



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0313792-9 B1

(22) Data do Depósito: 20/08/2003

(45) Data de Concessão: 18/10/2016



* B R P I 0 3 1 3 7 9 2 B 1 *

(54) Título: UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNA DE ERITROPOETINA, MÉTODO PARA TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS DE DISTRIBUIÇÃO DE FERRO EM DIABETES E MEDICAMENTO PARA O SEU TRATAMENTO

(51) Int.Cl.: A61K 38/18; A61P 7/06; A61P 39/00

(30) Prioridade Unionista: 29/08/2002 EP 02019100.3

(73) Titular(es): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

(72) Inventor(es): PAUL LEHMANN, Químico(a), RALF ROEDDIGER, Engenheiro(a) Químico(a), RUTH WALTER-MATSUI

UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNA DE ERITROPOETINA, MÉTODO PARA
TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS DE DISTRIBUIÇÃO DE FERRO EM
DIABETES E MEDICAMENTO PARA O SEU TRATAMENTO

A presente invenção refere-se a um novo
5 uso de eritropoetina, especialmente para o tratamento
de distúrbios de distribuição de ferro em diabetes.

Conhecem-se várias enfermidades, nas quais
o metabolismo do ferro não é normal. Em uma anemia,
pode ser formada insuficiência de sangue em decorrência
10 de uma ausência global de ferro no corpo. Uma outra
condição metabólica relacionada com o ferro consiste na
hemocromatose, em que a concentração global de ferro no
corpo é mais alta do que o normal, o que conduz a vá-
rias condições, tais como, por exemplo, a destruição de
15 órgãos.

Os distúrbios da distribuição de ferro di-
ferem da anemia e da hemocromatose descritos anterior-
mente, porque a concentração global de ferro no corpo é
normal. Por um lado, o ferro acumula-se nos vários ór-
20 gãos e pode conduzir a danos e até à destruição desses
órgãos. Por outro lado, o uso do ferro que se encontra
presente em quantidades normais na formação de sangue é
prejudicado, conduzindo a efeitos secundários que são
comparáveis àqueles relacionados com anemia.

25 Até agora não se sabia que os pacientes
que sofriam de diabetes tinham uma alta probabilidade
de serem afetados por distúrbios de distribuição de

ferro. Os distúrbios de distribuição de ferro podem ser diagnosticados por vários parâmetros os quais são amplamente utilizados no diagnóstico do estado do ferro. Com base nas medições de ferritina e receptor de
5 transferência solúvel é possível avaliar se a concentração total de ferro em um paciente diabético é normal. Se este for o caso, então uma concentração abai-
xada de hemoglobina nos reticulócitos é um indicador para distúrbios de distribuição de ferro. Um outro in-
10 dicador é uma concentração elevada continuamente pro-
longada da proteína C-reativa em pacientes que padecem de diabetes e que exibem uma concentração de ferro to-
tal normal. Um método para o diagnóstico de distúrbios de distribuição de ferro foi descrito por P. Lehmann,
15 M. Volkmann, J. Lotz, A. Baldauf, R. Roeddiger, poste-
riormente apresentado na AACC/CSCC, Annual Meeting, July 29 - August 2, 2001, Chicago, Illinois.

Desta maneira, ainda não foi sugerido qualquer tratamento para pacientes diabéticos que pade-
20 cem de distúrbios na distribuição de ferro. O problema subjacente à presente invenção é, portanto, proporcio-
nar um tratamento para distúrbios da distribuição de ferro em diabetes a fim de reduzir ao mínimo ou de su-
primir as desvantagens mencionadas anteriormente. Des-
25 cobriu-se, surpreendentemente, que a eritropoetina é
dotada de um efeito benéfico nos distúrbios de distri-
buição de ferro em diabetes. O problema é solucionado,
portanto, de acordo com a presente invenção, pela pro-

visão de eritropoetina para o uso no tratamento de distúrbios de distribuição de ferro em diabetes.

A não ser que de outro modo indicadas, as descrições seguintes são expostas para ilustrarem e definirem o significado e escopo dos vários termos usados para descreverem a invenção neste contexto.

Da maneira que é utilizado neste contexto, o termo "alquila inferior" significa um grupo de alquila linear ou ramificada dotada de u a seis átomos de carbono. Exemplos de grupos de alquila inferior incluem metilo, etilo e isopropilo, preferentemente metilo.

Da maneira que é utilizado neste contexto, o termo "alcoxila inferior" significa um grupo $R'-O-$, em que R' é um alquila inferior tal como descrito anteriormente.

Da maneira que é utilizado neste contexto, o termo "distúrbios de distribuição de ferro em diabetes" refere-se a um distúrbio de distribuição de ferro que ocorre em pacientes que padecem de diabetes. O distúrbio de distribuição de ferro pode, por exemplo, ser caracterizado tal como descrito anteriormente. Com particularidade, um distúrbio de distribuição de ferro é caracterizado pelos seguintes parâmetros: a concentração de receptor de transferrina solúvel [mg/l] dividido pela $\log(\text{concentração de ferritina } [\mu\text{g/l}])$ é menor do que 3,5 e simultaneamente a concentração de proteína C-reativa está acima de 5 mg/l.

O termo "eritropoetina" ou "proteína de

eritropoetina" refere-se a uma proteína com a atividade biológica *in vivo* de fazer com que as células da medula óssea aumentem a produção de reticulócitos e células vermelhas do sangue e selecionada a partir do grupo que
5 consiste de eritropoetina humana e análogos que são definidos mais adiante.

O termo eritropoetina pegilada "Peg-EPO ou PEG-EPO" refere-se a uma proteína de eritropoetina que é ligada covalentemente com de um a três derivados de
10 polietileno tais como descritos mais adiante.

Descrição dos Desenhos:

A Figura 1 é uma estrutura principal de EPO humano (165 aminoácidos) (SEQ ID NO:1).

A Figura 2 é uma estrutura principal de
15 EPO humano (166 aminoácidos) (SEQ ID NO:2).

De uma maneira mais detalhada, a presente invenção refere-se ao uso de eritropoetina na manufatura de um medicamento para o tratamento de distúrbios da distribuição de ferro em diabetes. Em uma concretiza-
20 ção preferida, a invenção relaciona-se com uma utilização tal como descrita anteriormente, em que o diabetes é diabetes mellitus não dependente de insulina.

A presente invenção é especialmente útil para a preparação de composições farmacêuticas que com-
25 preendem eritropoetina como ingrediente farmacêuticamente ativo. O termo "eritropoetina" ou "proteína de eritropoetina" ou "EPO" é o seguinte: particularmente os termos referem-se a uma glicoproteína, por exemplo,

a eritropoetina humana, por exemplo, tendo a seqüência de aminoácidos estabelecida na (SEQ ID NO: 1) ou na (SEQ ID NO: 2) ou uma seqüência de aminoácidos substancialmente homóloga a elas, cujas propriedades biológicas referem-se ao estímulo da produção das células vermelhas do sangue e ao estímulo da divisão e diferenciação de progenitores eritróides incumbidos na medula óssea. Da maneira que são utilizados neste contexto, estes termos incluem essas proteínas modificadas deliberadamente, tais como por exemplo, por mutagênese dirigida por local ou acidentalmente através de mutações. Estes termos também incluem análogos que são dotados de 1 a 6 locais adicionais para glicosilação, análogos que são dotados de pelo menos um aminoácido adicional na extremidade terminal carboxila da glicoproteína, em que o aminoácido adicional inclui pelo menos um local de glicosilação, e análogos que são dotados de uma seqüência de aminoácidos que inclui uma reordenação de pelo menos um local para glicosilação. Estes termos incluem eritropoetina humana tanto natural quanto produzida de forma recombinante. Em uma concretização preferida da presente invenção, a eritropoetina é uma eritropoetina humana.

