("Activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease A with modified amino groups" 1971, J. Biol. Chem. 246, 939-845).

10 Acetilación: se incubó la eritropoyetina (100 ug) en tampón fosfato 0,3 M (pH 7,2) que contenía contiene una cantidad igual de anhídrido acético a 0 °C durante 1 hora. Se detuvo la reacción por diálisis frente a agua destilada.

Succinilación: se incubó eritropoyetina (100 ug) en NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M (pH 8,0) con un exceso 15 molar de anhídrido succínico a 15 °C durante 1 hora. Se detuvo la reacción por diálisis frente a agua destilada.

15 Modificaciones de arginina: se modificó la eritropoyetina con 2,3-butanodiona como se describe en Riordan ("Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione" Riordan JF, Biochemistry 1973, 12(20): 3915-3923).

20 Se modificó la eritropoyetina con ciclohexanona como en Patthy *et al.*, ("Identification of functional arginine residues in ribonuclease A and lysozyme" Patthy, L, Smith EL, J. Biol. Chem 1975 250(2): 565-9).

Se modificó la eritropoyetina con fenilgloxal como se describe en Werber *et al.* ("Proceedings: Carboxypeptidase B: modification of functional arginyl residues" Werber, MM, Sokolovsky M Isr J Med Sci 1975 11(11): 1169-70).

25 Modificaciones de tirosina: se incubó la eritropoyetina (100 ug) con tetranitrometano como se describe previamente en Nestler *et al.*, "Stimulation of rat ovarian cell steroidogenesis by high density lipoproteins modified with tetranitromethane" Nestler JE, Chacko GK, Strauss JF 3rd. J Biol Chem 1985 Jun 25;260(12):7316-21).

30 Modificaciones de ácido glutámico (y ácido aspártico): Para modificar los grupos carboxilo, se incubó la eritropoyetina (100 ug) con EDC 0,02 M en glicinamida 1 M a pH 4,5 a temperatura ambiente durante 60 minutos como se describe en Carraway *et al.*, "Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen." Carraway KL, Spoerl P, Koshland DE Jr. J Mol Biol 1969 Mayo 28; 42(1):133-7.

35 Modificaciones de residuos de triptófano: se incubó la eritropoyetina (100 ug) con N-bromosuccinimida 20 uM en tampón fosfato de potasio 20 mM (pH 6,5) a temperatura ambiente como se describe en Ali *et al.*, J Biol Chem. 1995 Mar 3;270(9):4570-4. Se determinó el número de residuos de triptófano oxidados por el procedimiento descrito en Korotchkina (Korotchkina, GS *et al.*, Protein Expr Purif. 1995 Feb; 6(1):79-90).

40 Retirada de grupos amino: Para retirar los grupos amino de eritropoyetina (100 ug) se incubó con en PBS (pH 7,4) que contenía ninhidrina 20 mM (Pierce Chemical, Rockford, IL), a 37 °C durante dos horas como en Kokkini *et al.*, (Kokkini, G., *et al.*, "Modification of hemoglobin by ninhydrin" Blood, Vol. 556, No 4 1980: 701-705). Se llevó a cabo la reducción del aldehído resultante haciendo reaccionar el producto con borohidruro de sodio o hidruro de litio y aluminio. Específicamente, se incubó la eritropoyetina (100 ug) con borohidruro de sodio 0,1 M en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se terminó la reducción enfriando las muestras en hielo durante 10 minutos y dializándolas frente a PBS, tres veces, durante la noche. (Kokkini, G., Blood, Vol. 556, No 1980: 701-705). Se llevó a cabo la reducción usando hidruro de litio y aluminio incubando eritropoyetina (100 ug) con hidruro de litio y aluminio 0,1 M en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se terminó la reducción enfriando las muestras en hielo durante 10 minutos y dializándolas frente a PBS, tres veces, durante la noche.

50 Reducción de disulfuro y estabilización: se incubó la eritropoyetina (100 ug) con DTT 500 mM durante 15 minutos a 60 °C. A continuación, se añadió yodoacetamida 20 mM en agua a la mezcla y se incubó durante 25 minutos, a temperatura ambiente en la oscuridad.

55 Proteólisis limitada: Se puede someter la eritropoyetina a una proteólisis química limitada que se dirige a residuos específicos. Se hizo reaccionar la eritropoyetina con 2-(2-nitrofenilsulfenil)-3-metil-3'-bromoindolenina que escinde específicamente después de los residuos de triptófano en un exceso de 50 veces en ácido acético al 50 % durante 48 horas en oscuridad a temperatura ambiente en tubos tapados bajo presión de nitrógeno. Se terminó la reacción por desactivación con triptófano y desalación.

## 60 Ejemplo 6

### PROTECCIÓN DE ISQUEMIA RETINIANA POR ERITROPOYETINA ADMINISTRADA POR VÍA PERIFÉRICA.

65 Las células retinianas son muy sensibles a isquemia tal que muchas mueren después de 30 minutos estrés isquémico. Además, la isquemia subaguda o crónica subyace al deterioro de la visión que acompaña a una serie de

enfermedades humanas comunes, tales como diabetes mellitus, glaucoma y degeneración macular. En la actualidad no hay tratamientos eficaces para proteger a las células de isquemia. Existe una barrera ocluyente endotelial entre la sangre y la retina que excluye las moléculas más grandes. Para probar si la eritropoyetina administrada por vía periférica protegerá a las células sensibles a isquemia, se utilizó un modelo de glaucoma de rata reversible como se describe por Rosenbaum *et al.* (1997; *Vis. Res.* **37**:3443-51). Específicamente, se inyectó solución salina en la cámara anterior del ojo de ratas macho adultas a una presión por encima de la presión arterial sistémica y se mantuvo durante 60 minutos. Se administró solución salina por vía intraperitoneal a los animales o 5000 U de eritropoyetina/kg de peso corporal 24 horas antes de la inducción de isquemia, y se continuó como dosis diaria durante 3 días adicionales. Se realizó electroretinografía en ratas adaptadas a la oscuridad 1 semana después del tratamiento. La **figura 11-12** ilustra que la administración de eritropoyetina se asocia con una buena conservación del electroretinograma (ERG) (panel D), en contraste con animales tratados solo con solución salina (panel C), para los que permanece muy poca función. La **figura 11** compara las amplitudes de ondas a y b de electroretinograma para los grupos tratados con eritropoyetina y tratados con solución salina, y muestra una protección significativa aportada por la eritropoyetina.

