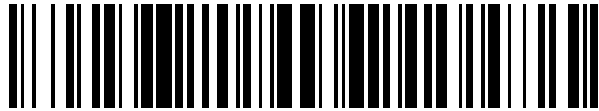


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 983**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 17/12 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2007 E 07766363 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2043692**

54 Título: **Derivados de polisacáridos de la eritropoyetina**

30 Prioridad:

25.07.2006 EP 06117830

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

08.09.2016

73 Titular/es:

**LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED (100.0%)
LONDON BIOSCIENCE INNOVATION CENTRE 2
ROYAL COLLEGE STREET
LONDON NW1 0NH, GB**

72 Inventor/es:

**JAIN, SANJAY;
LAING, PETER;
GREGORIADIS, GREGORY y
RUMPF, NORBERT, OSKAR**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 581 983 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

Derivados de polisacáridos de la eritropoyetina

5 La presente invención se refiere a nuevos derivados de polisacáridos de la EPO y métodos para producir tales derivados. Los derivados son útiles para mejorar la estabilidad, farmacocinética y farmacodinámica de la EPO.

10 La eritropoyetina es una hormona glicoproteica y es una citoquina de los precursores de eritrocitos (glóbulos rojos) en la médula ósea. Además llamada hematopoyetina o hemopoietin, se produce por el riñón, y regula la producción de glóbulos rojos.

15 La eritropoyetina es el principal regulador de la eritropoyesis en el cuerpo. (Martindale, 1996). La eritropoyetina humana recombinante está disponible comercialmente en formas conocidas como epoetina alfa y epoetina beta. Estas se usan en el manejo de la anemia en pacientes con insuficiencia renal crónica. La epoetina gamma además está disponible. Todos tienen la misma secuencia de 165 aminoácidos, pero difieren en su patrón de glicosilación.

20 La eritropoyetina humana recombinante se debe usar con precaución en pacientes con hipertensión, antecedentes de convulsiones, trombocitosis, insuficiencia hepática crónica, enfermedad vascular isquémica, o en pacientes con tumores malignos. La epoetina alfa y beta exhiben algunas diferencias en su farmacocinética, posiblemente debido a diferencias en la glicosilación y en la formulación de las preparaciones comerciales. La epoetina alfa se absorbe lentamente y de forma incompleta después de la inyección subcutánea y se ha reportado una biodisponibilidad de aproximadamente 10 a 50% con relación a la administración intravenosa. La epoetina beta se absorbe además lentamente y de forma incompleta y su biodisponibilidad absoluta se ha reportado que es alrededor de 40%.

25 Se han hecho intentos para derivatizar la EPO para mejorar sus propiedades farmacocinéticas. Existe un producto en desarrollo por Roche, conocido como CERA (Activador Continuo del Receptor de Eritropoyesis), que es una forma de EPO derivatizada con polietilenglicol. Esto se ha demostrado que tienen una vida media más larga que la EPO, reduciendo la necesidad de inyecciones frecuentes. Un nuevo agente estimulante adicional de la eritropoyesis es el Hematide, un péptido sintético nuevo, PEGilado, para el tratamiento de la anemia asociada con la enfermedad renal crónica y el cáncer. Esto se describe adicionalmente por Fan y *otros* (2006).

35 Otras formas de EPO se han desarrollado, además, tal como Darbepoetina, un análogo hiperglicosilado de eritropoyetina humana recombinante que tiene alrededor de tres veces más larga la vida media terminal después de la administración i.v. que la EPO humana recombinante y la hormona natural.

40 El documento EP1219636 describe muteínas modificadas de EPO producidas a partir de un microorganismo con una vida media plasmática prolongada en la circulación. Una técnica de síntesis de proteínas libres de células se usa para producir una muteína de EPO con un aminoácido no natural que puede reaccionar con un modificador tal como PEG o un polisacárido. Generalmente, el PEG se une a un grupo sulfhidrilo libre en las muteínas de EPO.

45 El documento US7,128,913 se dirige a los conjugados N-terminal de la EPO con PEG. Los conjugados tienen una mayor vida media en circulación y tiempo de residencia en el plasma.

El documento US2004/0082765 describe un mejor método para generar EPO conjugada a PEG. Los inventores encontraron que una composición de conjugados que tiene 1– 3 moléculas de PEG lineales por molécula rhEPO proporciona la eficacia más sostenida.

50 El documento US7,074,755 aborda además el problema de proporcionar composiciones mejoradas de conjugados de EPO activos biológicamente. La EPO se conjuga covalentemente a un polímero hidrofílico no antigénico enlazado covalentemente a una molécula orgánica que aumenta la vida media sérica en circulación de la composición. El polímero soluble en agua puede ser un óxido de polialqueno, una poliamida, o un carbohidrato, entre otros.

55 Sin embargo, no ha habido ningún trabajo publicado hasta la fecha que describe la derivatización de la EPO con polisacáridos aniónicos tal como el ácido polisiálico (PSA).

60 Los ácidos polisiálicos (PSA) son polímeros no ramificados de ácido siálico de origen natural producidos por ciertas cepas bacterianas y en los mamíferos en ciertas células. Pueden producirse en varios grados de polimerización de $n =$ aproximadamente 80 o más residuos de ácido siálico hacia abajo a $n = 2$ mediante hidrólisis ácida limitada o mediante digestión con neuraminidasa, o mediante fraccionamiento de las formas del polímero natural, derivadas de bacterias.

65 En los últimos años, las propiedades biológicas de los ácidos polisiálicos, particularmente las del ácido polisiálico homopolimérico alfa– 2,8 enlazado, han sido explotadas para modificar las propiedades farmacocinéticas de las proteínas y moléculas de bajo peso molecular del fármaco. La derivatización del ácido polisiálico da lugar a mejoras espectaculares en la vida media en circulación de un número de proteínas terapéuticas, que incluyen la catalasa y la asparaginasa, y permite además a tales proteínas ser usadas en el hecho de que los anticuerpos pre-existentes aumentan como una consecuencia indeseable (y a veces inevitable) de la exposición previa a la proteína terapéutica. El

ácido polisialílico alfa 2,8 enlazado ofrece una alternativa atractiva a PEG, siendo un polímero biodegradable invisible inmunológicamente que es naturalmente parte del cuerpo humano, y que se degrada, a través de neuraminidasas de tejido, a ácido siálico, un sacárido no tóxico.

5 Hemos descrito previamente métodos para la fijación de polisacáridos (en particular PSA) a los agentes terapéuticos, tales como las proteínas [US— A— 5846,951; WO— A— 0187922]. Algunos de estos métodos dependen tras la derivatización química del extremo 'no reductor' del polímero para crear una porción aldehído reactiva de la proteína que reacciona en los grupos de amina primaria. Una unidad terminal de ácido siálico no reductor, ya que contiene dioles vecinales, puede oxidarse fácilmente (y selectivamente) con peryodato para producir una forma mono— aldehído, que es mucho más reactivo hacia las proteínas, y que comprende un elemento adecuadamente reactivo para la unión de proteínas a través de la aminación reductora y otras químicas. La reacción se ilustra en las Figuras 1 y 2 en donde;

15 La Figura 1 muestra la oxidación del ácido colomínico (ácido polisialílico alfa— 2,8 enlazado de *E. coli*) con peryodato de sodio para formar un aldehído reactivo de la proteína en el extremo no reductor; y

La Figura 2 muestra la reducción selectiva de la base de Schiff con cianoborohidruro de sodio para formar un enlace covalente irreversible estable con el grupo amino de la proteína.

20 Durante las reacciones de conjugación convencionales descritas anteriormente pueden generarse subproductos involuntarios mediante, por ejemplo, la reacción del ácido colomínico con cadenas laterales de aminoácidos. Estos pueden ser suficientes para ser problemáticos en la fabricación de los conjugados químicamente definidos de acuerdo con las autoridades reguladoras para el uso terapéutico en el hombre y los animales.

25 No es sencillo purificar el producto de reacción previsto (por ejemplo el producto monopolisialilado) separado de los diferentes productos no deseados, ya que las características fisicoquímicas de la mayor parte de los productos de reacción son similares. Esto significa que las técnicas como la cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de permeación en gel (que separan sobre la base de la carga y tamaño respectivamente) producen perfiles de purificación pobres. Este problema puede superarse reduciendo la complejidad del producto en la reacción de conjugación.

30 El documento US 5305617 describe conjugados de fragmentos de heparina con activadores del plasminógeno, EPO, hormonas o anticuerpos. Los conjugados resultantes tienen una vida media más larga que la proteína nativa y son capaces de entregar la heparina al sitio de formación de coágulos o prevenir la reoclusión con el torrente sanguíneo.

35 El documento WO 2005/092928 describe conjugados de hidroxialquil almidón (HAS) y una proteína, donde los conjugados se forman mediante una reacción de aminación reductora entre al menos un aldehído, ceto, o derivado hemiacetal de HAS y al menos un grupo amino de la proteína. El documento WO 2005/092928 describe además que los derivados HAS pueden enlazarse predominantemente con el grupo amino N— terminal de una proteína cuando la reacción de aminación reductora se lleva a cabo a un pH en el intervalo de 4— 7.

40 El documento EP 1681303 describe conjugados de almidón hidroxialquilo (HAS) y una proteína donde el HAS se conjuga a la proteína a través de una porción de carbohidrato o un tioéter. La porción de carbohidrato puede enlazarse directamente a la cadena principal del polipéptido como parte de la cadena lateral de carbohidrato.

45 Hemos desarrollado un nuevo método para la conjugación de los polisacáridos a las proteínas mediante el cual puede utilizarse la alta reactividad del N— terminal de la proteína y que evita la complejidad del producto obtenido por el método establecido (Figuras 1 y 2) de aminación reductora de proteínas con el ácido colomínico natural oxidado con peryodato.

50 En vista de la técnica anterior, existe una necesidad de proporcionar mejores derivados de EPO que pueden usarse en la terapia humana y animal y tienen estabilidad, vida media optimizada y baja toxicidad. Hemos encontrado que fijar polisacáridos tales como los PSA a EPO imparte tales propiedades y de ese modo han llegado a esta invención. Esta es la primera vez que se ha descrito la EPO enlazada a polisacáridos aniónicos.

55 De acuerdo con un primer aspecto de esta invención, proporcionamos un compuesto que es un derivado de polisacárido N— terminal de la EPO, o de una proteína similar a EPO, siendo la proteína similar a EPO un homólogo de EPO que tiene al menos 50% de la actividad de EPO y que tiene 90% o más de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos con los residuos 28— 193 de la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el polisacárido es ácido polisialílico y comprende entre 2 y 200 unidades de sacárido.

60 La invención proporciona además un método para producir una población de derivados de ácido polisialílico N— terminal (PSA) de la eritropoyetina (EPO) o de una proteína similar a EPO, siendo la proteína similar a EPO un homólogo de EPO que tiene al menos 50% de la actividad de EPO y que tiene 90% o más de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos con los residuos 28— 193 de sec. con núm. de ident.: 1, el método comprende las etapas de:

65 a) reaccionar químicamente el grupo amino terminal de la proteína EPO o similar a EPO con PSA o intermediario de la reacción en una primera solución acuosa de pH ácido; en donde el PSA comprende 2— 200 unidades de sacárido;

y en donde el PSA tiene un aldehído reactivo en el extremo reductor y un extremo no reductor pasivado de manera que no reacciona con la proteína EPO o similar a EPO; y

b) purificar la población de los derivados de PSA amino— terminal resultantes de la EPO o proteína similar a EPO en una segunda solución acuosa de pH mayor que la primera solución acuosa;

5

en donde al menos el 85% de los derivados de PSA de EPO o proteína similar a EPO se derivatizan solo en el extremo N— terminal de la EPO o proteína similar a EPO.

10

La invención proporciona además una composición que comprende una población de derivados de ácido polisiálico (PSA) de la eritropoyetina (EPO), o de una proteína similar a EPO, siendo la proteína similar a EPO un homólogo de EPO que tiene al menos 50% de la actividad de EPO y que tiene 90% o más de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos con los residuos 28— 193 de sec. con núm. de ident.: 1,

15

en donde el PSA comprende entre 2 y 200 unidades de sacárido y

en donde al menos el 85% de los derivados de PSA de EPO o proteína similar a EPO se derivatizan solo en el extremo N— terminal de la EPO o proteína similar a EPO.

20

En lo sucesivo, cuando se usa el término EPO, pretendemos además cubrir las proteínas similares a EPO. Por proteína similar a EPO, se entiende una proteína que tiene una actividad equivalente a la de EPO. La EPO regula la producción de eritrocitos, como se detalló anteriormente. La actividad de la EPO o una proteína similar a EPO puede medirse usando un ensayo estándar como se describe en Krystal (1983). La actividad de las muestras de EPO se mide al inducir la proliferación *in vitro* de células progenitoras de eritrocitos aislados del bazo de un ratón. Los ratones se han dejado previamente anémicos artificialmente a través de inyección I.P. de fenilhidrazina. En el ensayo, la EPO se añade a los progenitores de eritrocitos y la velocidad de replicación del ADN se mide determinando la velocidad de incorporación de ³H— timidina. Una proteína se clasifica como "similar a EPO" si induce de 10— 200% de la velocidad de replicación en comparación con el estándar de EPO de NIBSC. Típicamente, una proteína similar a EPO tiene al menos 50% de la actividad de la EPO estándar.

25

30

Los mutantes de EPO que tienen la actividad requerida, como se detalló anteriormente, pueden usarse también. Una proteína "similar a EPO" puede denominarse además como un "homólogo de EPO". Si dos secuencias son homólogas se calcula de forma rutinaria usando un porcentaje de similitud o identidad, términos que son bien conocidos en la técnica. Las secuencias deben ser comparadas con la sec. con núm. de ident.:1, que es el precursor de la EPO humana con número de acceso SwissProt PO1588. La EPO activa es los residuos 28— 193 de esta secuencia. Las secuencias homólogas de EPO pueden compararse ya sea con la sec. con núm. de ident.:1 completa, o los residuos 28— 193 de esta. Preferentemente, las secuencias homólogas de EPO se comparan con la EPO activa, es decir, los residuos 28— 193.

35

40

En esta invención, los homólogos tienen 90% o más, tal como 95% o 99% de identidad o similitud en el nivel de aminoácidos. Un número de programas están disponibles para calcular la similitud o identidad; programas preferidos son los programas BLASTn, BLASTp y BLASTX, corren con los parámetros por defecto, disponibles en www.ncbi.nlm.nih.gov. Por ejemplo, 2 secuencias de aminoácido pueden compararse usando el programa BLASTn con parámetros por defecto (puntuación = 100, longitud de palabra = 11, valor esperado = 11, filtro de baja complejidad = encendido). Los niveles anteriores de homología pueden calcularse usando estos parámetros por defecto.

45

La EPO puede ser glicosilada o no glicosilada. Cuando la EPO es glicosilada, el compuesto comprende típicamente 2— 100 unidades de sacárido. Más típicamente, el compuesto comprende 10— 80 unidades de sacárido, preferentemente 20— 60 unidades de sacárido, con preferencia superlativa 40— 50 unidades de sacárido.

50

Cuando la EPO es no glicosilada, el compuesto comprende típicamente 80— 180 unidades de sacárido, preferentemente 100— 150 unidades de sacáridos, con mayor preferencia 120— 145, con preferencia superlativa 130— 140 unidades.

55

Preferentemente, el polisacárido aniónico tiene al menos 2, con mayor preferencia al menos 5, con preferencia superlativa al menos 10, por ejemplo al menos 50 unidades de sacárido.

60

Preferentemente, el ácido polisiálico consiste esencialmente sólo de unidades de ácido siálico. Sin embargo, el polisacárido puede tener unidades distintas de ácido siálico en la molécula. Por ejemplo, las unidades de ácido siálico pueden alternar con otras unidades de sacárido. Preferentemente, sin embargo, el polisacárido consiste esencialmente en unidades de ácido siálico.

65

El compuesto es un derivado N— terminal de la EPO o de una proteína similar a EPO, es decir, el polisacárido se asocia con la EPO en su extremo N— terminal. En esta especificación, por derivatización en el N— terminal, se entiende la derivatización en el grupo amino N— terminal de la EPO.

Preferentemente, el polisacárido tiene un grupo de ácido siálico terminal, y como se detalló anteriormente, es con mayor

preferencia un ácido polisialico, que es un polisacárido que comprende al menos 2 unidades de ácido siálico unidas entre sí a través de enlaces α -2-8 o α -2-9. Un ácido polisialico adecuado tiene un peso molecular promedio en peso en el intervalo de 2 a 50 kDa, preferentemente en el intervalo de 5 a 50 kDa. Con preferencia superlativa, el ácido polisialico se deriva de una fuente bacteriana, por ejemplo el polisacárido B de *E. coli* K1, *N. meningitidis*, *Maraxella liquefaciens* o *Pasteurella aeruginosa* o polisacárido K92 de la cepa *E. coli* K92. Es con preferencia superlativa el ácido colominico de *E. coli* K1.

El ácido polisialico puede estar en forma de una sal o del ácido libre. Puede estar en una forma hidrolizada, de manera que el peso molecular se ha reducido después de la recuperación a partir de una fuente bacteriana.

El polisacárido, que es preferentemente ácido polisialico puede ser el material que tiene una amplia difusión de pesos moleculares tales como que tienen una polidispersidad de más de 1.3, por ejemplo tanto como 2 o más. Preferentemente, la polidispersidad (p.d.) de peso molecular es menos de 1.3, con mayor preferencia menos de 1.2, por ejemplo menos de 1.1. La p.d. puede ser tan bajo como 1.01.

La EPO puede derivatizarse con más de un polisacárido aniónico. Por ejemplo, la EPO puede derivatizarse tanto en su N-terminal como en una cadena lateral interna de aminoácidos. Las cadenas laterales de lisina, cisteína, ácido aspártico, arginina, glutamina, tirosina, ácido glutámico, serina e histidina, por ejemplo, pueden derivatizarse por un polisacárido aniónico. La EPO puede además derivatizarse en una unidad glycon. Sin embargo, en una modalidad preferida de esta invención, la EPO se derivatiza en solo su extremo N-terminal.

En esta descripción, por derivatización en el N-terminal, se entiende la derivatización en el grupo amino N-terminal de la EPO.