Tal como se encontra estabelecido mais adiante, a preparação e a purificação da EPO são amplamente conhecidas na técnica. Por eritropoetina entende-se a proteína natural ou recombinante, preferentemente humana, conforme obtida a partir de qualquer fon-

te convencional tal como tecidos, síntese de proteína, cultura de células com células naturais ou recombinantes. Qualquer proteína que seja dotada da atividade de eritropoetina, tais como muteínas ou proteínas de outro modo modificadas, encontram-se abrangidas. Em uma concretização preferida da presente invenção, a proteína de eritropoetina é epoetina alfa ou epoetina beta. A EPO recombinante pode ser preparada por meio de expressão nas linhas de células CHO-, BHK- ou HeLa, por tecnologia de DNA recombinante ou por ativação de genes endógenos. A expressão de proteínas, incluindo por ativação de genes endógenos, é amplamente conhecida na técnica e encontra-se exposta, por exemplo, nas patentes U.S. N°s 5.733.761, 5.641.670 e 5.733.746, e nas publicações de patentes internacionais Nos. WO 93/09222, WO 94/12650, WO 95/31560, WO 90/11354, WO 91/06667 e WO 91/09955, ficando o conteúdo de cada uma delas incorporado neste contexto por referência. A utilização tal como definida anteriormente, em que a proteína de eritropoetina é expressada por ativação de gene endógeno é preferida. As espécies de EPO preferidas para a preparação de produtos de glicoproteína de eritropoetina são as espécies de EPO humana. Com maior preferência, a espécie de EPO é a EPO humana que tem a seqüência de aminoácidos exposta na SEQ ID NO:1 ou na SEQ ID NO:2, com maior preferência a seqüência de aminoácidos SEQ ID NO:1. Portanto, uma concretização preferida da presente invenção refere-se à utilização tal

como descrita anteriormente, em que a proteína de eritropoetina tem a seqüência de aminoácidos SEQ ID NO:1 ou na SEQ ID NO:2.

Além disso, a eritropoetina poderá ser um
5 análogo de glicoproteína dotado de 1 a 6 locais adicionais para glicosilação. Portanto, a presente invenção também se refere à utilização tal como descrita anteriormente, em que a proteína de eritropoetina é dotada da seqüência de eritropoetina humana modificada pela adi-
10 ção de 1 a 6 locais de glicosilação. A glicosilação de uma proteína, com um ou mais grupos de oligossacarídeos, ocorre em locais específicos ao longo de uma espinha dorsal de polipeptídios e afeta enormemente as propriedades físicas da proteína, tais como estabilidade da proteína, secreção, localização subcelular, e atividade biológica. A glicosilação é usualmente de dois tipos. Os oligossacarídeos de ligação "O" são presos aos resíduos de serina ou treonina e os oligossacarídeos de ligação "N" são presos aos resíduos de
20 asparagina. Um tipo de oligossacarídeo encontrado nos oligossacarídeos de ligação "N" e de ligação "O" é o ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), que é uma família dos amino açúcares que contêm 9 ou mais átomos de carbono. O ácido siálico é usualmente o resíduo
25 terminal dos oligossacarídeos de ligação "N" e de ligação "O" e, porque ele comporta uma carga negativa, confere propriedades ácidas à glicoproteína. A eritropoetina humana, dotada de 165 aminoácidos, contém três ca-

deias de oligossacarídeos de três ligações "N" e uma ligação "O" que compreendem cerca de 40% do peso molecular total da glicoproteína. A glicosilação de ligação "N" ocorre nos resíduos de asparagina localizados nas posições 24, 38 e 83, e a glicosilação de ligação "O" ocorre em um resíduo de serina localizado na posição 126. As cadeias de oligossacarídeos são modificadas com resíduos de ácido siálico terminais. A remoção enzimática de todos os resíduos de ácido siálico a partir da eritropoetina glicosilada resulta na perda de atividade *in vivo*, mas não na atividade *in vitro* porque a sialilação da eritropoetina impede a sua aglutinação, e subsequente liberação, pela proteína de aglutinação hepática.

O termo "eritropoetina" inclui análogos da eritropoetina humana com uma ou mais mudanças na sequência de aminoácidos da eritropoetina humana, que resultam em um aumento no número de locais para fixação de ácido siálico. Estes análogos de glicoproteína podem ser gerados por mutagênese orientada ao local dotada de adições, remoções, ou substituições de resíduos de aminoácidos que aumentam ou alteram locais que se encontram disponíveis para glicosilação. Análogos de glicoproteínas dotados de níveis de ácido siálico maiores do que aqueles encontrados na eritropoetina humana são gerados pela adição de locais de glicosilação que não perturbam a conformação secundária ou terciária requerida para atividade biológica. As glicoproteínas da

presente invenção também incluem análogos dotados de níveis de fixação de carboidratos aumentados em um local de glicosilação que usualmente envolvem a substituição de um ou mais aminoácidos em estreita proximidade com um local de ligação de "N" ou ligação de "O". As glicoproteínas da presente invenção também incluem análogos que são dotados de um ou mais aminoácidos que se estendem a partir da extremidade terminal de carboxilo da eritropoetina e que proporcionam pelo menos um local de carboidrato adicional. As proteínas de eritropoetina da presente composição também incluem análogos que são dotados de uma seqüência de aminoácidos que inclui a reorganização de pelo menos um local para glicosilação. Uma tal reorganização de local de glicosilação envolve a remoção de um ou mais locais de glicosilação na eritropoetina humana e a adição de um ou mais locais de glicosilação que se apresentam de forma não natural. O aumento do número de cadeias de carboidratos na eritropoetina e, conseqüentemente, do número de ácidos siálicos por moléculas de eritropoetina, podem conferir propriedades vantajosas, tais como uma solubilidade aumentada, uma maior resistência à proteólise, imunogenicidade reduzida, uma semivida de soro aumentada, e uma atividade biológica aumentada. Os análogos de eritropoetina com locais de glicosilação adicionais encontram-se expostos de uma maneira mais detalhada no pedido de patente européia 640.619, de Elliot, publicado em 1 de março de 1995.

De acordo com uma concretização preferida, a composição farmacêutica da presente invenção compreende proteínas de eritropoetina com uma sequência de aminoácidos que inclui pelo menos um local adicional
 5 para glicosilação tal como, sendo que não se fica limitado às mesmas, eritropoetinas que compreendem a sequência da eritropoetina humana modificada por uma modificação selecionada a partir das seguintes:

Asn³⁰Thr³²;
 10 Asn⁵¹Thr⁵³,
 Asn⁵⁷Thr⁵⁹;
 Asn⁶⁹;
 Asn⁶⁹Thr⁷¹;
 Ser⁶⁸Asn⁶⁹Thr⁷¹;
 15 Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Gly⁸⁹Thr⁹⁰;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Thr⁹²;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰Ala¹⁶²;
 20 Asn⁶⁹Thr⁷¹Ser⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn³⁰Thr³²Val⁸⁷Asn⁸⁸Thr⁹⁰;
 Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 Ser⁸⁷Asn⁸⁹Ile⁹⁰Thr⁹¹;
 Asn¹³⁶Thr¹³⁸;
 25 Asn¹³⁸Thr¹⁴⁰;
 Thr¹²⁵; and
 Pro¹²⁴Thr¹²⁵.

A notação utilizada neste contexto para modificação da sequência de aminoácidos significa que a(s) posição(ões) da(s) proteína(s) não modificada(s) correspondente(s) (por exemplo, hEPO da SEQ ID NO:1 ou
 5 SEQ ID NO:2) indicada pelos números sobrescritos é alterada para o(s) aminoácido(s) que imediatamente precedem o(s) número(s) sobrescrito(s) respectivo.

A proteína de eritropoetina também pode ser um análogo que tem pelo menos um aminoácido adicional na extremidade terminal carboxílica da glicoproteína, em que o aminoácido adicional inclui pelo menos um local de glicosilação. O aminoácido adicional poderá compreender um fragmento de peptídeo derivado da extremidade terminal carboxílica da gonadotropina coriônica
 15 humana. De preferência, a glicoproteína é um análogo selecionado a partir do grupo que consiste de (a) eritropoetina humana que tem a sequência de aminoácidos Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 20 Gln, que se estende a partir do término carboxílico; (b) o análogo em (a) compreendendo ainda Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; e (c) o análogo em (a) compreendendo ainda Asn³⁰ Thr³² Val⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO.