#### EJEMPLO 7

##### EFFECTOS RESTABLECEDORES DE ERITROPOYETINA SOBRE LA DISMINUCIÓN EN LA FUNCIÓN COGNITIVA QUE SURGE DE LESIÓN CEREBRAL

En un estudio para demostrar la capacidad de la eritropoyetina para restablecer una disminución en la función cognitiva en ratones después de recibir traumatismo craneoencefálico, los ratones hembra Balb/c se sometieron a traumatismo craneoencefálico cerrado como se describe en Brines *et al.* PNAS 2000, 97; 10295-10672 y cinco días más tarde, se empezó la administración de eritropoyetina de 5000 U/kg pc por vía intraperitoneal. Doce días después de la lesión, los animales se sometieron a prueba para determinar la función cognitiva en el laberinto de agua de Morris, con cuatro ensayos por día. Aunque los animales tanto tratados como no tratados respondieron mal en la prueba (con tiempos de nado de aproximadamente 80 segundos de 90 segundos posibles), la **figura 13** muestra que los animales tratados con eritropoyetina respondieron mejor (en esta presentación, es mejor un valor negativo). Incluso si la iniciación del tratamiento con eritropoyetina se retrasa hasta 30 días después de un traumatismo (**figura 14**), también se observa el restablecimiento de la función cognitiva.

#### Ejemplo 8

##### MODELO DE CAINATO

En el modelo de neurotoxicidad cainato, se administró asialoeritropoyetina de acuerdo con el protocolo de Brines *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 2000, 97; 10295-10672 a una dosis de 5000 U/kg-pc dada por vía intraperitoneal 24 horas antes de la administración de 25 mg/kg de cainato demuestra ser tan eficaz como eritropoyetina, como se muestra por el tiempo hasta la muerte (**figura 15**).

La invención no se debe limitar en alcance por los modos de realización específicos descritos que están destinados como ilustraciones individuales de aspectos individuales de la invención. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y dibujos adjuntos. Dichas modificaciones están destinadas a estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

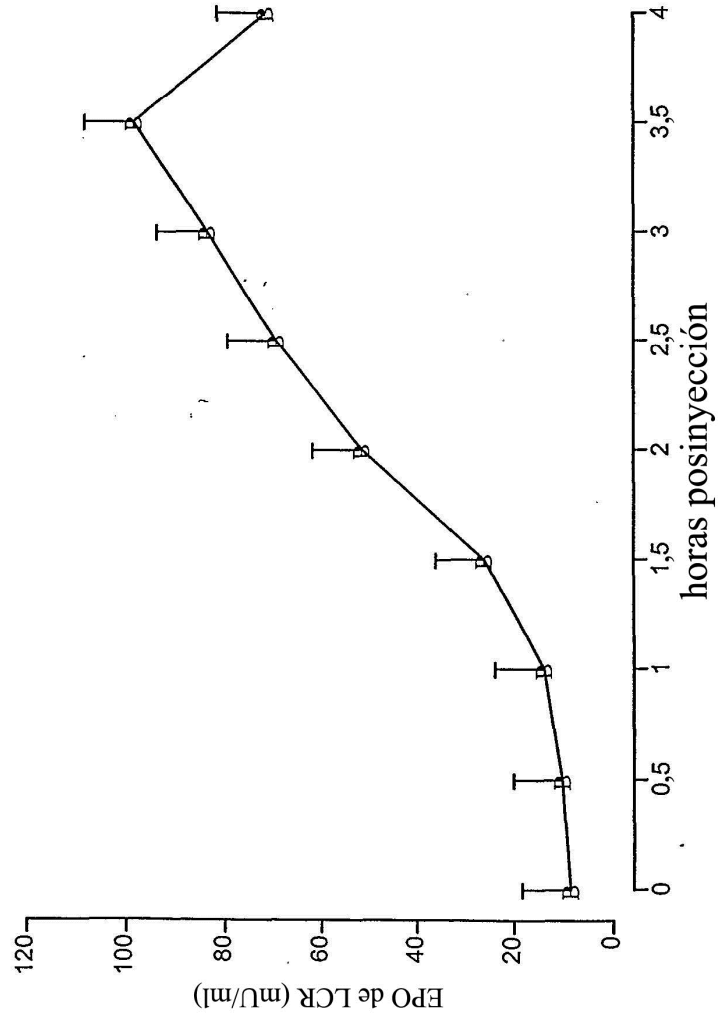
## REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende una eritropoyetina no eritropoyética modificada y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en la protección, potenciación o restablecimiento de la función o viabilidad de un tejido de mamífero neuronal sensible a eritropoyetina que comprende células sensibles a eritropoyetina, en la que dicha eritropoyetina modificada tiene al menos una de las siguientes modificaciones:
  - 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 restos de ácido siálico; o
  - uno o más residuos de lisina carbamilada y/o una carbamilación del grupo amino N-terminal.
2. Composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que se carbamila un residuo de lisina de dicha eritropoyetina modificada.
3. Composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que dicha eritropoyetina modificada es asialoeritropoyetina carbamilada.
4. Composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que dicha eritropoyetina modificada es asialoeritropoyetina biotinilada.
5. Composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que dicha eritropoyetina modificada es asialoeritropoyetina succinilada.
6. Composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que dicha eritropoyetina modificada es asialoeritropoyetina.
7. Composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 6, en la que dicha asialoeritropoyetina es asialoeritropoyetina humana.
8. Composición farmacéutica para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha eritropoyetina es eritropoyetina humana.
9. Composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 1, en la que la eritropoyetina modificada tiene uno o más residuos de lisina carbamilada y/o una carbamilación del grupo amino N-terminal y en la que dicha eritropoyetina es eritropoyetina humana.
10. Composición farmacéutica para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha eritropoyetina modificada se expresa en una célula de insecto o vegetal.
11. Composición farmacéutica para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha eritropoyetina modificada puede tratar o prevenir una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central o sistema nervioso periférico.
12. Composición farmacéutica para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicha eritropoyetina modificada puede tratar o prevenir una enfermedad o trastorno del cerebro, ojo o retina en un mamífero.
13. Composición farmacéutica para su uso de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha eritropoyetina modificada es eficaz para el restablecimiento o potenciación de la función cognitiva en un mamífero que tiene, ha tenido o está en riesgo de tener disfunción cognitiva.
14. Composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 13, en la que dicha disfunción cognitiva está provocada por traumatismo craneoencefálico.
15. Composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 13, en la que dicha potenciación de la función cognitiva es la potenciación del aprendizaje.
16. Composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el mamífero, tiene, ha tenido o está en riesgo de o padece esclerosis múltiple, apoplejía, lesión del sistema nervioso central, pérdida neuronal, isquemia, enfermedad o trastorno neurodegenerativo, lesión cerebral o lesión de médula espinal, tratamiento posoperatorio para lesión embólica o isquémica, neuropatía diabética, daño tisular ocular, degeneración macular, retinopatía diabética, glaucoma, isquemia retiniana, traumatismo retiniano, retinitis pigmentosa, daño del nervio óptico, desprendimiento de retina, retinopatía arteriosclerótica, retinopatía hipertensiva, bloqueo de arteria retiniana y/o bloqueo de vena retiniana.
17. Composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 16, en la que la enfermedad o trastorno

neurodegenerativo se selecciona de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome de Gilles de la Tourette, enfermedad de Leigh, Guillian Barré, esclerosis lateral amiotrófica y ataxia de Friedreich.

Figura 1

CONCENTRACIÓN DE EPO DE LCR DE RATA DESPUÉS DE  
ADMINISTRACIÓN PARENTERAL DE rH-EPO (5000 U/kg-pc i.p.)