En un ejemplo, el compuesto puede ser un conjugado enlazado covalentemente entre la EPO y un polisacárido aniónico. Otros medios de asociación entre el polisacárido y la EPO incluyen la atracción electrostática. Sin embargo, se prefiere el enlace covalente. La EPO puede enlazarse covalentemente al polisacárido en su aminoácido del N-terminal. El enlace covalente puede ser un enlace amida entre un grupo carboxilo y un grupo amino. Otro enlace por el que la EPO puede unirse de forma covalente al polisacárido es a través de una base de Schiff. Los grupos adecuados para conjugar a las aminas se describen adicionalmente en el documento WO2006/016168.

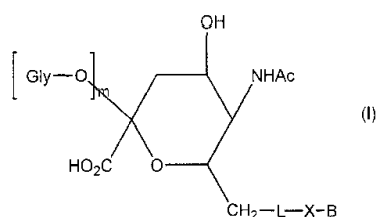
En la invención, el polisacárido puede ser un polisacárido de origen natural, o un derivado de un polisacárido de origen natural, por ejemplo, un polisacárido que se ha derivatizado mediante una reacción de uno o más grupos activos en los residuos de sacárido, o que se ha unido covalentemente a un grupo de derivatización en el extremo de la cadena de polisacárido.

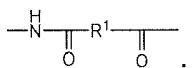
El polisacárido puede enlazarse a la EPO ya sea a través de su unidad terminal reductora o no reductora. Esto significa que una cadena de polisacárido puede enlazarse a dos proteínas EPO, es decir derivatizarse tanto en su extremo reductor como no reductor.

Los métodos para unir polisacáridos a proteínas son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle en el documento WO92/22331 y WO-A-0187922. Los métodos se describen además en las Figuras 1 y 2 de esta solicitud.

El polisacárido puede enlazarse a la EPO o proteína similar a EPO directamente, es decir, como se muestra en las Figuras 1 y 2, o a través de un enlazador. Los enlazadores adecuados se derivan de reactivos que contienen N-maleimida, vinilsulfona, N-yodoacetamida, ortopiridilo o N-hidroxisuccinimida. El enlazador puede ser bioestable o biodegradable y comprender, por ejemplo, un polipéptido o un oligómero sintético. El enlazador puede derivarse de una porción bifuncional, como se describe adicionalmente en el documento WO2005/016973. Un reactivo bifuncional adecuado es, por ejemplo, Bis-NHS. El reactivo puede tener la fórmula general Z-R¹-Z en donde cada Z es un grupo funcional y puede ser el mismo o diferente y R¹ es un radical orgánico bifuncional. Preferentemente, R¹ se selecciona del grupo que consiste en alcanodiilo, arileno, alcarileno, heteroarileno y alquilheteroarileno, cualquiera de los cuales puede sustituirse y/o interrumpirse por carbonilo, éster, sulfuro, éter, amida y/o enlaces de amina. Particularmente se prefiere C₃-C₆ alcanodiilo. Con preferencia superlativa, R¹ corresponde a la porción apropiada del reactivo bifuncional adecuado.

Un compuesto preferido de esta invención es de fórmula general (I)



- en donde m es al menos uno;
- 5 XB se deriva de B— XH que es EPO o una proteína similar a EPO en donde XH es NH₂ ;
- L es un enlace, un grupo de enlace, o comprende un polipéptido o un oligómero sintético;
- 10 GlyO es una unidad de sacárido aniónico;
- en donde el grupo de enlace, si está presente, es de fórmula general — Y— C(O)— R¹— C(O)— ; en donde Y es NR² o NR²— NR² y R¹ es un radical orgánico bifuncional como se definió anteriormente; y R² es H o C₁—₆alquilo.
- 15 En este aspecto de la invención, la EPO se enlaza al extremo no reductor del polisacárido. La unidad de polisacárido terminal es una unidad de ácido siálico. Las otras unidades de sacárido en el polisacárido se representan por GLyO y pueden ser el mismo o diferente. Unidades de sacáridos adecuados incluyen heparina, ácido hialurónico y sulfato de condroitina.
- 20 Cuando la EPO se une directamente al polisacárido, el grupo L es un enlace. Sin embargo, el grupo L, alternativamente, puede derivarse de un reactivo que contiene N— maleimida, vinilsulfona, N— yodoacetamida, ortopiridilo o N— hidroxisuccinimida. El reactivo puede tener la fórmula general Z— R¹— Z como se definió anteriormente. En esta modalidad, L es típicamente un grupo
- 25 
- XH es NH₂ y es el N— terminal de la EPO o proteína similar a EPO.
- 30 En un ejemplo, se describe una composición farmacéutica que comprende un nuevo compuesto como se definió anteriormente y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- La composición farmacéutica puede estar en la forma de una suspensión acuosa. Las suspensiones acuosas contienen los compuestos nuevos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una suspensión acuosa u homogénea inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes humectantes o dispersantes y agentes de suspensión.
- 35 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intranasal, por vía intradérmica, por vía tópica o por vía intratraqueal para uso humano o veterinario.
- 40 Las composiciones pueden comprender además un aditivo de la formulación. Por aditivo de la formulación se entiende un excipiente que es capaz de estabilizar la EPO ya sea interna o externamente, como se describe en Wang y otros (1999). El excipiente puede ser un estabilizador, un solubilizador o un ion metálico. Los ejemplos adecuados de aditivos de la formulación incluyen uno o más tampones, estabilizadores, tensioactivos, sales, polímeros, iones metálicos, azúcares, polioles o aminoácidos. Estos pueden usarse solos o en combinación.
- 45 Los estabilizadores actúan típicamente mediante la desestabilización del estado desnaturalizado de una proteína conduciendo a un aumento del cambio de la energía libre de Gibbs para el despliegue de la proteína. El estabilizador es preferentemente un azúcar o un poliol, por ejemplo sacarosa, sorbitol, trehalosa, glicerol, manitol, lactosa y etilenglicol. Un tampón estabilizante es el fosfato de sodio.
- 50 El solubilizante es preferentemente un tensioactivo, preferentemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos adecuados incluyen Tween 80, Tween 20, Tween 40, Pluoronic F68, Brij 35 y Triton X100.
- 55 El ion metálico es preferentemente divalente. Los iones metálicos adecuados incluyen Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Sr²⁺, Cu²⁺ y Fe²⁺.
- 60 El aditivo de la formulación puede ser además un polímero seleccionado a partir de albúmina de suero humano, PSA, PEG o hidroxibeta—ciclodextrina.
- Los aminoácidos adecuados y derivados de aminoácidos para el uso como el aditivo de la formulación incluyen histidina, glicina, otros aminoácidos similares y aspartato de sodio.
- 65 En un ejemplo, existe una composición que comprende una población de derivados de polisacáridos aniónicos de EPO

5 o una proteína similar a EPO, en donde los derivados comprenden entre 2 y 125 unidades de sacárido y en donde la población consiste en esencialmente solo derivados N— terminal de la proteína. Por "población" se entiende que existe más de un derivado de polisacárido en la composición. Los derivados pueden comprender los mismos o diferentes números de unidades de sacárido. Preferentemente, la polidispersidad del polisacárido en la composición es menos de 1.3, con mayor preferencia menos de 1.1. Los polisacáridos preferidos son como se detalló anteriormente para los otros aspectos de esta invención.

10 En la población, esencialmente toda la EPO se derivatiza solo en el extremo N— terminal. Por esto, se entiende que 85%, preferentemente al menos 90%, con preferencia superlativa al menos 95% de la proteína en la población se derivatiza con PSA solo en el extremo N— terminal.

El grado de derivatización en el N— terminal puede determinarse mediante técnicas conocidas en la técnica tales como mapeo de péptidos o Degradación de Edman.

15 Un aspecto adicional de la invención es un compuesto como se ha descrito anteriormente para uso en la terapia.

20 En un ejemplo, existe un método para producir un derivado de polisacárido de la EPO o de una proteína similar a EPO en donde un polisacárido aniónico que comprende 2— 200 unidades de sacárido se hace reaccionar químicamente con la EPO o proteína similar a EPO.

Se observará que el polisacárido puede reaccionar en cualquier grupo en la EPO o proteína similar a EPO. Por ejemplo, el polisacárido puede reaccionar con un grupo amina, hidroxilo, carboxilo o sulfhidrilo. Preferentemente, el grupo es un grupo amina terminal.

25 Los polisacáridos pueden enlazarse a las cadenas laterales de los aminoácidos mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un polisacárido puede acoplarse a C— terminal, — COOH o carboxilo de cadenas laterales de Asp o Glu mediante acoplamiento *in vitro*. Los grupos tiol de aminoácidos cisteína pueden además enlazarse a polisacáridos mediante el acoplamiento *in vitro*. Estos métodos se describen adicionalmente en el documento WO03/055526, en particular, la tabla de las páginas 6 y 7. En esta referencia, el acoplamiento, *in vitro* se usa además para enlazar una porción de oligosacárido con el grupo amida en la cadena lateral de Gln. Se describen además los grupos imidazol *in vitro* de los residuos de Arg y de His respectivamente.

30 El polisacárido puede reaccionar además con una forma modificada de EPO. Por ejemplo, uno o más grupos en la EPO pueden haber sufrido una transformación química, por ejemplo, mediante reducción u oxidación. Un carbonilo reactivo puede generarse en el lugar del grupo amino terminal de la EPO usando por ejemplo condiciones de oxidación.

35 Los polisacáridos adecuados para el uso en el método de esta invención son como se describieron anteriormente para los compuestos nuevos.

40 Los compuestos de la invención pueden fabricarse por cualquiera de los métodos adecuados descritos en la técnica anterior. Por ejemplo, un método típico se describe en nuestra solicitud de patente anterior WO92/22331.

45 Típicamente, el polisacárido aniónico se ha activado antes de la derivatización con EPO. Puede, por ejemplo, tener un grupo aldehído reactivo y la reacción de derivatización pueden llevarse a cabo bajo condiciones de reducción. El grupo aldehído reactivo puede producirse mediante la oxidación controlada de un grupo hidroxilo del polisacárido. Con preferencia superlativa, este aldehído reactivo se genera en una etapa preliminar, en la que se hace reaccionar el polisacárido bajo condiciones de oxidación controladas, por ejemplo usando peryodato de sodio, en solución acuosa. Preferentemente, la oxidación es una oxidación química, aunque pueden además usarse enzimas que son capaces de llevar a cabo esta etapa. El grupo aldehído reactivo puede estar en el extremo no reductor o extremo reductor del polisacárido. La EPO, típicamente el N— terminal, puede después reaccionar con el grupo aldehído reactivo para producir un aducto que, cuando se reduce, produce el derivado de la EPO N— terminal.

50 La activación del polisacárido debe llevarse a cabo preferentemente bajo condiciones de manera que no existe esencialmente la escisión a mitad de la cadena de la cadena principal del polisacárido, que no es esencialmente la reducción del peso molecular. El oxidante es convenientemente perrutenato, o, preferentemente, peryodato. La oxidación puede llevarse a cabo con peryodato en una concentración en el intervalo de 1 mM a 1 M, a un pH en el intervalo de 3 a 10, una temperatura en el intervalo de 0 a 60°C durante un tiempo en el intervalo de 1 min a 48 horas.

55 Las condiciones reductoras adecuadas para la reacción de derivatización pueden usar hidrógeno con catalizadores o, preferentemente hidruros, tales como borohidruros. Estos pueden inmovilizarse tales como borohidruro soportado con Amberlita (marca comercial). Preferentemente los hidruros metálicos alcalinos tal como borohidruro de sodio se usa como el agente reductor, a una concentración en el intervalo de 1μM a 0.1 M, un pH en el intervalo de 5.0 a 10, una temperatura en el intervalo de 0 a 60°C y un período en el intervalo 1 min a 48 horas. Las condiciones de reacción se seleccionan de manera que no se reducen los grupos carboxilo colgante del material de partida. Otros agentes reductores adecuados son cianoborohidruro bajo condiciones ácidas, por ejemplo, polímero apoyado en

65

cianoborohidruro o cianoborohidruro de metal alcalino, ácido L- ascórbico, metabisulfito de sodio, L- selectrida, triacetoxiborohidruro etc.

5 Otros derivados activados de los polisacáridos pueden tener utilidad en la presente invención, que incluyen aquellos con grupos funcionales colgantes tales como NHS, como se describe en nuestra anterior solicitud de patente WO06/00540.

En una modalidad, el aldehído reactivo está en el extremo reductor del polisacárido y el extremo no reductor se ha pasivado de manera que no reacciona con los grupos colgantes en la EPO.

10 La reactividad del extremo reductor del ácido colomínico, aunque débil hacia las proteínas objetivo, es suficiente para ser problemático en la fabricación de los conjugados químicamente definidos.

15 La química adecuada para preparar un polisacárido con un aldehído reactivo en el terminal reductor de un polisacárido se describe en nuestra Solicitud anterior WO05/016974. El proceso implica una etapa de oxidación selectiva preliminar seguido por la reducción y después la oxidación adicional para producir un compuesto con un aldehído en el terminal reductor y un extremo no reductor pasivado.

20 El documento WO2005/016973 describe derivados de ácido polisiálicos que son útiles para la conjugación a proteínas, particularmente los que tienen fármacos con sulfhidrilo libre. El compuesto de ácido polisiálico se hace reaccionar con un reactivo heterobifuncional para introducir un grupo funcional colgante para la conjugación específica de sitio a los grupos sulfhidrilo. Los polisacáridos aniónicos usados en la presente invención pueden derivatizarse además con un reactivo heterobifuncional de esta manera.

25 El polisacárido puede derivatizarse antes de que reaccione con la EPO. Por ejemplo, el polisacárido puede reaccionar con un reactivo bifuncional.

30 El polisacárido puede someterse a una etapa de reacción preliminar, en la que un grupo seleccionado de un grupo amina primaria, un grupo amina secundaria y una hidrazina se forma en el sacárido terminal, que es preferentemente ácido siálico, seguido de una etapa de reacción en la que este se hace reaccionar con un reactivo bifuncional para formar un intermediario de la reacción, como se describe adicionalmente en el documento WO2006/016168. El producto intermediario puede después reaccionar con la EPO. El reactivo bifuncional puede tener la fórmula general Z- R¹- Z, como se definió anteriormente.

35 Se encontró que ciertas condiciones de reacción promueven la derivatización selectiva en el extremo N- terminal de la EPO. Para promover la reacción selectiva en el extremo N- terminal, la reacción de derivatización debe llevarse a cabo en una primera solución acuosa de pH ácido, y el derivado de polisacárido resultante debe purificarse después en una segunda solución acuosa de pH mayor que la primera solución acuosa. Típicamente, el pH de la primera solución acuosa está en el intervalo de 4.0- 6.0 y el pH de la segunda solución acuosa está en el intervalo de 6.5- 9.0, preferentemente de 6.5- 8.5 o 6.5- 8.0. El pH bajo de la reacción de derivatización promueve la derivatización selectiva en el extremo N- terminal de la proteína en lugar de en cualquiera de los sitios a mitad de la cadena.

40 Además, encontramos que el uso de ciertos aditivos de la formulación promueven la formación de un derivado de EPO polisacárido, estable, selectivo. El aditivo de la formulación puede seleccionarse de uno o más tampones, estabilizadores, tensioactivos, sales, polímeros, iones metálicos, azúcares, polioles o aminoácidos. Estos pueden añadirse al medio de reacción, o, alternativamente, pueden añadirse a la composición del producto final, como un estabilizador.

45 En una modalidad de esta invención, el aditivo de la formulación es sorbitol, trehalosa o sacarosa. En una modalidad diferente, el aditivo de la formulación es un tensioactivo no iónico. El aditivo de la formulación puede ser alternativamente un polímero seleccionado de PSA, PEG o hidroxí- beta- ciclodextrina. En una modalidad diferente el aditivo de la formulación es un ion metálico divalente. Los iones metálicos divalentes incluyen Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Sr²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺ o Ca²⁺.

50 El aditivo de la formulación puede ser un tampón. Preferentemente, cuando el aditivo de la formulación es un tampón, este es fosfato de sodio.

55 La purificación del derivado de polisacárido en el método de la presente invención puede llevarse a cabo usando una variedad de métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de métodos de purificación adecuados incluyen HIC (cromatografía de interacción hidrofóbica), SEC (cromatografía de exclusión por tamaño), HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia), AEC (cromatografía de intercambio aniónico) y cromatografía de afinidad por metal.

60 Una población de ácidos polisiálicos que tienen una distribución de peso molecular amplia puede fraccionarse en fracciones con polidispersidades más bajas, es decir en fracciones con diferentes pesos moleculares promedios. El fraccionamiento se realiza preferentemente por cromatografía de intercambio aniónico, usando para la elución un tampón básico adecuado, como se describió en nuestras solicitudes de patente anteriores WO2005/016794 y WO2005/03149. El método de fraccionamiento es adecuado para un material de partida polisacárido,

65

así como con los derivados. La técnica puede así aplicarse antes o después de las etapas esenciales del proceso de esta invención. Preferentemente, el derivado de polisacárido resultante de la EPO tiene una polidispersidad de menos de 1.3, con mayor preferencia menos de 1.2, con preferencia superlativa menos de 1.1.

