



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

(21) **PI0611221-8 A2**

(22) Data de Depósito: 26/05/2006
(43) Data da Publicação: 24/08/2010
(RPI 2068)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 47/48
C07K 14/535

(54) Título: **POLIPEPTÍDEOS DE G-CSF PEGUILADOS E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS MESMOS**

(30) Prioridade Unionista: 01/06/2005 US 60/686.726

(73) Titular(es): Maxygen Holdings LTD.

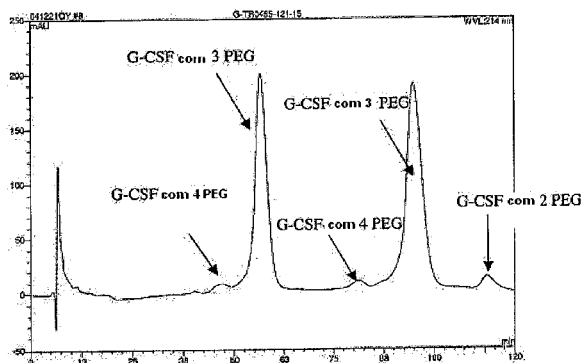
(72) Inventor(es): Bobby Soni, Carsten Germansen, Grethe Rasmussen

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT DK2006000292 de 26/05/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/128460 de 07/12/2006

(57) Resumo: Método para aumento da estabilidade e uniformidade de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado tendo pelo menos uma porção de PEG presa ao grupo epsilon amino de um resíduo de lisina ou ao grupo amino N-terminal e pelo menos uma porção de PEG presa a um grupo hidroxila, compreendendo sujeição do polipeptídeo a um pH elevado de acima de 8,0 durante um período de tempo adequado para remover as porções de PEG presas a um grupo hidroxila e redução do pH para cerca de 8,0 ou menos; bem como polipeptídeos e composições de G-CSF PEGuilado produzidas de acordo com o método e métodos para aumento dos níveis de neutrófilo em um paciente usando os polipeptídeos e composições de G-CSF PEGuilado.



POLIPEPTÍDEOS DE G-CSF PEGUILADOS E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS MESMOS

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um método para remoção
5 de porções de PEG lábeis de proteínas de G-CSF PEGuiladas
para aumentar a estabilidade e uniformidade e à proteínas
de G-CSF PEGuiladas resultantes. A invenção também se
refere à composições farmacêuticas compreendendo as
proteínas PEGuiladas e métodos de tratamento através de
10 administração das composições farmacêuticas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A fixação covalente de porções de polietileno glicol
(PEG) à proteínas ou polipeptídeos ("PEGuilação") é uma
técnica bem conhecida para aperfeiçoamento das propriedades
15 de tais proteínas ou polipeptídeos, em particular proteínas
farmacêuticas, por exemplo, de forma a melhorar a meia-vida
em circulação e/ou proteger epítomos potenciais e, assim
reduzir o potencial de uma resposta imunogênica indesejada.
Numerosas tecnologias baseadas em PEG ativo estão
20 disponíveis para proporcionar fixação da porção de PEG a um
ou mais grupos sobre a proteína. Por exemplo, propionato de
mPEG-succinimidila (mPEG-SPA, disponível da Nektar
Therapeutics) é geralmente considerado como sendo seletivo
para fixação ao N-terminal e grupos epsilon-amino de
25 resíduos de lisina via uma ligação de amida. Contudo, na
prática, o mPEG-SPA nem sempre se fica exclusivamente a
esses grupos, mas também pode se fixar ao grupo hidroxila
de um resíduo de serina, tirosina ou treonina via uma
ligação de éster. Como um resultado, proteínas PEGuiladas
30 preparadas usando essa tecnologia podem não ter um grau

suficiente de uniformidade e podem conter uma série de outros diferentes isômeros de PEG que não aqueles que eram pretendidos. Isso é indesejado por várias razões, incluindo o fato de que isso torna a caracterização de tais proteínas mais complicada. Ainda, porções de PEG ligadas a outros grupos que não aqueles pretendidos podem ser relativamente instáveis. Por exemplo, porções de PEG ligadas a um grupo hidroxila via uma ligação de éster no caso de um PEG amina-específico, tal como mPEG-SPA, tendem a ser relativamente instáveis comparado com aquelas porções que são ligadas via uma ligação de amida ao resíduo N-terminal ou uma lisina. Dependendo da formulação e condições de armazenamento, isso pode levar a uma perda indesejada desses grupos de PEG lábeis e, assim, potencialmente, a uma alteração nas propriedades da proteína PEGuilada com o tempo. Ainda, podem haver problemas regulatórios ou de segurança potenciais para uma proteína PEGuilada farmacêutica na qual há um risco de que uma ou mais porções de PEG possam se desprender da proteína no corpo após ela ser administrada a um paciente.

A presente invenção se dirige a esses problemas proporcionando um método pelo qual tais grupos de PEG lábeis podem ser facilmente removidos, desse modo, resultando em um produto de proteína PEGuilado mais estável e uniforme.

BREVE DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere, em geral, a um método para aumento da estabilidade e uniformidade de um polipeptídeo PEGuilado tendo pelo menos uma porção de PEG presa a um resíduo de lisina ou ao N-terminal e pelo menos

uma porção de PEG presa a um grupo hidroxila, compreendendo
sujeição do polipeptídeo a um pH alterado durante um
período de tempo adequado para remover porções de PEG
presas a um grupo hidroxila, após o que o pH é ajustado
5 para um pH adequado para armazenamento a longo prazo do
polipeptídeo em questão.

Em um aspecto particular, a invenção se refere a um
método para aumento da estabilidade e uniformidade de um
polipeptídeo de fator de estimulação de colônia de
10 granulócito (G-CSF) PEGuilado tendo pelo menos uma porção
de PEG presa ao grupo epsilon amino de um resíduo de lisina
ou ao grupo amino N-terminal e pelo menos uma porção de PEG
presa a um grupo hidroxila compreendendo sujeição do
polipeptídeo a um pH elevado de acima de 8,0 durante um
15 período de tempo adequado para remover porções de PEG
presas a um grupo hidroxila e redução do pH para cerca de
8,0 ou menos.

Outro aspecto da invenção se refere a um método para
produção de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado
20 compreendendo sujeição de um polipeptídeo de G-CSF a uma
reação de PEGuilação com um polietileno glicol (PEG)
ativado amina-específico para produzir um intermediário de
polipeptídeo de G-CSF PEGuilado e, subseqüentemente,
sujeição do intermediário de polipeptídeo PEGuilado a um pH
25 elevado de pelo menos cerca de 9,0 durante um período de
tempo adequado para remover porções de PEG presas a um
grupo hidroxila para produzir o polipeptídeo de G-CSF
PEGuilado.

Outro aspecto da invenção se refere a uma composição
30 compreendendo uma mistura homogênea de isômeros de PEG

posicionais de uma variante de polipeptídeo de G-CSF PEGuilado, em que pelo menos cerca de 80% dos isômeros de PEG posicionais da mistura consistem de dois isômeros de PEG posicionais tendo, cada um, porções de PEG consistindo
5 de duas porções de PEG ligadas a grupos epsilon amino de lisina e uma porção de PEG ligada ao grupo amino N-terminal.

Um aspecto adicional da invenção se refere a uma composição compreendendo uma mistura de isômeros de PEG
10 posicionais de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado, em que o polipeptídeo compreende a substituição K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1) e em que pelo menos cerca de 80% dos isômeros de PEG posicionais do polipeptídeo são isômeros de
15 PEG posicionais de lisina/N-terminais tendo três porções de PEG presas.

Em ainda outro aspecto, a invenção se refere a um método de produção de uma mistura de isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais de um polipeptídeo de G-
20 CSF recombinante compreendendo as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S 159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem, compreendendo: a) expressão do polipeptídeo de G-CSF recombinante em uma célula hospedeira; b) isolamento do polipeptídeo de G-CSF recombinante; c) reação do
25 polipeptídeo de G-CSF recombinante isolado com um PEG ativado amina-específico para produzir uma pluralidade de isômeros de PEG posicionais do polipeptídeo de G-CSF recombinante; d) reação da pluralidade de isômeros de PEG posicionais em um pH de 8,5 a 10,5 para produzir uma
30 pluralidade de isômeros de PEG posicionais de lisina/N-

terminais parcialmente PEGuilados do polipeptídeo de G-CSF recombinante.

Outros aspectos da invenção se referem a polipeptídeos de G-CSF PEGuilados produzidos usando os métodos descritos aqui, bem como polipeptídeos de G-CSF PEGuilados caracterizados por sua distribuição de isômero de PEG posicional e composições compreendendo tais polipeptídeos de G-CSF PEGuilados e métodos para aumento do nível de neutrófilos em um paciente sofrendo de ou em risco de um nível insuficiente de neutrófilos através de administração de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado ou uma composição da invenção. Aspectos adicionais da invenção e modalidades preferidas serão evidentes a partir da descrição abaixo, bem como das reivindicações em anexo.

15 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra uma exploração de uma análise por SDS-PAGE de uma variante de G-CSF que foi PEGuilada, parcialmente des-PEGuilada e purificada conforme descrito acima.

20 A Figura 2 mostra uma exploração de uma análise por SDS-PAGE de um G-CSF que foi PEGuilado e parcialmente des-PEGuilado conforme descrito aqui.

A Figura 3 mostra um cromatograma de troca de cátions do reservatório de produto parcialmente des-PEGuilado preparado de acordo com a invenção.

A Figura 4 mostra um cromatograma de troca de cátions de uma variante de G-CSF PEGuilada purificada que não foi submetida à des-PEGuilação de acordo com a invenção.

DESCRIÇÃO

30 **Definições**

No contexto da presente descrição e reivindicações, as seguintes definições se aplicam: os termos "polipeptídeo" ou "proteína" podem ser usados permutavelmente aqui para se referir a polímeros de aminoácidos, sem estar limitado a uma seqüência de aminoácido de qualquer comprimento em particular. Esses termos se destinam a incluir não apenas proteínas de comprimento total, mas também, por exemplo, fragmentos ou versões truncadas, variantes, domínios, etc. de qualquer determinada proteína ou polipeptídeo.

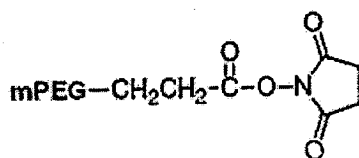
10 Um polipeptídeo de "G-CSF" é um polipeptídeo tendo a seqüência do fator de estimulação de colônia de granulócito humano (hG-CSF), conforme mostrado em SEQ ID NO: 1, ou uma variante de hG-CSF que exibe atividade de G-CSF. A "atividade de G-CSF" pode ser a capacidade de se ligar a um
15 receptor de G-CSF (Fukunaga e colaboradores, *J. Bio. Chem.*, 265: 14008, 1990), mas é, de preferência, atividade de proliferação de células de G-CSF, em particular determinada em um ensaio de atividade *in vitro* usando a linhagem de células de murino NFS-60 (ATCC Número: CRL-1838). Um ensaio
20 *in vitro* adequado para atividade de G-CSF usando a linhagem de células NFS-60 é descrita em Hammerling e colaboradores em *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13(1): 9-20, 1995. Um polipeptídeo "exibindo" atividade de G-CSF é considerado como tendo tal atividade quando ele mostra uma função
25 mensurável, por exemplo, uma atividade proliferativa mensurável no ensaio *in vitro*.

Uma "variante" é um polipeptídeo o qual difere quanto a um ou mais resíduos de aminoácido de um polipeptídeo precursor, onde o polipeptídeo precursor geralmente é um
30 com uma seqüência de aminoácido nativa, do tipo selvagem,

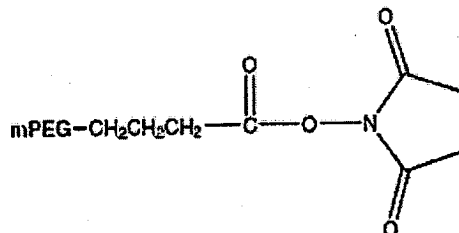
tipicamente um polipeptídeo de mamífero nativo e, mais tipicamente, um polipeptídeo humano nativo. A variante, assim, contém uma ou mais substituições, inserções ou deleções comparado com o polipeptídeo nativo. Esse pode, por exemplo, incluir truncamento do N- e/ou C-término em um ou mais resíduos de aminoácido ou a adição de um ou mais resíduos extra no N- e/ou C-término, por exemplo, adição de um resíduo de metionina no N-terminal. A variante, mais freqüentemente, irá diferir em até 15 resíduos de aminoácido do polipeptídeo precursor, tal como em até 12, 10, 8 ou 6 resíduos de aminoácido.