2,5 h y más  $p < 0,01$  en comparación con el valor de referencia

Figura 2

CORAZÓN DE RATA 7 DÍAS DESPUÉS DE 30 MINUTOS DE ISQUEMIA

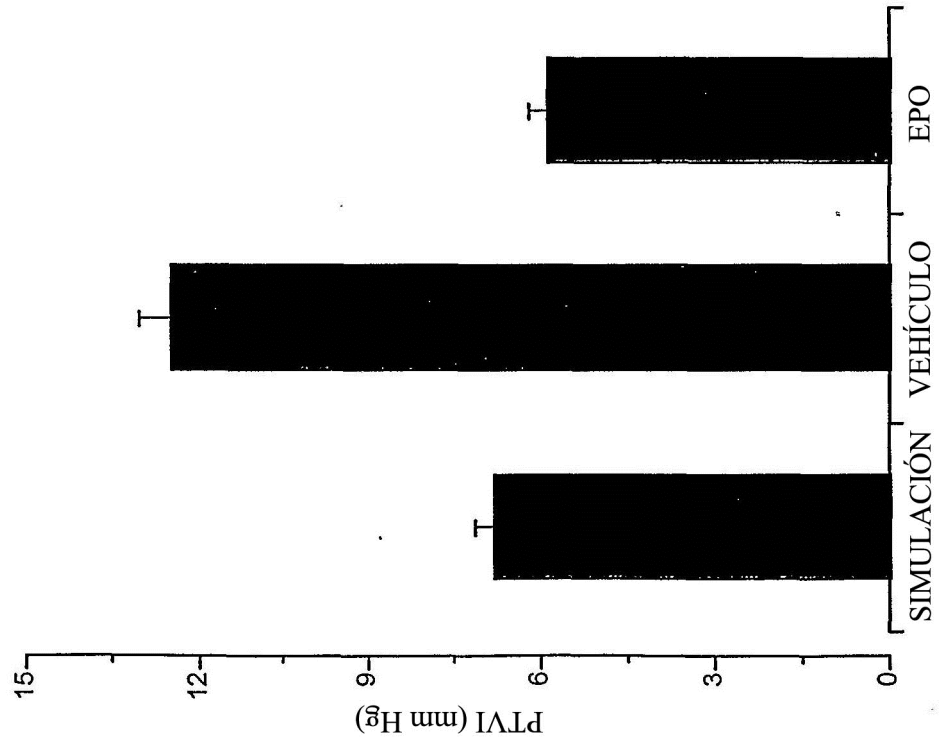
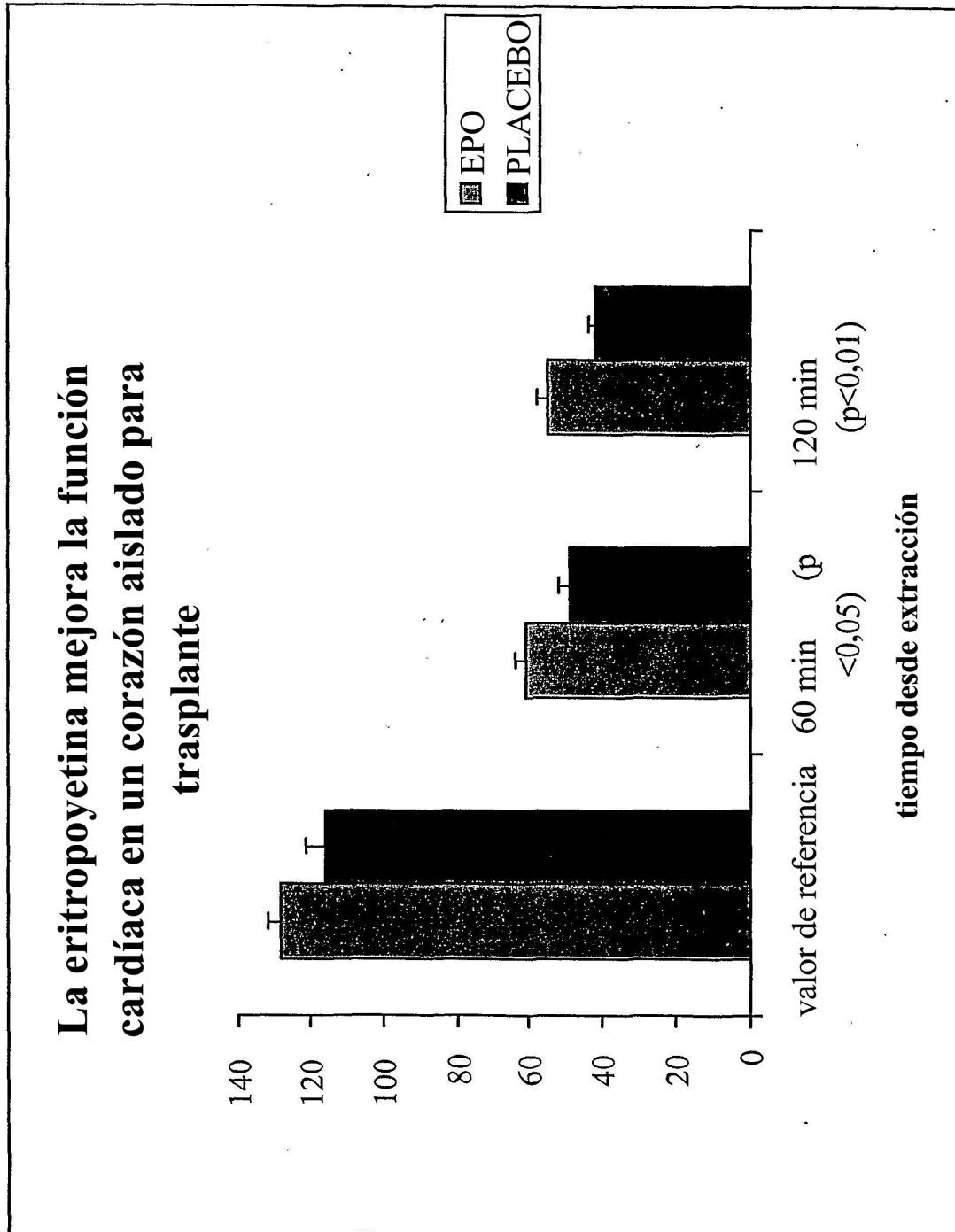