- 5 La derivatización de la EPO de acuerdo con esta invención, resulta en una mayor vida media, estabilidad mejorada, inmunogenicidad reducida, y/o control de la solubilidad de la proteína. Por lo tanto la biodisponibilidad y las propiedades farmacocinéticas de la EPO se mejoran. El nuevo método es de particular valor para la creación de un conjugado de EPO monopolisialilado.
- 10 La invención se ilustra mediante los Ejemplos 1 a 3.12 y como referencia a los siguientes dibujos:—
- La Figura 1 es un esquema de reacción que muestra la activación de la técnica anterior de la unidad terminal de ácido siálico no reductor;
- 15 La Figura 2 es un esquema de reacción que muestra la derivatización N— terminal o aleatoria de las proteínas;
- La Figura 3a muestra la degradación del ácido colomínico de 24kDa (CA) a diferentes valores de pH usando Detección Triple GPC (Viscotek: RI + RALS + Viscosímetro);
- 20 La Figura 3b muestra la cromatografía de permeación en gel del polímero CA;
- La Figura 4 muestra la caracterización de EPO PEGilada y polisialilada mediante SDS— PAGE;
- La Figura 5 muestra la caracterización de EPO polisialilada mediante SDS— PAGE (lado derecho) y SE— HPLC (lado izquierdo);
- 25 La Figura 6 muestra la caracterización de EPO, EPO polisialilada y PEGilada mediante SE— HPLC;
- La Figura 7 muestra los datos de FACS para EPO (conteo de reticulocitos);
- 30 La Figura 8 muestra la eliminación *in vivo* de las formulaciones de EPO;
- La Figura 9 muestra la eliminación *in vivo* de las formulaciones de EPO;
- 35 La Figura 10 muestra la caracterización de conjugados de EPO— CA mediante SE— HPLC;
- La Figura 11 muestra la eliminación *in vivo* de la EPO no glicosilada frente a la EPO polisialilada no glicosilada;
- La Figura 12 muestra la eliminación *in vivo* de la EPO no glicosilada frente a EPO polisialilada no glicosilada;
- 40 La Figura 13 muestra la caracterización de los conjugados NG— EPO— CA mediante SE— HPLC y SDS PAGE;
- La Figura 14 muestra la detección de la EPO PSA mediante ELISA de tipo sándwich;
- 45 La Figura 15 muestra la sensibilidad de ELISA para EPO— PSA en diluyente reactivo;
- La Figura 16 muestra la estabilidad de los conjugados de EPO mediante HPLC de exclusión por tamaño;
- La Figura 17 muestra SDS— PAGE de EPO polisialilada;
- 50 La Figura 18 muestra la eficacia *in vivo* de formulaciones de EPO (n=3— 4±SE) con ratones hembras consanguíneos; de 12 semanas de edad; SC (química aldehído);
- Figura 19 eficacia *in vivo* de las formulaciones de EPO (ratas Wistar hembra; de 8— 9 semanas de edad, n=5±SEM); y
- 55 La Figura 20 muestra muestra la PEGilación de NG EPO mediante SE— HPLC.

EJEMPLOS

60 Materiales

65 Carbonato de amonio, etilenglicol, polietilenglicol (8KDa), cianoborohidruro de sodio (> 98% puro), metaperyodato de sodio y marcadores de peso molecular, sulfato de amonio, cloruro de sodio, fosfato de sodio, sorbitol, Tween 20 y Tris se obtuvieron de Sigma Chemical laboratorio, Reino Unido. El acetato de sodio y el fosfato de sodio eran de BDH, Reino Unido. El ácido colomínico usado, ácidos polisialícos lineales alfa— (2,8)— enlazado de *E. coli* K1 (promedio 22.7kDa, alta polidispersidad 1.34, 39kDa p.d. 1.4; 11 kDa, p.d. 1.27) fue de Camida, Ireland y S.I.I.L. India Ltd. Otros materiales

incluyen 2,4 dinitrofenil hidrazina (Aldrich Chemical Company, Reino Unido), tubo de diálisis (límites de corte 3.5KDa y 10 kDa; Medicell International Limited, Reino Unido), columnas Sefarosa SP HiTrap, columnas PD— 10, Q FF [columna de 1 ml o 5 ml]; columna Hitrap butilo HP [1 o 5 ml]; (Pharmacia, Reino Unido), geles de poliacrilamida con Tris— glicina (4— 20% y 8— 16%), tampón de corrida y de carga Tris— glicina dodecilsulfato de sodio (Novex, Reino Unido). Se obtuvo agua desionizada de una unidad de purificación de agua Elgastat Option 4 (Elga Limited, Reino Unido). Todos los reactivos usados fueron de grado analítico. Se usó un lector de placas (Dynex Technologies, Reino Unido) para las determinaciones espectrofotométricas en los ensayos de proteínas o CA. Los ratones y las ratas se compraron de Harlan, Reino Unido y aclimataron durante al menos una semana antes de su uso. La EPO se obtuvo de SILL, India,

1. Determinación de proteína y ácido colomínico

La estimación cuantitativa de ácidos polisialícos (como ácido siálico) con el reactivo resorcinol se llevó a cabo por el método de resorcinol [Svennerholm, 1957] como se describió en otra parte [Gregoriadis y *otros*, 1993; Fernandes y Gregoriadis, 1996, 1997]. La proteína se midió mediante el método colorimétrico BCA o absorbancia UV a 280 nm.

2.1. Activación del ácido colomínico

La solución recién preparada de metaperyodato de sodio (NaIO_4) 0.02 M (exceso molar de 8 veces) se mezcló con CA a 20°C y la mezcla de reacción se agitó magnéticamente durante 15 min en la oscuridad. Después, se añadió un volumen de dos veces de etilenglicol a la mezcla de reacción para gastar el exceso de NaIO_4 y la mezcla se dejó agitar a 20°C durante unos 30 min. adicionales. El ácido colomínico oxidado se dializó (tubo de diálisis con corte de 3.5KDa de peso molecular) extensivamente (24 h) contra un tampón 0.01% carbonato de amonio (pH 7.4) a 4°C. La ultrafiltración (corte mayor de 3.5 kDa de peso molecular) se usó para concentrar la solución CAO a partir del tubo de diálisis. Después de la concentración hasta el volumen necesario, el filtrado se liofilizó y se almacenó a -40°C hasta el uso más adelante. Alternativamente, CAO se recuperó de la mezcla de reacción mediante precipitación (dos veces) con etanol.

2.2. Determinación del estado de oxidación de CA y derivados

La estimación cualitativa del grado de oxidación del ácido colomínico se llevó a cabo con 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4— DNPH), que produce 2,4 dinitrofenil— hidrazonas moderadamente solubles en la interacción con los compuestos carbonilo. (CA) No oxidado/ (CAO) oxidado se añadieron al reactivo 2,4— DNPH (1.0 ml)), las soluciones se agitaron y después se dejaron reposar a 37°C hasta que se observó un precipitado cristalino [Shriner y otros, 1980]. El grado (cuantitativo) de oxidación de CA se midió con un método [Park y Johnson, 1949] basado en la reducción de los iones de ferricianuro en solución alcalina a ferrocianuro férrico (azul persa), que se mide después a 630 nm. En este caso, la glucosa se usó como un estándar.

2.3. Cromatografía de permeación en gel

Las muestras de ácido colomínico (CA y CAO) se disolvieron en NaNO_3 (0.2M), CH_3CN (10%; 5mg/ml) y se cromatografiaron sobre columnas 2x GMPW_{XL} con detección mediante índice de refracción (sistema GPC: bomba de disolvente VE1121 GPC, detector VE3580 RI y comparación con el software Trisec 3 Viscotek Europe Ltd). Las muestras (5 mg/ml) se filtraron sobre membrana de nylon de 0.45 micras y corrieron a 0.7 cm/min con NaNO_3 0.2 M y CH_3CN (10%) como la fase móvil.

Los resultados se muestran en la Figura 3b y las tablas 5 y 6.

2.4. Estabilidad del ácido colomínico

Las reglas para la química de la PEGilación no pueden aplicarse a polisialilación como tal debido a la diferencia en las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas. El PSA es un polímero lábil en medio ácido y es estable durante semanas alrededor de pH neutro (Figura 3a). Los resultados en la Figura 3a muestran que a pH 6.0 y 7.4 CA es estable durante 8 días, a pH 5.0 existe una degradación lenta (después de 48 horas 92% del PM inicial), y a pH 4.0 existe una degradación lenta (después de 48 horas 70 % del PM inicial). El ácido polisialíco es altamente hidrofílico, mientras que PEG es anfifílico. Cuando la polisialilación se lleva a cabo usando condiciones usadas para la PEGilación, la agregación y precipitación de las proteínas se ve en muchos casos.

3. Preparación de conjugados proteína N— terminal— CA con aditivos de la formulación

3.1. Preparación de conjugados EPO— CA (método N— terminal)

La EPO se suministró como una solución (0.34 mg/ml en tampón 10 mM fosfato de sodio 130 Mm NaCl pH 7.0; actividad específica: 110,000 U/mg, pm 30600) y almacenó a -32° C, la proteína se descongeló a 2— 8 ° C y la cantidad necesaria se tomó en un tubo Eppendorf de 2 ml. La cantidad necesaria (exceso molar de 25 veces) de ácido colomínico se tomó y se añadió la solución de proteína a CA sólido y se mezcló suavemente. Se añadió el volumen necesario de solución de cianoborohidruro de sodio para tener 50 mM o 3.17 mg/ml en la mezcla de reacción, se agitó en vórtice y comprobó el pH de la mezcla de reacción final; si fuera necesario, se ajustó el pH a 6.0. El tubo se cerró

herméticamente y se agitó a la temperatura deseada durante 24 horas o la mezcla de reacción se incubó primero a RT (22°C) durante 8 horas y después se mantuvo a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ durante toda la noche (14 horas). Después de la incubación, se tomaron las muestras necesarias (por ejemplo, para el ensayo de actividad, SDS— PAGE, SE— HPLC).

5 3.1.1 Purificación y caracterización de conjugados de EPO— CA (método N— terminal)

10 La muestra de la mezcla de reacción restante se diluyó con tampón A1 de HIC (3M sulfato de amonio, pH 6.3) de manera que resulta una concentración final de 2 M y se cargó en la columna de HIC equilibrada previamente con tampón A de HIC a la velocidad de 1.5 ml/min a RT. La fracción de la carga se colectó y marcó. La columna se lavó con
15 tampón A2 de HIC (2 M sulfato de amonio, pH 6.3) (al menos 6 volúmenes de columna), las fracciones se recogieron y marcaron. El producto se eluyó con tampón B de HIC (50 mM Na_2HPO_4 pH 7.4), la primera fracción (0.5 ml) y después las fracciones de 0.5— 1 mL (6CV) se recogieron y se marcaron. Las muestras se mantuvieron en hielo ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante la purificación.

20 La concentración de proteínas se analizó mediante UV (280 nm) (Abs de 1 mg/ml de EPO es de aproximadamente 0.743). Se tomaron las muestras para SDS— PAGE. La separación de la EPO no conjugada se realizó usando cromatografía de intercambio aniónico (AEC) si el PM de CA es demasiado pequeño (por ejemplo, 22 kDa) para la separación del conjugado y la EPO mediante SE— HPLC. Para AEC se diluyeron las fracciones de HIC que contienen la proteína con tampón A de AEC (50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 8.0) (1 ml de muestra + 5 ml de tampón A de AEC) y se
25 cargaron a la columna EC pre— equilibrada con tampón A de AEC a 1.0 ml/min. Las fracciones de la carga se recogieron y marcaron. La columna se lavó con tampón A de AEC (al menos 10 ml) las fracciones se recogieron y marcaron. Se eluyó el producto con tampón de elución B (Tris 50 mM, 600 mM NaCl, pH 8.0), se recogieron y marcaron la primera fracción de 0.5 ml y después las fracciones de 0.5— 1 ml a 2.0 ml/min. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación.

Alternativamente la purificación se puede realizar mediante SE— HPLC (por ejemplo, para separar los conjugados de EPO si el CA usado tiene un peso molecular alto, por ejemplo, 39kDa). La concentración de proteínas se analizó por UV (280 nm) (Abs de 1 mg/ml de EPO es de aproximadamente 0.743). Se tomaron muestras para SDS— PAGE.

30 Se sacó una alícuota para ensayo de proteínas y ensayo de CA. La solución restante se almacenó a -20°C hasta el uso. Los productos se caracterizaron mediante SDS— PAGE. Se usó para determinar la actividad de las muestras de EPO y NG EPO al inducir la proliferación *in vitro* de células progenitoras de eritrocitos aislados del bazo de un ratón dejado anémico artificialmente a través de inyección I.P. de fenilhidrazina. El protocolo se adaptó basado en el método reportado por Krystal. El ensayo depende de la adición de EPO a los progenitores de eritrocitos y la medición de la
35 velocidad de replicación del ADN mediante la determinación de la velocidad de incorporación de ^3H — timidina. Los estudios de farmacocinética (PK) y farmacodinámica *in vivo* se realizaron en ratones B6D2F1.

3.2. Preparación de conjugados de EPO— CA (Aleatorio)

40 (Ejemplo de Referencia)

La EPO se suministró como una solución (0.34 mg/ml en tampón 10 mM fosfato de sodio 130 Mm NaCl pH 7.0; actividad específica: 110,000 U/mg, pm 30600) y almacenó a -32°C , la proteína se descongeló a $2-8^\circ\text{C}$ y la cantidad necesaria se tomó en un tubo Eppendorf de 2 ml. La cantidad necesaria de ácido colomínico se tomó y se añadió la solución de proteína a CA sólido y se mezcló suavemente. Se añadió el volumen necesario de solución de
45 cianoborohidruro de sodio para tener 50 mM o 3.17 mg/ml en la mezcla de reacción, se agitó en vórtice y comprobó el pH de la mezcla de reacción final; si fuera necesario, se ajustó el pH a 7.4. El tubo se selló herméticamente y se agitó a la temperatura deseada ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 24 horas. Después de la incubación, se tomaron las muestras necesarias (por ejemplo, para el ensayo de actividad, SDS— PAGE, SE— HPLC).

50 3.2.1. Purificación y caracterización de conjugados de EPO— CA (Aleatorio)

La muestra de la mezcla de reacción restante se diluyó con tampón A1 de HIC (3M sulfato de amonio, pH 6.3) de manera que una concentración final de 2 M resulta y se cargó en la columna de HIC previamente equilibrada con
55 tampón A de HIC a una velocidad de 1.5 ml/min a RT. La fracción de carga se recogió y marcó. La columna se lavó con tampón A2 de HIC (2 M sulfato de amonio, pH 6.3) (al menos 6 volúmenes de columna), las fracciones de lavado se recogieron y marcaron. Se eluyó el producto con tampón B de HIC (50 mM Na_2HPO_4 pH 7.4), se recogieron y marcaron la primera fracción de 0.5 ml y después las fracciones de 0.5— 1 ml (6CV). Las muestras se mantuvieron en hielo ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante la purificación.

60 La concentración de proteínas se analizó mediante UV (280 nm) (Abs de 1 mg/ml de EPO es de aproximadamente 0.743). Se tomaron las muestras para SDS— PAGE. La separación de la EPO no conjugada se realizó usando cromatografía de intercambio aniónico (AXC) si el Mw de CA es demasiado pequeño (por ejemplo, 22 kDa) para la separación del conjugado y la EPO mediante SE— HPLC. Para AXC se diluyeron las fracciones de HIC que contienen la proteína con tampón A de AXC (50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 8.0) (1 ml de muestra + 5 ml de tampón A de AXC) y se
65 cargaron a la columna AXC pre— equilibrada con tampón A de AXC a 1.0 ml/min. Las fracciones de carga se recogieron y marcaron. La columna se lavó con tampón A de AXC (al menos 10 ml) las fracciones se recogieron y marcaron. Se

eluyó el producto con tampón de elución (Tris 50 mM, 600 mM NaCl, pH 8.0), se recogió la primera fracción (0.5 ml) y después las fracciones de 0.5– 1 ml a 2.0 ml/min y marcaron. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación.

5 La purificación alternativa se puede realizar mediante SE– HPLC (por ejemplo, para separar los conjugados de EPO si el CA usado tiene un peso molecular alto, por ejemplo, 39kDa). La concentración de proteínas se analizó por UV (280 nm) (Abs de 1 mg/ml de EPO es de aproximadamente 0.743). Se tomaron las muestras para SDS– PAGE.

3.3. Química de Glycon

10

(Ejemplo de Referencia)

15

El ácido colomínico hidrazida se disolvió en la solución de EPO para obtener la concentración de Ca final de 10 mM. El pH de la solución se ajustó a 5.5. Se añadió el volumen necesario de solución de NaIO₄ en solución NaOAc para obtener la concentración final de 5 mM NaIO₄. La reacción se detuvo con NaHSO₃ (concentración final de NaHSO₃ que sea 20 mM). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente. Finalmente se añadió el volumen necesario de solución de NaCNBH₃ en solución NaOAc para dar la concentración final de 50 mM NaCNBH₃. La reacción se continuó a 4±1°C en un agitador durante una hora. Después de la incubación se tomaron las muestras necesarias para SDS, SE– HPLC, ensayo de actividad.

20

3.3.1. Purificación y caracterización de conjugados de EPO– CA (química Glycon)

25

La muestra de la mezcla de reacción restante se diluyó con tampón A1 de HIC (3 M sulfato de amonio, pH 6.3) de manera que una concentración final de 2 M resulta y se cargó en la columna de HIC equilibrada previamente con tampón A de HIC a una velocidad de 1.5 ml/min a RT. La fracción de carga se recoge y se marca (L₁– L_x). La columna se lavó con tampón A2 de HIC (2 M sulfato de amonio, pH 6.3) (al menos 6 volúmenes de columna) y se recogieron y marcaron las fracciones. El producto se eluyó con tampón B de HIC (50 mM Na₂HPO₄ pH 7.4), se recogieron y marcaron la primera fracción de 0.5 ml y después las fracciones de 0.5– 1 ml (6CV). Las muestras se mantuvieron en hielo (4±1°C) durante la purificación.

30

La concentración de proteínas se analizó mediante UV (276 nm) (Abs de 1 mg/ml de EPO fue aproximadamente 0.743). Se tomaron las muestras para SDS– PAGE. La separación de la EPO no conjugada se realizó usando cromatografía de intercambio aniónico (AXC) si el PM de CA es demasiado pequeño (por ejemplo, 22 kDa) para la separación del conjugado y la EPO mediante SE– HPLC. Para AXC se diluyeron las fracciones de HIC que contienen la proteína con tampón A de AXC (50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 8.0) (1 ml de muestra + 5 ml de tampón A de AXC) y se cargaron a la columna AXC pre– equilibrada con tampón A de AXC a 1.0 ml/min. Las fracciones de carga se recogieron y marcaron. La columna se lavó con tampón A de AXC (al menos 10 ml) las fracciones se recogieron y marcaron. Se eluyó el producto con tampón de elución (Tris 50 mM, 600 mM NaCl, pH 8.0), se recogieron y marcaron la primera fracción de 0.5 ml y después las fracciones de 0.5– 1 ml a 2.0 ml/min. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación.

40

La purificación alternativa puede hacerse mediante SE– HPLC (por ejemplo, para separar los conjugados de EPO si el CA usado tiene un peso molecular alto, por ejemplo, 39kDa). La concentración de proteínas se analizó por UV (280 nm) (Abs de 1 mg/ml de EPO es de aproximadamente 0.743). Se tomaron las muestras para SDS– PAGE.