Um "PEG ativado amina-específico" é qualquer derivado de PEG que se prende, de preferência, ao grupo amino N-terminal ou a grupos ϵ -amino de resíduos de lisina via uma ligação de amida. Exemplos de derivados de PEG ativados amina-específicos incluem:

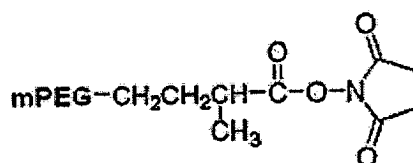
mPEG-propionato de succinimidila (mPEG-SPA):



mPEG-butanoato de succinimidila (mPEG-SBA):



e mPEG- α -metilbutanoato de succinimidila (mPEG-SMB):



mPEG-SPA, mPEG-SBA e mPEG-SMB estão disponíveis da Nektar

Therapeutics; veja os Catálogos 2004 e 2005-2006 da Nektar Advanced PEGylation, "Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation". Outros derivados de PEG ativado amina-específicos incluem PEG-SS (succinato de succinimidila), PEG-SG (glutarato de succinimidila), PEG-NPC (carbonato de p-nitrofenila) e PEG-isocianato, disponíveis da SunBio Corporation; e PEG-SCM, disponível da NOF Corporation.

Uma porção de PEG "lábil" se refere, no presente contexto, a uma porção de PEG presa a um grupo hidroxila de um polipeptídeo, em particular via uma ligação de estar ao grupo hidroxila de um resíduo de serina, tirosina ou treonina. Conforme explicado acima, a fixação de tais porções de PEG via um grupo hidroxila tende a ser instável, de modo que essas porções de PEG tendem a se desprender do polipeptídeo com o tempo através de hidrólise das ligações de estar, por exemplo, quando um polipeptídeo contendo tais porções é armazenado na forma de uma solução aquosa.

Conforme usado aqui, "estabilidade" se refere à fixação de porções de PEG ligadas a um polipeptídeo, isto é, quer tais porções de PEG permaneçam ligadas ao polipeptídeo durante o tempo, por exemplo, durante armazenamento em uma solução aquosa ou quer eles venham a tender a se desprender, por exemplo, como um resultado de hidrólise da ligação de éster;

Conforme usado aqui, o termo "isômero de PEG posicional" de uma proteína se refere à diferentes formas PEGuiladas da proteína onde grupos de PEG estão localizados em diferentes posições de aminoácido da proteína. O termo "isômero de PEG de lisina/N-terminal" de uma proteína

significa que os grupos de PEG estão presos ao amino-
término da proteína e/ou a grupos epsilon amino de resíduos
de lisina na proteína. Por exemplo, a expressão "isômeros
de PEG posicionais de lisina/N-terminais tendo 3 porções de
5 PEG presas", conforme aplicado ao G-CSF, significa uma
mistura de isômeros de PEG posicionais de G-CSF nos quais
três grupos de PEG são presos a grupos epsilon amino de
resíduos de lisina e/ou ao N-terminal da proteína.
Tipicamente, um "isômero de PEG posicional de lisina/N-
10 terminal tendo 3 porções de PEG presas" terá duas porções
de PEG presas aos resíduos de lisina e uma porção de PEG
presa ao N-terminal. Análise dos isômeros de PEG
posicionais pode ser realizada usando HPLC por troca de
cátions, conforme descrito nos exemplos abaixo.

15 Uma "mistura substancialmente purificada de isômeros
de PEG de lisina/N-terminais" de um polipeptídeo se refere
à mistura de isômeros de PEG posicionais de lisina/N-
terminais a qual foi submetida a um procedimento
cromatográfico ou outro de purificação de forma a remover
20 impurezas tais como isômeros de PEG posicionais de não-
lisina/N-terminais. A "mistura substancialmente purificada
de isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais" será,
por exemplo, isenta da maioria das porções de PEG lábeis
presas a um grupo hidroxila que, de outro modo, estaria
25 presente na ausência de uma etapa de des-PEGuilação parcial
e subsequente purificação, conforme descrito aqui, e
conterá, tipicamente, menos do que cerca de 20% de
polipeptídeos contendo uma porção de PEG lábil presa a um
grupo hidroxila, mais tipicamente menos de cerca de 15%. De
30 preferência, existirão menos do que cerca de 10% de

polipeptídeos contendo uma porção de PEG lábil presa a um grupo hidroxila, por exemplo, menos do que cerca de 5%.

O termo "mistura homogênea de isômeros de PEG posicionais de uma variante de polipeptídeo" significa que a porção de polipeptídeo da diferentes isômeros de PEG posicionais é a mesma. Isso significa que os diferentes isômeros de PEG posicionais da mistura são todos baseados em uma única seqüência de variante de polipeptídeo. Por exemplo, uma mistura homogênea de isômeros de PEG posicionais de uma variante de polipeptídeo de G-CSF PEGuilada significa que diferentes isômeros de PEG posicionais da mistura são baseados em uma única variante de polipeptídeo de G-CSF.

Conforme usado aqui, "uniformidade" se refere à homogeneidade de um polipeptídeo PEGuilado em termos do número de diferentes isômeros posicionais, isto é, diferentes isômeros de polipeptídeo contendo diferentes números de porções de PEG presas em diferentes posições, bem como à distribuição relativa desses isômeros posicionais. Para polipeptídeos farmacêuticos destinados a uso terapêutico em seres humanos ou animais, geralmente é desejável que o número de diferentes isômeros de PEG posicionais seja minimizado.

"Des-PEGuilação parcial" se refere ao fato de que os métodos da invenção servem para remover porções de PEG lábeis presas a um grupo hidroxila, enquanto que porções de PEG que são mais estavelmente presas ao N-terminal ou grupo amino de um resíduo de lisina permanecem intactos. Conforme explicado abaixo, o progresso do processo de des-PEGuilação é dependente do valor de pH elevado em particular e da

duração do pH elevado. Portanto, dependendo das condições escolhidas em qualquer caso em particular, é possível que uma pequena proporção dos polipeptídeos ainda possa ter uma porção de PEG presa a um grupo hidroxila no final de uma etapa de des-PEGuilação. Baseado na informação fornecida aqui e no conhecimento geral comum na técnica de análise de proteína, contudo, aqueles habilitados na técnica serão capazes de adaptar o processo de modo que substancialmente todas as porções de PEG lábeis sejam removidas e quaisquer porções de PEG lábeis restantes sejam insignificantes para as propriedades desejadas do produto final. Qualquer referência à "des-PEGuilação" aqui deverá ser compreendida como se referindo à "des-PEGuilação parcial".

Descrição Detalhada

Conforme indicado acima, um aspecto particular da invenção se refere a um método para aumento da estabilidade e uniformidade de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado tendo pelo menos uma porção de PEG presa ao grupo epsilon amino de um resíduo de lisina ou ao grupo amino N-terminal e pelo menos uma porção de PEG presa a um grupo hidroxila, compreendendo sujeição do polipeptídeo a um pH elevado acima de 8,0 durante um período de tempo adequado para remover as porções de PEG presas a um grupo hidroxila e redução do pH para cerca de 8,0 ou menos. Embora esse método seja adequado para qualquer polipeptídeo de G-CSF de mamífero, o polipeptídeo é, de preferência, um polipeptídeo de G-CSF, isto é, com a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 1, opcionalmente com um resíduo de metionina preso ao N-terminal ou uma variante do mesmo. No caso de variantes de G-CSF, essas podem ter uma ou mais substituições,

inserções ou deleções e/ou truncamento do N- e/ou C-término em um ou mais resíduos de aminoácido, comparado com um polipeptídeo de G-CSF nativo do tipo selvagem, tipicamente comparado com o G-CSF humano (SEQ ID NO: 1), por exemplo, de 1 a 15 substituições, tal como até 6, 8, 10 ou 12 substituições. Variantes de G-CSF preferidas incluem aquelas divulgadas no WO 01/51510 e WO 03/006501.

Conforme é descrito, por exemplo, no WO 03/006501, hG-CSF contém quatro resíduos de lisina nas posições 16, 23, 34 e 40 e, quando de sujeição de G-CSF à PEGuilação usando PEG ativado que, de preferência, se liga a resíduos de lisina ou ao N-terminal, freqüentemente será desejável remover pelo menos um desses resíduos de lisina, por exemplo, dois, três ou todos esses resíduos de lisina, por exemplo, através de deleção mas, de preferência, através de substituição. O polipeptídeo de G-CSF usado no método da invenção pode, portanto, ser uma variante na qual pelo menos um dos resíduos de aminoácido selecionados do grupo consistindo de K16, K23, K34 e K40 tenha sido deletado ou substituído, geralmente através de substituição por um resíduo de R ou Q, de preferência um resíduo de R. O polipeptídeo de G-CSF pode, assim, ter uma, duas, três ou quatro substituições selecionadas do grupo consistindo de K16R/Q, K23R/Q, K34R/Q, K40R/Q (onde, por exemplo, "K16R/Q" denota que a lisina na posição 16 é substituída por um resíduo de arginina ou glutamina). De preferência, o polipeptídeo inclui as substituições K16R+K34R+K40R, enquanto que a lisina na posição 23 é deixada inalterada.

Além da remoção de resíduos de lisina onde PEGuilação não é desejada, o WO 03/006501 também descreve a adição de

resíduos de lisina de forma a criar sítios para PEGuilação. Esses podem ser adicionados através de inserção, mas são, de preferência, adicionados através de substituição. Exemplos de substituições de aminoácido preferidas de forma a introduzir um sítio para PEGuilação incluem uma ou mais de Q70K, Q90K, T105K, Q120K, T133K, S159K e H170K, tais como duas, três, quatro ou cinco dessas substituições, com substituições preferidas sendo T105K+S159K. Em uma modalidade preferida, o polipeptídeo de G-CSF inclui as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K. Em uma modalidade particular, o polipeptídeo de G-CSF tem apenas essas cinco substituições com relação ao hG-CSF.

Produção de polipeptídeos de G-CSF

Os polipeptídeos de G-CSF a serem PEGuilados de acordo com a invenção podem ser produzidos através de qualquer método adequado conhecido na técnica, por exemplo, conforme descrito no WO 03/006501, o qual é aqui incorporado por referência. Tais métodos incluem construção de uma sequência de nucleotídeo que codifica o polipeptídeo e expressão da sequência em um hospedeiro transformado ou transfectado. Contudo, os polipeptídeos da invenção podem ser produzidos, talvez menos eficazmente, através de síntese química ou uma combinação de síntese química e tecnologia de DNA recombinante. Uma sequência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo ou a parte de polipeptídeo de um conjugado da invenção pode ser construída através de isolamento ou síntese de uma sequência de nucleotídeo que codifica o G-CSF precursor, tal como hG-CSF, com a sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 1 e, então, alteração da sequência de

nucleotídeo de modo a realizar a introdução (isto é, inserção ou substituição) ou deleção (isto é, remoção ou substituição) do(s) resíduo(s) de aminoácido relevante(s).

A seqüência de nucleotídeo é, convenientemente, modificada através de mutagênese sítio-dirigida de acordo com métodos convencionais. Alternativamente, a seqüência de nucleotídeo é preparada através de síntese química, por exemplo, através de uso de um sintetizador de oligonucleotídeo, em que oligonucleotídeos são projetados baseado na seqüência de aminoácido do polipeptídeo desejado e, de preferência, seleção daqueles códons que são favorecidos na célula hospedeira na qual o polipeptídeo recombinante será produzido. Por exemplo, vários pequenos oligonucleotídeos que codificam porções do polipeptídeo desejado podem ser sintetizados e montados através de PCR, ligação ou reação em cadeia de ligação (LCR) (Barany, *PNAS* 88: 189-193, 1991). Os oligonucleotídeos individuais conterão, tipicamente, saliências 5' ou 3' para montagem complementar.

Uma vez montada (através de síntese, mutagênese sítio-dirigida ou outro método), a seqüência de nucleotídeo que codifica o polipeptídeo é inserida em um vetor recombinante e operavelmente ligada à seqüências de controle necessárias para expressão do G-CSF na célula hospedeira transformada desejada.

Aqueles habilitados na técnica serão capazes de selecionar vetores, seqüências de controle de expressão e hospedeiros adequados para expressão do polipeptídeo. O vetor recombinante pode ser um vetor de replicação autônoma, isto é, um vetor o qual existe como uma entidade

extracromossômica, a replicação do qual é independente de replicação cromossômica, por exemplo, um plasmídeo. Alternativamente, o vetor é um o qual, quando introduzido em uma célula hospedeira, é integrado no genoma da célula hospedeira e replicado junto com o(s) cromossoma(s) no(s) qual(is) ele foi integrado.

O vetor é, de preferência, um vetor de expressão no qual a sequência de nucleotídeo que codifica o polipeptídeo da invenção é operavelmente ligado a segmentos adicionais requeridos para transcrição da sequência de nucleotídeo. O vetor é, tipicamente, derivado de DNA de plasmídeo ou viral. Uma série de vetores de expressão adequados para expressão nas células hospedeiras mencionadas aqui estão comercialmente disponíveis ou descritos na literatura. Informação detalhada sobre vetores adequados para expressão de G-CSF pode ser encontrada no WO 03/006501.