A proteína de eritropoetina também poderá
 25 ser dotada de uma sequência de aminoácidos que inclui uma reordenação de pelo menos um local para glicosilação. A reordenação pode compreender uma supressão de qualquer um dos locais de carboidratos de ligação "N"

na eritropoetina humana e uma adição de um local de carboidrato de ligação "N" na posição 88 da sequência de aminoácidos da eritropoetina humana. De preferência, a glicoproteína está na forma de um análogo selecionado a partir do grupo que consiste de Gln²⁴ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; Gln³⁸ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO; e Gln⁸³ Ser⁸⁷ Asn⁸⁸ Thr⁹⁰ EPO. Um outro análogo é darbepoetina alfa. Uma proteína de eritropoetina preferida na utilização descrita anteriormente é darbepoetina alfa.

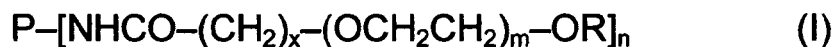
10 Mais particularmente, a proteína de eritropoetina da presente composição farmacêutica tal como descrita anteriormente poderá incluir igualmente os seus derivados pegilados. Os derivados pegilados da eritropoetina e a sua preparação são conhecidos na técnica e encontram-se descritos, por exemplo, na WO 15 01/02017, EP-A-1064951, EP-A-539.167, EP-A-605.963, WO 93/25212, WO 94/20069, WO 95/11924, patente U.S. N° 5.56, EP-A-584.876, WO 92/16555, WO 94/28024, WO 97/04796, patentes U.S. N°s 5.359.030 e 5.681.811, patente U.S. N° 4.179.337, patente japonesa, WO 98/32466, 20 patente U.S. N° 5.324.650. Preferencialmente, na utilização descrita anteriormente, a proteína de eritropoetina é pegilada. Uma concretização preferida das espécies de eritropoetina pegilada refere-se aos derivados 25 dos conforme descritos mais adiante.

Conseqüentemente, a presente invenção refere-se igualmente à utilização tal como descrita anteriormente, em que a eritropoetina é um conjugado, o di-

to conjugado compreendendo uma proteína de eritropoetina tal como descrito anteriormente dotado de pelo menos um grupo amino livre e tendo a atividade biológica *in vivo* de fazer com que as células da medula óssea aumentem a produção de reticulócitos e células vermelhas do sangue e selecionado a partir do grupo que consiste de eritropoetina humana e seus análogos que têm a sequência de eritropoetina humana modificada pela adição de 1 a 6 locais de glicosilação ou uma reordenação de pelo menos um local de glicosilação, sendo a dita eritropoetina ligada covalentemente a **n** grupos poli(etileno glicol) da fórmula $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2)_m-\text{OR}$ com o $-\text{CO}$ (isto é, carbonilo) de cada grupo de poli(etileno glicol) formando uma ligação de amida com um dos referidos grupos amino; em que R é alquila inferior; x é 2 ou 3; **m** varia de cerca de 450 a cerca de 900; **n** varia de 1 a 3; e **n** e **m** são selecionados de maneira tal que o peso molecular do conjugado menos a glicoproteína de eritropoetina varia de 20 quilodáltons a 100 quilodáltons. Esta invenção proporciona, outrossim, composições farmacêuticas as quais contêm os conjugados descritos neste contexto, em que a percentagem de conjugados em que **n** é 1 compreende pelo menos noventa por cento, de preferência pelo menos noventa e dois por cento, ou preferencialmente noventa e seis por cento de todos os conjugados da composição.

Mais especificamente, os conjugados descritos anteriormente podem ser representados pela fór-

mula (I)



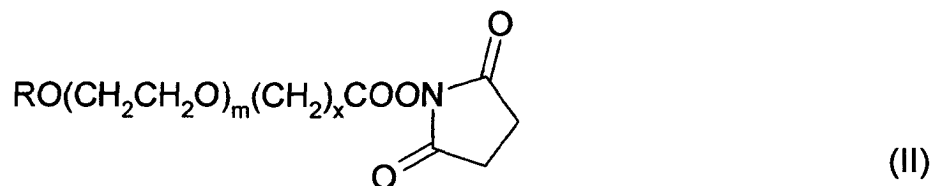
em que P é o resíduo de uma proteína de eritropoetina tal como descrita neste contexto, (isto é, sem o grupo amino ou os grupos amino que formam uma ligação de amida com o carbonilo ilustrado na Fórmula I), tendo a atividade biológica *in vivo* de fazer com que as células da medula óssea aumentem a produção de reticulócitos e células vermelhas do sangue; e em que R é alquila inferior; **x** é 2 ou 3; **m** varia de 450 até cerca de 900; **n** varia de 1 a 3, e **n** e **m** são selecionados de maneira tal que o peso molecular do conjugado menos a glicoproteína de eritropoetina seja de 20 quilodáltons a 100 quilodáltons. De acordo com esta invenção, R é qualquer alquila inferior. Os conjugados em que R é metilo são os preferidos.

O símbolo "m" representa o número de resíduos de óxido de etileno (OCH₂CH₂) no grupo de poli(óxido de etileno). Uma única subunidade de PEG (polietileno glicol) de óxido de etileno é dotada de um peso molecular de cerca de 44 dáltons. Assim, o peso molecular do conjugado (excluindo-se o peso molecular da EPO) depende do número "m". Nos conjugados desta invenção "m" varia entre cerca de 450 até cerca de 900 (correspondente a um peso molecular de cerca de 20 kDa até cerca de 40 kDa), preferencialmente entre cerca de 650 até cerca de 750 (correspondente a um peso molecu-

lar de cerca de 30 kDa). O número **m** é selecionado de uma maneira tal que o conjugado resultante desta invenção possui uma atividade fisiológica comparável à EPO não modificada, atividade essa que pode representar a
 5 mesma, maior do que, ou uma fração da atividade correspondente da EPO não modificada. Um peso molecular de "cerca de" um determinado número significa que se encontra dentro de uma faixa razoável desse número conforme determinado por técnicas analíticas convencionais.
 10 O número "m" é selecionado de maneira tal que o peso molecular de cada grupo de poli(etileno glicol) ligado covalentemente à glicoproteína de eritropoetina varia entre cerca de 20 kDa até cerca de 40 kDa, e compreende preferentemente cerca de 3 kDa.

15 Nos conjugados desta invenção, o número "n" é o número de grupos de poli(etileno glicol) ligados covalentemente aos grupos amino livres (incluindo os grupos ϵ -amino de um aminoácido de lisina e/ou do grupo amino terminal) de uma proteína de eritropoetina
 20 por intermédio de ligações de amida. Um conjugado desta invenção poderá ter um, dois ou três grupos PEG por molécula de EPO. O "n" é um inteiro que varia de 1 a 3, preferentemente "n" é 1 ou 2, e com maior preferência "n" é 1. Um conjugado preferido dos conjugados
 25 descritos anteriormente compreende compostos em que **x** é 2, **m** varia de 650 a 750, **n** é 1 e **R** é metilo.

O composto da fórmula (I) pode ser preparado a partir de material polimérico conhecido:



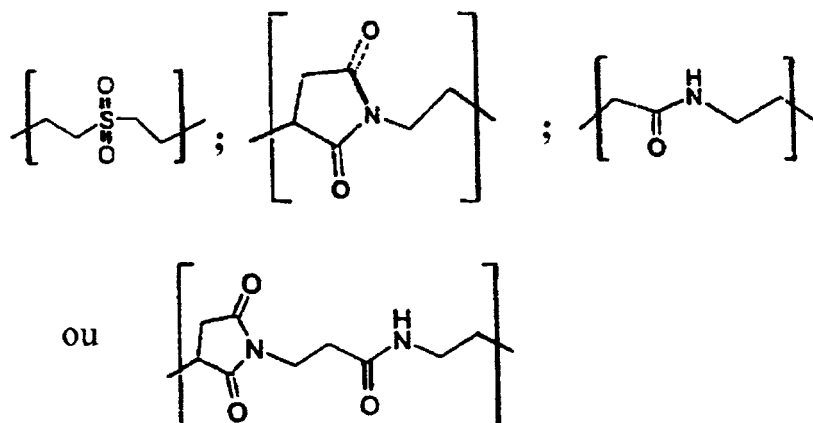
em que **R** e **m** são tais como descritos anteriormente, pela condensação do composto da Fórmula (II) com a glicoproteína de eritropoetina. Os compostos da fórmula (I-I) em que **x** é 3, compreendem os ésteres de succinimidil de poli(etileno glicol) de ácido butírico alcoxila alfa-inferior, (alcoxila inferior-PEG-SBA). Os compostos da fórmula (II) em que **x** é 2 compreende os ésteres de succinimidil de poli(etileno glicol) de ácido propiônico alcoxilo alfa-inferior, (alcoxilo inferior-PEG-SPA). Poderá ser utilizado qualquer processo convencional para se fazer reagir um éster estimulado com uma amina para se formar uma amida. Na reação descrita anteriormente, o éster de succinimidil exemplificado é um grupo residual que provoca a formação da amida. O uso de ésteres de succinimidil tais como os compostos da fórmula II para produzirem conjugados com proteínas encontra-se exposto na patente U.S. Nº 5.672.662, concedida em 30 de setembro de 1997 (Harris, et al.).