45

3.4. PEGilación de la EPO (Ejemplo de referencia):

50

La EPO (30.6kDa) se suministró como una solución (0.954 mg/ml en tampón 10mM acetato de sodio, pH 4.0 que contiene 5% sorbitol, 0.025 mg/ml de polisorbato 80) y se almacenó a 2– 8 ° C. La solución de EPO se concentró para preparar aproximadamente 1.0 mg/ml de solución. La cantidad necesaria de EPO se tomó en un tubo Eppendorf y colocó en hielo. La cantidad de PEG añadido para la conjugación se calculó basándose en la fórmula:

55

$$\text{Peso de PEG} = \frac{\text{Cantidad de proteína (g)}}{(\text{PM de la proteína})} \times (\text{PM de PEG}) \times (\text{Exceso molar de PEG})$$

60

La cantidad necesaria de PEG 20K se pesó. Se solubilizó en 10 mM NaOAc, 5% sorbitol, pH 5.5 (20% de volumen del volumen final de reacción como se usa en la presente), la mezcla se agitó en vórtice suavemente hasta que todo el PEG se disolvió y después o bien se filtró en un nuevo eppendorf o se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf para eliminar cualquier material agregado/precipitado. Se añadió una cantidad necesaria de la solución de proteína EPO a la solución de PEG para dar un exceso molar de 25 veces de PEG y se mezcló suavemente, manteniendo la mezcla de reacción en un agitador suave a 4±1°C. Se añadió el volumen necesario de solución 100 mg/ml NaCNBH₃ para tener 50 mM o 3.17 mg/ml en la mezcla de reacción final, se mezclaron suavemente y el pH de la mezcla de reacción final se comprobó, y si fuera necesario se ajustó a 5.5 con 1 M NaOH/HCl a 4±1°C. Finalmente el volumen de la reacción se ajustó usando 20 mM NaOAc, 5% de sorbitol, y pH 5.5 para dar una

65

concentración de proteína de 1 mg/ml en la mezcla de reacción. El tubo se selló herméticamente y se agitó a la temperatura deseada ($4\pm 1^\circ\text{C}$) durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante un método adecuado y se tomaron las muestras para la actividad *in vitro*, SDS– PAGE (usando gel 4– 20% Tris– glicina), SE– HPLC (columna superosa 6) y se comprobó el pH de la mezcla de reacción. Para eliminar cualquier precipitado la mezcla de reacción se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min antes del análisis SE– HPLC y la purificación, el tampón preferido para SE– HPLC fue 0.1 M fosfato de sodio (pH 6.9). Los resultados se muestran en la Figura 5.

3.5 Preparación de conjugados N– terminal de eritropoyetina no glicosilada (NG EPO– CA)

NG EPO se suministró como una solución (0.18 mg/ml en tampón 20 mM fosfato de sodio 300mM NaCl pH 6.65; actividad específica 100000 U/mg; pm. 19000) y almacenó a -32°C , la proteína se descongeló a $2-8^\circ\text{C}$ y se tomó la cantidad necesaria en un eppendorf de 2 ml. La cantidad de ácido colomínico (por ejemplo, ácido colomínico oxidado o no oxidado) necesario para la conjugación se calculó. La cantidad necesaria de ácido colomínico se pesó La solución de proteína se añadió a CA sólido y se mezcló suavemente. Se añadió el volumen necesario de solución de cianoborohidruro de sodio a la mezcla de reacción de manera que la concentración final de cianoborohidruro de sodio debe ser de 50 mM o 3.17 mg/ml en la mezcla de reacción. La mezcla de reacción final se agitó en vórtex y se comprobó el pH; si fuera necesario el pH se ajustó a 7.4. El tubo se selló herméticamente y se agitó a la temperatura deseada ($4\pm 1^\circ\text{C}$) durante 24 horas. Después de la incubación, se tomaron las muestras necesarias para el ensayo de actividad, SDS– PAGE, SE– HPLC etc.

3.5.1 Purificación y caracterización de conjugados de NG EPO– CA

La muestra de la mezcla de reacción restante se diluyó con tampón A de HIC (1.2 M sulfato de amonio, pH 6.3) (1 ml de muestra + 4 ml de tampón A) y se cargó en la columna de HIC previamente equilibrada con tampón A de HIC. Las fracciones de la carga se recogieron y marcaron. La columna se lavó con tampón A de HIC (al menos 10 ml). Las fracciones de lavado se recogieron y marcaron. El producto se eluyó con tampón B de HIC, se recogieron y marcaron la primera fracción de 0.5 ml y después las fracciones de 0.5– 1 ml. Las muestras se mantuvieron en hielo durante la purificación. La concentración de proteína se analizó mediante UV (280 nm) (Abs de 1 mg/ml de nEPO fue aproximadamente 0.743). Se tomaron las muestras para SDS– PAGE. Las condiciones de reacción condujeron a NG EPO libre no significativa en la mezcla de reacción por lo que no fue necesaria purificación adicional. Si se presentó NG EPO en la mezcla de reacción, las fracciones de HIC que contienen proteínas se concentraron usando Vivaspin 6 (5000 MWCO) y la purificación se realizó mediante SE– HPLC. La concentración de proteína se analizó mediante UV (280 nm) (Abs de 1 mg/ml de NG EPO es aproximadamente 0.743). Se tomaron las muestras para SDS– PAGE.

Se sacó una alícuota para ensayo de proteínas y ensayo de CA. Se almacenó el restante a -20°C hasta el uso. El producto se caracterizó mediante SDS– PAGE.

3.6. SE– HPLC de las formulaciones de EPO

La HPLC se realizó en un Cromatógrafo Líquido (Jasco) equipado con un Jasco, AS– 2057 más automuestreador refrigerado a 4°C , y un detector Jasco UV– 975 UV/VIS. Los datos se registraron mediante el software EZChrom Elite en una IBM/PC. Las muestras de la SEC se analizaron con una fase móvil isocrática de 0.1 M fosfato de Na, pH 6.9; en una columna de Superosa 6 (Figura 5). La Figura 6 muestra un solo pico a $RT=76.408$, lo cual se atribuye a la EPO.

La tabla de los picos para la SEC que se muestra en el lado izquierdo de la Figura 5 es como sigue:

Pico	RT	Área %	Especies
1	33.896	13.9	Agregado
2	60.871	85.7	CA38K– EPO
3	76.229	0.4	EPO

Tabla 1

3.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, inmunoelectrotransferencia y ELISA

SDS– PAGE se realizó usando 4– 20% de geles con triglicina. Las muestras se diluyeron con tampón ya sea reductor o no reductor y 5.0 ug de proteína se cargó en cada pocillo. Los geles se corrieron en un sistema tampón triglicerina y se tiñó con azul de Coomassie. La inmunoelectrotransferencia se realizó usando el anticuerpo anti PSA (Figura 4). La Figura 4 muestra la SDS– PAGE de las formulaciones de EPO (específica de sitio; N– terminal).

3.8. Actividad *in vitro*

Se usó para determinar la actividad de las muestras de EPO al inducir la proliferación *in vitro* de células progenitoras de

eritrocitos aisladas del bazo de un ratón dejado anémico artificialmente a través de la inyección I.P. de fenilhidrazina. El protocolo se adaptó basado en el método reportado por Krystal. El ensayo depende de la adición de EPO a los progenitores de eritrocitos y la medición de la velocidad de replicación del ADN mediante la determinación de la velocidad de incorporación de ³H— timidina.

5

3.9. Estudios de estabilidad

Los conjugados de EPO estériles se almacenaron en 20 mM fosfato de sodio, pH 7.4; 5% sorbitol y 0.025 mg/ml Tween 20; a 4°C durante seis semanas. SE— HPLC de las muestras se realizó usando columnas de SEC bajo las siguientes condiciones: Volumen de inyección 100 ul, velocidad de flujo 0.250 ml/min, tampón de corrida 0.1 M fosfato de sodio, pH 6.9.

10

3.10. Eficacia *in vivo* de las formulaciones de EPO

La eficacia *in vivo* de las formulaciones de EPO se estudió en ratones hembra B6D2F1, de 7— 8 semanas de edad, se inyectó 5— 15 ugs de dosis de proteína (igual actividad) en ratones por vía subcutánea. Los animales se dividieron en siete grupos de cuatro. Las formulaciones de EPO se les dieron a cada animal de cada grupo de la siguiente manera; EPO, conjugados de EPO— PSA, PBS, Aranesp (5 µg). 50 µl de sangre se tomó de cada animal y se analizó mediante FACS después de la tinción con colorante para el conteo de reticulocitos (Figuras 8 y 9).

15

20

5 µl de sangre total bien mezclada se mezcló con 1 ml de reactivo para el Conteo de Reticulocitos y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Las muestras se analizaron después con la ayuda de la máquina de FACS contando los reticulocitos.

25

3.11. Elisa

La EPO— PSA se capturó por el anticuerpo anti— PSA recubierto sobre la placa. La EPO— PSA capturada se detectó con el anticuerpo anti— EPO de manera que solo se detectó la EPO conjugada con PSA.

30

3.12. Eliminación *in vivo*

La eliminación *in vivo* de la formulación de EPO se estudió en ratones. La cantidad adecuada de dosis de proteína se inyectó a los ratones por vía subcutánea e intravenosa. Las formulaciones de EPO se radiomarcaron con ¹²⁵I y se midió la radioactividad de la muestra de sangre a intervalos frecuentes.

35

Resultados

Activación de CA y determinación del grado de oxidación

Se usó ácido colomínico (CA), un homopolímero lineal alfa— 2,8 enlazado de residuos de ácido N— acetilneuramínico (Neu5Ac). La exposición de los ácidos colomínicos a la oxidación se llevó a cabo durante 15 min usando 20 mM peryodato a temperatura ambiente. La integridad de los residuos Neu5Ac internos alfa— 2,8 enlazado después del tratamiento con peryodato se analizó mediante cromatografía de permeación en gel y los cromatogramas obtenidos para el material oxidado (CAO), se comparó con el de CA nativo. Se encontró que el CA oxidado y nativo exhiben perfiles de elución casi idénticos, sin evidencia de que la etapa de oxidación sucesiva da lugar a la fragmentación significativa de la cadena del polímero.

40

45

La medición cuantitativa del estado de oxidación de CA se realizó mediante la reducción del ion de ferricianuro en solución alcalina a ferrocianuro (Azul de Prusia) [Park y Johnson, 1949] usando glucosa como un estándar. La Tabla 1 muestra que el ácido colomínico oxidado se encontró que tiene una cantidad del agente reductor mayor que la estequiométrica (> 100%), es decir, 112 % en moles de contenido de aldehído aparente que comprende el poder reductor combinado del hemiacetal extremo reductor y el aldehído introducido (en el otro extremo, extremo no reductor).

50

Especies de CA	Grado de oxidación
ácido colomínico (CA)	16.1 ± 0.63
ácido colomínico oxidado (CAO)	112.03 ± 4.97
ácido colomínico reducido (CAOR)	0; No detectable
ácido colomínico oxidado reducido oxidado (CAORO)	95.47 ± 7.11

55

60

65

Tabla 2: Grado de oxidación de varios intermediarios de ácido colomínico en el esquema de doble reacción de oxidación usando glucosa como un estándar (100%, 1 mol de aldehído por mol de glucosa; n=3 ± s.d).

5 Preparación, purificación y caracterización de los conjugados de EPO

El procedimiento para preparar y purificar los conjugados de ácido colomínico (CA) de *Eritropoyetina* (EPO) de manera selectiva *N* terminalmente conduciendo la reacción a un pH reducido (pH 5,5) y pH aleatorio (7.4) y a $4\text{Å}\pm 1\text{Å}^{\circ}\text{C}$ se detalla anteriormente. Esto implica la conjugación en la presencia de cianoborohidruro de sodio, seguido de purificación usando cromatografía de intercambio iónico (AEX) para eliminar la EPO libre seguido de eliminación del CA mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). El pH bajo se usó para favorecer la derivatización selectiva del grupo alfa amino del extremo N- terminal, y además para minimizar la agregación de EPO durante la reacción. La composición del tampón de reacción final fue de 5% sorbitol, 0.5 mg/ml Tween 20 en 10 mM NaOAc a pH 5.5.

15 La formación de los conjugados de EPO- CA se confirmó mediante el SE- HPLC (cambio de tiempo de retención de EPO- CA en comparación con la EPO; además coelución de ambas porciones); cromatografía de intercambio iónico (unión de conjugados en la columna de AEC) y electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE; ensanchamiento y desplazamiento de bandas hacia arriba con especies de alto m.w.) (Figura 4). Las muestras polisialiladas fueron activas *in vitro* y mostraron perfil enormemente superior (PK y PD) a la EPO simple. Las Figuras 11 y 12 muestran los resultados *in vivo*.

La Figura 5, lado izquierdo, muestra la SE- HPLC de la conjugación de EPO- CA 39kDa después de 24 horas. La Tabla 3 es la tabla de análisis de picos. Condiciones de la caracterización: columna Superdex 200, tampón 0.15 M bicarbonato de amonio, pH 7.8.

25

Pico	RT	Ar %	Especies
1	31.421	3.38	Agregado
2	48.346	80.76	CA39- EPO
3	59.204	15.86	EPO

30

Tabla 3

35

El grado de derivatización se encontró que era más en la EPO PEGilada que la EPO polisialilada (Figura 6). Esto puede deberse a la naturaleza inerte de PEG y la naturaleza cargada del ácido siálico. El recuento de reticulocitos a partir de los datos de FACS fue más para el conjugado PSA- EPO que la EPO (Figura 7). Después de la purificación del conjugado EPO- CAO no se observó EPO significativa en el cromatograma de SEC HPLC y la derivatización se demostró por el cambio del tiempo de retención en SE- HPLC y la ampliación y el desplazamiento de las bandas con mayor peso molecular en SDS PAGE. La polisialilación de EPO se demostró además mediante inmunoelectrotransferencia usando un anticuerpo murino anti PSA. El perfil de eliminación *in vivo* de conjugado PSA- EPO se encontró que era superior en comparación con la EPO (Figura 8) cuando se administra IV y el área bajo la curva se aumentó en 7.1 veces. Del mismo modo la dosis subcutánea de EPO- PSA muestra además una mayor retención en comparación con la EPO y el área bajo la curva se aumentó en 2.5 veces. Se encontró además la polisialilación de EPO que es proporcional al tiempo de incubación para la mezcla de reacción, el exceso molar y el pH. En el perfil de eliminación *in vivo* (intravenoso y subcutáneo) para NG EPO polisialilada se encontró que era mejor que la NG EPO (Figuras 11 y 12). En algunos geles SDS fue visto además dipolisialilación de EPO. Los conjugados de EPO- PSA se confirmaron además mediante el método ELISA (Figuras 14 y 15). Se encontró el fenómeno de eritropoyesis que es mayor con el conjugado EPO- PSA en comparación con la EPO y se encontró que era proporcional al peso molecular del polímero a partir de 6 a 15 kDa (Figura 18). Se encontró que 15 kDa es la longitud de cadena óptima para la EPO mientras que con cadenas más pesadas de ácido siálico se reduce el fenómeno de la eritropoyesis. Esto puede deberse a la naturaleza del polímero cargado negativamente lo que resulta en la repulsión del receptor. Este estudio se confirmó con la ayuda de la Figura 18. Se encontró que Emax de Aranesp es mucho mayor que EPO- PSA lo que no es clínicamente bueno y conduce a la trombosis y puede causar el agotamiento de la médula ósea y se encontró además que disminuye los reticulocitos por debajo de la línea de base después del tratamiento. Se encontró que EPO- PSA es muy superior a la EPO y se encontró que la EPO- PSA es tan buena como la EPO- PEG y que la EPO- PSA conduce además a la eritropoyesis constante.

60 Se encontró que los conjugados de PSA son activos en el ensayo de actividad *in vitro*. El estudio de eficacia *in vivo* muestra que los conjugados PSA- EPO son tan buenos como los conjugados de PEG y ampliamente superior a la EPO (Figura 8 y 9).

65 La formación de los conjugados de NG EPO- CA se confirmó mediante la SE- HPLC (cambio del tiempo de retención de NG EPO- CA en comparación con NGEPO; co- elución además de ambas porciones); cromatografía de intercambio iónico (unión de conjugados en la columna de AEC) y electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE;

desplazamiento de bandas con especies de alto pm). Las Figuras muestran esa conjugación EPO– CA 39kDa después de 24 horas. Las muestras polisialiladas fueron activas *in vitro* y demostraron perfil enormemente superior (PK y PD) a NGepo simple.

5 La Figura 10 muestra los resultados de SE– HPLC. El análisis de los picos se muestra en la tabla 4 más abajo. Condiciones de la caracterización columna Superdex 200, tampón 0.15 M bicarbonato de amonio, pH 7.8.

Pico	RT	Ar %	Especies
1	31.863	3.41	agregado
2	33.212	6.65	agregado
3	42.667	14.72	(CA) ₂ – nEPO
4	48.571	74.49	CA– n EPO
5	68.183	0.73	nEPO

Tabla 4

La Figura 12 muestra los resultados de la eliminación *in vivo*. PSA– NG EPO mostró un perfil muy superior en comparación con NG EPO.

25 La Tabla 5 muestra los valores de varios parámetros usados y la tabla 6 da el peso molecular y la polidispersidad de las fracciones CA.

Parámetros	Valores
Mn (Da)	26,666
PM (Da)	27,956
Mz (Da)	31,129
Mp (Da)	22,969
PM/Mn	1.048
IV (dl/g)	0.2395
Rh (nm)	4.683
Ramificaciones	0.00
Concentración de la Muestra (mg/ml)	5.600
Recobrado de la Muestra (%)	90.71
dn/dc (ml/g)	0.156
dA/dc (ml/g)	0.000
Mark– Houwink a	– 0.048
Mark– Houwink logk	– 0.425

Tabla 5

Fracción CA	PM (kDa)	pd
475	97.2	1.285
450	52.3	1.109
425	37.9	1.062
400	28.0	1.048
375	19.0	1.080
*350	14.5	—
*300	10.0	—
*250	7.0	—

Tabla 6

20 Referencias

Fernandes, A.I., Gregoriadis, G., Synthesis, characterization and properties of polysialylated catalase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1293 (1996) 92– 96

25 Fernandes, A.I., Gregoriadis, G., Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1341 (1997) 26– 34.

Gregoriadis, G., McCormack, B., Wang, Z., Lively, R., Polysialic acids: potential in drug delivery, *FEBS Letters*, 315 (1993) 271– 276.