Figura 3



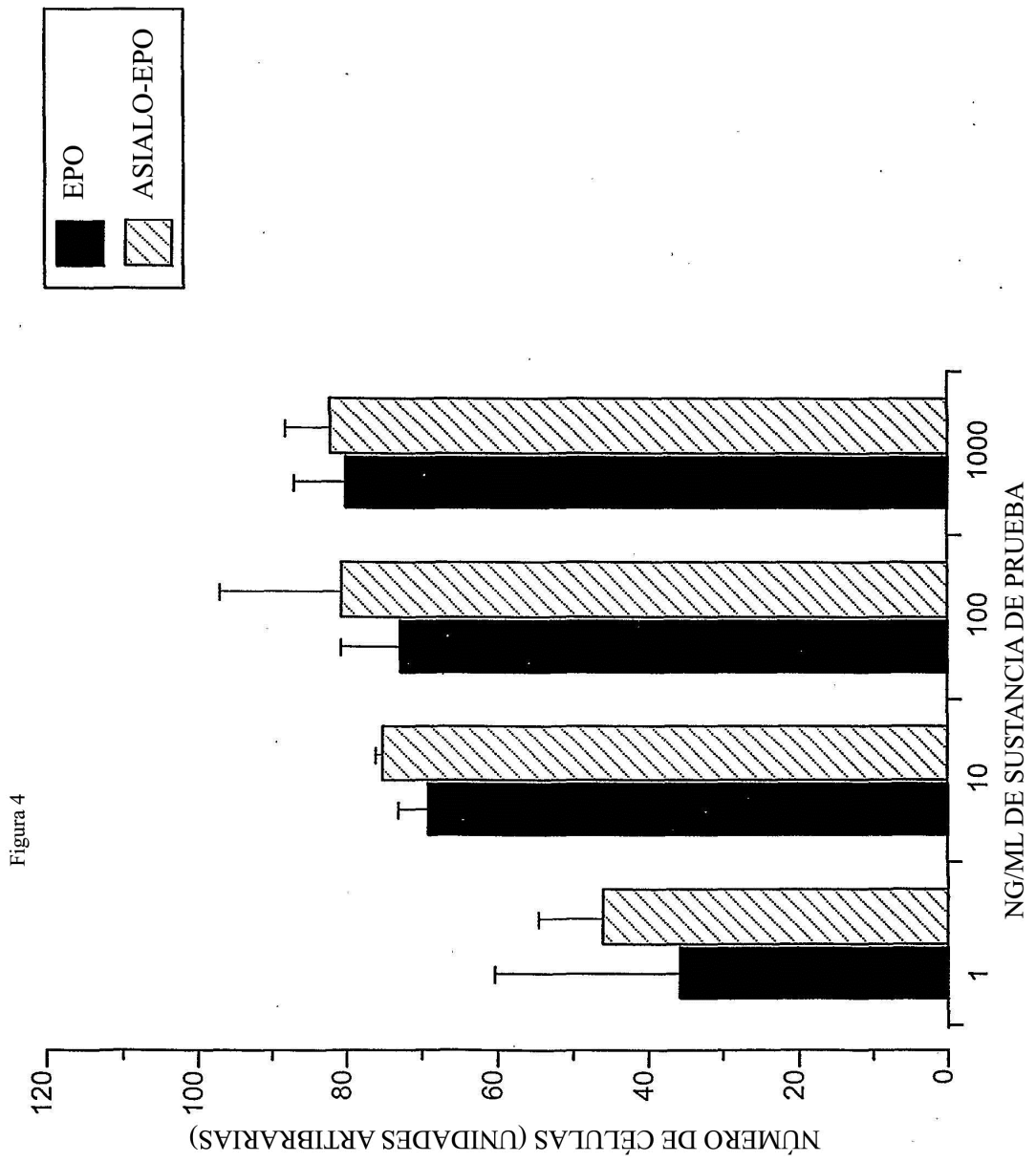


Figura 5

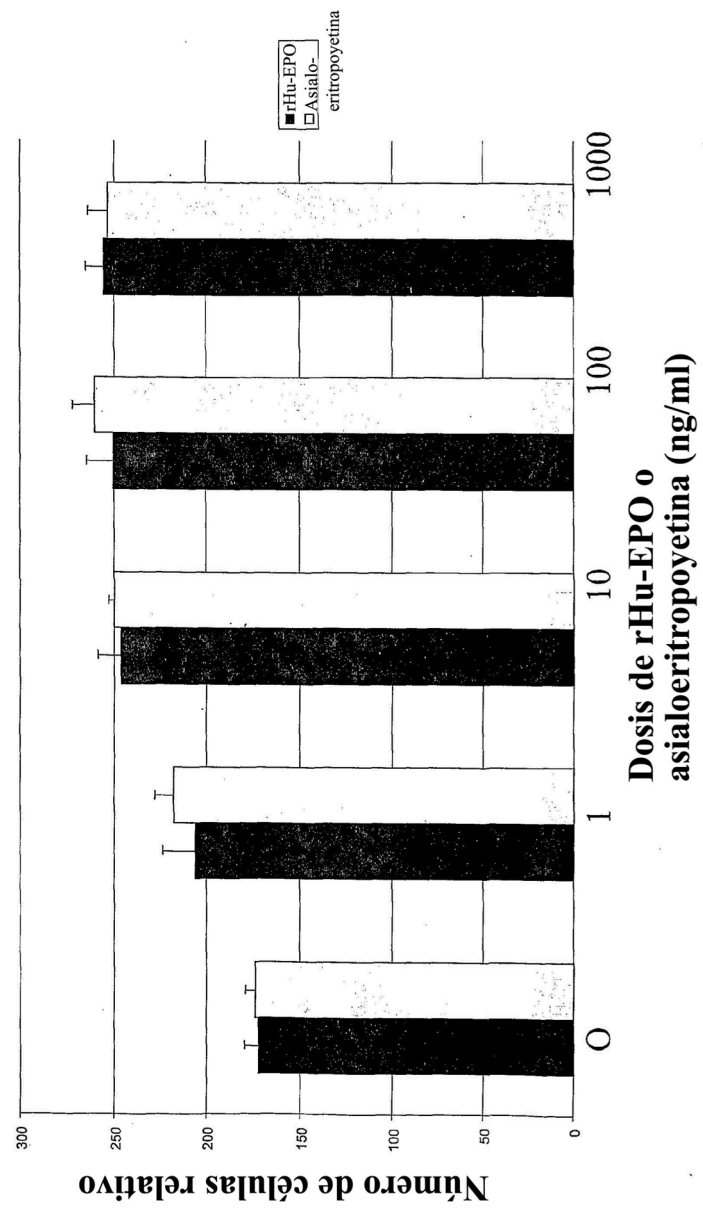


Figura 6

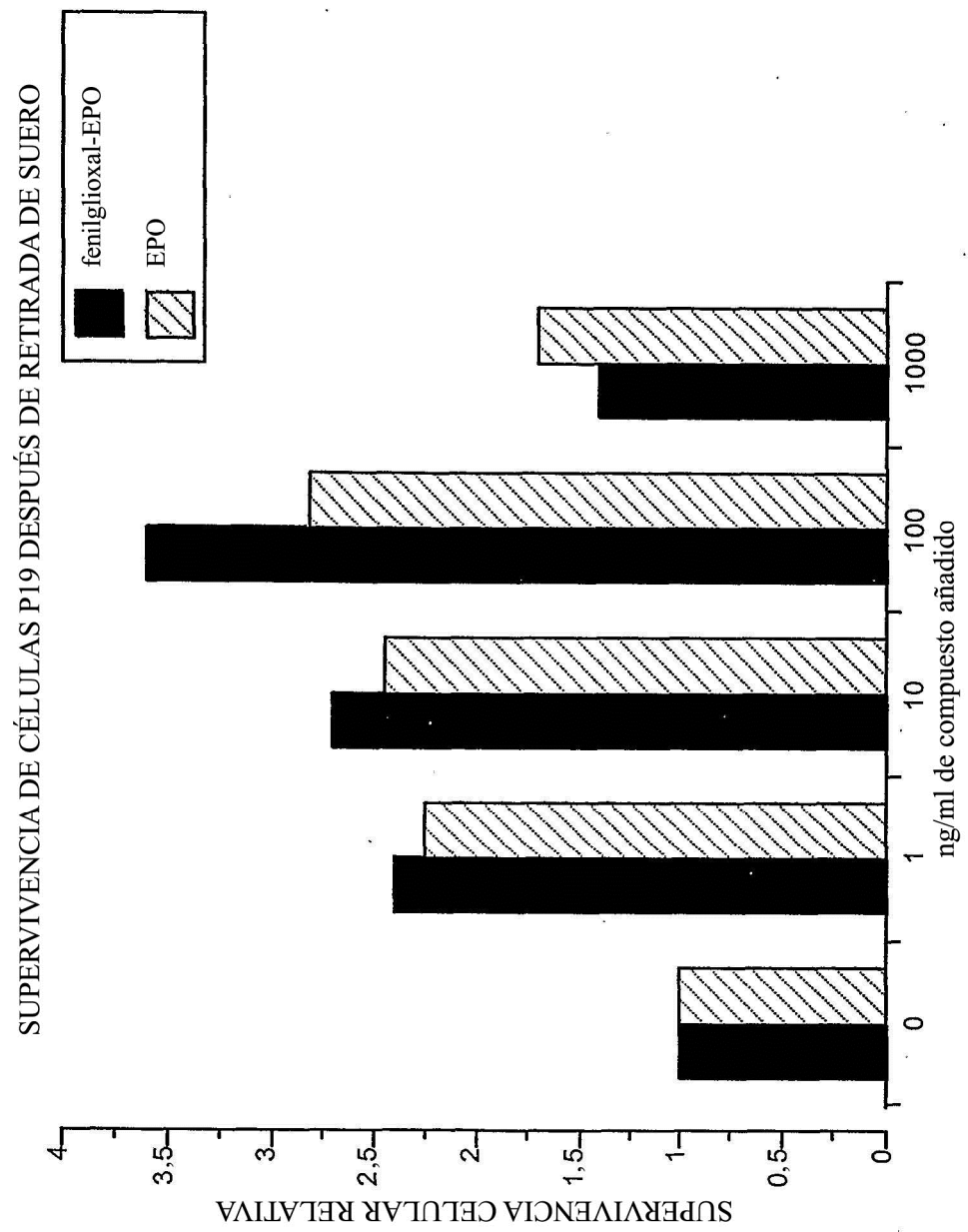


Figura 7