A EPO humana contém nove grupos amino livres, o grupo amino amino-terminal mais os grupos ε-amino de 8 resíduos de lisina. Quando o reagente de pegilação foi combinado com um composto SBA da Fórmula II, constatou-se que sob pH 7,5, uma relação proteína:PEG de 1:3, e uma temperatura de reação de 20-25°C, foram produzidas uma mistura de mono-, di- e quantida-

des residuais das espécies tri-pegiladas. Quando o reagente de pegilação foi o composto SPA da Fórmula II, sob condições semelhantes com a exceção de que a relação proteína:PEG foi de 1:2, produz-se principalmente a espécie mono-pegilada. A EPO pegilada pode ser administrada como uma mistura, ou como a espécie pegilada diferente separada por cromatografia de permuta catiônica. Pela manipulação das condições de reação (por exemplo, relação de reagentes, pH, temperatura, concentração de proteínas, tempo de reação e outros), as quantidades relativas das diferentes espécies pegiladas poderão ser variadas.

Uma outra concretização preferida da presente invenção refere-se à utilização tal como ficou definida anteriormente, em que a proteína de eritropoetina é um conjugado, o referido conjugado compreendendo uma proteína de eritropoetina tal como definida anteriormente que é dotada de pelo menos um grupo amino livre e que é dotada da atividade biológica *in vivo* de fazer com que as células da medula óssea aumentem a produção de reticulócitos e de células vermelhas do sangue, e selecionado a partir do grupo que consiste de eritropoetina humana e seus análogos que têm a estrutura principal da eritropoetina humana modificada pela adição de 1 a 6 locais de glicosilação; sendo a dita proteína de eritropoetina ligada covalentemente a de um a três grupos de poli(etileno glicol) alcoxila inferior, com cada grupo de poli(etileno glicol) sendo ligado covalentemente à proteína de eritropoetina por

mente à proteína de eritropoetina por intermédio de um ligante da fórmula $-\text{C}(\text{O})-\text{X}-\text{S}-\text{Y}-$, com o $\text{C}(\text{O})$ do ligante formando uma aglutinação de amida com um dos referidos grupos amino, X é $-(\text{CH}_2)_k-$ ou $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, em que k varia de 1 até cerca de 10, Y é



o peso molecular médio de cada metade de poli(etileno glicol) varia de cerca de 20 quilodáltons até cerca de 40 quilodáltons, e o peso molecular do conjugado varia de cerca de 51 quilodáltons até cerca de 175 quilodáltons.

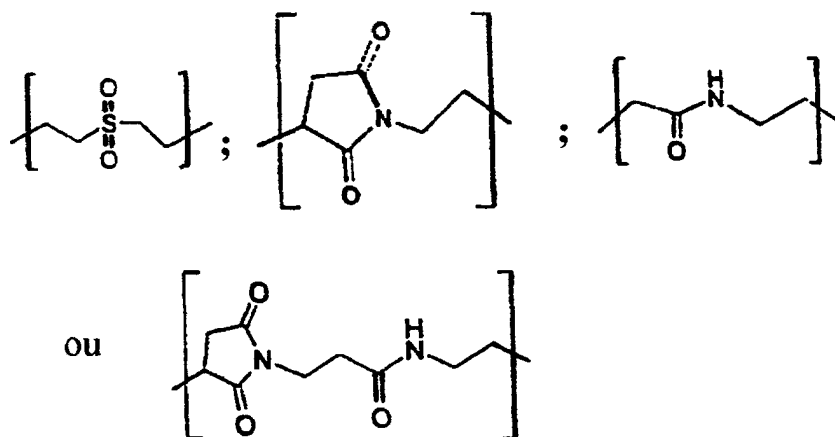
Esta espécie de eritropoetina também pode ser representada pela fórmula (III)



em que R poderá ser qualquer alquila inferior. Um alquila inferior preferido é metilo. X poderá ser $-(\text{CH}_2)_k-$ ou $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, em que k varia de 1 até cerca de 10. De preferência, k varia de 1 até cerca de 4, com

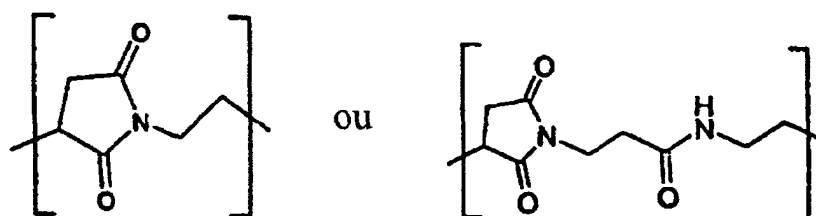
maior preferência k é 1 ou 2. Com maior preferência X é $-(CH_2)-$.

Na fórmula I, Y é



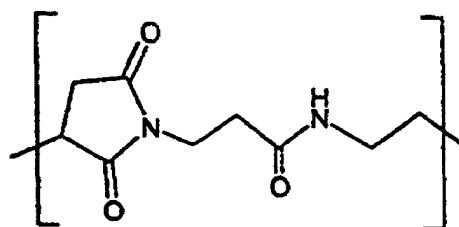
5

de preferência,



10

com maior preferência,



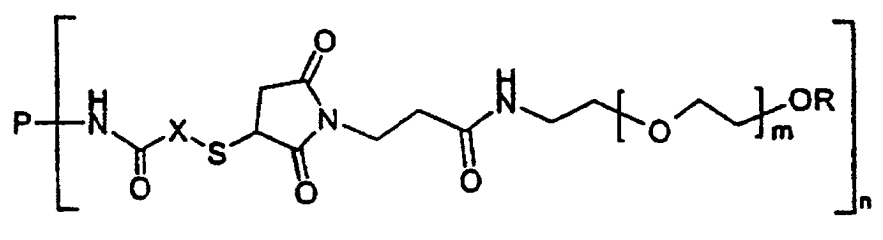
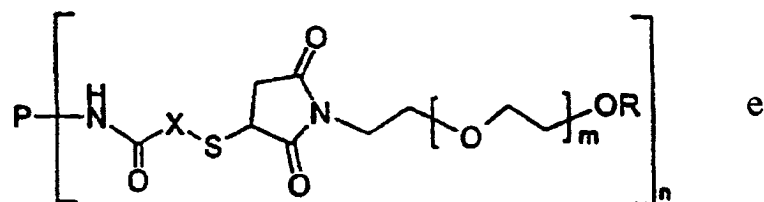
15

Na Fórmula (III), o número m é selecionado de maneira tal que o conjugado resultante da fórmula

(III) possui uma atividade fisiológica comparável à da EPO não modificada, atividade essa que pode representar a mesma, mais do que, ou uma fração da atividade correspondente da EPO não modificada. O m representa o número de resíduos de óxido de etileno na unidade PEG. Uma única sub-unidade PEG de $-(OCH_2CH_2)-$ tem um peso molecular de cerca de 44 dáltons. Desta maneira, o peso molecular do conjugado (excluindo-se o peso molecular da EPO) depende do número m . Um peso molecular de "aproximadamente" um certo número significa que se encontra dentro de uma faixa razoável desse número, conforme determinado por meio de técnicas analíticas convencionais. O m é um inteiro que varia entre cerca de 450 até cerca de 900 (correspondente a um peso molecular de 20 a 40 kDa), de preferência m varia entre cerca de 550 até cerca de 800 (cerca de 24 a 35 kDa), e com maior preferência, m varia entre cerca de 650 até cerca de 700 (cerca de 29 até cerca de 31 kDa).