O termo "seqüências de controle" é definido aqui como incluindo todos os componentes os quais são necessários ou vantajosos para a expressão do polipeptídeo da invenção. Cada seqüência de controle pode ser nativa ou estranha à seqüência de ácido nucleico que codifica o polipeptídeo. Tais seqüências de controle incluem, mas não estão limitadas a, uma seqüência líder, uma seqüência de poliadenilação, seqüência de pró-peptídeo, promotor, intensificador ou uma seqüência de ativação a montante, seqüência de peptídeo sinalizador, íntron sintético e terminador de transcrição. No mínimo, as seqüências de controle incluem um promotor. Uma ampla variedade de seqüências de controle de expressão pode ser usada na presente invenção, por exemplo, qualquer uma das seqüências

de controle listadas no WO 03/006501.

A seqüência de nucleotídeo da invenção que codifica um polipeptídeo exibindo atividade de G-CSF, quer preparada através de mutagênese sítio-dirigida, síntese, PCR ou outros métodos, pode também opcionalmente incluir uma seqüência de nucleotídeo que codifica um peptídeo sinalizador. O peptídeo sinalizador está presente quando o polipeptídeo tem de ser secretado das células nas quais ele é expresso. Tal peptídeo sinalizador, se presente, deverá ser um reconhecido pela célula escolhida para expressão do polipeptídeo. O peptídeo sinalizador pode ser homólogo (por exemplo, ser aquele que normalmente se associa com hG-CFS) ou heterólogo (isto é, originário de outra fonte que não hG-CSF) ao polipeptídeo ou pode ser homólogo ou heterólogo à célula hospedeira, isto é, ser um peptídeo sinalizador normalmente expresso a partir da célula hospedeira ou um o qual normalmente não é expresso a partir da célula hospedeira. Conseqüentemente, o peptídeo sinalizador pode ser procariota, por exemplo, derivado de uma bactéria, tal como *E. coli*, ou eucariota, por exemplo, derivado de uma célula de mamífero, inseto ou levedo. Para informação adicional sobre peptídeos sinalizadores adequados veja WO 03/006501.

Qualquer hospedeiro adequado pode ser usado para produzir o polipeptídeo de G-CSF, incluindo bactérias (embora não particularmente preferido), fungos (incluindo levedos), planta, inseto, mamífero ou outras células de animal ou linhagens de células apropriadas, bem como animais ou plantas transgênicas. Células de mamífero são preferidas. Exemplos de células hospedeiras bacterianas

incluem bactérias gram-positivas, tais como cepas de *Bacillus*, por exemplo, *B. brevis* ou *B. subtilis*, *Pseudomonas* ou *Streptomyces*, ou bactérias gram-negativas, tais como cepas de *E. coli*. Exemplos de células hospedeiras de fungos filamentosos adequadas incluem cepas de *Arpergillus*, por exemplo, *A. oryzae*, *A. niger* ou *A. nidulans*, *Fusarium* ou *Trichoderma*. Exemplos de células hospedeiras de levedo adequadas incluem cepas de *Saccharomyces*, por exemplo, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Klyveromyces*, *Pichia*, tais como *P. pastoris* ou *P. methanolica*, *Hansenula*, tal como *H. Polymorpha* ou *Yarrowia*. Exemplos de células hospedeiras de inseto adequadas incluem uma linha de células de Lepidóptero, tais como células de *Spodoptera frugiperda* (Sf 9 ou Sf21) ou *Trichoplusia ni* (High Five) (US 5.077.214). Exemplos de células hospedeiras de mamífero adequadas incluem linhagens de células de ovário de hamster Chinês (CHO) (por exemplo, CHO-K1; ATCC CCL-61), linhagens de células de Green Monkey (COS) (por exemplo, COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); células de camundongo (por exemplo, NS/O), linhagens de células de Rim de Hamster Bebê (por exemplo, ATCC CRL- 1632 ou ATCC CCL-10) e células humanas (por exemplo, HEK 293 (ATCC CRL-1573)). Linhagens de células adicionais adequadas são conhecidas na técnica e disponíveis de depositários públicos, tal como a American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

Nos métodos de produção da presente invenção, as células são cultivadas em um meio nutriente adequado para a produção do polipeptídeo usando métodos conhecidos na técnica.

Por exemplo, a célula pode ser cultivada através de cultura em um frasco de agitação, fermentação em pequena escala ou larga escala (incluindo fermentações contínua, em batelada, alimentada-em batelada ou em estado sólido) em fermentadores de laboratório ou industriais realizada em um meio adequado e sob condições que permitam que o polipeptídeo seja expresso e/ou isolado. A cultura ocorre em um meio nutriente adequado compreendendo fontes de carbono e nitrogênio e sais inorgânicos, usando procedimentos conhecidos na técnica. Meios adequados estão disponíveis de fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com composições publicadas (por exemplo, em catálogos da American Type Culture Collection). Se o polipeptídeo é secretado no meio nutriente, o polipeptídeo pode ser recuperado diretamente do meio. Se o polipeptídeo não é secretado, ele pode ser recuperado de lisatos de células.

O polipeptídeo resultante pode ser recuperado através de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser recuperado do meio nutriente através de procedimentos convencionais incluindo, mas não limitado a, centrifugação, filtração, extração, liofilização, evaporação ou precipitação.

Os polipeptídeos podem ser purificados através de uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado a, cromatografia (por exemplo, troca de íons, afinidade, hidrofóbica, cromotofocalização e exclusão de tamanho), procedimentos eletroforéticos (por exemplo, focalização isoeletrica preparativa), solubilidade diferencial (por exemplo, precipitação com sulfato de

amônio), SDS-PAGE ou extração (veja, por exemplo, *Protein Purification*, J.-C. Janson e Lars Ryden editores, VCH Publishers, New York, 1989). Métodos específicos para purificação de polipeptídeo exibindo atividade de G-CSF são descritos por D. Metcalf e N. A. Nicola em *The hemopoietic colony-stimulating factors*, páginas 50-51, Cambridge University Press (1995), por C. S. Bae e colaboradores, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 52: 338-344 (1999) e na US 4.810.643.

10 **PEGuilação**

Os polipeptídeos de G-CSF purificados podem, então, ser PEGuilados através de uma variedade de métodos conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Por exemplo, um polipeptídeo de G-CSF pode ser submetido à PEGuilação com um polietileno glicol (PEG) ativado amina-específico.

O PEG ativado amina-específico pode ser qualquer um daqueles mencionados acima, por exemplo, mPEG-propionato de succinimidila (mPEG-SPA), mPEG-butanoato de succinimidila (mPEG-SBA) ou mPEG- α -metilbutanoato de succinimidila (PEG-SMB). O peso molecular das porções de PEG pode ser selecionado baseado, por exemplo, no número de porções de PEG a ser preso ao polipeptídeo e, freqüentemente, estará na faixa de cerca de 1 kDa a cerca de 20 kDa, tal como de cerca de 1 kDa a cerca de 12 kDa, por exemplo, de cerca de 2 kDa a cerca de 10 kDa, tal como de cerca de 4 kDa a cerca de 6 kDa, por exemplo, cerca de 5 kDa. Por exemplo, o PEG ativado pode ser mPEG-SPA com um peso molecular de cerca de 5 kDa. PEGuilação pode ser realizada, por exemplo, em um pH de cerca de 7,5-9,0, por exemplo, cerca de 8,0-8,5. Quando usado sobre porções de PEG aqui, a palavra "cerca de"

indica um peso molecular médio aproximado e reflete o fato de que normalmente haverá uma determinada distribuição de peso molecular em um determinado preparado polimérico. Para informação geral adicional a respeito de métodos de PEGuilação veja, por exemplo, os Catálogos 2004 e 2005-2006 da Nektar Advanced, bem como as referências citadas no mesmo. Uma descrição mais detalhada de métodos de PEGuilação para polipeptídeos de G-CSF também é proporcionada no WO 03/006501.

10 ***Des-PEGuilação parcial***

A escolha de um pH elevado para a etapa de des-PEGuilação é feita baseado em fatores tais como a temperatura na qual a etapa de des-PEGuilação ocorre, a duração da etapa de des-PEGuilação e as condições que foram usadas para PEGuilação, incluindo o pH no qual PEGuilação foi realizada. Geralmente, quanto maior o pH usado durante a des-PEGuilação, mais rápida a des-PEGuilação ocorre. Aqueles habilitados na técnica, assim, reconhecerão que condições de des-PEGuilação, tais como pH, tempo e temperatura, podem ser ajustadas umas às outras para obter o resultado desejado em qualquer determinada situação. Por exemplo, embora seja possível usar um pH elevado relativamente baixo de, por exemplo, entre 8 e 9, uso de um pH maior, por exemplo, de entre 9 e 11, tal como entre 9 e 10, resultará em uma des-PEGuilação mais rápida. Tipicamente, o pH elevado, portanto, estará na faixa de cerca de 8,5 a cerca de 11,0 por exemplo, de cerca de 8,5 a cerca de 10,5, tal como de cerca de 9,0 a cerca de 10,0. O pH elevado pode, por exemplo, estar em uma faixa de cerca de 9,2 a cerca de 9,8, por exemplo, cerca de 9,5.

Normalmente, a etapa de des-PEGuilação ocorrerá imediatamente após PEGuilação, uma vez que isso normalmente será mais eficaz e resultará em tempos de processamento mais curtos e maiores rendimentos. Em sua versão básica, a invenção é, assim, caracterizada por des-PEGuilação parcial de um intermediário denso PEGuilado, seguido por separação convencional usando, por exemplo, purificação cromatográfica, conforme descrito abaixo. Se desejado por qualquer razão, contudo, o procedimento de PEGuilação pode ser seguido por uma etapa de purificação intermediária antes de des-PEGuilação. A etapa de purificação intermediária pode, por exemplo, compreender purificação cromatográfica conforme descrito abaixo, seguido por ultrafiltração e/ou diafiltração. O produto intermediário obtido a partir de qualquer procedimento de purificação intermediário pode, se desejado, ser armazenado antes de des-PEGuilação e quaisquer etapas subseqüentes de purificação. Nesse caso, o produto PEGuilado intermediário pode, por exemplo, ser armazenado através de congelamento ou liofilização usando métodos geralmente conhecidos na técnica.

A des-PEGuilação pode ser realizada em qualquer temperatura a qual, de outro modo, é adequada para o polipeptídeo em questão, por exemplo, de cerca de 5°C a cerca de 40°C, tal como de cerca de 10°C a cerca de 35°C. A des-PEGuilação, freqüentemente, será realizada em uma temperatura de cerca de 15°C a cerca de 25°C, por exemplo, em uma temperatura ambiente de cerca de 20-22°C.

Conforme explicado acima, a duração da etapa de des-PEGuilação em um pH elevado para obter um resultado

desejado dependerá de outros fatores, tais como o pH e temperatura, mas geralmente estará na faixa de cerca de 2 horas a cerca de 100 horas, tipicamente de cerca de 4 horas a cerca de 72 horas, mais tipicamente de cerca de 8 horas a cerca de 48 horas. Uma vez que normalmente é desejável realizar a etapa de des-PEGuilação em um tempo tão curto quanto possível, o polipeptídeo freqüentemente será submetido ao pH elevado durante um período de não mais do que cerca de 24 horas, por exemplo, dentro de cerca de 12 horas a cerca de 30 horas, tal como de cerca de 18 a cerca de 24 horas. Conforme indicado acima, um período de des-PEGuilação relativamente curto no pH elevado geralmente será acompanhado por um pH relativamente alto, por exemplo, cerca de 9-10.

Após a des-PEGuilação em um pH elevado, o pH é reduzido para cerca de 8,0 ou menos, o pH em particular sendo escolhido de acordo com as condições de armazenamento pretendidas para o polipeptídeo. Para G-CSF, um pH adequado para armazenamento a longo prazo freqüentemente estará na faixa de cerca de 2,0 a cerca de 5,0, por exemplo, de cerca de 2,5 a cerca de 4,5, tal como cerca de 4,0. Em alguns casos, dependendo, por exemplo, da formulação usada em particular, um pH um pouco maior pode ser escolhido, isto é, um pH de cerca de 5,0-8,0, por exemplo, cerca de 6,0-7,5, tal como cerca de 7,0-7,5. Várias formulações farmacêuticas de G-CSF são descritas, por exemplo, na US 5.104.651. US 5.919.757. US 6.497.869 e US 6.776.983.

Para ajuste do pH no contexto da presente invenção, qualquer ácido ou base adequada pode ser usado, ácidos e bases orgânicas e inorgânicas. Similarmente, qualquer

tampão adequado pode ser usado para manutenção do pH em um nível desejado. Aqueles habilitados na técnica estarão familiarizados com ácidos, bases e tampões adequados para uso em qualquer determinada situação dependendo, por exemplo, do polipeptídeo em questão e do pH desejado.

Subseqüente à redução do pH, o polipeptídeo geralmente será submetido a pelo menos uma etapa de purificação cromatográfica, por exemplo, cromatografia de troca de íons ou cromatografia de filtração em gel, de forma a separar polipeptídeos tendo um número desejado de grupos de PEG presos. A purificação cromatográfica pode ser realizada usando métodos geralmente conhecidos na técnica. Por exemplo, onde o pH reduzido após des-PEGuilação está abaixo de cerca de 7,0, cromatografia de troca de cátions pode ser usada. Alternativa ou adicionalmente, cromatografia pode ser realizada antes de redução do pH, usando cromatografia de troca de ânions no valor de pH elevado. Purificação adicional, bem como qualquer análise desejada do produto, podem ser similarmente realizadas usando métodos padrões conhecidos na técnica. Por exemplo, purificação adicional subseqüente à etapa de purificação cromatográfica pode ser realizada usando, por exemplo, ultrafiltração ou diafiltração.