30 Jain y otros, Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity in vivo, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1622 (2003) 42– 49.

Jain y otros, The natural way to improve the stability and pharmacokinetics of protein and peptide drugs. *Drug delivery systems and sciences*, 4(2), (2004) 3– 9. Krystal

35 Martindale, *The extra pharmacopoeia*, Trigésimo primera edición, Royal Pharmaceutical Society, Londres, 1996, 762– 763.

40 Park, J.T., Johnson, M.J., A submicrodetermination of glucose, *Journal of Biological Chemistry*, 181 (1949) 149– 151.

Shriner, R. L., Fuson, R.D.C., Curtin, D.Y., Morill, T.C., *The Systematic Identification of Organic Compounds*, 6ta ed., Wiley, Nueva York, 1980.

45 Svennerholm, L., Quantitative estimation of sialic acid II: A colorimetric resorcinol– hydrochloric acid method, *Biochimica et Biophysica Acta*, 24 (1957) 604– 611.

Wang, W., Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *International Journal of Pharmaceutics*, 185(1999) 129– 188.

50 Fan y otros, *Exp Hematol*. 2006 Oct; 34(10): 1303– 11.

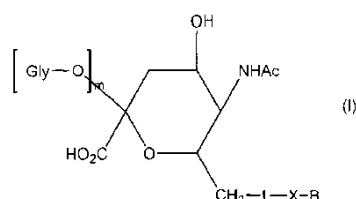
Lista de secuencias

5 <110> Lipoxen Technologies Ltd
 <120> Derivatización de EPO
 <130> HMJ04369WO
 10 <150> EP06117830.7
 <151> 2006- 07- 25
 <160> 1
 15 <170> Patentin versión 3.3
 <210> 1
 <211> 193
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
 20 25 30
 Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
 35 40 45
 Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
 50 55 60
 Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
 65 70 75 80
 Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
 85 90 95
 Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
 100 105 110
 Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
 115 120 125
 Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
 130 135 140
 Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
 145 150 155 160
 Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
 165 170 175
 Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
 180 185 190
 Arg

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que es un derivado de polisacárido N- terminal de la eritropoyetina (EPO), o de una proteína similar a EPO, la proteína similar a EPO es un homólogo de EPO que tiene al menos 50% de la actividad de la EPO y tiene 90% o más de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos con los residuos 28- 193 de la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el polisacárido es ácido polisiálico y comprende entre 2 y 200 unidades de sacárido.
- 10 2. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 en donde el PSA consiste esencialmente solamente de unidades de ácido siálico.
3. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde la EPO o proteína similar a EPO es glicosilada o no glicosilada.
- 15 4. Un compuesto de conformidad con cualquier reivindicación anterior que tiene la fórmula general (I)



- 25 en donde m es al menos uno;
 XB se deriva de B- XH que es EPO o una proteína similar a EPO en donde XH es NH₂ y es el N- terminal de la proteína;
 L es un enlace, un grupo de enlace, o comprende un polipéptido o un oligómero sintético;
 GlyO es una unidad de sacárido aniónico,
 en donde el grupo de enlace, si está presente, es de la fórmula general - Y- C(O)- R¹- C(O)- ;
 en donde Y es NR² o NR²- NR²;
 R¹ es un radical orgánico difuncional seleccionado del grupo que consiste en alcanodiilo, arileno, alcarileno,
 30 heteroarileno y alquilheteroarileno, cualquiera de los cuales se sustituye opcionalmente y/o interrumpe por carbonilo, éster, sulfuro, éter, amida y/o enlaces de amina;
 y R² es H o C₁₋₆ alquilo.

- 40 5. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 4, en donde L es un enlace o es un grupo

- 45 6. Un compuesto de conformidad con cualquier reivindicación anterior en donde la EPO, o proteína similar a EPO, es glicosilada y comprende 2- 100 unidades de sacárido o 10- 80 unidades de sacárido o 20- 60 unidades de sacárido o 40- 50 unidades de sacárido.
- 50 7. Un compuesto de conformidad con cualquier reivindicación anterior en donde la EPO, o proteína similar a EPO, es no glicosilada y comprende 80- 180 unidades de sacárido o 100- 150 unidades de sacárido o 120- 145 unidades de sacárido o 130- 140 unidades de sacárido.
- 55 8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1- 7 y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
9. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1- 7 o la composición farmacéutica de la reivindicación 8 para uso en la terapia.
- 60 10. Un método para producir una población de derivados de ácido polisiálico (PSA) N- terminal de la eritropoyetina (EPO) o de una proteína similar a EPO, siendo la proteína similar a EPO un homólogo de EPO que tiene al menos 50% de la actividad de la EPO y que tiene 90% o más de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos con los residuos 28- 193 de la sec. con núm. de ident.: 1, el método comprende las etapas de:
 - a) reaccionar químicamente el grupo amino terminal de la proteína EPO o similar a EPO con PSA o intermediario de la reacción en una primera solución acuosa de pH ácido; en donde el PSA comprende 2- 200 unidades de sacárido; y en donde el PSA tiene un aldehído reactivo en el extremo reductor y un extremo no reductor pasivado de manera que no reacciona con la proteína EPO o similar a EPO; y

- b) purificar la población de los derivados de PSA amino— terminal resultantes de la EPO o proteína similar a EPO en una segunda solución acuosa de pH mayor que la primera solución acuosa;
- 5 en donde al menos el 85% de los derivados de PSA de EPO o proteína similar a EPO se derivatizan solo en el extremo N— terminal de la EPO o proteína similar a EPO.
11. Un método de conformidad con la reivindicación 10 en donde la reacción de derivatización se lleva a cabo bajo condiciones de reducción.
- 10 12. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10— 11 en donde el pH de la primera solución acuosa está en un intervalo de pH de 4.0 a 6.0 y la segunda solución acuosa es de un pH mayor que la primera solución acuosa, o en donde el pH de la primera acuosa solución está en un intervalo de pH de 4.0 a 6.0 y el pH de la segunda solución acuosa está en un intervalo de pH de 6.5 a 9.0, o en donde el pH de la primera solución acuosa está en un intervalo de pH de 4.0 a 6.0 y el pH de la segunda solución acuosa está en un intervalo de pH de 6.5 a 8.5, o en donde el pH de la primera solución acuosa está en un intervalo de pH de 4.0 a 6.0 y el pH de la segunda solución está en el acuosa está en un intervalo de 6.5 a 8.0.
- 15 13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10— 12, que se lleva a cabo en presencia de un aditivo de la formulación seleccionado de uno o más tampones, estabilizadores, tensioactivos, sales, polímeros, iones metálicos, azúcares, polioles o aminoácidos.
- 20 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 en donde el aditivo de la formulación es un tampón y el tampón es fosfato de sodio/acetato.
- 25 15. Un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10— 14 en donde el PSA tiene un grupo aldehído reactivo que se convierte en una etapa de reacción preliminar en una amina, que se hace reaccionar después con un reactivo bifuncional que comprende al menos un grupo funcional seleccionado de N— maleimida, vinilsulfona, N— yodoacetamida, grupo ortopiridilo o N— hidroxisuccinimida, para formar un intermediario de reacción, en donde el intermedio de reacción se hace reaccionar con la EPO o proteína similar a EPO.
- 30 16. Una composición que comprende una población de derivados de ácido polisialico (PSA) de la eritropoyetina (EPO), o de una proteína similar a EPO, siendo la proteína similar a EPO un homólogo de EPO que tiene al menos 50% de la actividad de la EPO y que tiene 90% o mayor identidad de secuencia a nivel de aminoácidos con los residuos 28— 193 de la sec. con núm. de ident.: 1,
- 35 en donde el PSA comprende entre 2 y 200 unidades de sacárido y
- en donde al menos el 85% de los derivados de PSA de EPO o proteína similar a EPO se derivatizan solo en el extremo N— terminal de la EPO o proteína similar a EPO.
- 40 17. Una composición de conformidad con la reivindicación 16, en donde los derivados de PSA de EPO o proteína similar a EPO son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1— 9.
- 45 18. Una composición de conformidad con la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en donde el PSA comprende al menos 5 unidades de sacárido o al menos 10 unidades de sacárido o al menos 50 unidades de sacárido.
19. Una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16— 18, en donde la polidispersidad del PSA es menos de 1.3 o es menos de 1.2 o es 1.01.
- 50 20. Una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16— 19, en donde el PSA tiene un peso molecular promedio en el intervalo de 2 a 50 kDa.
21. Una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16— 20 en donde el PSA consiste esencialmente solo de unidades de ácido siálico.
- 55 22. Una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16— 21 en donde la EPO o proteína similar a EPO se derivatiza por el PSA en la unidad terminal reductora del PSA.
- 60 23. Una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16— 22, que es una composición farmacéutica y comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
24. Una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16— 23 para su uso en terapia.