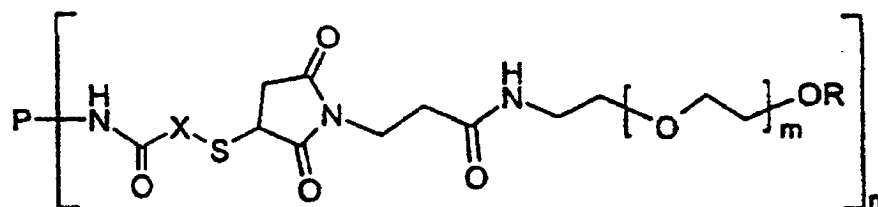
Na fórmula (III), o número n é o número de grupos ϵ -amino de um aminoácido de lisina em uma proteína de eritropoetina aglutinada covalentemente a uma unidade PEG por intermédio de uma ligação de amida. Um conjugado desta invenção poderá ser dotado de uma, duas, ou três unidades PEG por molécula de EPO. O n é um inteiro que varia de 1 a 3, de preferência n é 1 ou 2, e com maior preferência, n é 1.

As proteína de eritropoetina da fórmula (III) são representados pelas fórmulas:



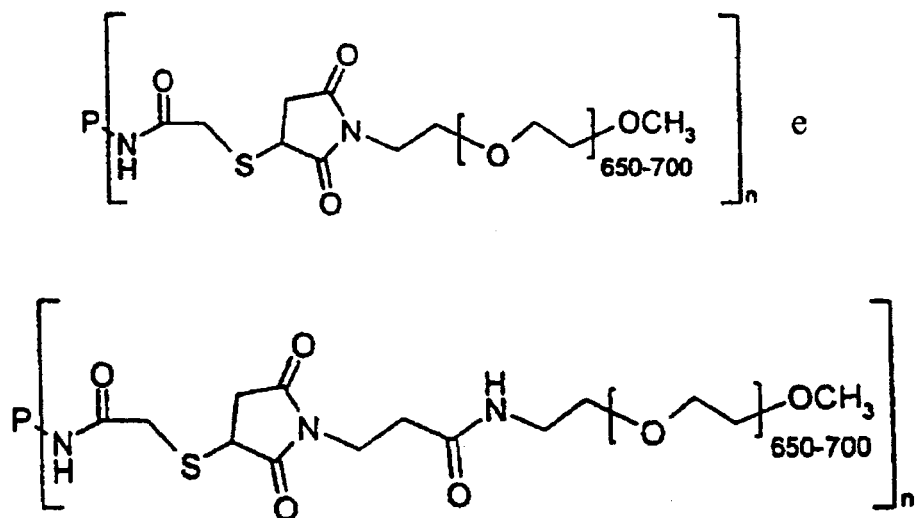
5

Na concretização de maior preferência da presente invenção, um conjugado de eritropoetina é representado pela fórmula:

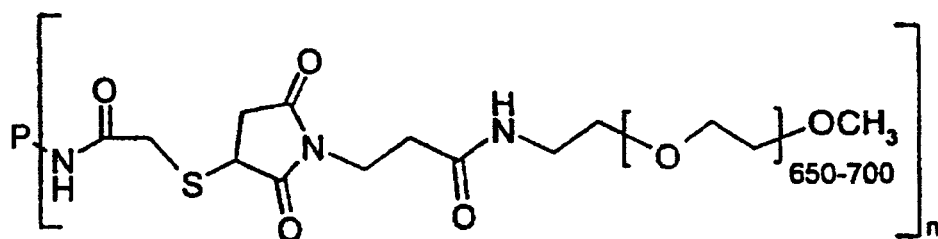


10 em que nas fórmulas expostas anteriormente **n** é um inteiro de 1 a 3; **m** é um inteiro de 450 a 900; R é alquila inferior; X é $-(\text{CH}_2)_k-$ ou $-\text{CH}_2(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_k-$, e P é o resíduo da glicoproteína de eritropoetina sem o grupo amino ou grupos que formam uma ligação de amida com X.

15 Outros produtos de glicoproteína de eritropoetina preferidos encontram-se representados pelas fórmulas:



Os produtos de glicoproteína de eritropoe-
tina de maior preferência encontram-se representados
5 pela fórmula:



Estas proteína de eritropoetina podem ser
preparadas por:

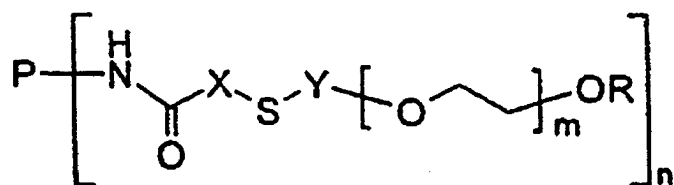
(a) fazendo-se reagir covalentemente um
10 grupo ε-amino de um ácido amino de lisina de uma prote-
ína de eritropoetina representado pela fórmula, P-
[NH₂]_n, com um reagente bifuncional representado pela
fórmula, Z-CO-X-S-Q, para formar um intermediário com
uma ligação de amida representada pela fórmula:

15



em que **P** é uma proteína de eritropoetina menor do que o grupo amino que forma uma ligação de amida; **n** é um inteiro que varia de 1 a 3; **Z** é um grupo reativo, por exemplo, um éster carboxílico-NHS; **X** é $-(CH_2)_k-$ ou $CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, em que **k** varia de 1 até cerca de 10; e **Q** é um grupo de proteção, tal como alcanoíla, por exemplo, acetil.

(b) fazer reagir covalentemente o intermediário com uma ligação de amida proveniente da etapa (a) com um derivado de polietileno glicol ativado, representado pela fórmula, $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$, para formar um produto de glicoproteína de eritropoetina representado pela fórmula:

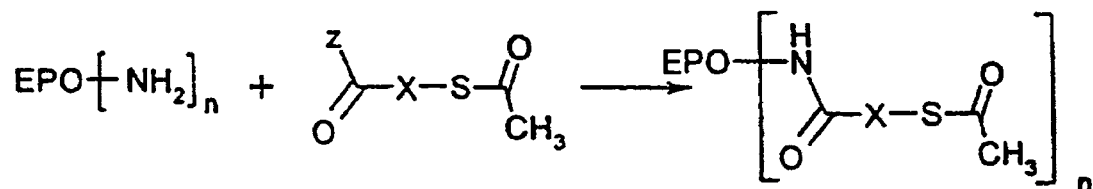


em que **W** é uma forma reativa sulfidrílica de **Y**; **m** é um inteiro que varia entre cerca de 450 até cerca de 900; **R** é alquila inferior; e **Y** é tal como se encontra definido anteriormente.

Nesta concretização, o reagente bifuncional é preferentemente N-succinimidil-S-acetiltiopropionato ou N-succinimidil-S-acetiltioacetato, **Z** é preferentemente N-hidróxi-succinimida, e o derivado de polietileno glicol ativado $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$ é selecionado preferentemente a partir do grupo que consiste de iodo-

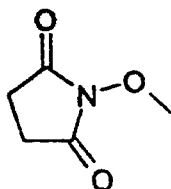
acetil-metóxi-PEG, metóxi-PEG-vinilsulfona, e metóxi-PEG-maleimida.