Conforme mencionado acima, outro aspecto da invenção se refere a um método para produção de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado compreendendo sujeição de um polipeptídeo de G-CSF à PEGuilação com um polietileno glicol (PEG) ativado amina-específico e, subseqüentemente, sujeição do polipeptídeo PEGuilado a um pH elevado de pelo menos cerca de 9,0 durante um período de tempo adequado para remover as

porções de PEG presas a um grupo hidroxila. Esse método resulta em um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado tendo pelo menos uma porção de PEG presa ao grupo epsilon amino de um resíduo de lisina ou ao grupo amino N-terminal e
5 subsequente nenhuma porção de PEG presa a um grupo hidroxila. Em uma modalidade, esse aspecto da invenção é realizado usando uma PEGuilação em um pH de cerca de 7,0-9,0, após o que o pH é aumentado para remover as porções de PEG lábeis. Em outra modalidade, PEGuilação pode ser
10 realizada em um pH maior de acima de 9,0, tal como um pH na faixa de 9-11, tal como de cerca de 9,2 a 10,0, por exemplo, cerca de 9,5. Nesse caso, PEGuilação e des-PEGuilação podem ser realizadas como uma única etapa em um único valor de pH durante um período de tempo suficiente
15 para resultar na PEGuilação desejada no N-terminal e resíduos de lisina enquanto se evita ligação indesejada de porções de PEG a grupos hidroxila.

O PEG ativado amina-específico pode ser qualquer um daqueles mencionados acima, por exemplo, mPEG-propionato de
20 succinimidila (mPEG-SPA), mPEG-butanoato de succinimidila (mPEG-SBA) ou mPEG- α -metilbutanoato de succinimidila (mPEG-SMB). O peso molecular das porções de PEG será, similarmente, conforme descrito acima, por exemplo, na faixa de cerca de 1 kDa a cerca de 20 kDa, tal como de
25 cerca de 1 kDa a cerca de 12 kDa, por exemplo, de cerca de 2 kDa a cerca de 10 kDa, tal como de cerca de 4 kDa a cerca de 6 kDa, por exemplo, cerca de 5 kDa. Por exemplo, o PEG ativado pode ser um mPEG-SPA com um peso molecular de cerca de 5 kDa. PEGuilação pode, por exemplo, ser realizada em um
30 pH de cerca de 7,5-9,0, por exemplo, cerca de 8,0-8,5.

Dependendo do pH usado durante PEGuilação, o pH elevado escolhido também será similar às faixas geralmente descritas acima, por exemplo, na faixa de cerca de 9,2 a 11,0, tal como de cerca de 9,2 a 10,0. Similarmente, o período de tempo no pH elevado também pode ser escolhido conforme descrito acima e o mesmo se aplica à subsequente purificação, etc.

O método descrito aqui proporciona uma série de vantagens com relação a processos de produção objetivados à produção de uma proteína PEGuilada uniforme e estável, incluindo o fato de que é simples e rápido, necessitando apenas de uma única etapa extra de pH alterado por um período de tempo limitado, e não há necessidade de, de outro modo, alterar os procedimentos de PEGuilação ou purificação usados em um determinado processo de produção. Por essa razão, o mesmo procedimento geral de um pH alterado durante um período de tempo suficiente para remover grupos de PEG lábeis pode ser usado para a produção de qualquer proteína PEGuilada. Em geral, um pH ácido ou básico pode ser usado para remover porções de PEG lábeis presas a um grupo hidroxila, com o desprendimento das porções de PEG lábeis ocorrendo mais rápido quando o pH é mais ácido (para um pH ácido) ou mais básico (para um pH básico). A escolha das condições para obtenção de desprendimento de PEG lábil será feita com base, por exemplo, nas características estruturais da proteína em particular, incluindo o microambiente de sítios de fixação para as porções de PEG.

Polipeptídeos de G-CSF PEGuilados

Conforme indicado acima, o método da presente invenção

é vantajoso pelo fato de que ele resulta em uma homogeneidade aumentada do polipeptídeo PEGuilado em termos do número de diferentes isômeros de PEG posicionais. Dependendo do número de grupos de fixação e da química de PEGuilação que está sendo usada em particular, os métodos 5 permitem o isolamento de G-CSF PEGuilado que é mais uniforme e mais estável durante armazenamento do que seria de outro modo possível. Por exemplo, descobriu-se que, para um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado tendo as substituições 10 K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem, é possível obter um produto em que pelo menos cerca de 90-95% dos isômeros de PEG posicionais do polipeptídeo têm 3 porções de PEG presas.

Outra modalidade da invenção se refere a uma 15 composição compreendendo uma mistura homogênea de isômeros de PEG posicionais de uma variante de polipeptídeo de G-CSF PEGuilada, em que pelo menos cerca de 80%, de preferência pelo menos cerca de 85%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90%, por exemplo, pelo menos cerca de 95%, dos 20 isômeros de PEG posicionais da mistura consistem de dois isômeros de PEG posicionais tendo, cada um porções de PEG consistindo de duas porções de PEG ligadas a grupos epsilon amino de resíduos de lisina e uma porção de PEG ligada ao grupo amino N-terminal.

25 Outra modalidade da invenção, assim, se refere a um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado compreendendo as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem, em que pelo menos cerca de 80% dos isômeros de PEG posicionais da polipeptídeo têm 30 3 porções de PEG presas. Tipicamente, a proporção dos

isômeros de PEG posicionais tendo 3 porções de PEG presas será maior do que 80%, tal como pelo menos cerca de 85% ou pelo menos cerca de 90% e pode mesmo ser maior, tal como pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94% ou pelo menos cerca de 95%. Em ainda outra modalidade, a invenção se refere a um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado contendo apenas as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem, em que pelo menos cerca de 80% dos isômeros de PEG posicionais da polipeptídeo têm 3 porções de PEG presas. Tipicamente, a proporção dos isômeros de PEG posicionais tendo 3 porções de PEG presas será maior do que 80%, tal como pelo menos cerca de 85% ou pelo menos cerca de 90% e pode mesmo ser maior, tal como pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94% ou pelo menos cerca de 95%.

Em ainda uma outra modalidade, a invenção se refere a uma composição compreendendo uma mistura de polipeptídeos de G-CSF PEGuilados compreendendo as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem, em que pelo menos cerca de 80%, de preferência pelo menos cerca de 85%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 90%, tal como pelo menos cerca de 95% dos polipeptídeos de G-CSF PEGuilados na mistura são compostos de dois isômeros de PEG posicionais, cada um contendo três grupos de PEG, em que um dos isômeros tem grupos de PEG presos ao N-terminal, Lys23 e Lys159, e o outro isômero tem grupos de PEG presos no N-terminal, Lys105 e Lys159. Em ainda outra modalidade, a invenção se

refere a uma composição compreendendo uma mistura de polipeptídeos de G-CSF PEGuilados contendo apenas as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem, em que pelo menos cerca
5 de 80%, de preferência, pelo menos cerca de 85%, mais preferivelmente cerca de 90%, tal como pelo menos cerca de 95% dos polipeptídeos de G-CSF PEGuilados na mistura são compostos de dois isômeros de PEG posicionais, cada um contendo três grupos de PEG, em que um dos isômeros tem
10 grupos de PEG presos ao N-terminal, Lys23 e Lys159, e o outro isômero tem grupos de PEG presos no N-terminal, Lys105 e Lys159.

Descobriu-se que os polipeptídeos de G-CSF PEGuilados produzidos de acordo com a invenção são altamente estáveis
15 ao armazenamento com relação a seu grau de PEGuilação. Conforme é mostrado nos exemplos abaixo, formulações aquosas de tais polipeptídeos de G-CSF PEGuilados são capazes de ser armazenadas durante um período de tempo prolongado com um padrão de PEGuilação grandemente
20 inalterado. Esse foi, em particular, o caso quando as composições foram armazenadas em uma temperatura de 5°C mas, surpreendentemente, descobriu-se que as composições eram relativamente estáveis mesmo quando armazenadas em uma temperatura elevada de 25°C ou 35°C.

25 Um outro aspecto da invenção, portanto, se refere a um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado estável ao armazenamento compreendendo as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem, em que pelo menos cerca de 80% dos isômeros de PEG posicionais do
30 polipeptídeo têm 3 porções de PEG presas após armazenamento

em uma composição de referência aquosa durante 3 meses em uma temperatura de 5°C. Tipicamente, a proporção dos isômeros de PEG posicionais tendo 3 porções de PEG presas após armazenamento durante 3 meses em uma temperatura de 5°C será maior do que 80%, tal como pelo menos cerca de 85% ou pelo menos cerca de 90%. Em alguns casos, essa proporção pode mesmo ser maior, tal como pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94% ou pelo menos cerca de 95%. Para fins de determinação da estabilidade de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado produzido de acordo com a invenção, a estabilidade pode ser testada conforme descrito no Exemplo 4, por exemplo, usando uma das formulações A, B, C ou D descritas no mesmo como a composição de referência, em particular a formulação D.

Composições farmacêuticas

Outro aspecto da invenção se refere à composições farmacêuticas compreendendo um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado de acordo com a invenção. Uma modalidade da invenção, assim, se refere a uma composição compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável e um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado, em que o polipeptídeo compreende as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1) e em que pelo menos cerca de 80% dos isômeros de PEG posicionais do polipeptídeo têm 3 porções de PEG presas. Tipicamente, a proporção dos isômeros de PEG posicionais tendo 3 porções de PEG presas será de pelo menos 85%, de preferência pelo menos cerca de 90% e pode mesmo ser maior, tal como pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos

cerca de 93%, pelo menos cerca de 94% ou pelo menos cerca de 95%. Em ainda outra modalidade, a invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável e um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado, em que o polipeptídeo contém apenas as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1) e em que pelo menos cerca de 80% dos isômeros de PEG posicionais do polipeptídeo têm 3 porções de PEG presas. Tipicamente, a proporção dos isômeros de PEG posicionais tendo 3 porções de PEG presas será de pelo menos cerca de 85%, de preferência pelo menos cerca de 90% e pode mesmo ser maior, tal como pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de 93%, pelo menos cerca de 94% ou pelo menos cerca de 95%.

Outra modalidade da invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo uma mistura homogênea de isômeros de PEG posicionais de uma variante de polipeptídeo de G-CSF PEGuilada, em que pelo menos cerca de 80%, de preferência, pelo menos cerca de 85%, mais preferivelmente cerca de 90%, tal como pelo menos cerca de 95% dos polipeptídeos de G-CSF PEGuilados na mistura são compostos de dois isômeros de PEG posicionais, cada um contendo porções de PEG consistindo de duas porções de PEG ligada a grupos epsilon amino de resíduos de lisina e uma porção de PEG ligada ao grupo amino N-terminal.

Em ainda outra modalidade, a invenção se refere à composições farmacêuticas compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável e uma mistura de polipeptídeos de G-CSF PEGuilados compreendendo as substituições K16R,

K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem, em que pelo menos cerca de 80%, de preferência, pelo menos cerca de 85%, mais preferivelmente cerca de 90%, tal como pelo menos cerca de 95% dos polipeptídeos de G-CSF PEGuilados na mistura são compostos de dois isômeros de PEG posicionais, cada um contendo três grupos de PEG, em que um dos isômeros tem grupos de PEG presos ao N-terminal, Lys23 e Lys159, e o outro isômero tem grupos de PEG presos no N-terminal, Lys105 e Lys159. Em
5 ainda outra modalidade, a invenção se refere à composições farmacêuticas compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável e uma mistura de polipeptídeos de G-CSF PEGuilados contendo apenas as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo
15 selvagem, em que pelo menos cerca de 80%, de preferência, pelo menos cerca de 85%, mais preferivelmente cerca de 90%, tal como pelo menos cerca de 95% dos polipeptídeos de G-CSF PEGuilados na mistura são compostos de dois isômeros de PEG posicionais, cada um contendo três grupos de PEG, em que um
20 dos isômeros tem grupos de PEG presos ao N-terminal, Lys23 e Lys159, e o outro isômero tem grupos de PEG presos no N-terminal, Lys105 e Lys159.

Composições farmacêuticas compreendendo o polipeptídeo de G-CSF da invenção podem ser formuladas de várias formas, por exemplo, na forma liofilizada ou, de preferência, em
25 uma formulação líquida estável, tipicamente como uma formulação aquosa. Tais composições compreendem, tipicamente, um ou mais componentes selecionados de agentes de tamponamento, conservantes, isotonicantes, estabilizantes, tensoativos ou detergentes não-iônicos e
30

excipientes diversos adicionais, tais como agentes de composição de volume ou enchedores, agentes de quelação, antioxidantes e co-solventes. Um exemplo de uma formulação adequada para G-CSF é aquela usada para Neulasta®
5 (pegfilgrastim), a qual é fornecida em uma solução aquosa com um pH de 4,0 contendo, por 0,6 ml, 0,35 mg de acetato, 30,0 mg de sorbitol, 0,02 mg de polisorbato 20 e 0,02 mg de sódio.