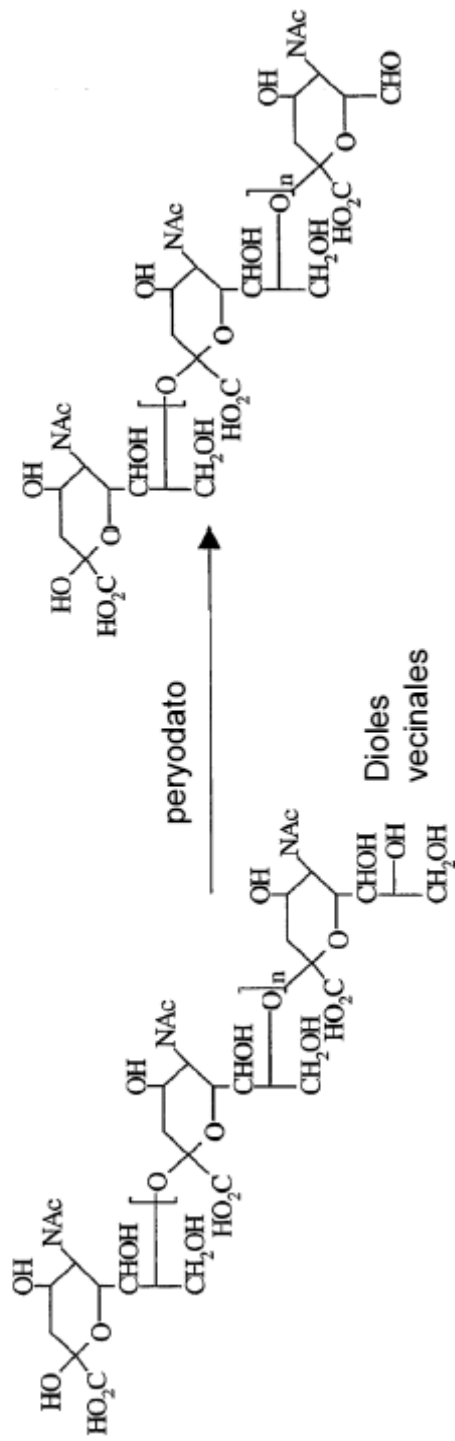


Figura 1

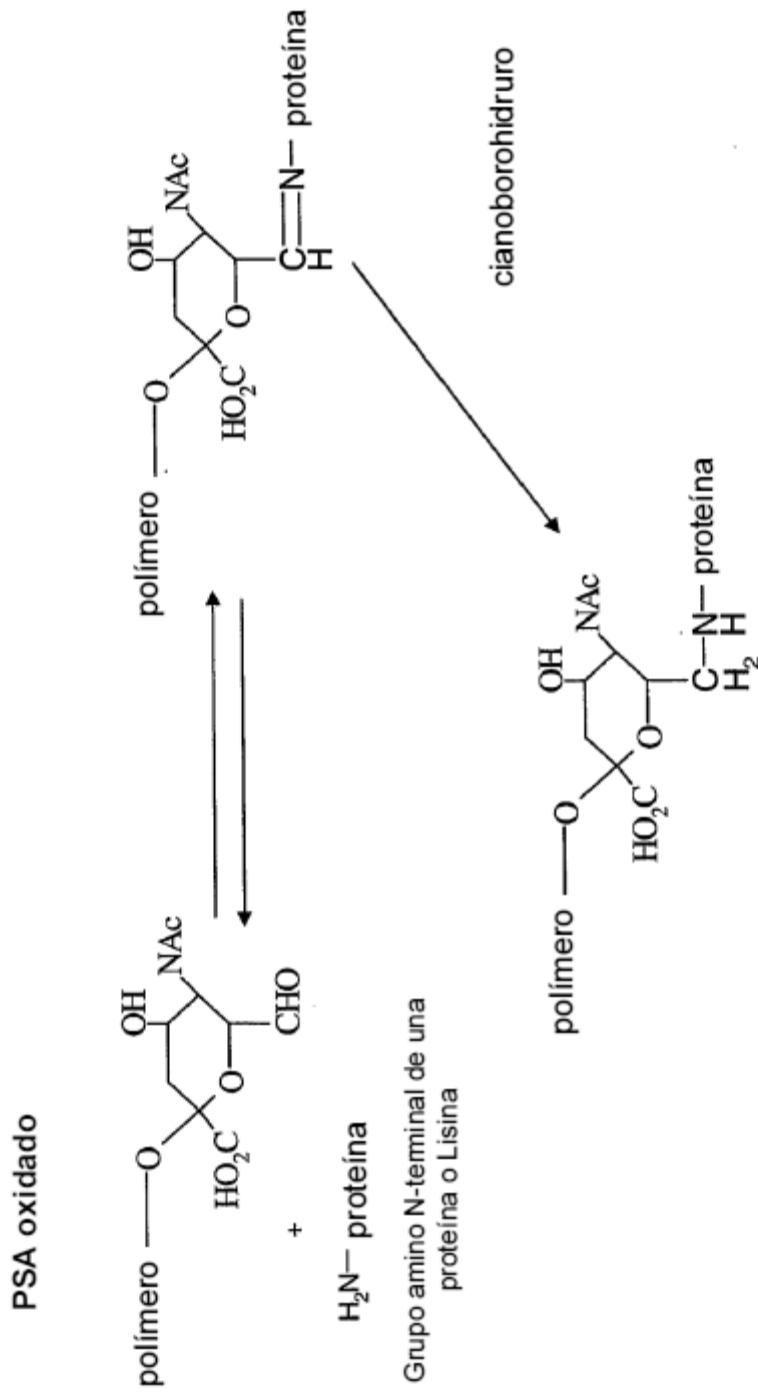


Figura 2

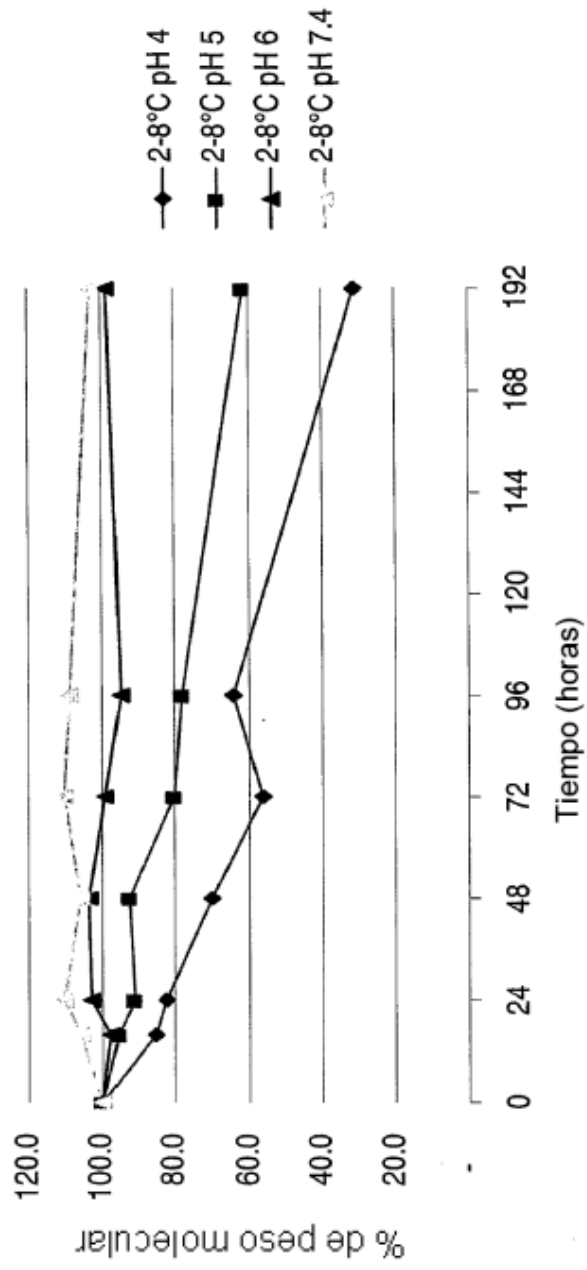


Figura 3a

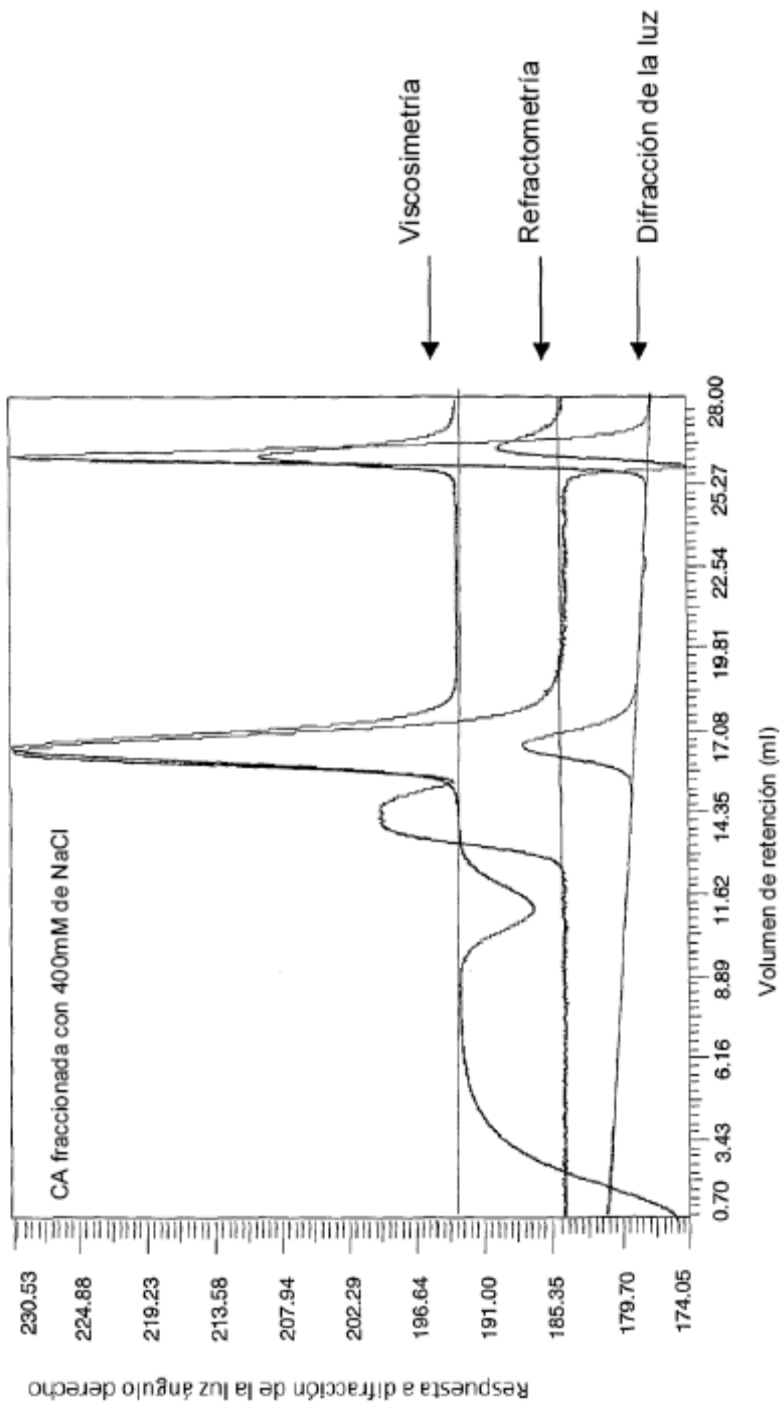
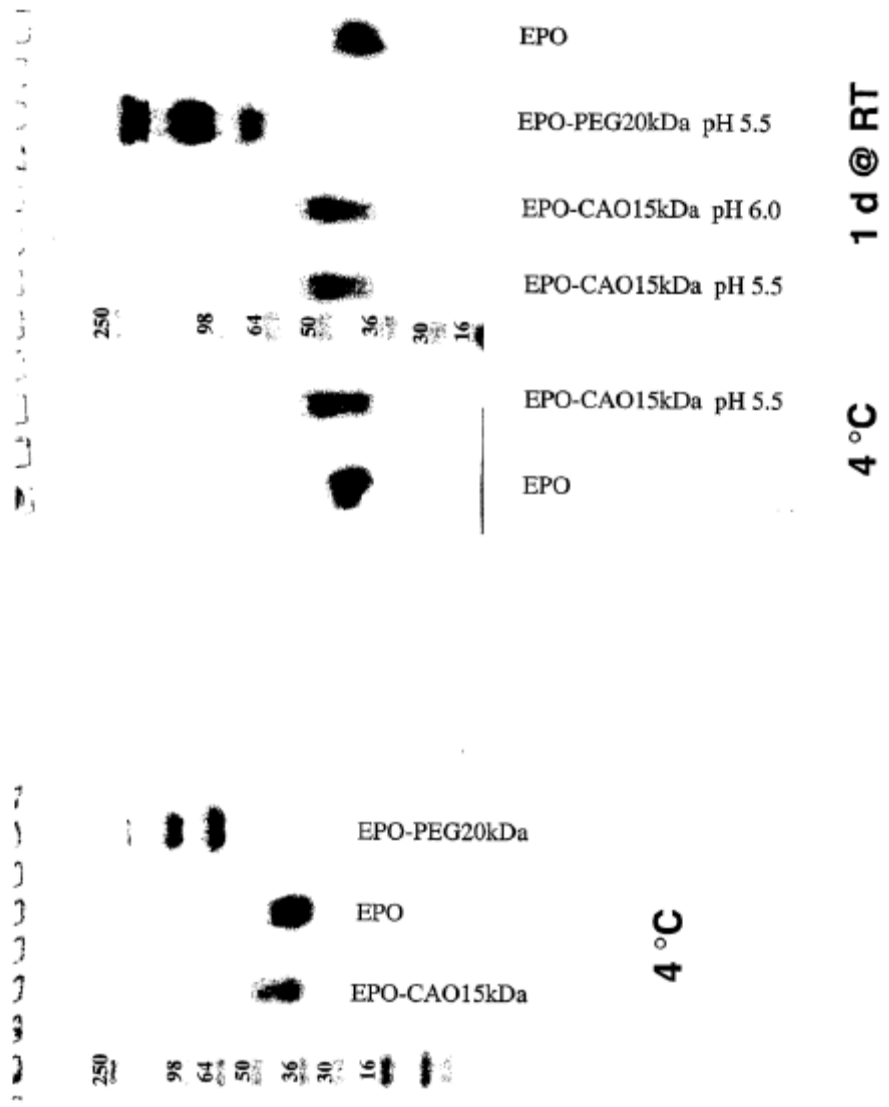