LA ASIALOERITROPOYETINA REDUCE EL VOLUMEN DE  
INFARTO ASÍ COMO LA ERITROPOYETINA

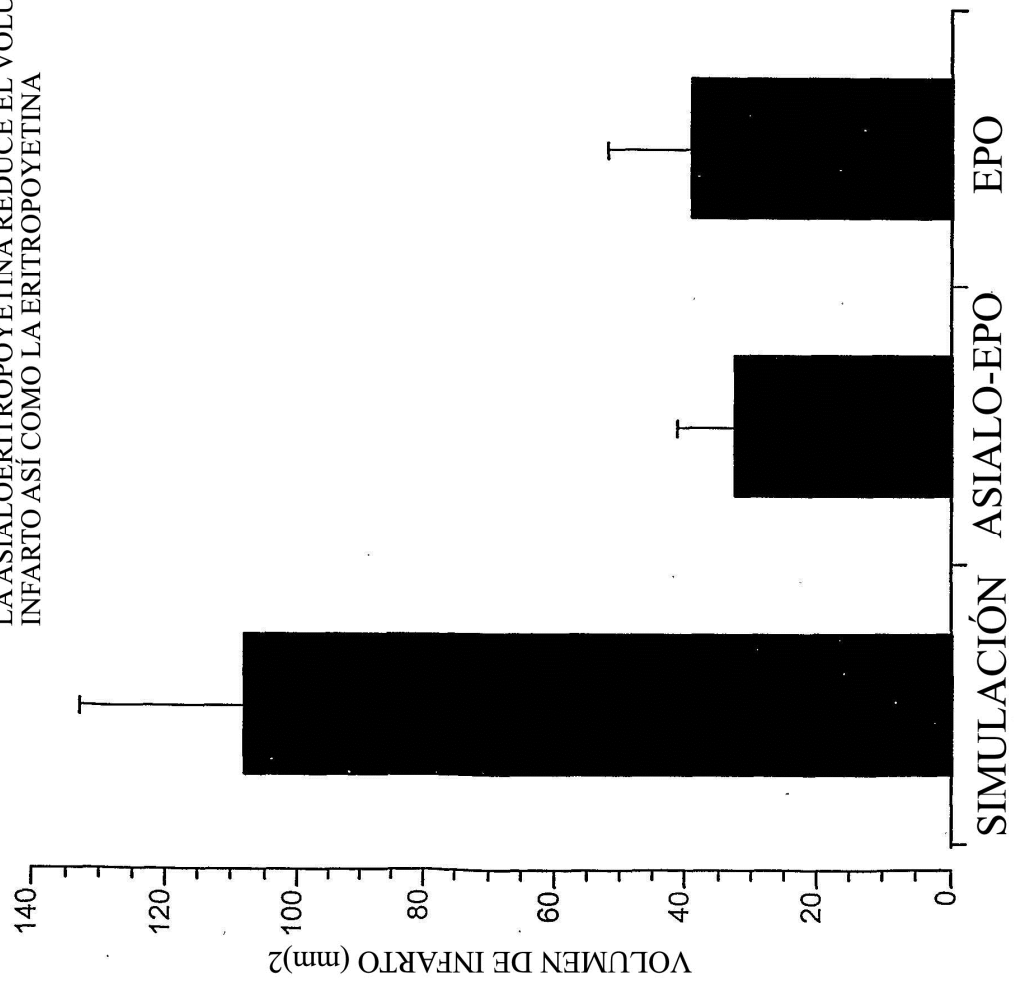
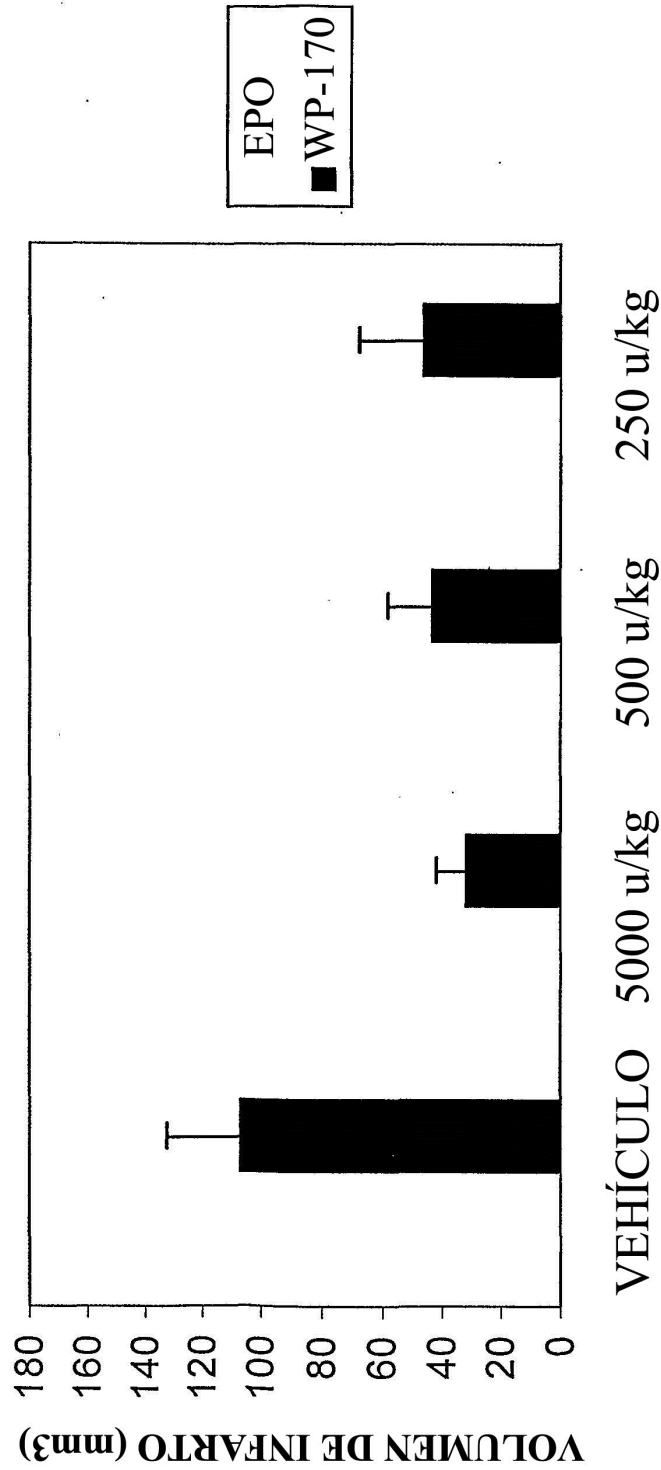


