



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 670**

51 Int. Cl.:
C07K 14/535 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07789047 .3**
96 Fecha de presentación : **25.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2041167**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Derivatización del factor estimulante de colonias granulocíticas (GCSF).**

30 Prioridad: **25.07.2006 EP 06117830**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.09.2010

73 Titular/es: **LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED**
London Bioscience Innovation Centre
2 Royal College Street
London NW1 0NH, GB

72 Inventor/es: **Jain, Sanjay;**
Laing, Peter y
Gregoriadis, Gregory

74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 344 670 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 344 670 T3

DESCRIPCIÓN

Derivatización del factor estimulante de colonias granulocíticas (GCSF).

5 La presente invención hace referencia a derivados polisacáridos novedosos del GCSF y a métodos para producir dichos derivados. Los derivados son útiles para mejorar la estabilidad, la farmacocinética y la farmacodinámica del GCSF.

10 El Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas (GCSF, CSF3) es una glicoproteína. Puede actuar como una hormona, un factor de crecimiento o una citoquina y la producen cierto número de tejidos diferentes para estimular que la médula ósea produzca granulocitos y células madre. El GCSF también estimula la supervivencia, proliferación, diferenciación y funcionamiento de los precursores de neutrófilos y los neutrófilos maduros.

15 El GCSF es producido por el endotelio, los macrófagos y cierto número de otras células inmunitarias. La glicoproteína humana natural existe de dos formas, una proteína larga de 174 y 180 aminoácidos con un peso molecular de 19,600 gramos por mol. La forma de 174 aminoácidos, más abundante y más activa, se ha utilizado en el desarrollo de productos farmacéuticos mediante la tecnología de ADN recombinante (ADNr). El GCSF de los ratones fue reconocido y purificado por primera vez en Australia en 1983, y la forma humana fue clonada por grupos procedentes de Japón y los Estados Unidos en 1986. El receptor de GCSF está presente en células precursoras de la médula ósea, y, en respuesta a la estimulación provocada por el GCSF, inicia la proliferación y la diferenciación en granulocitos maduros.

25 El GCSF estimula la producción de glóbulos blancos. En oncología y hematología, se utiliza una forma recombinante del GCSF con determinados pacientes con cáncer para acelerar la recuperación de la neutropenia tras la quimioterapia, permitiendo regímenes de tratamiento de mayor intensidad. La quimioterapia puede causar mielosupresión y niveles inaceptablemente bajos de glóbulos blancos, haciendo que los pacientes sean propensos a infecciones y sepsis. El GCSF también se utiliza para incrementar el número de células madre hematopoyéticas en la sangre antes de la recogida mediante leucoféresis para su uso en los trasplantes de células madre hematopoyéticas.

30 El GCSF recombinante humano sintetizado en un sistema de expresión de *E. coli* se denomina filgrastim. La estructura del filgrastim difiere ligeramente de la estructura de la glicoproteína natural. La mayoría de los estudios publicados han utilizado el filgrastim. El filgrastim (Neupogen[®]) es una forma comercialmente disponible del GCSF_{rh} (GCSF recombinante humano).

35 Otra forma de GCSF recombinante humano, el lenograstim, se sintetiza en las células de los ovarios de los hámsteres chinos. Dado que éste es un sistema de expresión de células de mamíferos, es imposible de distinguir el lenograstim del GCSF humano natural de 174 aminoácidos. Aún no se han identificado consecuencias clínicas o terapéuticas de las diferencias entre el filgrastim y el lenograstim, y no se han realizado estudios comparativos formales.

40 Se han hecho intentos por derivatizar el GCSF para mejorar sus propiedades farmacocinéticas. Existe un producto en el mercado, el PEG-filgrastim (Neulasta[®]), que es una forma derivatizada del polietilenglicol del GCSF. Se ha demostrado que éste posee una vida media mayor que el filgrastim, reduciendo la necesidad de inyecciones diarias. El diseño y desarrollo del PEG-filgrastim viene descrito con más detalle en Curr. Pharm Des. 2004; 10(11): 1235-44.