Figura 3b

Figura 4



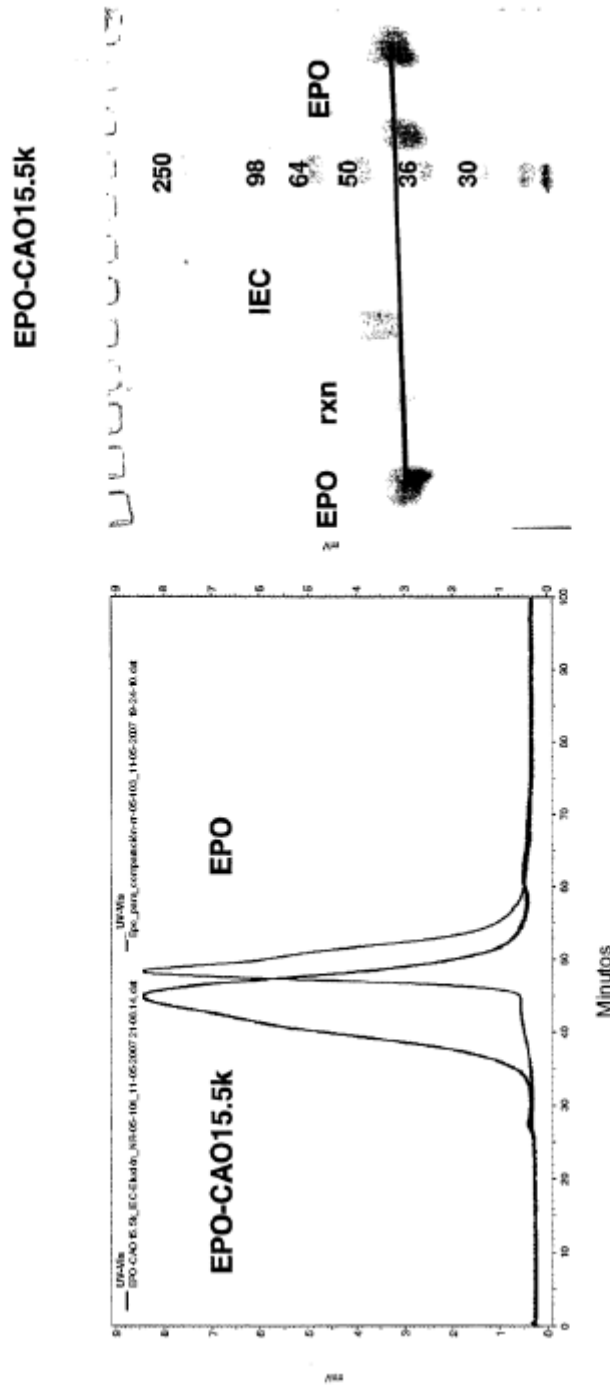


Figura 5

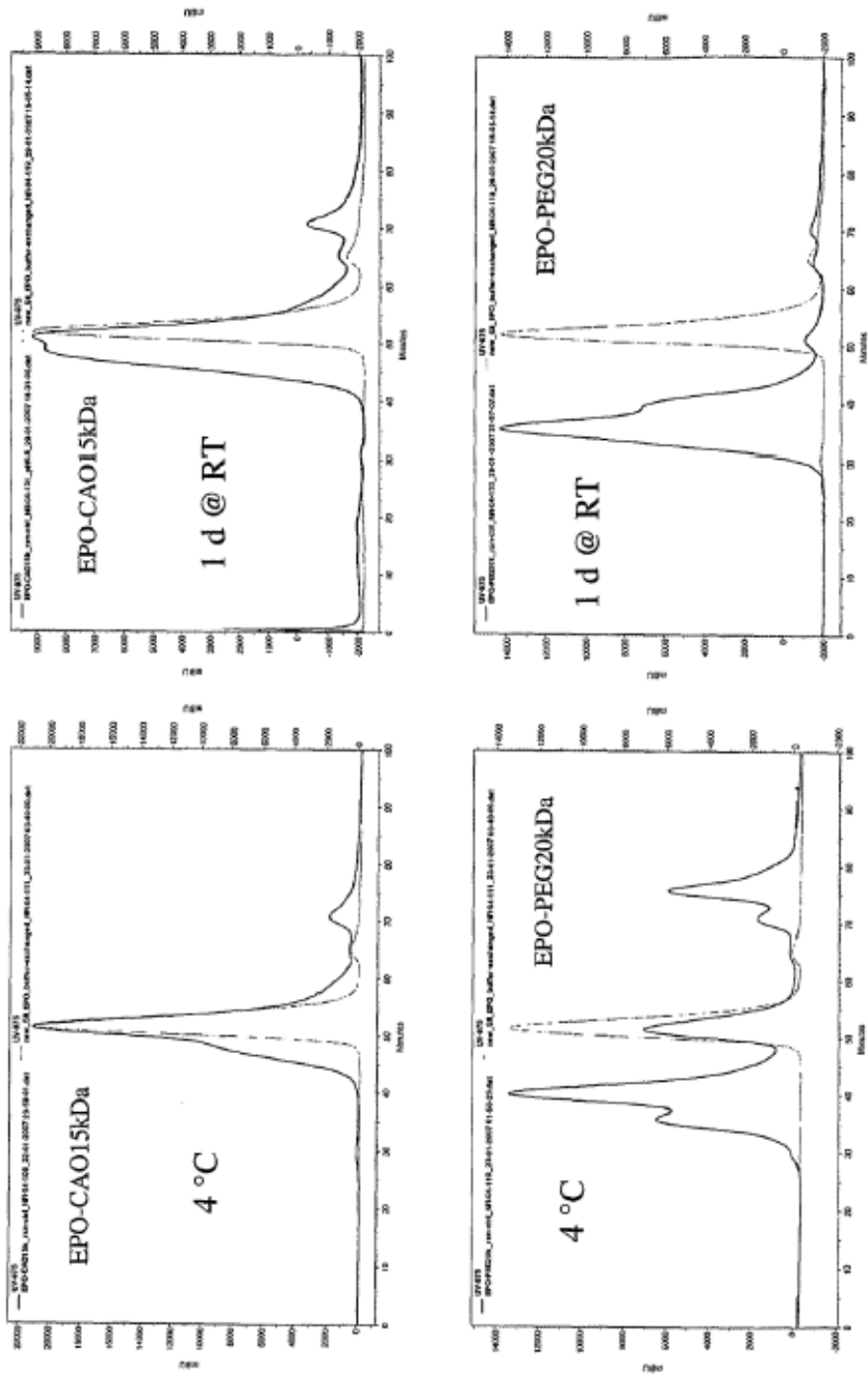


Figure 6

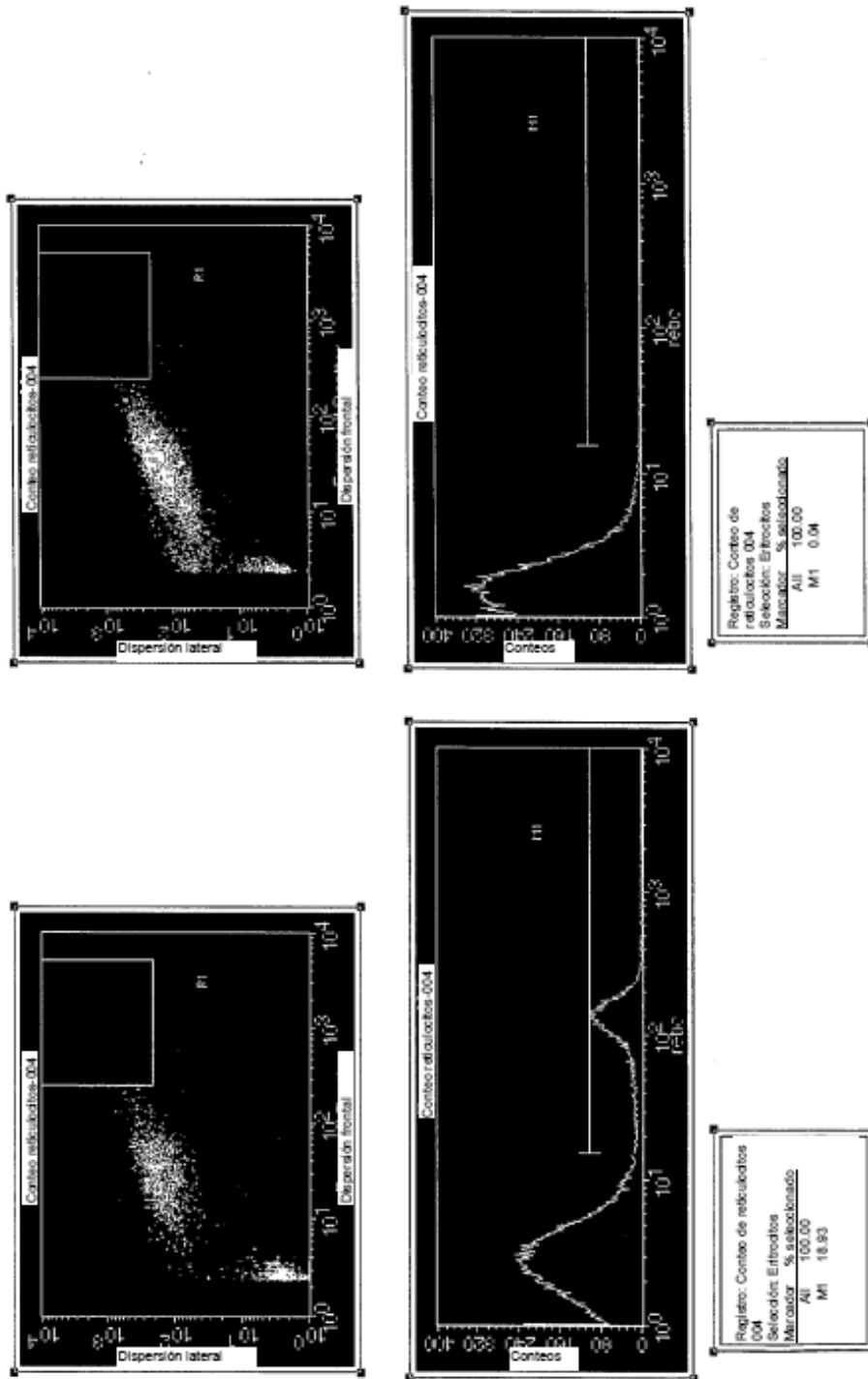


Figura 7

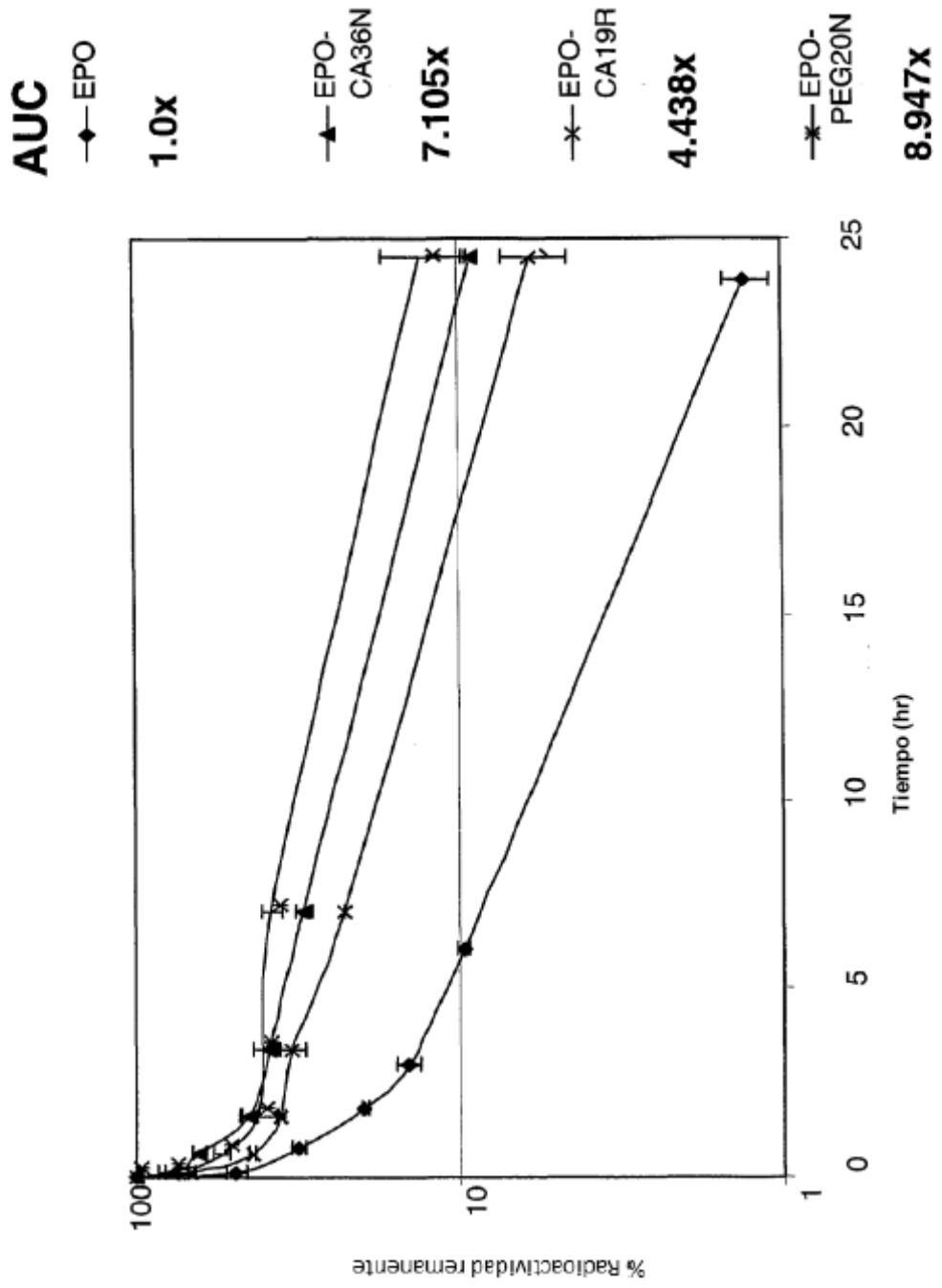


Figura 8

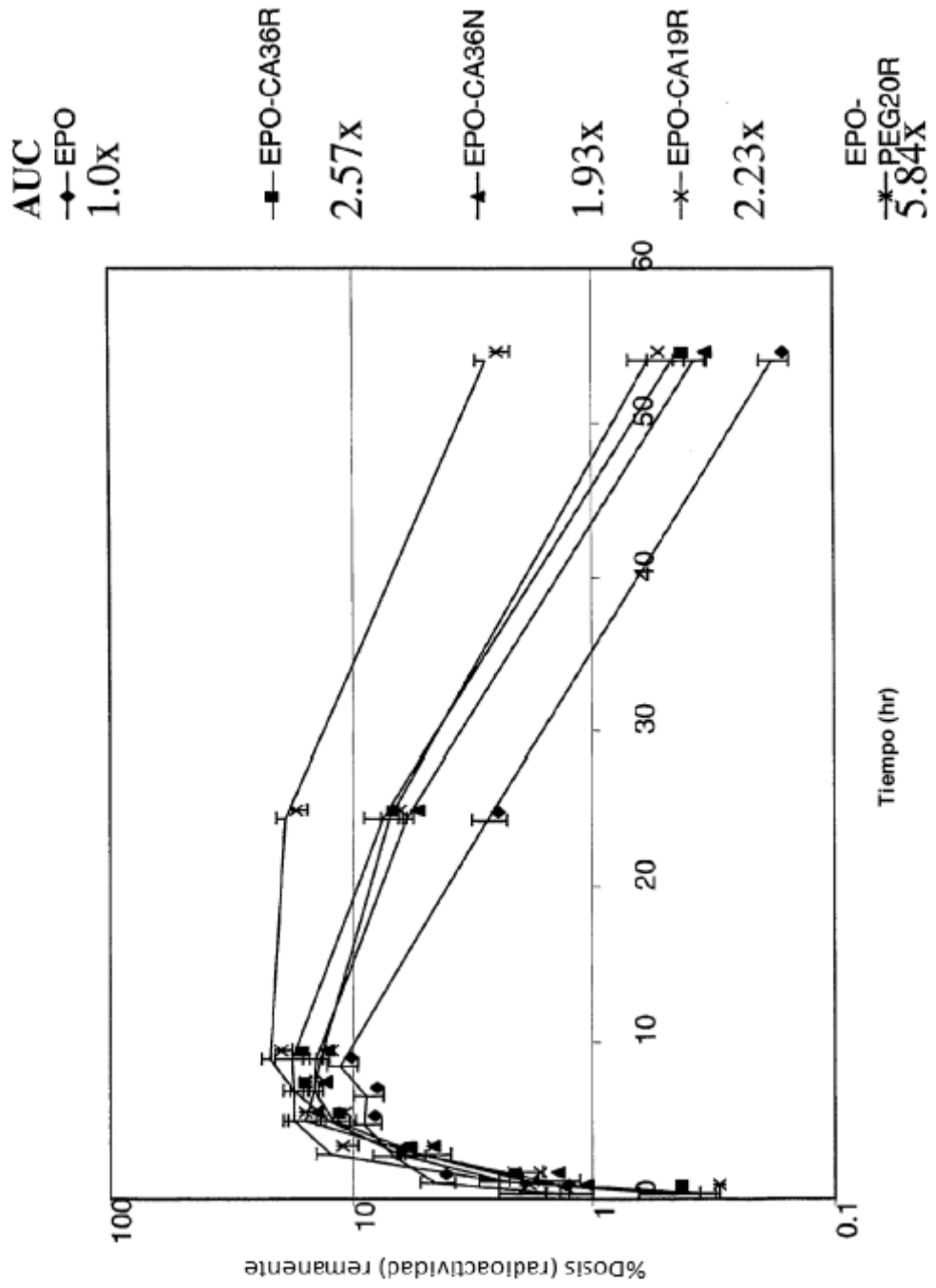


Figura 9

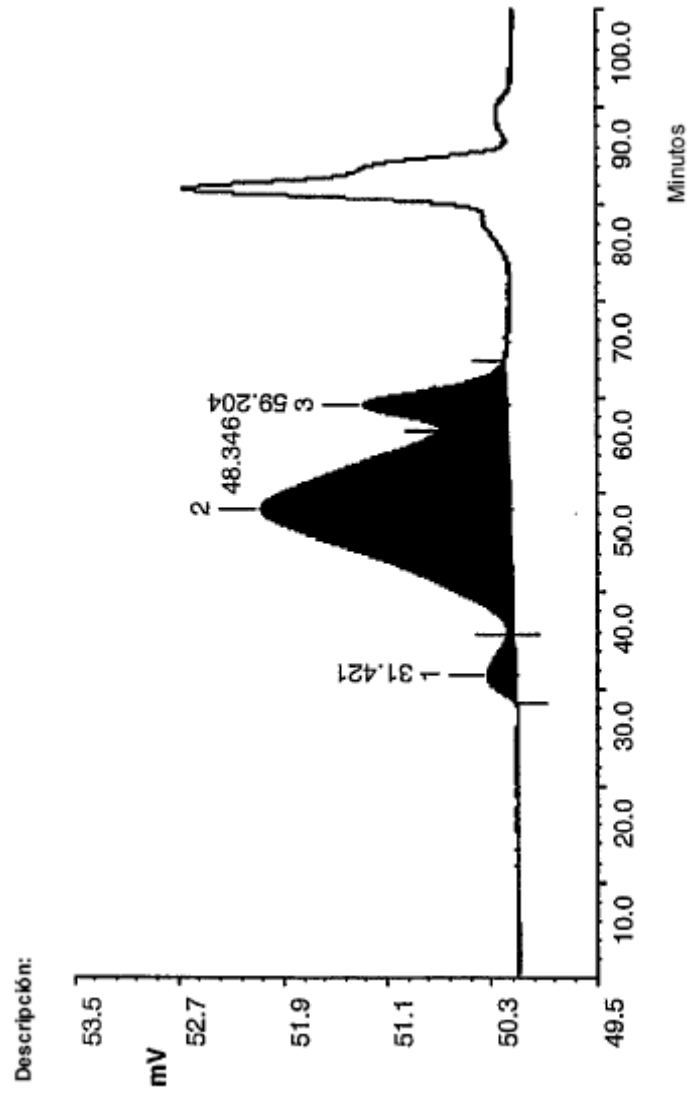


Figura 10

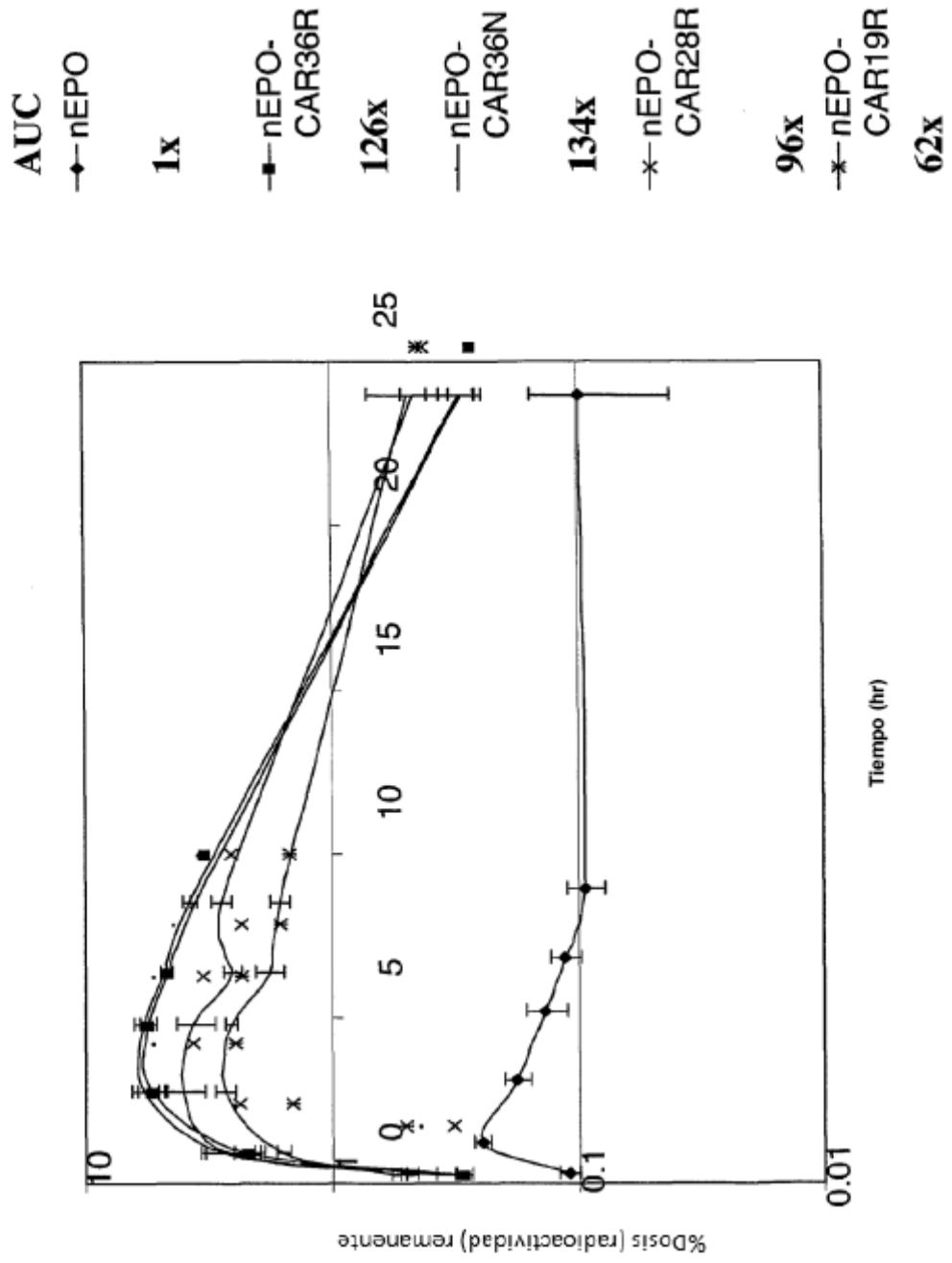
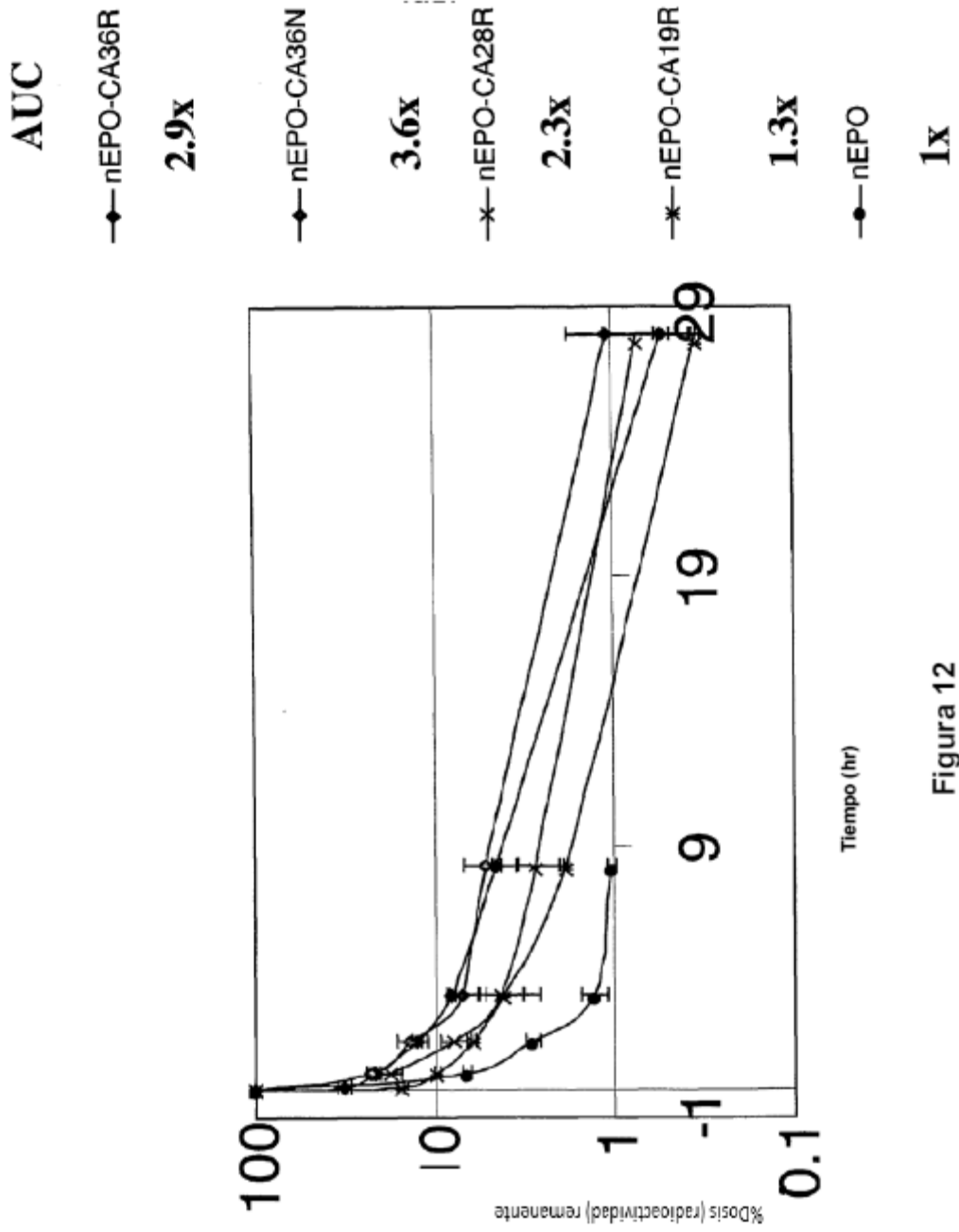