Um exemplo de uma composição farmacêutica é uma
10 solução projetada para administração parenteral. Embora em muitos casos formulações em solução farmacêutica sejam proporcionadas na forma líquida apropriadas para uso imediato, tais formulações parenterais também podem ser fornecidas em uma forma congelada ou liofilizada. No
15 primeiro caso, a composição deve ser descongelada antes de uso. A última forma é, freqüentemente, usada para intensificar a estabilidade do composto ativo contido na composição sob uma variedade maior de condições de armazenamento, uma vez que é reconhecido por aqueles
20 habilitados na técnica que preparados liofilizados são, em geral, mais estáveis do que suas contra-partes líquidas. Tais preparados liofilizados são reconstituídos antes de uso através da adição de um ou mais diluentes farmacêuticamente aceitáveis adequados, tais como água
25 estéril para injeção ou solução salina fisiológica estéril. Entretanto, as composições da invenção estão, de preferência, na forma de uma solução aquosa.

No caso de parenterais, eles são preparados para armazenamento como formulações liofilizadas ou soluções
30 aquosas através de mistura, conforme apropriado, do

polipeptídeo tendo o grau desejado de pureza com um ou mais
veículos, excipientes ou estabilizantes farmacêuticamente
aceitáveis tipicamente empregados na técnica (todos os
quais podem ser denominados "excipientes"), por exemplo,
5 agentes de tamponamento, agentes de estabilização,
conservantes, isotonicantes, detergentes não-iônicos,
antioxidantes e/ou outros aditivos diversos.

Agentes de tamponamento ajudam a manter o pH em uma
faixa desejada. Eles estão, tipicamente, presentes em uma
10 concentração oscilando de cerca de 2 mM a cerca de 50 mM.
Agentes de tamponamento adequados incluem ácidos orgânicos
e inorgânicos e sais dos mesmos, tais como tampões de
citrato (por exemplo, mistura de citrato monossódico-
citrato dissódico, mistura de ácido cítrico-citrato
15 trissódico, mistura de ácido cítrico-citrato monossódico,
etc.), tampões de succinato (mistura de ácido succínico-
succinato monossódico, mistura de ácido succínico-hidróxido
de sódio, mistura de ácido succínico-succinato dissódico,
etc.), tampões de tartrato (por exemplo, mistura de ácido
20 tartárico-tartrato de sódio, mistura de ácido tartárico-
tartrato de potássio, mistura de ácido tartárico-hidróxido
de sódio, etc.), tampões de fumarato (por exemplo, mistura
de ácido fumárico-fumarato monossódico, mistura de ácido
fumárico-fumarato dissódico, mistura de fumarato
25 monossódico-fumarato dissódico, etc.), tampões de gluconato
(por exemplo, mistura de ácido glucônico-gliconato de
sódio, mistura de ácido glucônico-hidróxido de sódio,
mistura de ácido glucônico-gluconato de potássio, etc.),
tampões de oxalato (por exemplo, mistura de ácido oxálico-
30 oxalato de sódio, mistura de ácido oxálico-hidróxido de

sódio, mistura de ácido oxálico-oxalato de potássio, etc.), tampões de lactato (por exemplo, mistura de ácido láctico-lactato de sódio, mistura de ácido láctico-hidróxido de sódio, mistura de ácido láctico-lactato de potássio, etc.)

5 e tampões de acetato (por exemplo, mistura de ácido acético-acetato de sódio, mistura de ácido acético-hidróxido de sódio, etc.). Possibilidades adicionais são tampões de fosfato, tampões de histidina e sais de trimetilamina, tal como Tris.

10 Conservantes são adicionados para retardar o crescimento microbiano e, quando presentes, são, tipicamente, adicionados em quantidades de cerca de 0,2%-1% (peso/v). Conservantes adicionados incluem fenol, álcool benzílico, meta-cresol, metil parabeno, propil parabeno, 15 cloreto de octadecildimetilbenzil amônio, haletos de benzalcônio (por exemplo, cloreto, brometo ou iodeto de benzalcônio), cloreto de hexametônio, alquil parabenos, tais como metil ou propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol e 3-pentanol.

20 Isotonificantes são adicionados para assegurar isotonicidade de composições líquidas e incluem álcoois poliídricos de açúcar, de preferência álcoois de açúcar triídricos ou superiores, tais como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol e manitol. Álcoois poliídricos 25 podem estar presentes em uma quantidade entre 0,1% e 25% em peso, tipicamente 1% a 5%, levando-se em conta as quantidades relativas dos outros ingredientes.

Estabilizantes se refere a uma ampla categoria de excipientes os quais podem oscilar, quanto à função, de um 30 agente de composição de volume a um aditivo, o qual

solubiliza o agente terapêutico ou ajuda a prevenir desnaturação ou aderência à parede do recipiente. Estabilizantes típicos podem ser álcoois de açúcar poliídricos (enumerados acima); aminoácidos, tais como
5 arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutâmico, treonina, etc., açúcares orgânicos ou álcoois de anticorpo, tais como lactose, trealose, estaquiose, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol,
10 mioinositol, galactitol, glicerol e semelhantes, incluindo ciclitóis, tal como inositol; polietileno glicol; polímeros de aminoácido; agentes de redução contendo enxofre, tais como uréia, glutathione, ácido tióctico, tioglicolato de sódio, tioglicerol, α -monotioglicerol e tiosulfato de
15 sódio; polipeptídeos de baixo peso molecular (isto é, <10 resíduos); proteínas, tais como albumina de soro humano, albumina de soro bovino, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; monossacarídeos, tais como xilose, manose, frutose e
20 glicose; dissacarídeos, tais como lactose, maltose e sacarose; trissacarídeos, tal como rafinose e polissacarídeos, tal como dextrana. Estabilizantes podem, por exemplo, estar presentes na faixa de 0,1 a 10.000 partes em peso baseado no peso da proteína ativa.

25 Tensoativos ou detergentes não-iônicos (também conhecidos como "agentes de umedecimento") podem estar presentes para ajudar a solubilizar o agente terapêutico, bem como proteger o polipeptídeo terapêutico contra agregação agitação-induzida, o que também permite que a
30 formulação seja exposta à tensão de superfície de

cisalhamento sem causar desnaturação do polipeptídeo. Tensoativos não-iônicos exemplificativos incluem polisorbatos (20, 80, etc.), polioxâmeros (184, 188 etc.), polióis Pluronic®, polioxietileno sorbitan monoéteres
5 (Tween®-20, Tween®-80, etc.).

Excipientes diversos adicionais que podem ser adicionados incluem agentes de composição de volume ou enchedores (por exemplo, amido), agentes de quelação (por exemplo, EDTA), antioxidantes (por exemplo, ácido
10 ascórbico, metionina, vitamina E) e co-solventes.

O ingrediente ativo também pode estar encerrado em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação ou através de polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de hidróximetilcelulose, gelatina ou
15 poli-(metilmetacrilato), em sistemas de distribuição de fármaco coloidais (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões.

Formulações parenterais a serem usadas para
20 administração *in vivo* devem ser estéreis. Isso é prontamente realizado através de métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, por meio de filtração através de membranas de filtração estéreis.

Métodos terapêuticos

25 Outro aspecto da invenção se refere a métodos terapêuticos e métodos para a fabricação de um medicamento usando o polipeptídeo de G-CSF PEGuilado da invenção. Leucopenia (um nível reduzido de células sanguíneas brancas) e neutropenia (um nível reduzido de neutrófilos)
30 são distúrbios que resultam em uma suscetibilidade

aumentada a vários tipos de infecções. Neutropenia pode ser crônica, por exemplo, em pacientes infectados com HIV, ou aguda, por exemplo, em pacientes com câncer sofrendo quimioterapia ou terapia de radiação. Para pacientes com

5 neutropenia grave, por exemplo, como um resultado de quimioterapia, mesmo infecções relativamente pequenas podem ser graves e neutropenia freqüentemente requererá uma interrupção no protocolo de quimioterapia. Os polipeptídeos de G-CSF PEGuilados da invenção são particularmente

10 adequados para a prevenção ou tratamento de infecção em pacientes com câncer sofrendo determinados tipos de quimioterapia, terapia de radiação e transplantes de medula óssea, mobilização de células progenitoras para coleta em transplantes de células progenitoras de sangue periférico,

15 tratamento de leucopenia crônica grave ou relativa, tratamento de pacientes com leucemia mielóide aguda, em particular, tratamento de AIDS ou outras doenças de imunodeficiência, e para terapia antifúngica, em particular para o tratamento de candidíase sistêmica ou invasiva. Um

20 "paciente", para as finalidades da presente invenção, inclui seres humanos e outros mamíferos, embora os métodos terapêuticos da invenção sejam primariamente objetivados ao tratamento de pacientes humanos.

Esse aspecto da invenção, assim, se refere a um método

25 para aumento do nível de neutrófilos em um paciente sofrendo de ou em risco de um nível insuficiente de neutrófilos compreendendo administração, ao referido paciente, de uma dose eficaz de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado conforme descrito acima ou uma composição

30 farmacêutica conforme descrito acima compreendendo o

polipeptídeo de G-CSF PEGuilado. Em uma modalidade desse aspecto da invenção, o paciente sofrendo de ou em risco de um nível insuficiente de neutrófilos é um paciente com câncer, em particular um paciente com câncer sendo tratado com quimioterapia ou terapia de radiação, especialmente quimioterapia.

Os polipeptídeos de G-CSF PEGuilados da invenção são considerados como sendo úteis para estimulação da produção de neutrófilos em pacientes sofrendo de uma variedade de diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de mama, câncer de pulmão de células não-pequenas, câncer de pulmão de células pequenas, câncer cólon-retal, câncer uterino, câncer ovariano, linfoma não-Hodgkin (NHL) e doença de Hodgkin. Similarmente, os polipeptídeos da invenção são considerados para administração a pacientes recebendo qualquer um de uma variedade de diferentes tipos de agentes quimioterapêuticos, incluindo:

- Agentes de alquilação, por exemplo, derivados de gás de mostarda, tais como a Ciclofosfamida, Clorambucil, Ifosfamida, Mecloretamina ou Melphalan; etilenoiminas, tais como Hexametilmelamina ou Tiotepa; alquil-sulfonatos, tal como Busulfan; hidrazinas e triazinas, tais como Altretamina, Dacarbazina, Procarbazina ou Temozolomida; nitrosuréias, tais como Carmustina, Lomustina ou Estreptozocina; e agentes de complexo de metal inorgânico, tais como Cisplatina, Carboplatina ou Oxaliplatina;

- Alcalóides vegetais, por exemplo, taxanos (por exemplo, Docetaxel ou Paclitaxel), vinca alcalóides (por exemplo, Vinblastina, Vincristina ou Vinorelbina), análogos de camptotecan (por exemplo, Irinotecan ou Topotecan) e

podofilotoxinas (por exemplo, Etoposídeo ou Tenoposídeo);

• Antibióticos anti-tumor, por exemplo, antraciclinas, tais como Daunorubicina, Doxorubicina, Epirubicina, Idarubicina ou Mitoxantrona; cromomicinas, tais como
5 Dactinomicina ou Plicamicina; e outros antibióticos anti-tumor, tais como Bleomicina ou Mitomicina;

• Anti-metabólitos, por exemplo, antagonistas de ácido fólico, tal como Metotrexato; antagonistas de pirimidina, tais como as Capecitabina, Citarabina, 5-Fluorouracila (5-
10 FU), Foxuridina ou Gemcitabina; antagonistas de purina, tais como 6-Mercaptopurina ou 6-Tioguanina; inibidores de deaminase de adenosina, tais como Cladribina, Fludarabina, Nelarabina ou Pentostatina; e inibidores de reductase de ribonucleotídeo, tal como Hidróxuréia;

15 • Inibidores de topoisomerase, por exemplo, inibidores de topoisomerase I, tais como Ironotecan ou Topotecan; e inibidores de topoisomerase II, tais como Amsacrine, Etoposídeo, Fosfato de Etoposídeo ou Teniposídeo.