45 US20070014759 describe conjugados entre partes de moléculas de PEG y GCSF que están unidas a través de un grupo de enlace glicosilo intacto. Los conjugados se forman a partir de péptidos tanto glicosilados como no glicosilados a través de la acción de una glicosiltransferasa en aminoácidos de cadena media. US6956027 facilita las condiciones para modificar de forma selectiva el extremo N-terminal del GCSF con PEG.

50 Otros han derivatizado el GCSF con moléculas que no son PEG. WO 2005/014050, por ejemplo, describe el GCSF unido covalentemente a almidón de hidroxialquilo.

55 En vista del estado anterior de la técnica, existe la necesidad de proporcionar derivados mejorados del GCSF que se puedan utilizar en terapia humana y animal y que posean una estabilidad y vida media optimizadas y baja toxicidad. Hemos descubierto que unir PSAs al GCSF confiere dichas propiedades y de ese modo hemos llegado a esta invención. Ésta es la primera vez que se ha descrito el GCSF unido en el extremo N-terminal a polisacáridos aniónicos.

60 Los ácidos polisialícos (PSAs) son polímeros del ácido siálico no ramificados presentes de forma natural producidos por determinadas cepas bacterianas y en los mamíferos en ciertas células. Pueden producirse en diferentes grados de polimerización desde n= alrededor de 80 ó más residuos de ácido siálico hasta n=2 mediante hidrólisis ácida limitada o mediante digestión con neuraminidasas, o mediante fraccionamiento de las formas naturales derivadas de manera bacteriana del polímero.

65 En los últimos años, se han aprovechado las propiedades biológicas de los ácidos polisialícos, en particular las del ácido polisialíco homopolimérico unido con enlaces alfa-2,8, para modificar las propiedades farmacocinéticas de las moléculas de fármacos de bajo peso molecular y de proteínas. La derivatización del ácido polisialíco da lugar a aumentos espectaculares en la vida media de cierto número de proteínas terapéuticas circulantes incluyendo la catalasa y la asparaginasa, y también permite que se puedan utilizar dichas proteínas con anticuerpos preexistentes generados

como una consecuencia no deseada (y a veces inevitable) a una exposición previa a la proteína terapéutica [Fernandes y Gregoriadis, 2006; Jain *et. al.*, 2003, 2004]. El ácido polisialílico unido con enlaces alfa-2,8 ofrece una alternativa atractiva al PEG, siendo un polímero biodegradable inmunológicamente invisible que forma parte de manera natural del cuerpo humano, y que se degrada, a través de neuraminidasas de los tejidos, en ácido siálico, un sacárido no tóxico.

5 Anteriormente hemos descrito métodos para la unión de polisacáridos (en especial el PSA) a agentes terapéuticos como por ejemplo las proteínas [US-A-5846.951; WO-A-0187922]. Algunos de estos métodos dependen de la derivatización química del extremo “no reductor” del polímero para crear una parte de una molécula de aldehído reactiva a las proteínas que reaccione ante grupos amina primarios. Una unidad terminal de ácido siálico no reductora, debido a
10 que contiene dioles vecinos, puede oxidarse fácilmente (y de forma selectiva) con peryodato para producir una forma de monoaldehído, que es mucho más reactiva ante las proteínas, y que comprende un elemento adecuadamente reactivo para la unión de las proteínas a través de la aminación reductiva y otros comportamientos químicos. La reacción viene ilustrada en las Figuras 1 y 2 en las que:

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

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

20 Se pueden generar subproductos de forma no intencionada durante las reacciones de conjugación convencionales descritas anteriormente mediante la reacción del ácido colomínico con cadenas laterales de aminoácidos, por ejemplo. Estos puede que sean suficientes como para dar problemas en la fabricación de conjugados químicamente definidos requeridos por las autoridades reguladoras para el uso terapéutico en el hombre y los animales.

25 No resulta sencillo purificar el producto de reacción buscado (por ejemplo el producto monopolisialilado) de los diferentes productos no deseados, dado que las características fisicoquímicas de la mayoría de los productos de reacción son similares. Esto significa que técnicas como la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía de permeación en gel (que separan basándose respectivamente en la carga y el tamaño) producen perfiles de purificación
30 pobres. Este problema se puede superar reduciendo la complejidad de los productos en la reacción de conjugación. Hemos desarrollado un nuevo método para la conjugación de polisacáridos con proteínas según el que puede utilizarse la alta reactividad del extremo N-terminal de la proteína y que evita la complejidad de los productos que se obtiene usando el método establecido (Figura 1 y 2) de la aminación reductiva de las proteínas con ácido colomínico natural oxidado con peryodato.