De uma maneira mais detalhada, as proteínas de eritropoetina da fórmula (III) podem ser preparadas pela ligação covalente de grupos tiol à EPO ("ativação") e acoplamento da EPO ativada resultante com um derivado de poli(etileno glicol)(PEG). A primeira etapa para a preparação da EPO pegilada de acordo com a presente invenção compreende a ligação covalente de grupos tiol com grupos NH_2 de EPO. Esta ativação de EPO é realizada com reagentes bifuncionais que transportam um grupo tiol protegido e um grupo reativo adicional, tais como ésteres ativos (por exemplo, um éster de succinimidil), anidridos, ésteres de ácidos sulfônicos, halogenetos de ácidos carboxílicos e ácidos sulfônicos, respectivamente. O grupo tiol é protegido por grupos conhecidos na técnica, por exemplo, grupos acetil. Estes reagentes bifuncionais são capazes de reagir com os grupos ϵ -amino dos ácidos amino lisina pela formação de uma ligação de amida. A primeira etapa da reação encontra-se exposta em seguida:

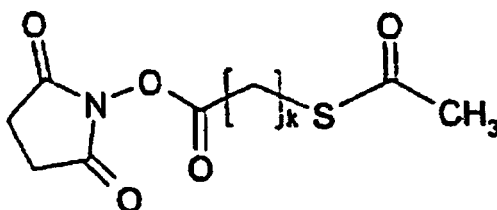


EPO, n e X são tais como definidos anteriormente e Z é um grupo reativo conhecido na técnica, por exemplo, um

substituente de N-hidróxi-succinima (NHS) com a fórmula:

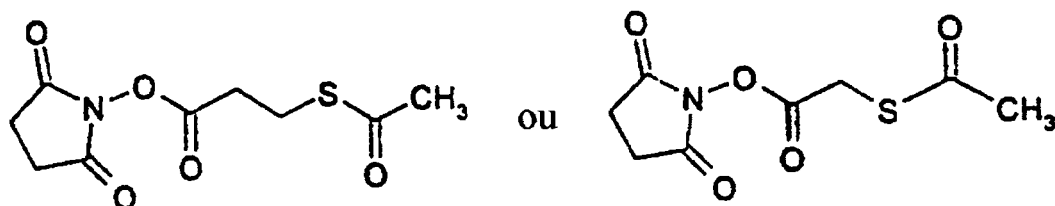


De acordo com uma concretização preferida,
 5 a ativação dos grupos de ϵ -amino lisina é realizada mediante reação com reagentes bifuncionais que são dotados de uma metade succinimidil. Os reagentes bifuncionais podem transportar diferentes espécies de espaçadores, por exemplo, metades $-(CH_2)_k-$ ou $-CH_2-(O-CH_2-CH_2-)_k-$,
 10 em que k varia de 1 até cerca de 10, de preferência de 1 até cerca de 4, e com maior preferência, 1 ou 2, e com maior preferência, 1. Exemplos destes reagentes são N-succinimidil-S-acetiltiopropionato (SATP) e N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA).



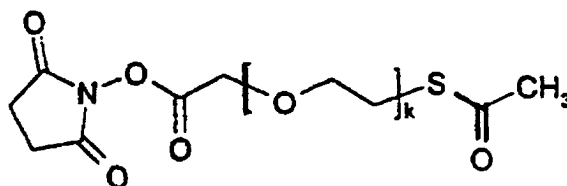
15

Éster de -NHS-acetiltioalquil-carboxílico, tal como



SATP

SATA



Éster -NHS- de ácido 2-(acetiltio)-
 5 (etóxi)_k-acético,
 em que **k** é tal como ficou definido anteriormente.

A preparação dos reagentes bifuncionais é conhecida na técnica. Os precursores de ésteres -NHS- de ácido 2-(acetiltio)-(etóxi)_k-acético encontram-se
 10 descritos na DE-3924705, enquanto a derivação para o composto acetiltio encontra-se descrita por March, J., Advanced Organic Chemistry, McGraw-Hill, 1977, 375-376. O SATA encontra-se disponível comercialmente (Molecular Probes, Eugene, OR, USA e Pierce, Rockford, IL).

15 O número de grupos tiol a serem adicionados a uma molécula EPO pode ser selecionado pela ajustagem dos parâmetros de reação, isto é, a concentração da proteína (EPO) e a relação proteína/reagente bifuncional. De preferência, a EPO é ativada mediante liga-
 20 ção covalente de 1 a 5 grupos tiol por molécula de EPO, com maior preferência, de 1,5 a 3 grupos tiol por molécula de EPO. Estas faixas referem-se à distribuição estatística do grupo tiol sobre a população de proteínas de EPO.

25 A reação é realizada, por exemplo, em uma solução amortecedora aquosa, pH 6,5-8,0, por exemplo,

em 10 mM fosfato de potássio, 50 mM NaCl, pH 7,3. O reagente bifuncional pode ser adicionado em DMSO. Depois que foi concluída a reação, de preferência após 30 minutos, a reação é sustada mediante adição de lisina.

5 O excesso de reagente bifuncional pode ser separado por meio de processos conhecidos na técnica, por exemplo, mediante diálise ou filtragem de coluna. O número médio de grupos tiol adicionados à EPO pode ser determinado por meio de processos fotométricos, descritos, por exemplo, por Grasetti, D.R. e Murray, J.F., em J. Appl. Biochem. Biotechnol. 119, 41-49 (1967).

10

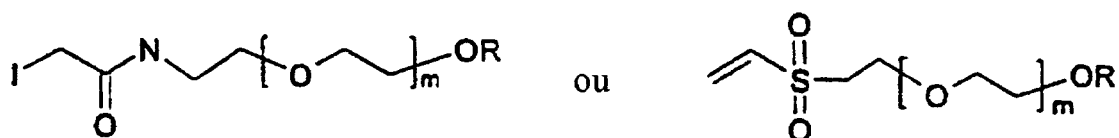
A reação supra é seguida pelo acoplamento covalente de um derivado de polietileno glicol (PEG) ativado. Os derivados de PEG adequados são moléculas

15 de PEG ativadas com um peso molecular médio entre cerca de 20 até cerca de 40 kDa, com maior preferência, entre cerca de 24 até cerca de 35 kDa, e com maior preferência, cerca de 30 kDa.

Os derivados de PEG ativados são conhecidos na técnica e encontram-se descritos, por exemplo, Morpurgo, M. et al., J. Bioconj. Chem. (1996) 7, página 363 ff para PEG-vinilsulfona. As espécies de PEG de cadeia linear e de cadeia ramificada são adequadas para a preparação dos compostos da Fórmula 1. Exemplos de

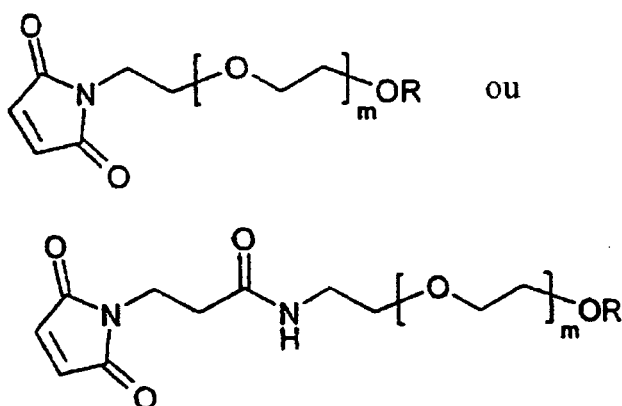
20 reagentes de PEG reativos são iodo-acetil-metóxi-PEG e metóxi-PEG-vinilsulfona:

25

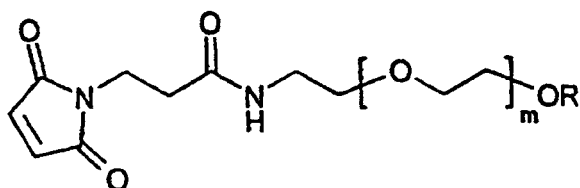


A utilização destas substâncias ativadas por iodo é conhecida na técnica e encontra-se descrita, por exemplo, por Hermanson, G.T. em Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) p, 147-148.

Com maior preferência, as espécies de PEG são ativadas por maleimida utilizando-se (alcóxi-PEG-maleimida), tal como metóxi-PEG-maleimida (MW 30000; Shearwater Polymers, Inc.). A estrutura da alcóxi-PEG-maleimida é a seguinte:



em que **R** e **m** são tais como foram definidos anteriormente, preferencialmente.