Os polipeptídeos de G-CSF PEGuilados da invenção serão
20 administrados a pacientes em uma dose "eficaz" ou "terapeuticamente eficaz", isto é, uma dose que é suficiente para produzir os efeitos desejados com relação à condição para a qual eles são administrados, em particular uma dose que, dadas as condições, é suficiente para
25 resultar na estimulação desejada de neutrófilos. A dose exata pode depender de fatores tais como o paciente individual e o distúrbio que está sendo tratado e será capaz de ser determinada por aqueles habilitados na técnica, tipicamente por um médico. A dosagem do
30 polipeptídeo de G-CSF PEGuilado pode, por exemplo, ser

aproximadamente da mesma ordem de magnitude que a dosagem atual recomendada para pegfilgrastim (Neulasta®), a qual é de 6 mg por paciente adulto. Uma dose apropriada do polipeptídeo de G-CSF PEGuilado da invenção é, portanto, considerada como estando na faixa de cerca de 1 mg a cerca de 15 mg, tal como de cerca de 2 mg a cerca de 15 mg, por exemplo, de cerca de 3 mg a cerca de 12 mg. Uma dose apropriada pode, assim, ser, por exemplo, cerca de 3 mg, cerca de 6 mg ou cerca de 9 mg. Em cada caso, as dosagens são expressas como uma dose padrão por paciente, onde o paciente é um adulto ou, de outro modo, pesa pelo menos 45 kg. Alternativamente, a dosagem pode ser determinada de acordo com o peso do paciente, de modo que uma dose do polipeptídeo de G-CSF da invenção esteja na faixa de cerca de 10 µg/kg a cerca de 200 µg/kg, tal como de cerca de 25 µg/kg a cerca de 150 µg/kg, por exemplo, de cerca de 30 µg/kg a cerca de 120 µg/kg. Uma dose adequada pode ser, assim, por exemplo, cerca de 30 µg/kg, cerca de 60 µg/kg, cerca de 90 µg/kg ou cerca de 120 µg/kg.

A invenção é ainda descrita por meio dos exemplos não limitativos a seguir.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Preparação e análise de uma variante de G-CSF parcialmente des-PEGuilado

Preparo da amostra e des-PEGuilação

Uma variante de G-CSF tendo as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K comparado com G-CSF humano do tipo selvagem (SEQ ID NO: 1) foi produzida a partir de células CHO-K1 substancialmente conforme descrito no WO

03/006501. 200 mL de variante de G-CSF a 4,5 mg/mL (900 mg de G-CSF) foram PEGuilados usando mPEG-SPA 5000 (Nektar Therapeutics). Resumidamente, 100 mL de uma solução a 13,2% (peso/peso) de mPEG-SPA foram adicionados durante um período de 10 minutos a 200 mL da solução de G-CSF e gentilmente agitados para assegurar mistura suficiente. A amostra foi deixada incubar durante 44 minutos a 21 ± 3 °C, pH de 8,5, com ligeira agitação. A mistura de amostra foi subsequëntemente ajustada para um pH de 9,5 usando uma solução de estoque de ácido bórico a 800 mM, pH de 10,0. A amostra foi, então, incubada a 21 ± 3 °C durante 24 horas sem agitação. A amostra foi, então, diluída aproximadamente 2,5 vezes com ácido cítrico a 100 mmoles/kg, NaOH a 20 mmoles/kg, pH de 2,5, para um pH final de 3,5.

15 ***Isolamento de G-CSF parcialmente des-PEGuilado***

Após redução do pH para 3,5, a amostra foi carregada imediatamente sobre uma coluna VL44 (Millipore) acondicionada com aproximadamente 225 mL de SP-Sepharose HP (Amersham, GE Healthcare) equilibrada com ácido cítrico a 20 mmoles/kg, NaOH a 15 mmoles/kg, pH de 3,4. Após carregamento do material, a coluna foi lavada para remover o material não ligado, tal como mPEG-ácido livre. Um gradiente linear de tampão de eluição a 25-100% (ácido cítrico a 20 mmoles/kg, NaOH a 20 mmoles/kg, NaCl a 200 mmoles/kg, pH de 3,5) foi usado para eluir o G-CSF PEGuilado da coluna. O gradiente foi desenvolvido para 25 CV (volumes de coluna). A etapa na coluna foi realizada a 21 ± 3 °C e todos os tampões usados foram ajustados para a mesma temperatura. A carga na coluna era de 4,1 mg de proteína/mL de resina e a taxa de fluxo era de 8 CV/hora.

Frações tendo um tamanho de amostra de 40 mL foram coletadas analisadas através de SDS-PAGE. Baseado na análise de SDS-PAGE, um reservatório de produto de 1440 mL, correspondendo a cerca de 6,5 CV, contendo G-CSF isolado tendo primariamente 3 grupos de PEG presos por molécula de G-CSF foi feito. Considera-se que o volume do reservatório de produto pode ser reduzido através de aumento das etapas do gradiente de eluição.

O reservatório de produto foi diafiltrado para aproximadamente 200 mL e substancialmente diafiltrado em acetato de sódio a 10 mM, 43 mg/mL, pH de 4,0 e concentrado para 4,9 mg/mL usando um sistema Millipore LabScale TFF equipado com duas membranas Millipore Pellicon XL de 50 cm² com um corte de peso molecular (MWCO) de 30 kDa.

15 **Resultados**

O reservatório de produto foi ultrafiltrado e diafiltrado em Na-acetato a 10 mM, 43 mg/ml de manitol, pH de 4,0 e submetido à caracterização físico-química. A Figura 1 mostra uma exploração da análise de SDS-PAGE da variante de G-CSF que foi PEGuilada, parcialmente des-PEGuilada e purificada conforme descrito acima, as sete fileiras mostradas sendo como segue:

- 1 Marcador de peso molecular
- 2 Após PEGuilação
- 25 3 pH de 9,5, T = 0 h
- 4 pH de 9,5, T = 24 h
- 5 Quando de aplicação sobre coluna de troca de cátions
- 6 Escoamento da troca de cátions
- 7 Produto purificado
- 30 Uma única banda principal na fileira 7 foi observada,

correspondendo à variante de G-CSF trazendo 3 grupos de mPEG-SPA 5000 por molécula de polipeptídeo. Além disso, uma banda menor, correspondendo ao G-CSF trazendo 4 grupos de mPEG-SPA 5000 também é observada na fileira 7. Se desejado, 5 otimização ou ajuste do procedimento de purificação através de métodos geralmente conhecidos na técnica permitirá que essa banda menor correspondendo a 4 grupos PEG seja reduzida ou substancialmente eliminada, embora isso leve a uma ligeira redução no rendimento, dependendo do grau de 10 pureza requerido.

O rendimento desse procedimento foi de 450mg de G-CSF parcialmente des-PEGuilado purificado trazendo primariamente 3 grupos PEG por molécula de polipeptídeo, correspondendo a um rendimento global de 50%.

15 **Exemplo 2**

Preparo e análise de variante de G-CSF parcialmente des-PEGuilada

Preparo de amostra, des-PEGuilação e purificação

Uma variante de G-CSF tendo as substituições K16R, 20 K34R, K40R, T105K e S159K comparado com o G-CSF do tipo selvagem (SEQ ID NO:1) foi produzida a partir de células CHO-K1 e subseqüentemente PEGuilada usando mPEG-SPA 5000 substancialmente conforme descrito no Exemplo 1 acima, resultando em 29 mL de variante de G-CSF PEGuilada a 3,5 25 mg/mL. Isto foi diafiltrado em borato de sódio 150 mM, pH 9,5, usando um dispositivo de filtro Vivaspin equipado com um filtro MWCO de 10 kDa. A concentração da amostra final foi de 4,7 mg/mL. A amostra foi, então, incubada a $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 42 horas.

30 Após incubação, a amostra foi preparada para

cromatografia de troca de cátions através de diluição com ácido cítrico a 30 mM, NaOH a 10 mM, pH de 2,9. A amostra foi, então, aplicada sobre uma coluna XK 16/20 (Amersham Biosciences) acondicionada com 28 mL de resina SP-Sepharose HP. A coluna foi equilibrada com um tampão de equilíbrio de ácido cítrico a 20 mM, NaCl a 15 mM, pH de 3,5, antes de carregamento da amostra. Após carregamento, a coluna foi lavada com o mesmo tampão e eluída usando um gradiente linear de NaCl a 15 mM a 200 mM em ácido cítrico a 20 mM, pH de 3,5, para separar as diferentes espécies de PEG.

Frações foram coletadas em tubos e analisadas através de análise por SDS-PAGE. Um reservatório de produto contendo da variante de G-CSF PEGuilada contendo primariamente 3 porções de PEG presas foi feito baseado no SDS-PAGE. Esse reservatório de produto foi diafiltrado e o tampão trocado usando um dispositivo de filtro Vivaspin com um MWCO de 10 kDa. A amostra foi diafiltrada em succinato de sódio a 10 mM, 43 mg/mL, pH de 4,3 e finalmente concentrada para 3,0 mg/mL.

20 **Análise de isômero posicional**

Usando HPLC de troca de cátions (CIEX-HPLC) combinado com um pré-tratamento com sialidase, dados foram obtidos sobre a composição de diferentes isômeros posicionais em reservatórios de produto contendo múltiplas espécies PEGuiladas. Além de heterogeneidade apos PEGuilação em virtude da presença de diferentes isômeros posicionais, G-CSF PEGuilado também é heterogêneo pelo fato de que ele contém um sitio de O-glicosilação (Thr133) que pode ter zero, um ou dois grupos ácido siálico presos. De forma a reduzir o número de picos no cromatograma como um resultado

de diferentes números de grupos ácido siálico, uma etapa de tratamento com enzima sialidase é incluída antes de análise. O tratamento com sialidase é realizado primeiro através de diluição da solução de G-CSF, se necessário, para 1 mg/ml com um tampão de acetato de sódio a 50 mM, pH de 5,0, após o que, 0,05 µl (0,25 mUnidades) de sialidase são adicionados por µg de proteína e a amostra é incubada a 37°C durante 18 horas para remover os ácidos siálicos. A amostra é, então, analisada no mesmo dia ou mantida a 4°C até o dia de análise. HPLC foi realizada usando uma coluna de HPLC de troca de cátions PolySULFOETHYL ATM (PolyLC Inc.), com detecção por UV a 214 nm. Caracterização dos diferentes picos foi realizada através de análise por SDS-PAGE após coleta manual da coluna de CIEX PolySULFOETHYL ATM.

Resultados - Perda de PEG

A amostra permutada com tampão foi analisada através de SDS-PAGE para estimar o grau de perda de PEG como uma função do tempo. Os resultados (veja Figura 2) eram similares àqueles ilustrados na Figura 1 para o Exemplo 1, com apenas alterações mínimas no grau global de PEGuilação sendo observadas entre as amostras incubadas durante 24 ou 42 horas (Figura 2, fileiras 4 e 5).

Resultados - Avaliação de isômeros posicionais em reservatórios de produto

A Figura 3 mostra um cromatograma de troca de cátions do reservatório de produto parcialmente des-PEGuilado de acordo com a invenção obtido conforme descrito acima contendo primariamente três grupos de PEG 5000, conforme julgado através de análise por SDS-PAGE. Os dois picos

principais representam, cada um, um isômero posicional principal trazendo três grupos de PEG 5000. Os três picos menores representam dois isômeros posicionais trazendo quatro grupos de PEG e um isômero posicional trazendo dois grupos de PEG.

Os dois picos principais foram coletados e submetidos à análise por mapeamento de peptídeo nativo para determinar a posição dos grupos de PEG presos. Descobriu-se que os dois principais isômeros posicionais são PEGuilados nos seguintes resíduos de aminoácido:

Isômero A: N-terminal, Lys23 e Lys159

isômero B: N-terminal, Lys105 e Lys159

Esses dois isômeros principais representavam mais de 95% dos isômeros posicionais presentes na amostra.

Exemplo 3

Exemplo Comparativo

Para fins comparativos, a Figura 4 mostra um cromatograma de troca de cátions de uma variante de G-CSF PEGuilada purificada que não foi submetida à des-PEGuilação de acordo com a presente invenção. A variante de G-CSF, nesse caso, tinha as mesmas cinco substituições comparado com o G-CSF humano nativo, conforme indicado acima nos Exemplos 1 e 2, isto é, K16R, K34R, K40R, T105K e S159K. Ela foi preparada e PEGuilada com mPEG-SPA 5000 substancialmente conforme descrito no Exemplo 1, exceto quanto ao fato de que ela não foi submetida à incubação em um pH de 9,5 para remoção das porções de PEG lábeis. Como um resultado, a variante PEGuilada compreendia uma mistura de uma série de diferentes isômeros de PEG tendo 2-6 porções de PEG presas. Essa mistura de isômeros posicionais

foi purificada usando cromatografia de troca de cátions substancialmente conforme descrito no Exemplo 1. Uma fração contendo primariamente 4-5 porções de PEG presas foi isolada e, após ultrafiltração e diafiltração
5 substancialmente conforme descrito no Exemplo 1, foi submetida à análise por CIEEX-HPLC conforme descrito acima. Essa fração corresponde à fração de 3-PEG descrita nos Exemplos 1 e 2, mas com grupos de PEG adicionais (lábeis) sendo presos em uma ou duas posições com relação ao produto
10 3-PEG parcialmente des-PEGuilado, isto é, o produto purificado nesse caso contém, primariamente, 4-5 grupos de PEG presos.