35 De conformidad con un primer aspecto de esta invención proporcionamos un compuesto que es un derivado polisacárido N-terminal del GCSF, o de una proteína parecida al GCSF, según el que el polisacárido es un ácido polisialílico y está compuesto de entre 2 y 200 unidades sacáridas.

40 En lo sucesivo, cuando utilicemos el término GCSF, también es nuestra intención cubrir las proteínas parecidas al GCSF. Por proteína parecida al GCSF, nos referimos a cualquier compuesto biológico que posea la actividad del factor estimulante de colonias granulocíticas humano (a) cuya secuencia de aminoácidos sea al menos en un cincuenta por ciento (50%) idéntica a la ID DE SECUENCIA N° 1, y (b) que posea al menos un treinta y cinco por ciento (35%), preferentemente al menos un 50%, más preferentemente al menos un 60 ó un 70% de la actividad del factor
45 estimulante de colonias granulocíticas humano tal y como se mide mediante un bioensayo en comparación con la Norma Internacional de la Organización Mundial de la Salud para el factor estimulante de colonias granulocíticas humano (Humano, derivado del ADNr) según se mide de conformidad con el bioensayo descrito en el Ejemplo 1.

Las proteínas parecidas al GCSF también pueden denominarse “homólogas del GCSF”. Si dos secuencias son
50 homólogas se calcula de forma rutinaria utilizando la identidad o similitud porcentual, términos que son bien conocidos en la técnica. Las secuencias deberían compararse con la ID DE SECUENCIA N° 1, que es el GCSF humano con número de registro en Swissprot P09919. El GCSF activo son los residuos 30-207 de esta secuencia. Las secuencias de las homólogas del GCSF pueden compararse o bien con la totalidad de la ID DE SECUENCIA N° 1, o con los residuos 30-207 de la misma. Preferentemente, la homóloga se compara con el GCSF activo.

55 WO-A-2005055946, WO-A-03031464 y Glycobiology 16(9), páginas 833-843 (2006) describen conjugados de polisacáridos con proteínas.

En esta invención las homólogas poseen un 50% o más de identidad en el nivel de los aminoácidos, más preferentemente un 60%, 70%, 80% o más, más preferentemente un 90% o más, como por ejemplo un 95% ó un 99% de identidad en el nivel de los aminoácidos. Hay disponibles cierto número de programas para calcular la identidad; los programas preferentes son los programas BLASTn, BLASTp y BLASTx, ejecutados con parámetros por defecto, disponibles en www.ncbi.nlm.nih.gov. Por ejemplo, 2 secuencias de aminoácidos pueden compararse utilizando el programa BLASTn con parámetros por defecto (puntuación = 100, longitud de palabra = 11, valor previsto = 11, filtrado de baja complejidad = activado). Los niveles anteriores de homología pueden calcularse utilizando estos parámetros
65 por defecto.

El GCSF puede ser glicosilado o no glicosilado.

ES 2 344 670 T3

En esta invención, el término GCSF incluye el GCSF natural extraído del cuerpo de un ser humano o de un mamífero y versiones sintéticas del mismo, tales como el GCSF recombinante humano, por ejemplo el filgrastim y el lenograstim tal y como se ha analizado anteriormente. También se incluyen los mutantes del GCSF que poseen una actividad adecuada parecida al GCSF, tal como los mutantes de la cisteína.

Por “derivado N-terminal”, nos referimos a que el polisacárido aniónico derivatiza el GCSF en su grupo amina N-terminal.

Preferentemente, el polisacárido posee al menos 2, más preferentemente al menos 5, lo más preferentemente al menos 10, por ejemplo al menos 50 unidades sacáridas.

El polisacárido aniónico es un ácido polisiálico y consta básicamente solamente de unidades de ácido siálico. Sin embargo, el polisacárido puede poseer unidades que no sean de ácido siálico en la molécula. Por ejemplo, las unidades de ácido siálico pueden alternarse con otras unidades sacáridas. Preferentemente, sin embargo, el polisacárido consta básicamente de unidades de ácido siálico.