A reação de acoplamento com alcóxi-PEG-maleimida ocorre depois de separação *in situ* do grupo de proteção de tiol em uma solução de amortecimento aquosa, por exemplo, 10 mM fosfato de potássio, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6,2. A clivagem do grupo de proteção pode ser realizada, por exemplo, com hidroxilamino em DMSO a 25°C, pH 6,2 durante cerca de 90 minutos. Para a modificação do PEG, a relação molar de EPO/alcóxi-PEG-maleimida ativada deverá ser de cerca de 1:3 até cerca de 1:6, e de preferência 1:4. A reação poderá ser sustada mediante a adição de cisteína e a reação dos grupos tiol (-SH) remanescentes com N-metilmaleimida ou outros compostos apropriados capazes de formarem aglutinações de bissulfureto. Por causa da reação de quaisquer grupos tiol ativos remanescentes com um grupo de proteção, tais como N-metilmaleimida ou outro grupo de proteção adequado, as glicoproteínas de EPO nos conjugados desta invenção podem conter esses grupos de proteção. De uma maneira geral o procedimento descrito neste contexto produzirá uma mistura de moléculas que são dotadas de números variáveis de tióis protegidos por diferentes números do grupo de proteção, na dependência do número dos grupos tiol ativados na glicoproteína que não foram conjugados ao PEG-maleimida.

Considerando-se que N-metilmaleimida forma o mesmo tipo de aglutinação covalente quando usada para bloquear os restantes grupos tiol da proteína pegilada,

compostos de bissulfureto conduzirão a uma reação de permuta sulfureto/bissulfureto intermolecular para um acoplamento ligado de bissulfureto do reagente de bloqueio. Os reagentes de bloqueio preferidos para esse tipo de reação de bloqueio são a glutathione oxidada (GSSG), a cisteína e a cistamina. Enquanto que com a cisteína nenhuma carga líquida é introduzida na proteína pegilada, com o uso de reagentes de bloqueio GSSG ou cistamina resulta em uma carga negativa ou positiva adicional.

A maior purificação dos compostos da Fórmula 1, incluindo a separação das espécies de EPO mono-, di- e tri-pegiladas, poderá ser realizada por meio de processos conhecidos na técnica, por exemplo, cromatografia de coluna.

Derivados de eritropoetina pegilados preferentemente contêm pelo menos noventa por cento de conjugados mono-PEG. Usualmente os conjugados mono-PEG de glicoproteínas de eritropoetina são desejáveis porque eles tendem a ter atividade mais alta do que os conjugados di-PEG. A percentagem dos conjugados mono-PEG bem como a relação das espécies mono- e di-PEG pode ser controlada pelo agrupamento de frações mais amplas em torno do pico de eluição, para diminuir a percentagem de frações mono-PEG ou mais estreitas para aumentar a percentagem de mono-PEG na composição. Cerca de noventa por cento de conjugados mono-PEG constitui um bom equilíbrio de rendimento e atividade. Por vezes compo-

sições em que, por exemplo, pelo menos noventa por cento ou pelo menos noventa e seis por cento dos conjugados são espécies mono-PEG (n igual a 1) poderão ser desejadas. Em uma concretização desta invenção, a percentagem de conjugados onde n é 1 varia de noventa por cento a noventa e seis por cento.

As composições farmacêuticas que compreendem eritropoetina pegilada são conhecidas na técnica e encontram-se descritas, por exemplo, no pedido de patente internacional WO 01/87329. As composições podem compreender de 10 a 10000 µg de uma proteína de eritropoetina por ml, tal como se definiu anteriormente. Preferentemente, as composições compreendem de 10 a 1000 µg, por exemplo, 10, 50, 100, 400, 800 ou 2500 µg por ml. Além disso, as composições poderão compreender de 10 µg a 10000 µg de proteína de eritropoetina por ml, 10-200 mmol/l sulfato, 10 a 50 mmol/l de fosfato, pH 6,0 a 6,5. Esta composição também pode compreender até 20 mM de metionina, 1-5 % de um poliol (p/v), até 0,1% de pluronic F68 (p/v) e opcionalmente até 1 mM de CaCl₂. Um exemplo desta composição compreende 10 µg a 10000 µg de proteína de eritropoetina por ml, 40 mmol/l de sulfato, 10 mmol/l de fosfato, 3% de manitol (p/v), 10 mM de metionina, 0,01% de pluronic F68 (p/v), pH 6,2. Alternativamente, a composição poderá compreender 10 µg a 10000 µg de proteína de eritropoetina por ml, 10 a 100 mmol/l de NaCl, 10 a 50 mmol/l de fosfato, pH 6,0 a 7,0, opcionalmente 1-5% (p/v) de um poliol. Além

dito, esta composição poderá compreender até 20 mM de metionina, até 0,1% de pluronic F68 (p/v) e opcionalmente 7,5 $\mu\text{mol/l}$ de CaCl_2 . Especificamente, esta composição poderá compreender de 10 μg a 10000 μg de proteína de eritropoetina por ml, 100 mmol/l de NaCl_2 , 10 mM de metionina, 0,01% de pluronic F68 (p/v), e 10 mmol/l de fosfato, pH 7,0.

A presente invenção também se refere à composição mencionada anteriormente a qual compreende 10 μg a 10000 μg de proteína de eritropoetina por ml, 10 a 50 mmol/l de arginina, pH 6 a 6,5, 10 a 100 mmol/l de sulfato de sódio. Além disto, esta composição poderá compreender até 20 mM de metionina, até 0,1% de pluronic F68 (p/v), e opcionalmente até 1 mmol/l de CaCl_2 e opcionalmente 1 - 5% (p/v) de um poliol. Especificamente, esta composição poderá compreender de 10 μg a 10000 μg de proteína de eritropoetina por ml, 40 mmol/l de arginina, pH 6,2, 30 mmol/l de sulfato de sódio, 3% de manitol (p/v), 10 mM de metionina, 0,01% de pluronic F68 (p/v) e, opcionalmente, 1 mmol/l de CaCl_2 . Uma concretização preferida da presente invenção refere-se às composições que compreendem de 10 a 10000 $\mu\text{g/ml}$ de eritropoetina, de preferência 25 a 2500 $\mu\text{g/ml}$ de eritropoetina, e

- a) 10 mM de sódio/fosfato de potássio, 100 mM de NaCl , pH 7,0 ou
- b) 10 mM de fosfato de sódio, 120 mM de sulfato de sódio, pH 6,2 ou

- c) 10 mM fosfato de sódio, 40 mM de sulfato de sódio, 3% de manitol (p/v), pH 6,2 ou
- d) 10 mM de fosfato de sódio, 40 mM de sulfato de sódio, 3% de manitol (p/v), 10 mM de metionina, 0,01% de pluronic F68 (p/v), pH 6,2 ou
- e) 40 mM de arginina, 30 mM de sulfato de sódio, 3% de manitol (p/v), pH 6,2 ou
- f) 40 mM de arginina, 30 mM de sulfato de sódio, 3% de manitol (p/v), 10 mM de metionina, 0,01% pluronic F68 (p/v) pH 6,2.

Na concretização de maior preferência, as composições compreendem uma quantidade de proteína de eritropoetina de 50, 100, 400, 800 ou 2500 µg/ml. As composições de maior preferência compreendem ou 10 mM de fosfato de sódio, 40 mM de sulfato de sódio, 3% de manitol (p/v), 10 mM de metionina, 0,01% de pluronic F68 (p/v), pH 6,2, ou então 40 mM de arginina, 30 mM de sulfato de sódio, 3% de manitol (p/v), 10 mM de metionina, 0,01% de pluronic F68 (p/v), pH 6,2. Outros detalhes dessas composições são conhecidos a partir do WO 01/87329.

A invenção também se refere a um método adequado para o tratamento de distúrbios por distribuição de ferro em diabetes, o qual compreende a administração de uma quantidade de proteína de eritropoetina efetiva tal como ficou definida anteriormente. Além

disso, a invenção relaciona-se com um medicamento adequado para o tratamento de distúrbios de distribuição de ferro em diabetes caracterizado pelo fato de conter uma quantidade de proteína de eritropoetina efetiva.

5 Nos casos mencionados anteriormente, os diabetes mellitus não dependentes de insulina constituem a forma de diabetes preferida.

No tratamento de distúrbios de ferro por distribuição de ferro em diabetes, a EPO pode ser administrada, por exemplo, de acordo com uma dosagem de 150 U/kg de peso corpóreo, duas vezes por semana. A dosagem pode ser variada de acordo com as necessidades do paciente individual e também pode estar na faixa de, por exemplo, 100 a 200 U/kg. Na dependência do tempo de semi-vida do derivado de EPO utilizado, poderá ser administrada uma dose entre, por exemplo, 1 ou 3 vezes por semana. Na dependência das necessidades de um paciente individual, um médico também poderá escolher uma dosagem diferente.