Figura 8  
asialoeritropoyetina  
(*respuesta a la dosis*)



n para cada grupo es mayor  
o igual a 4

Figura 9  
EPO biotinilada y asialo-EPO conservan  
la actividad en el ensayo de P19

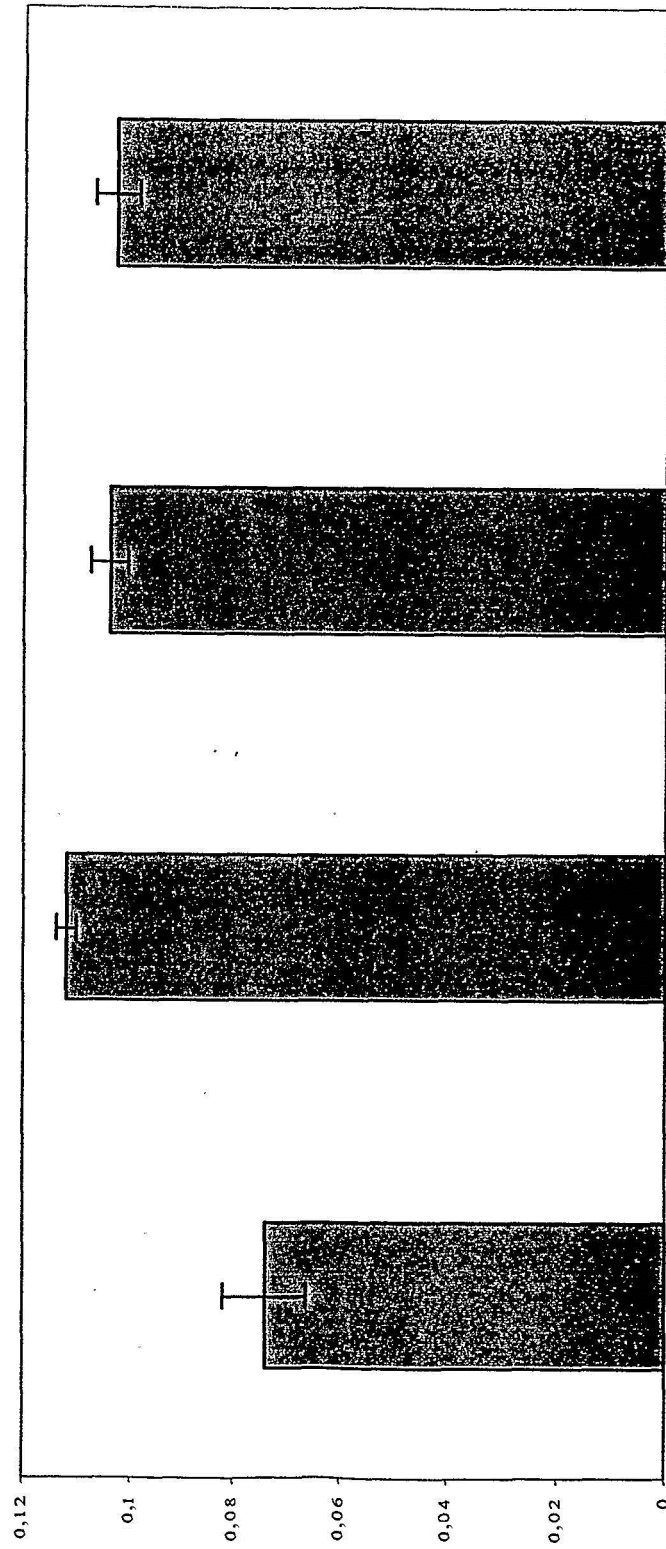
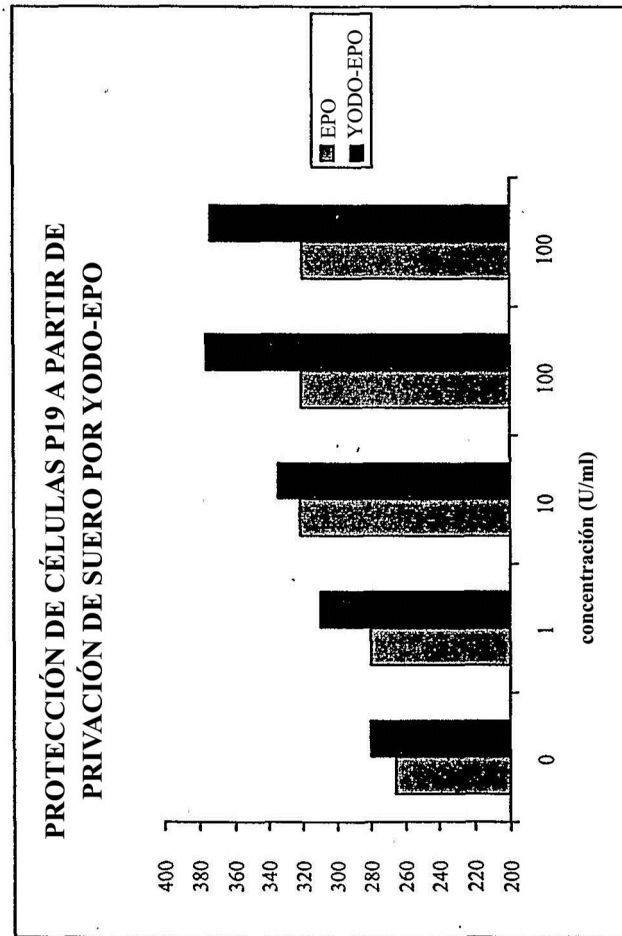