Comparado com o produto parcialmente des-PEGuilado preparado de acordo com a invenção, cuja composição é
15 mostrada na Figura 3, o produto mostrado na Figura 4 é claramente uma mistura muito mais complexa e heterogênea. Enquanto que o produto preparado de acordo com a invenção mostrado na Figura 3 contém mais de 95% dos dois principais isômeros posicionais, cada um tendo 3 porções de PEG, o
20 produto mostrado na Figura 4 compreende seis isômeros posicionais principais, cada um 4 ou 5 porções de PEG presas. Esses isômeros posicionais de 4-5 PEG compreendem porções de PEG lábeis em um ou ambos de of Ser66 ou Tyr165 (dados não mostrados), bem como porções de PEG estáveis no
25 N-terminal e em 1 ou 2 posições K23, K105 e K159. Em virtude de impedimento estérico, nem todas essas posições sobre um único polipeptídeo de G-CSF podem ser ocupadas por porções de G-CSF. O produto mostrado na Figura 4, assim, contém uma mistura heterogênea dos seis principais isômeros
30 de PEG a seguir:

N-terminal, K23, S66, K159, Y165 (5-PEG)

N-terminal, S66, K105, K159, Y165 (5-PEG)

N-terminal, K23, S66, K159 (4-PEG)

N-terminal, K23, S66, Y165 (4-PEG)

5 N-terminal, S66, K105, K159 (4-PEG)

N-terminal, S66, K105, Y165 (4-PEG)

Exemplo 4

Dados de estabilidade

A estabilidade das porções de PEG presas foi testada em diferentes formulações aquosas armazenadas em quatro temperaturas diferentes. O polipeptídeo era uma variante de G-CSF tendo as cinco substituições listadas no Exemplo 1 e o qual foi preparado, PEGuilado e submetido à des-PEGuilação parcial e, então, purificado também conforme descrito no Exemplo 1. As formulações testadas eram como segue:

	Unidades	Formulação			
		A	B	C	D
G-CSF	mg/ml	2	10	2	2
Na-acetato	mM	10	10	10	10
Tween®80	mg/ml	-	-	0,05	-
Tween®20	mg/ml	-	-	-	0,05
Manitol	mg/ml	43	43	43	43

O pH de cada uma das formulações era de 4,0.

Usando CIEX-HPLC, a distribuição de isômeros de PEG em cada amostra foi determinada após 26 dias, 56 dias e 89 dias para investigar a estabilidade da PEGuilação. Os resultados são mostrados na tabela abaixo.

Formulação	Temp.	Dia	3 PEG	Outras/não caracterizadas	2 PEG
------------	-------	-----	-------	------------------------------	-------

A	-	0	92,3	7,8	0
	-80 °C	26	93,3	6,6	0
	5 °C		93,5	6,4	0,1
	25 °C		94,1	5,5	0,3
	35 °C		04,3	4,7	0,8
	-80 °C	56	95,4	4,7	0
	5 °C		95,3	4,7	0
	25 °C		95,3	3,8	0,9
	35 °C		95,3	3,0	1,7
	-80 °C	89	96,1	3,9	0
	5 °C		95,9	4,1	0
	25 °C		96,1	3,1	0,8
	35 °C		95,5	2,7	1,8
B	-	0	92,4	7,6	0
	-80 °C	26	93,5	6,5	0,0
	5 °C		93,4	6,5	0,1
	25 °C		94,0	5,7	0,3
	35 °C		94,2	5,0	0,8
	-80 °C	56	95,1	4,9	0
	5 °C		95,4	4,7	0
	25 °C		95,2	4,3	0,6
	35 °C		96,2	2,4	1,4
	-80 °C	89	95,9	4,1	0
	5 °C		95,9	4,1	0
	25 °C		96,8	3,2	0
	35 °C		95,5	2,6	1,9
	-	0	92,1	7,9	0
	-80 °C		93,8	6,1	0
	5 °C		94,1	5,8	0

C	25 °C	26	94,0	5,7	0,3
	35 °C		94,6	4,5	0,8
	-80 °C	56	95,1	4,9	0
	5 °C		95,1	4,9	0
	25 °C		94,1	4,8	1,1
	35 °C		95,1	3,0	1,9
	-80 °C	89	95,9	4,1	0
	5 °C		95,9	4,1	0
	25 °C		96,1	3,2	0,7
	35 °C		95,5	2,7	1,8
D	-	0	92,6	7,5	0
	-80 °C	26	93,8	6,1	0,1
	5 °C		93,6	6,3	0,1
	25 °C		93,7	6,1	0,3
	35 °C		94,4	4,9	0,8
	-80 °C	56	95,3	4,7	0
	5 °C		95,2	4,8	0
	25 °C		95,2	4,0	0,8
	35 °C		95,5	3,3	1,3
	-80 °C	89	96,0	4,0	0
	5 °C		96,0	4,0	0
	25 °C		96,2	3,1	0,7
	35 °C		95,7	2,5	1,8

Os resultados acima mostram que, a despeito da formulação e da temperatura de armazenamento, a PEGuilação é altamente estável, com a proporção de isoformas 3 PEG estando muito próxima de 95% em todas as temperaturas quando coletados a 26, 56 ou 89 dias. A única diferença prontamente observada a partir da tabela é uma ligeira

diminuição ao longo do tempo, usando os dados a -80°C como uma referência, na proporção das outras formas/não caracterizadas, principalmente para amostras armazenadas a 25°C ou 35°C e um aumento correspondente na proporção de
5 isômeros de 2 PEG para essas amostras.

Por comparação, a tabela abaixo mostra dados similares, determinados após 20 e 83 dias de armazenamento, para a mesma variante de G-CSF em uma formulação similar àquela descrita acima, mas preparada sem a etapa de des-
10 PEGuilação da presente invenção, isto é, correspondendo ao produto descrito no Exemplo comparativo 3 acima. A formulação, nesse caso, tinha um pH de 4,0 e consistia de acetato de sódio a 15 mM, 45 mg/ml de manitol e 5 mg/ml de variante de G-CSF PEGuilada a qual no início do
15 experimento, continha primariamente (98-99%) porções de 4-5 PEG presas. A tabela abaixo mostra a distribuição das isoformas de PEG, conforme determinado após 83 dias nas quatro temperaturas indicadas, bem como após 20 dias em duas dessas temperaturas. Deve ser observado que a
20 proporção dos polipeptídeos de G-CSF contendo porções de 4-5 PEG diminui apenas ligeiramente após 83 dias quando armazenados a 5°C , enquanto que há uma perda substancial de isoformas de 4-5 PEG e um aumento correspondente nas isoformas de 3 PEG a 25°C e uma perda ainda maior de
25 isoformas 4-5 PEG e um aumento correspondente nas isoformas 3 PEG a 35°C . Isso ilustra que, na ausência do método de des-PEGuilação da presente invenção, um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado preparado conforme descrito acima contém grupos de PEG lábeis que, ao longo do tempo e dependendo da
30 temperatura, se desprenderão do polipeptídeo quando

armazenado em uma formulação aquosa.

Temp.	Dia	4-5 PEG	3 PEG	Outras/não caracterizadas
-	0	98,6%	0	1,4%
-80 °C	20	98,1%	0,5%	1,4%
35 °C		96,0%	2,9%	1,1%
-80 °C	83	97,9%	0,6%	1,6%
5 °C		97,6%	1,0%	1,5%
25 °C		90,6%	8,4%	1,1%
35 °C		78,1%	21,5%	0,5%

Embora a invenção precedente tenha sido descrita em alguns detalhes para fins de clareza e compreensão, será claro para aqueles habilitados na técnica, a partir de uma
5 leitura da presente divulgação, que várias alterações na forma e detalhes podem ser feitas sem se desviar do verdadeiro escopo da invenção. Deve ser compreendido que os exemplos e modalidades descritos aqui são para fins ilustrativos apenas e que várias modificações ou alterações
10 à luz dos mesmos serão sugeridos para aqueles habilitados na técnica e deverão ser incluídos dentro do conceito inventivo e visão do presente pedido e escopo das reivindicações em anexo. Todas as publicações, patentes, pedidos de patente e/ou outros documentos mencionados no
15 presente pedido são incorporados por referência aqui em sua totalidade para todas as finalidades até o mesmo ponto como se cada publicação, patente, pedido de patente e/ou outro documento individual fosse individualmente indicado como sendo incorporado aqui por referência em sua totalidade
20 para todas as finalidades.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

SEQ ID NO: G-CSF humano

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

REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumento da estabilidade e uniformidade de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado tendo pelo menos uma porção de PEG presa ao grupo epsilon amino de um resíduo de lisina ou ao grupo amino N-terminal e pelo menos uma porção de PEG presa a um grupo hidroxila caracterizado por compreender a sujeição do polipeptídeo a um pH elevado de acima de 8,0 durante um período de tempo suficiente para remover porções de PEG presas a um grupo hidroxila e redução do pH para cerca de 8,0 ou menos.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do pH elevado estar na faixa de cerca de 8,5 a cerca de 10,5.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato do pH elevado estar na faixa de cerca de 9,0 a cerca de 10,0.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato do pH elevado estar na faixa de cerca de 9,2 a cerca de 9,8, por exemplo de 9,5.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato do polipeptídeo ser submetido ao pH elevado durante um período de cerca de 2 horas a cerca de 100 horas.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato do polipeptídeo ser submetido ao pH elevado durante um período de cerca de 4 horas a cerca de 72 horas.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato do polipeptídeo ser submetido ao pH elevado durante um período de cerca de 8 horas a cerca de

48 horas.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato do polipeptídeo ser submetido ao pH elevado durante um período de cerca de 12 horas a cerca de 5 30 horas.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de ainda compreender sujeição do polipeptídeo em um pH reduzido a pelo menos uma etapa de purificação 10 cromatográfica.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato da etapa de purificação cromatográfica ser cromatografia de troca de íons.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, 15 caracterizado pelo fato do pH ser reduzido para abaixo de 7,0 e a etapa de purificação cromatográfica ser cromatografia de troca de cátions.

12. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato da etapa de purificação 20 cromatográfica ser cromatografia de filtração em gel.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, ou 12, caracterizado pelo fato do pH reduzido estar na faixa de cerca de 2,0 a cerca de 5,0.

25 14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato do pH reduzido estar na faixa de cerca de 2,5 a cerca de 4,5.

15. Método para produção de polipeptídeo de G-CSF PEGuilado caracterizado pelo fato de compreender sujeição 30 de um polipeptídeo de G-CSF a uma reação de PEGuilação com

um polietileno glicol (PEG) ativado amina-específico para produzir um intermediário de polipeptídeo de G-CSF PEGuilado e, subseqüentemente, sujeição do intermediário de polipeptídeo PEGuilado a um pH elevado de pelo menos cerca de 9,0 durante um período de tempo adequado para remover porções de PEG presas a um grupo hidroxila para produzir o polipeptídeo de G-CSF PEGuilado.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato da reação de PEGuilação ser realizada em um pH na faixa de cerca de 7,0-9,0.

17. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato da reação de PEGuilação ser realizada em um pH acima de 9.0.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato da reação de PEGuilação e subseqüente remoção de porções de PEG presas a um grupo hidroxila serem realizadas como uma única etapa em um único valor de pH.

19. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato do PEG ativado amina-específico ser mPEG-propionato de succinimidila (mPEG-SPA), mPEG-butanoato de succinimidila (mPEG-SBA) ou mPEG- α -metilbutanoato de succinimidila (mPEG-SMB).

20. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato do PEG ativado amina-específico ser mPEG-SPA com um peso molecular de cerca de 5 kDa.

21. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato do pH elevado estar na faixa de cerca de 9,2 a 11,0.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21,

caracterizado pelo fato do pH elevado estar na faixa de cerca de 9,2 a 10,0.

23. Polipeptídeo de G-CSF PEGuilado caracterizado pelo fato de ser produzido através do método das reivindicações 1 a 22.

24. Polipeptídeo de G-CSF PEGuilado, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato do polipeptídeo ser uma variante de G-CSF compreendendo as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem.

25. Composição caracterizada por compreender uma mistura de isômeros de PEG posicionais de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado, em que o polipeptídeo compreende as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem e pelo menos cerca de 80% dos isômeros de PEG posicionais do polipeptídeo serem isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais tendo três porções de PEG presas.

26. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de pelo menos cerca de 85% dos isômeros de PEG posicionais do polipeptídeo serem isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais tendo três porções de PEG presas.

27. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de pelo menos cerca de 90% dos isômeros de PEG posicionais do polipeptídeo serem isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais tendo três porções de PEG presas.

28. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de pelo menos cerca de 80% dos

isômeros de PEG posicionais tendo três porções de PEG presas serem compostos de dois isômeros de PEG posicionais em que um dos isômeros tem porções de PEG presas ao N-terminal, Lys23 e Lys159 e o outro isômero tem porções de PEG presas ao N-terminal, Lys105 e Lys159.

29. Composição, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de pelo menos cerca de 85% dos isômeros de PEG posicionais tendo três porções de PEG presas serem compostos de dois isômeros de PEG posicionais em que um dos isômeros tem porções de PEG presas ao N-terminal, Lys23 e Lys159 e o outro isômero tem porções de PEG presas ao N-terminal, Lys105 e Lys159.