20 A atividade específica da EPO ou conjugados de EPO de acordo com a presente invenção pode ser determinada por vários ensaios conhecidos na técnica. A atividade biológica das proteínas de EPO purificadas desta invenção é tal que a administração da proteína de EPO por injeção a pacientes humanos resulta em as células da medula óssea aumentarem a produção de reticulócitos e das células vermelhas do sangue em comparação com os grupos de pacientes não injetados ou de contro-

le. A atividade biológica das proteínas de EPO, ou de fragmentos das mesmas, obtidas e purificadas de acordo com esta invenção, pode ser testada por meio de processos de acordo com Annable, et al., Bull. Wld. Hlth. Org. (1972) 47:99-112 e Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2). Um outro ensaio biológico para se determinar a atividade da proteína de EPO, o ensaio de camundongo normocitaêmico, encontra-se descrito na técnica (por exemplo, Pharm. Europa Spec. Issue Erythropoietin BRP Bio 1997(2), e a monografia de eritropoetina de Ph Eur. BRP.).

A invenção será mais bem compreendida pela referência aos exemplos seguintes que ilustram, mas não limitam, a invenção descrita neste contexto.

15 EXEMPLO

Uma mulher de meia idade que padece de diabetes é examinada quanto a distúrbios de distribuição de ferro por determinação dos seguintes parâmetros - COMPOSIÇÃO DE REVESTIMENTO DE PRÉ-TRATAMENTO (proteína C reativa), ferritina e receptor de transferrina solúvel - conforme descrito por P. Lehmann, M. Volkmann, J. Lotz, A. Baldauf, R. Roeddiger, , posteriormente apresentado na AACC/CSCC, Annual Meeting, July 29 - August 2, 2001, Chicago, Illinois. Os resultados mostram distúrbios de distribuição de ferro. A paciente é tratada subcutaneamente com 150 U/kg Recormo™ (proteína de eritropoetina disponível comercialmente) duas vezes na semana durante um máximo de 12 semanas. Depois disso,

a determinação dos parâmetros tais como descritos anteriormente mostram um aperfeiçoamento no distúrbio de deficiência de ferro.

REIVINDICAÇÕES

1 - Utilização de proteína de eritropoetina, **caracterizada** pelo fato de que é usada na fabricação de um medicamento para o tratamento de distúrbios de distribuição de ferro em diabéticos não dependentes de insulina.

2 - Utilização, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de eritropoetina é uma eritropoetina humana.

3 - Utilização, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de eritropoetina é epoetina alfa ou epoetina beta.

4 - Utilização, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de eritropoetina é expressa por ativação de gene endógeno.

5 - Utilização, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de eritropoetina apresenta a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 ou SEQ ID NO:2.

6 - Utilização, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de eritropoetina apresenta a sequência de eritropoetina humana modificada pela adição de 1 a 6 locais de glicosilação.

7 - Utilização, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de eritropoetina é darbepoetina alfa.

8 - Utilização, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de eritropoietina, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, é pegilada.

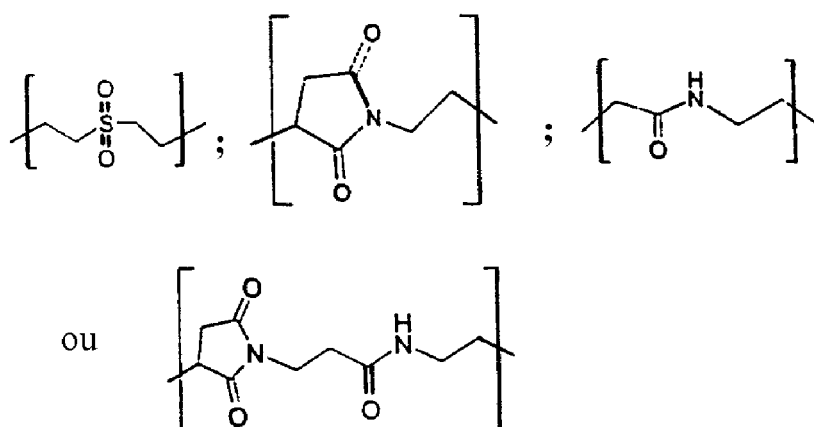
9 - Utilização, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de eritropoetina é um conjugado, o referido conjugado compreendendo uma

proteína de eritropoetina que apresenta pelo menos um grupo amino livre e tendo a atividade biológica *in vivo* de fazer com que as células da medula óssea aumentem a produção de reticulócitos e células vermelhas do sangue e selecionado a partir do grupo que consiste em eritropoetina humana e seus análogos que têm uma sequência de eritropoetina humana modificada pela adição de 1 a 6 locais de glicosilação ou uma reordenação de pelo menos um local de glicosilação; sendo a referida eritropoetina ligada covalentemente a **n** grupos poli(etileno glicol) da fórmula $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2)_m-\text{OR}$ com o $-\text{CO}$ de cada grupo de poli(etileno glicol) formando uma ligação de amida com um dos referidos grupos amino; em que R é alquila (C_1-C_6); x é 2 ou 3; m varia de 450 a 900; n varia de 1 a 3; e n e m são selecionados de maneira tal que o peso molecular do conjugado menos a proteína de eritropoetina varia de 20 quilodáltons a 100 quilodáltons.

10 - Utilização, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada** pelo fato de que x é 2, m é 650 a 750, n é 1 e R é metil.

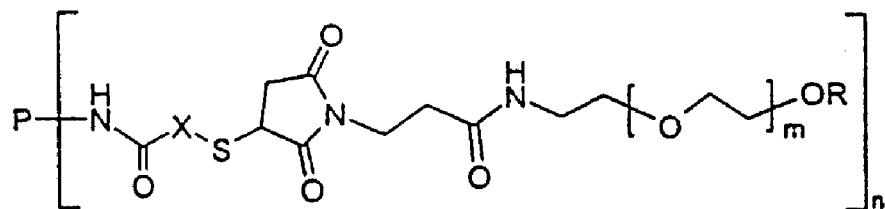
11 - Utilização, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada** pelo fato de que a proteína de eritropoetina é um conjugado, o referido conjugado compreendendo uma proteína de eritropoetina que apresenta pelo menos um grupo amino livre e que apresenta atividade biológica *in vivo* de fazer com que as células da medula óssea aumentem a produção de reticulócitos e de células vermelhas do sangue, e selecionado a partir do grupo que consiste em eritropoetina humana e seus análogos que têm a estrutura principal da eritropoetina humana modificada pela adição de 1 a 6 locais de glicosilação; sendo a referida proteína de eritropoetina ligada covalentemente a de um a três grupos de poli(etileno glicol) alcoxila inferior, com cada grupo de poli(etileno glicol) sendo ligado covalentemente à

proteína de eritropoetina por intermédio de um ligante da fórmula $-C(O)-X-S-Y-$, com o C(O) do ligante formando uma aglutinação de amida com um dos referidos grupos amino, X é $-(CH_2)_k-$ ou $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, em que k varia de 1 até 10, Y é



o peso molecular médio de cada metade de poli(etileno glicol) varia de 20 quilodáltons até 40 quilodáltons, e o peso molecular do conjugado varia de 51 quilodáltons até 175 quilodáltons.

12 - Utilização, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que é usada com um conjugado de eritropoetina da fórmula:



em que **n** é um inteiro de 1 a 3; **m** é um inteiro de 450 a 900; R é alquila(C₁-C₆); X é $-(CH_2)_k-$ ou $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$, k varia de 1 até 10 e P é o resíduo da proteína de eritropoetina sem os n grupos amino que formam uma ligação de amida com X.

FIG. 1

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
 Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
 Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
 Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
 Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
 Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
 Cys Arg Thr Gly Asp¹⁶⁵

FIG. 2

Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg¹⁰ Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys²⁰
 Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala³⁰ Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr⁴⁰
 Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala⁵⁰ Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala⁶⁰
 Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu⁷⁰ Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu⁸⁰
 Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro⁹⁰ Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser¹⁰⁰
 Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg¹¹⁰ Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser¹²⁰
 Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu¹³⁰ Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys¹⁴⁰
 Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg¹⁵⁰ Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala¹⁶⁰
 Cys Arg Thr Gly Asp Arg¹⁶⁶