Figura 10



# Electroretinogramas de ratas sometidas a 60 minutos de isquemia

Figura 11

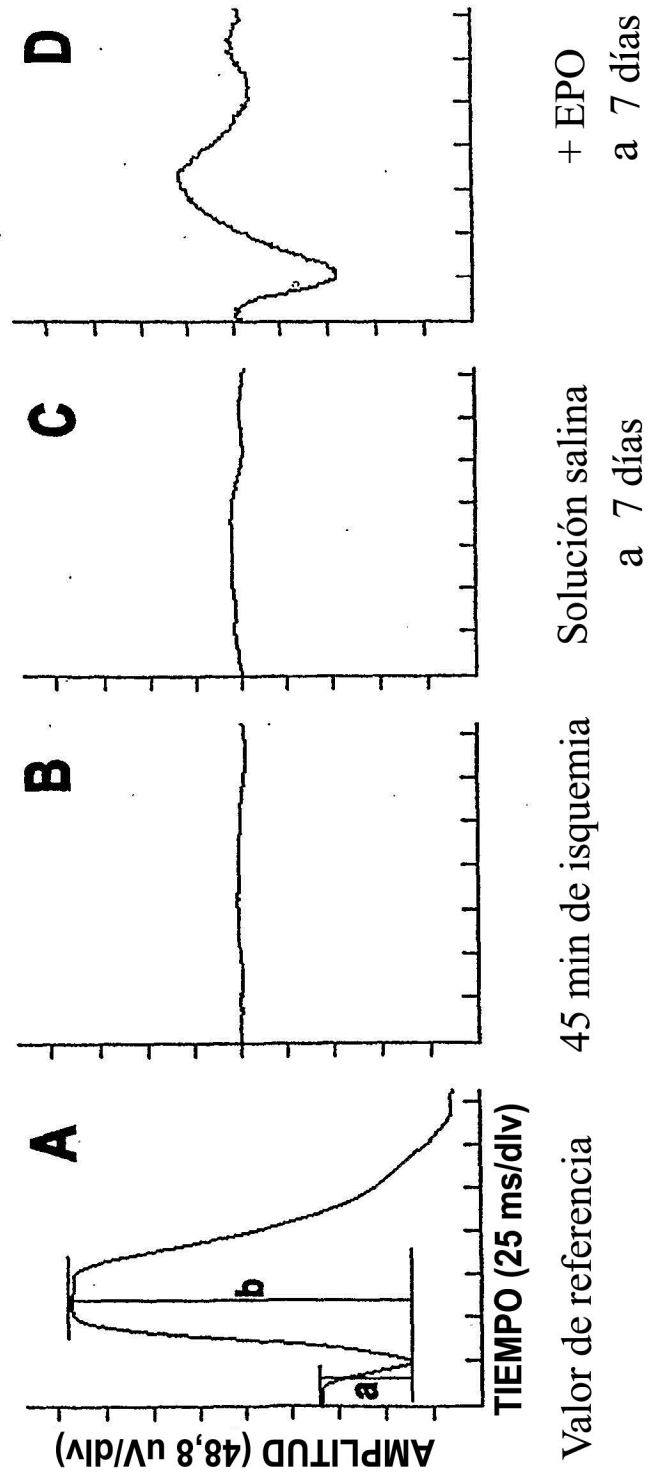
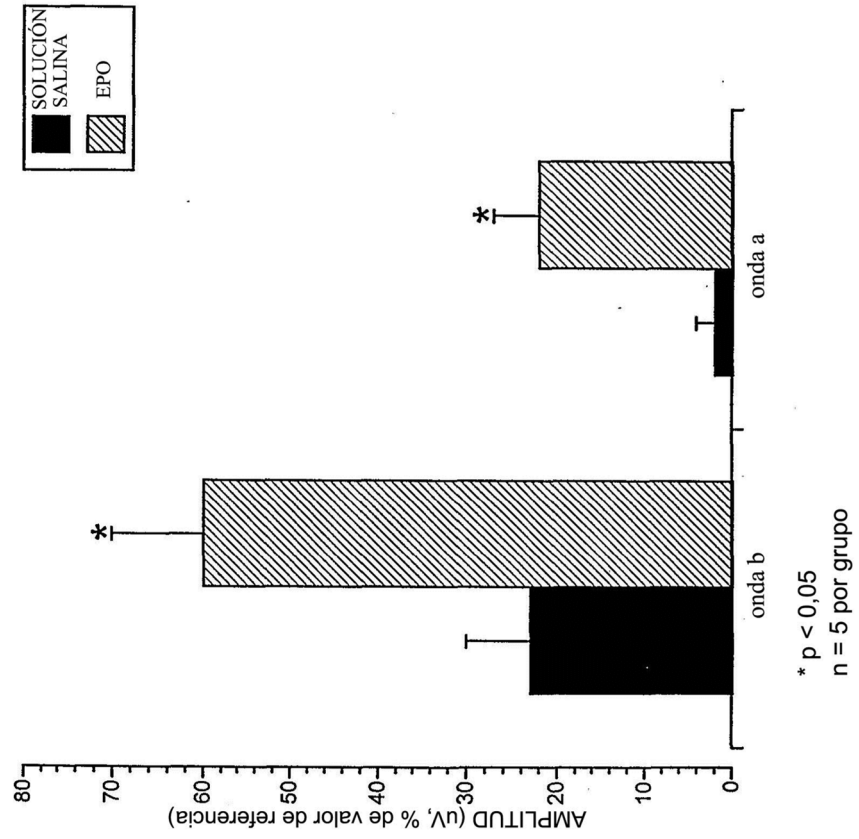