30. Composição, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de pelo menos cerca de 90% dos isômeros de PEG posicionais tendo três porções de PEG presas serem compostos de dois isômeros de PEG posicionais em que um dos isômeros tem porções de PEG presas ao N-terminal, Lys23 e Lys159 e o outro isômero tem porções de PEG presas ao N-terminal, Lys105 e Lys159.

31. Composição caracterizada por compreender uma mistura de isômeros de PEG posicionais de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado, em que o polipeptídeo compreende as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF humano do tipo selvagem e pelo menos cerca de 80% dos isômeros de PEG posicionais do polipeptídeo serem isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais tendo 3 porções de PEG presas após armazenamento em uma composição de referencia aquosa durante 3 meses em uma temperatura de 5°C.

32. Composição caracterizada pelo fato de compreender

um veículo farmacêuticamente aceitável e um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado da reivindicação 23 ou 24 ou uma composição das reivindicações 25 a 31.

33. Método de produção de uma mistura de isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais de um polipeptídeo de G-CSF recombinante compreendendo as substituições K16R, K34R, K40R, T105K e S159K com relação ao G-CSF do tipo selvagem caracterizado pelo fato de compreender:

a) expressão do polipeptídeo de G-CSF recombinante em uma célula hospedeira;

b) isolamento do polipeptídeo de G-CSF recombinante;

c) reação do polipeptídeo de G-CSF recombinante isolado com um PEG ativado amina-específico para produzir uma pluralidade de isômeros de PEG posicionais do polipeptídeo de G-CSF recombinante; e

d) reação da pluralidade de isômeros de PEG posicionais em um pH de 8,5 a 10,5 para produzir uma pluralidade de isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais parcialmente des-PEGuilados do polipeptídeo de G-CSF recombinante.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato do PEG ativado amina-específico ser selecionado do grupo consistindo de mPEG-propionato de succinimidila (mPEG-SPA), mPEG-butanoato de succinimidila (mPEG-SBA ou mPEG- α -metilbutanoato de succinimidila (mPEG-SMB)).

35. Método, de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizado pelo fato de ainda compreender sujeição da pluralidade de isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais do polipeptídeo de G-CSF recombinante a uma ou

mais etapas de purificação cromatográfica par produzir uma mistura substancialmente purificada de isômeros de PEG de lisina/N-terminais do polipeptídeo de G-CSF.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35,
5 caracterizado pelo fato de ainda compreender combinação de uma dose eficaz da mistura substancialmente purificada de isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais do polipeptídeo de G-CSF recombinante com pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável para produzir uma
10 composição farmacêutica.

37. Pluralidade de isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais parcialmente des-PEGuilados caracterizada pelo fato de ser produzida através do método da reivindicação 33.

15 38. Mistura substancialmente purificada de isômeros de PEG posicionais de lisina/N-terminais caracterizada pelo fato de ser produzida através do método de acordo com a reivindicação 35.

20 39. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de ser produzida através do método da reivindicação 36.

40. Método para aumento do nível de neutrófilos em um paciente sofrendo de ou em risco de um nível insuficiente de neutrófilos caracterizado pelo fato de compreender administração, ao referido paciente, de uma dose eficaz de
25 um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado da reivindicação 23 ou 24 ou uma composição das reivindicações 25 a 32 ou 36 a 39.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato do nível insuficiente de neutrófilo ser um resultado de quimioterapia ou terapia de radiação.

30 42. Uso de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado, da

reivindicação 23 ou 24 ou uma composição das reivindicações 25 a 32 ou 36 a 39 caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para aumento do nível de neutrófilos em um paciente sofrendo de ou em risco de um
5 nível insuficiente de neutrófilos.

43. Uso, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato do nível insuficiente de neutrófilo ser um resultado de quimioterapia ou terapia de radiação.

44. Composição compreendendo uma mistura homogênea de
10 isômeros de PEG posicionais de uma variante de polipeptídeo de G-CSF PEGuilada caracterizada pelo fato de pelo menos cerca de 80% dos isômeros de PEG posicionais da mistura consistirem de dois isômeros de PEG posicionais, cada um tendo porções de PEG consistindo de duas porções de PEG
15 ligadas a grupos epsilon amino da lisina e uma porção de PEG ligada ao grupo amino N-terminal.

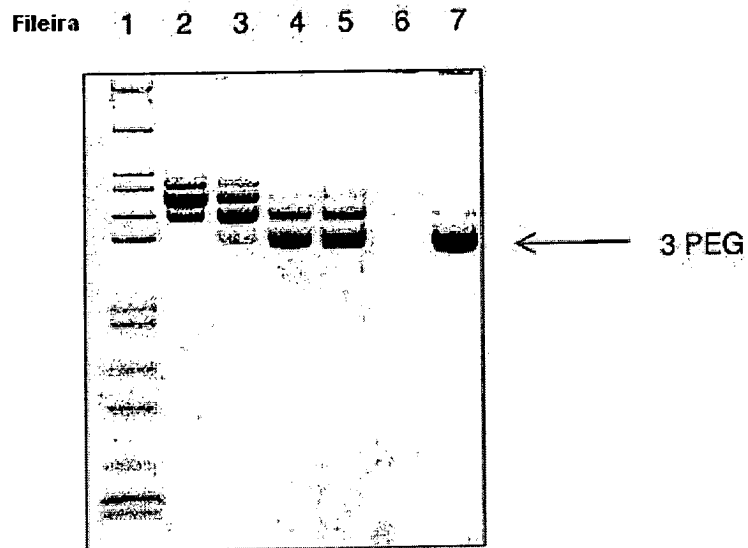
45. Composição, de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de pelo menos cerca de 85% dos isômeros de PEG posicionais da mistura homogênea
20 consistirem de dois isômeros de PEG posicionais tendo, cada um porções de PEG consistindo de duas porções de PEG ligadas a grupos epsilon amino da lisina e uma porção de PEG ligada ao grupo amino N-terminal.

46. Composição, de acordo com a reivindicação 44,
25 caracterizada pelo fato de pelo menos cerca de 90% dos isômeros de PEG posicionais da mistura homogênea consistirem de dois isômeros de PEG posicionais, cada um tendo porções de PEG consistindo de duas porções de PEG ligadas a grupos epsilon amino da lisina e uma porção de
30 PEG ligada ao grupo amino N-terminal.

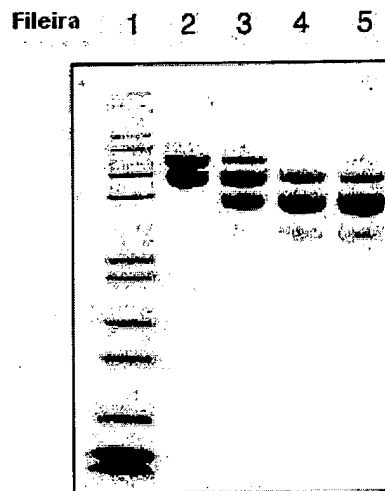
47. Composição caracterizada pelo fato de compreender um veículo farmacêuticamente aceitável e uma composição das reivindicações 44 a 46.

5 48. Método para aumento do nível de neutrófilos em um paciente sofrendo de ou em risco de um nível de neutrófilo insuficiente caracterizado pelo fato de compreender administração, ao referido paciente, de uma dose eficaz de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 44 a 46.

10 49. Uso de uma composição das reivindicações 44 a 46 caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para aumento do nível de neutrófilos em um paciente sofrendo ou em risco de um nível insuficiente de neutrófilos.

Figura 1Fileira

- 1 Marcador de peso molecular
- 2 Após PEGuilação
- 3 pH de 9,5, T = 0 h
- 5 4 pH de 9,5, T = 24 h
- 5 Quando de aplicação sobre coluna de troca de cátions
- 6 Escoamento da troca de cátions
- 7 Produto purificado

Figura 2Fileira

- 1 Marcador de peso molecular
- 2 Após PEGuilação
- 5 3 Material diafiltrado, pH de 9,5, T = 0 h
- 4 pH de 9,5, T = 24 h
- 5 pH de 9,5, T = 48 h

Figura 3

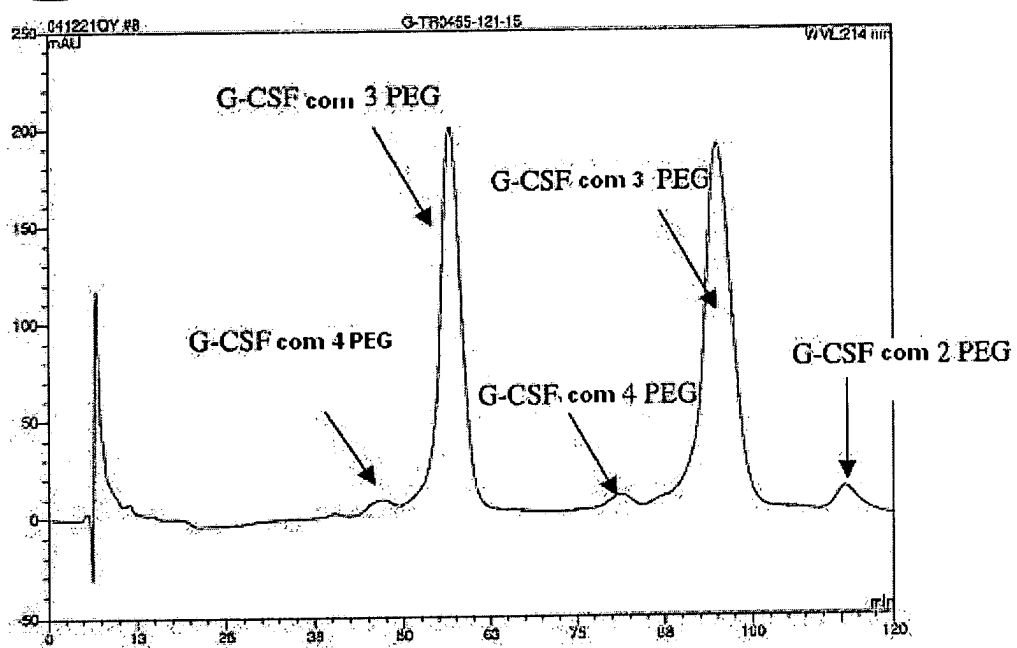
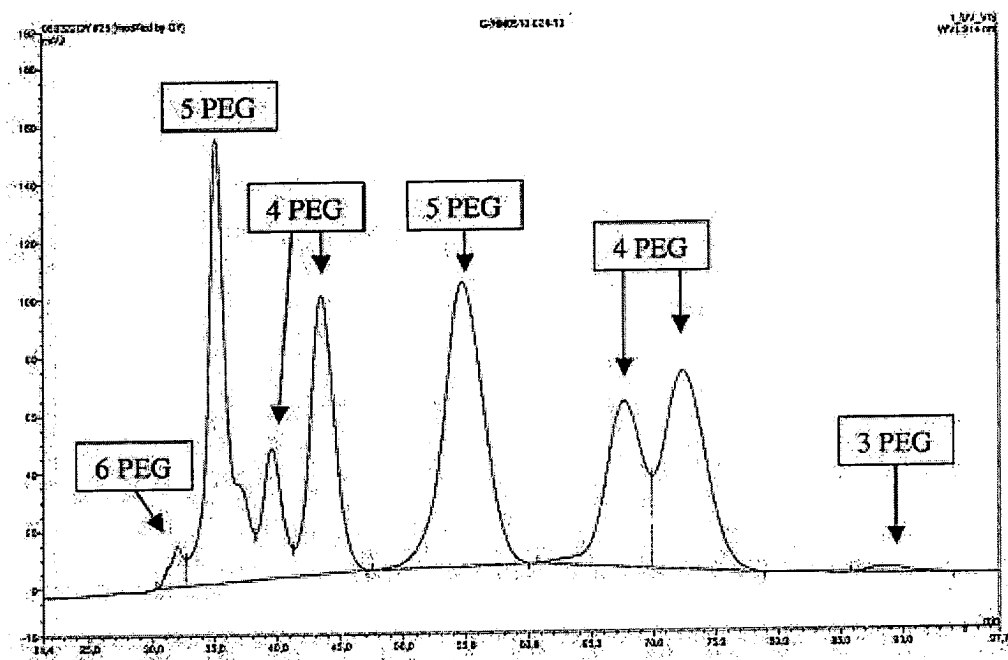


Figura 4



**POLYPEPTÍDEOS DE G-CSF PEGUILADOS E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS
MESMOS**

Método para aumento da estabilidade e uniformidade de um polipeptídeo de G-CSF PEGuilado tendo pelo menos uma
5 porção de PEG presa ao grupo epsilon amino de um resíduo de lisina ou ao grupo amino N-terminal e pelo menos uma porção de PEG presa a um grupo hidroxila, compreendendo sujeição do polipeptídeo a um pH elevado de acima de 8,0 durante um período de tempo adequado para remover as porções de PEG
10 presas a um grupo hidroxila e redução do pH para cerca de 8,0 ou menos; bem como polipeptídeos e composições de G-CSF PEGuilado produzidas de acordo com o método e métodos para aumento dos níveis de neutrófilo em um paciente usando os polipeptídeos e composições de G-CSF PEGuilado.