Figura 11



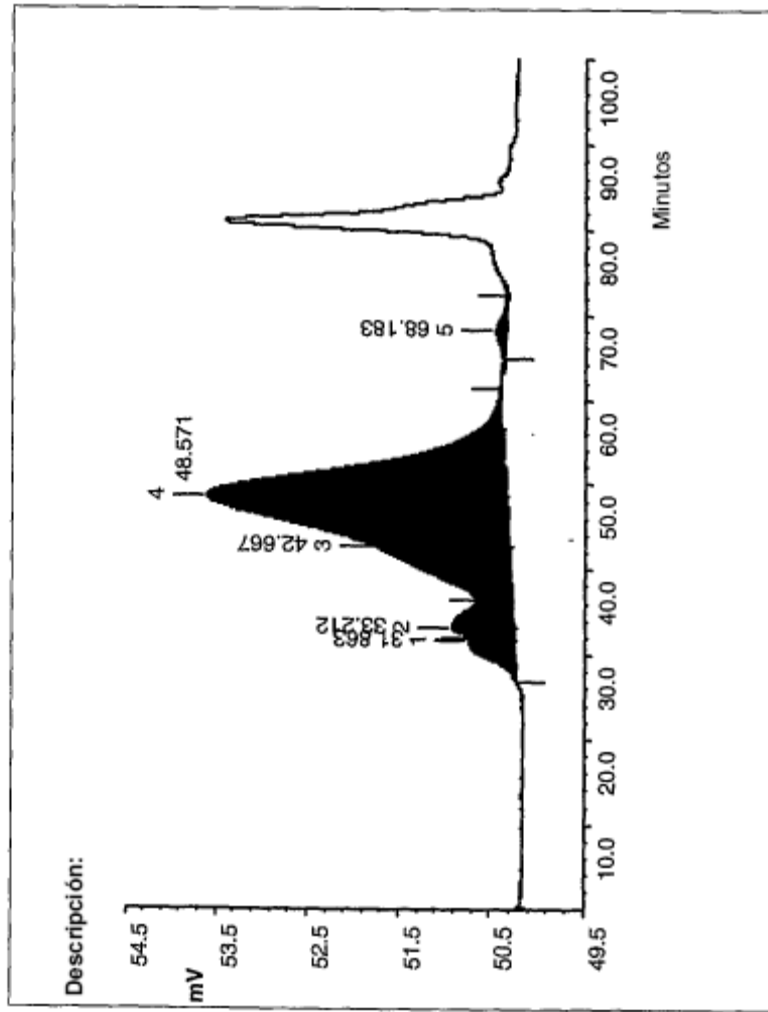


Figura 13

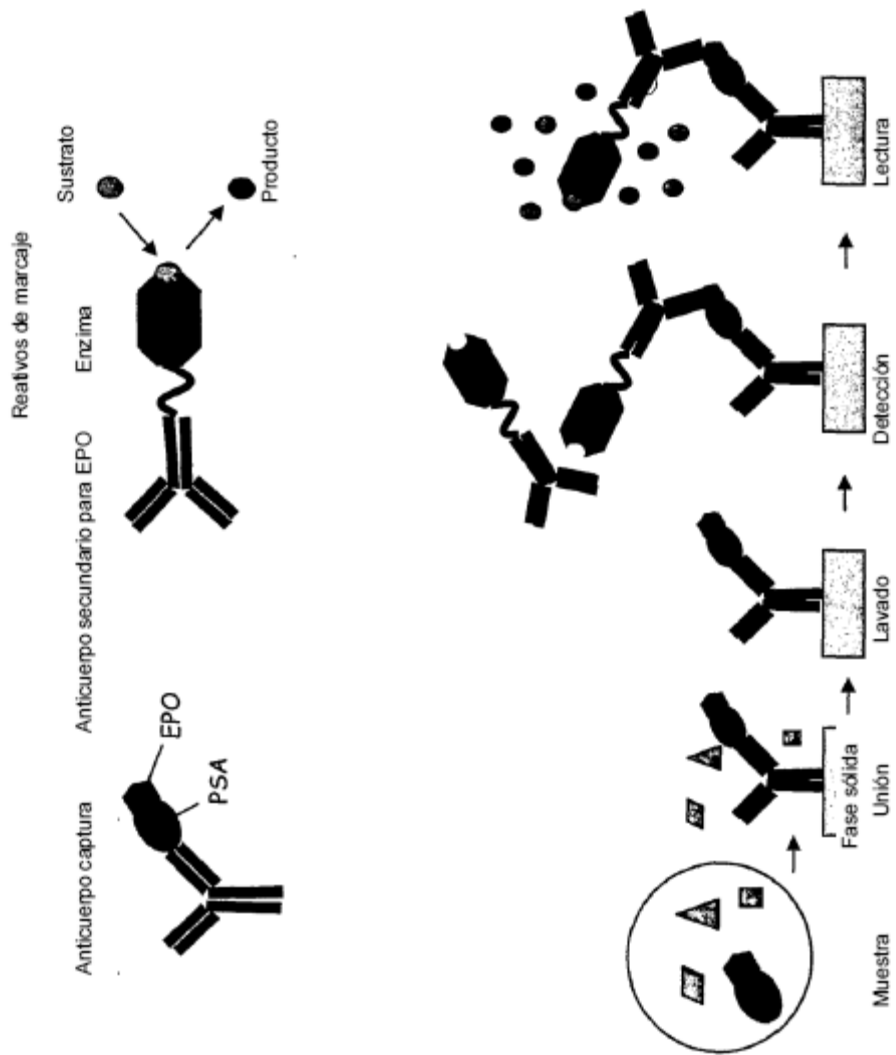


Figura 14

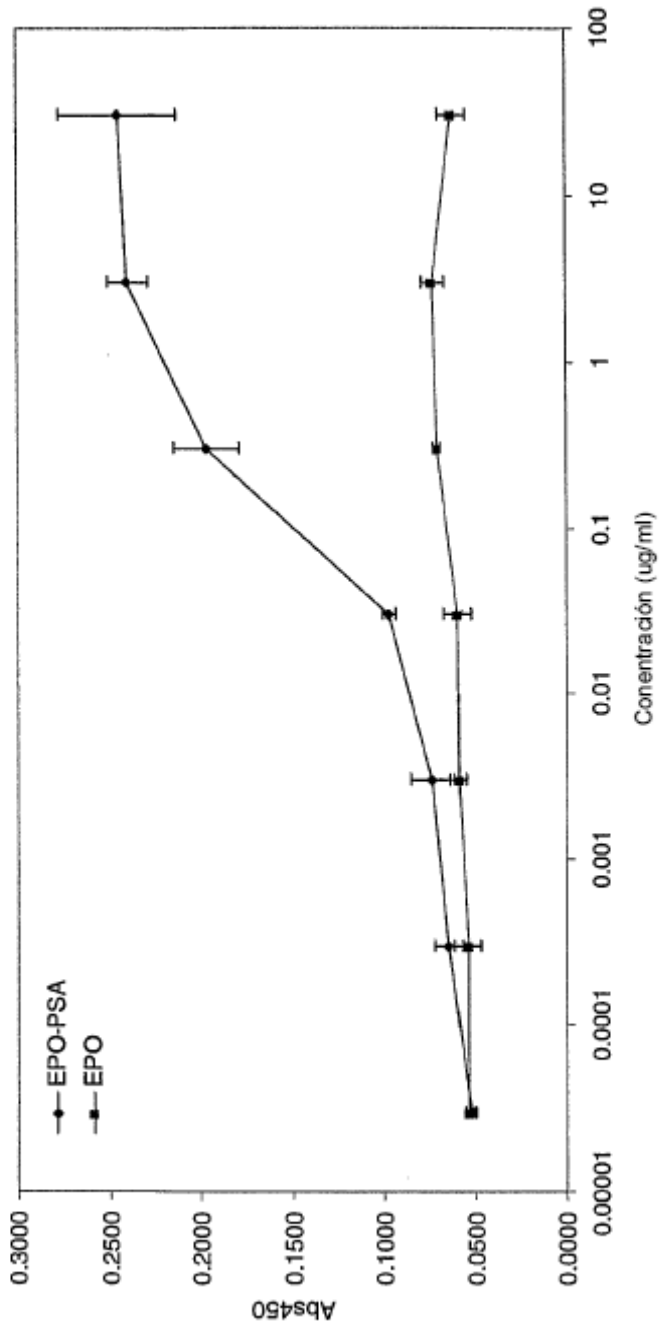


Figura 15

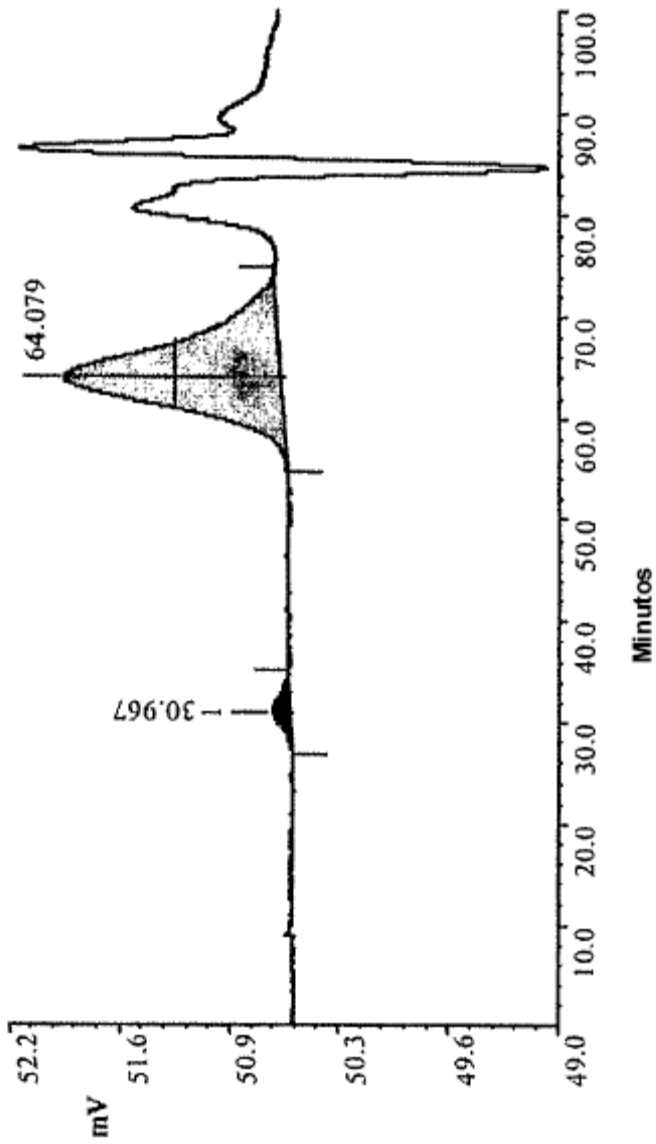


Figura 16

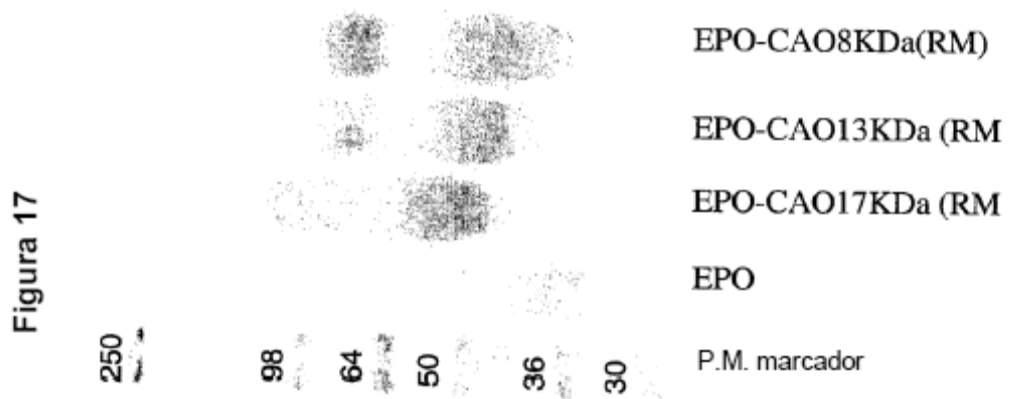


Figura 17

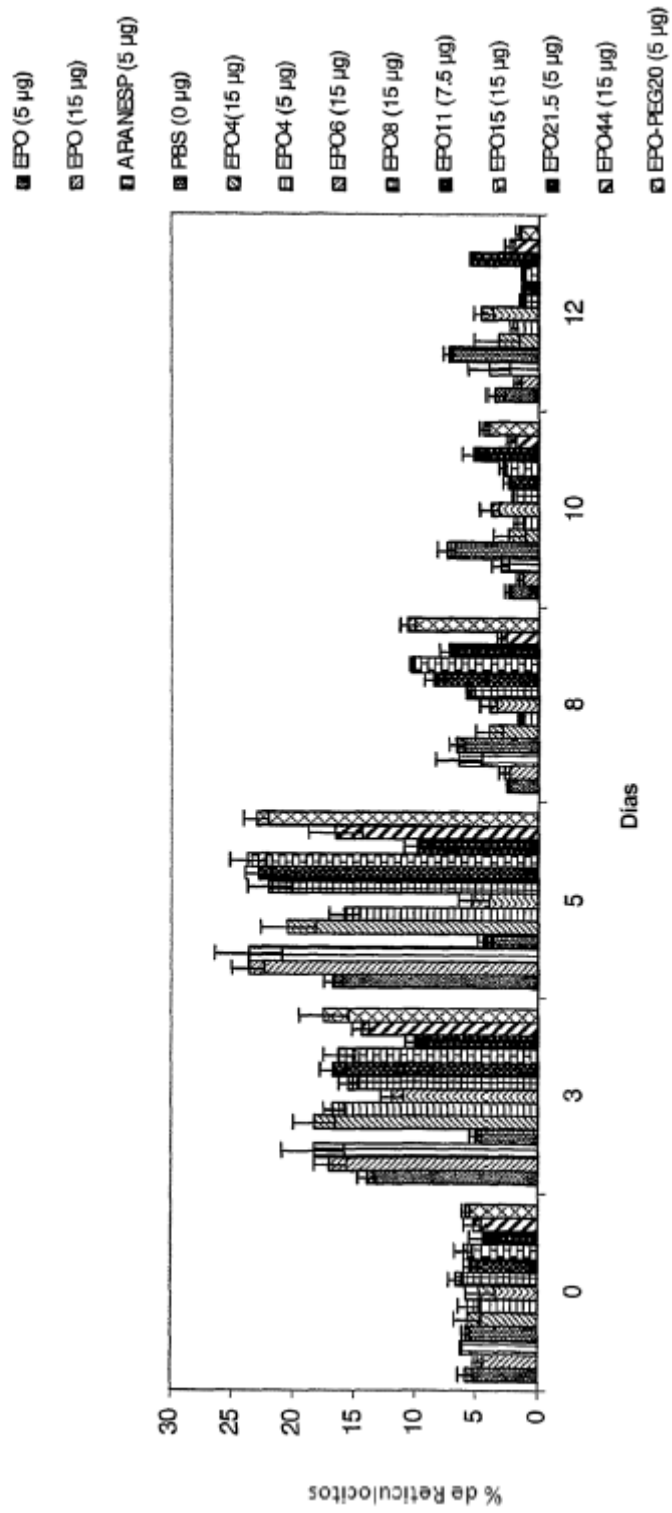


Figura 18

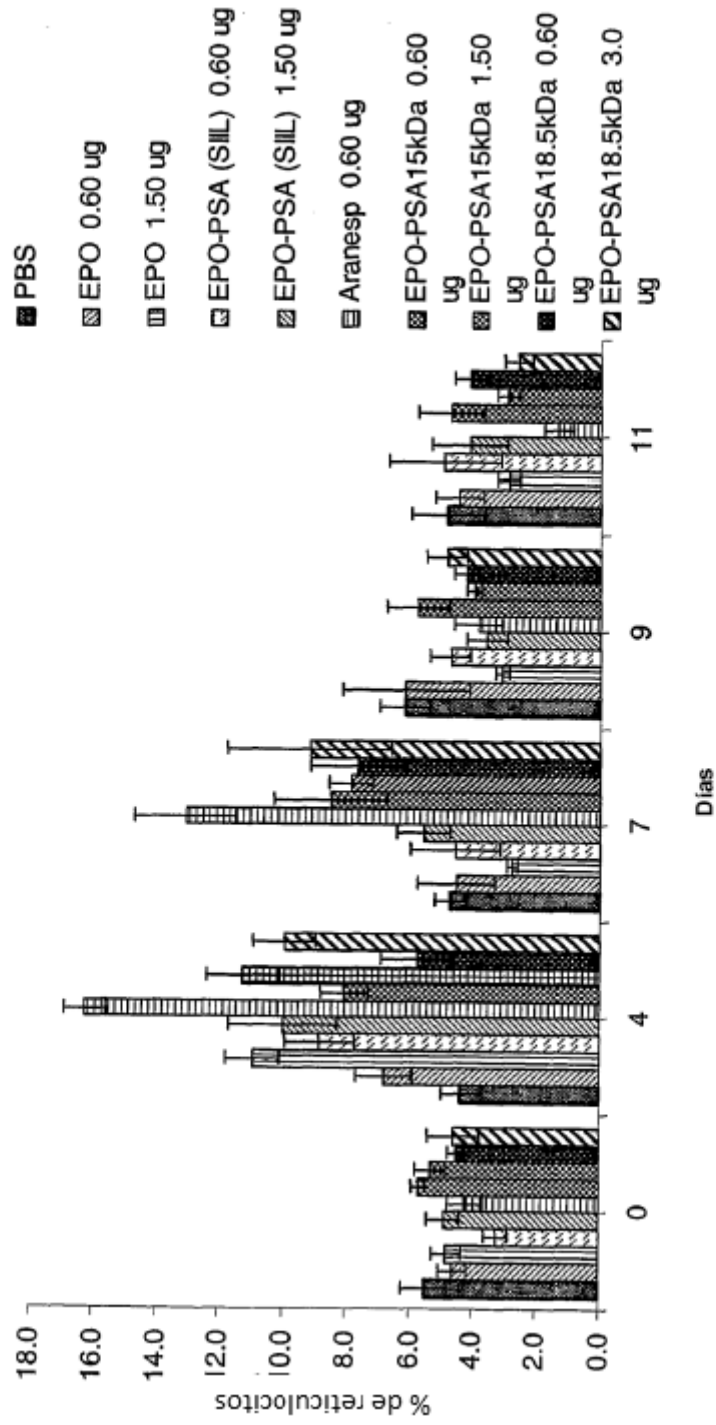


Figura 19

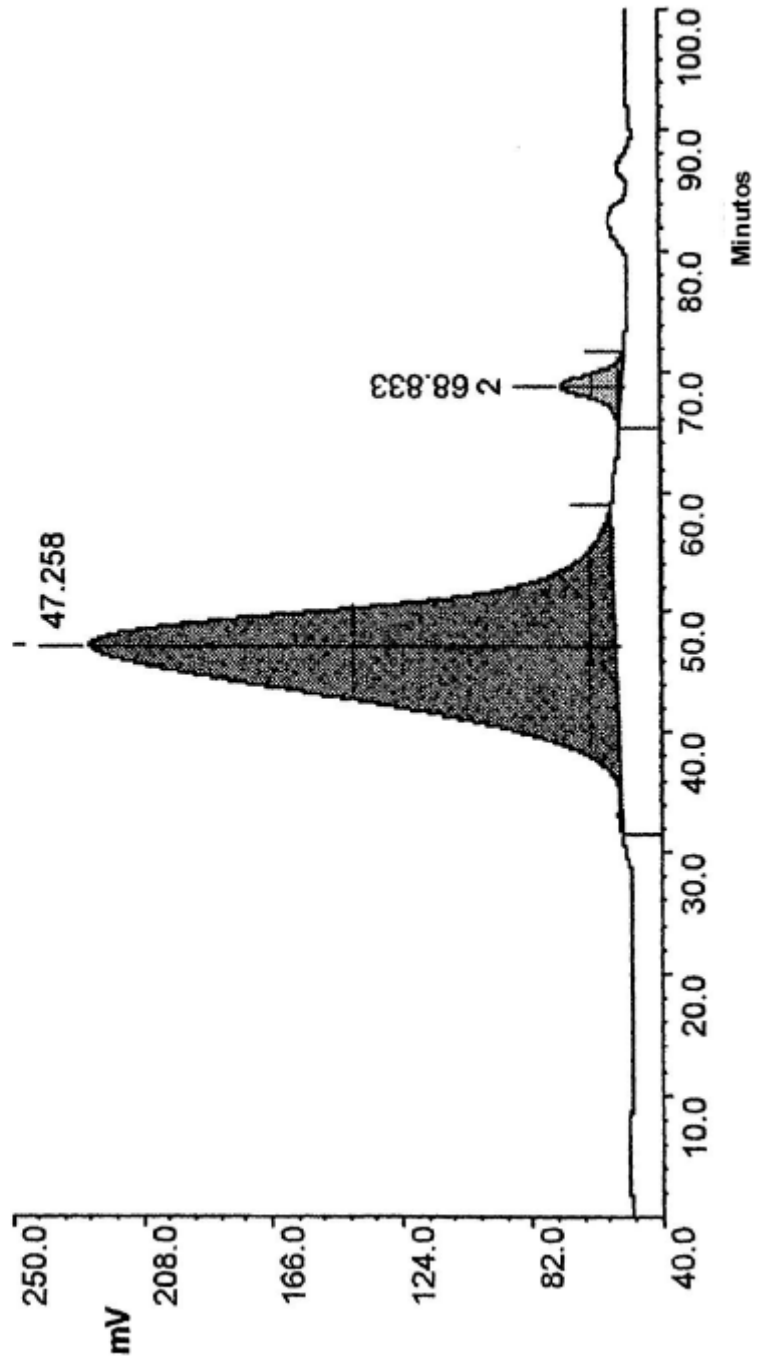


Figura 20