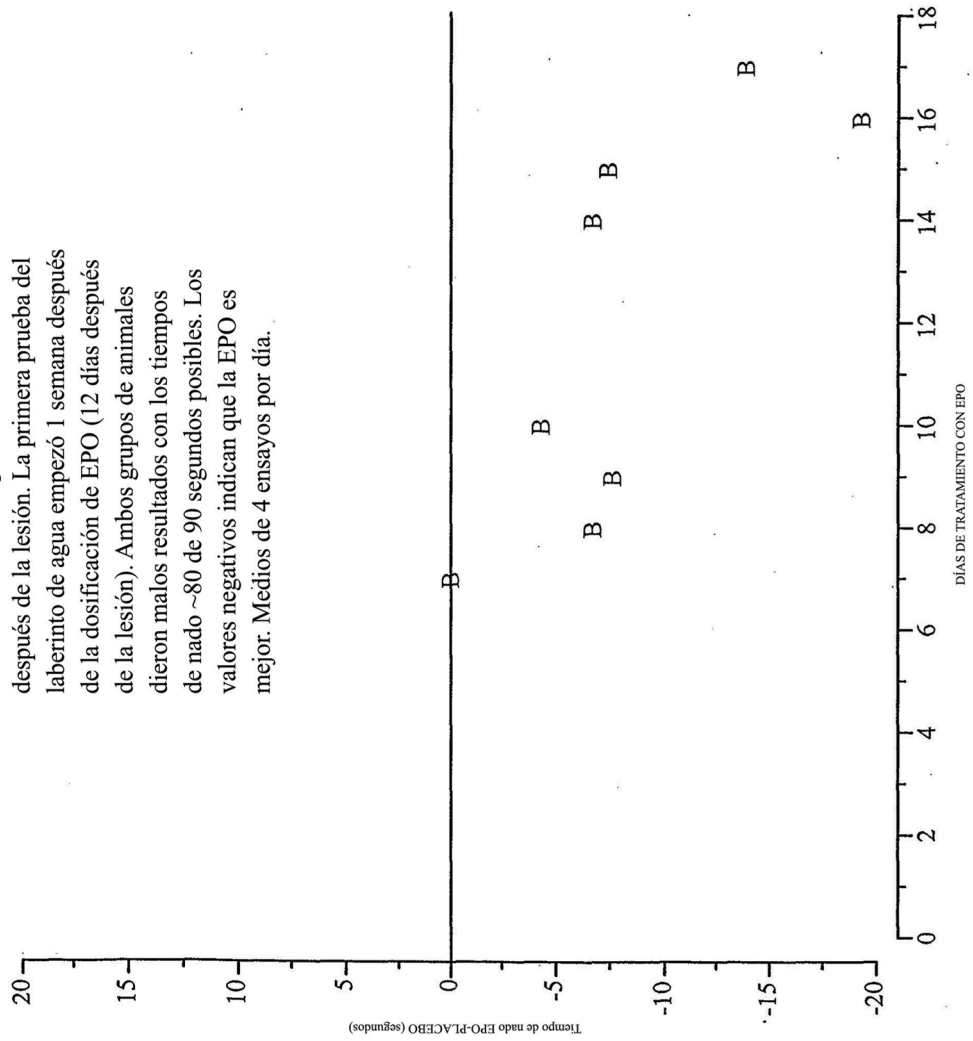
Figura 12

AMPLITUD DE RETINOGRAMA DESPUÉS DE 60 MIN DE ISQUEMIA



Laberinto de agua de Morris; ratones hembra Balb/c n= 16. Traumatismo craneoencefálico cerrado con EPO rx que comienza en el día 5 después de la lesión. La primera prueba del laberinto de agua empezó 1 semana después de la dosificación de EPO (12 días después de la lesión). Ambos grupos de animales dieron malos resultados con los tiempos de nado ~80 de 90 segundos posibles. Los valores negativos indican que la EPO es mejor. Medios de 4 ensayos por día.

Figura 13



Diferencia en el tiempo de nado hasta la plataforma en el laberinto de agua de Morris.

Ratones Bab/c; traumatismo craneoencefálico 1 mes antes, tratados con 5000 U/kg de EPO al día excepto fines de semana empezando un mes después de la lesión (n = 7 cada grupo) medios de 4 ensayos cada día

Figura 14

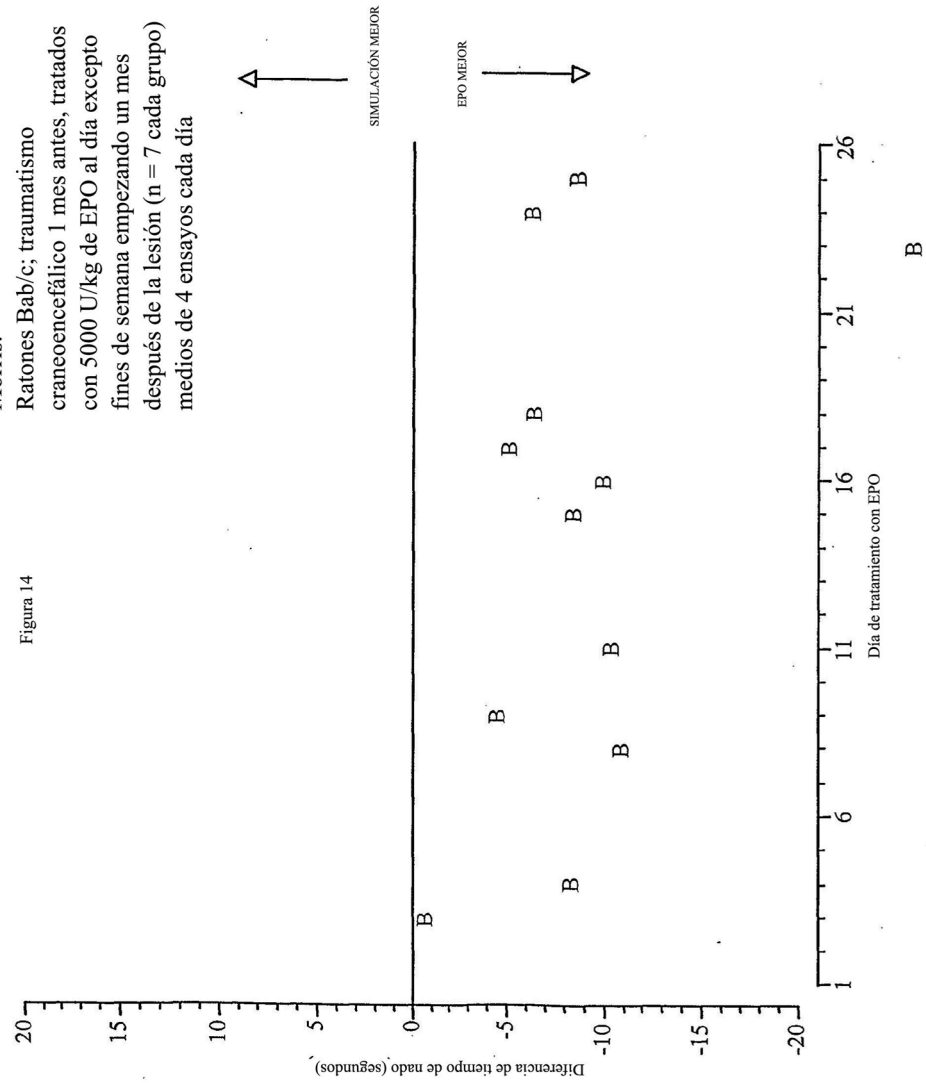


Figura 15

Modelo de cainato