El polisacárido posee un grupo de ácido siálico terminal y es un ácido polisiálico, esto es un polisacárido que está compuesto de al menos 2 unidades de ácido siálico unidas la una a la otra a través de enlaces α -2-8 o α -2-9. Un ácido polisiálico adecuado posee un peso molecular medio de entre 2 y 200 kDa, preferentemente de entre 5 y 75 kDa. Lo más preferentemente, el ácido polisiálico deriva de una fuente bacteriana, por ejemplo el polisacárido B de *E. coli* K1, *N. meningitidis*, *Maraxella liquefaciens* ó *Pasteurella aeruginosa* ó el polisacárido K92 de la cepa K92 de *E. coli*. Lo más preferentemente es el ácido colomínico de *E. coli* K1.

El ácido polisiálico puede tener la forma de una sal o del ácido libre. Puede tener una forma hidrolizada, de modo que el peso molecular se haya reducido tras la recuperación de una fuente bacteriana.

El polisacárido, preferentemente el ácido polisiálico, puede ser un material que posea una amplia gama de pesos moleculares tal como por ejemplo poseer una polidispersidad de más de 1,3, por ejemplo tanto como 2 ó más. Preferentemente la polidispersidad del peso molecular es de menos de 1,3 ó 1,2, más preferentemente de menos de 1,1, por ejemplo tan pequeña como 1,01.

Típicamente, el compuesto de esta invención es un derivado del ácido polisiálico del GCSF y consta de 80-180 unidades de ácido siálico. Más típicamente, el compuesto consta de 100-150 unidades de ácido siálico. Preferentemente, el compuesto consta de 120-145, lo más preferentemente de 130-140 unidades de ácido siálico.

El compuesto de conformidad con el primer aspecto de esta invención puede ser un conjugado unido covalentemente entre el extremo N-terminal del GCSF o una proteína parecida al GCSF y un polisacárido aniónico. Entre otros medios de asociación entre el polisacárido y el GCSF se incluyen la atracción electrostática. Sin embargo, se prefiere el enlace covalente. El enlace covalente puede ser un enlace amídico entre un grupo carboxilo y un grupo amina. Otro enlace por el que el GCSF podría unirse covalentemente al polisacárido es a través de una base de Schiff. Los grupos adecuados para conjugarse con aminas se describen con mayor profundidad en WO 2006/016168.

El polisacárido puede estar unido al GCSF a través de su unidad terminal o bien reductora o no reductora. Una cadena polisacárida puede estar unida en ambas unidades terminales a proteínas del GCSF. Esto significa que una cadena polisacárida puede estar unida a dos proteínas del GCSF, es decir, estar derivatizada tanto en su extremo reductor como en el no reductor.

En la invención, el polisacárido puede ser un polisacárido presente de forma natural, o un derivado de un polisacárido presente de forma natural, por ejemplo, un polisacárido que se haya derivatizado mediante una reacción de uno o más grupos activos en los residuos sacáridos, o que se haya unido covalentemente a un grupo derivatizador en el extremo de la cadena polisacárida.

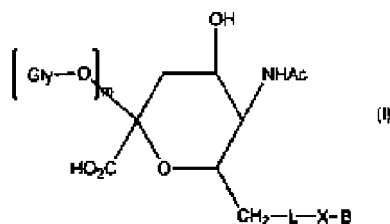
Los métodos para unir los polisacáridos a las proteínas son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle en WO 92/22331 y WO-A-0187922. Los métodos preferentes en esta invención se describen con más detalle a continuación. También se describen métodos en las Figuras 1 y 2 de esta solicitud.

El polisacárido puede enlazarse al GCSF o a la proteína parecida al GCSF directamente, es decir, tal y como se muestra en las Figuras 1 y 2, o a través de un enlazador. Los enlazadores adecuados se derivan de los reactivos que contienen N-maleimida, vinilsulfona, N-yodoacetamida, ortopiridilo o N-hidroxisuccinimida. El enlazador también puede ser bioestable o biodegradable y comprender, por ejemplo, un polipéptido o un oligómero sintético. El enlazador puede derivarse de una parte de una molécula bifuncional, tal y como se describe con mayor profundidad en WO 2005/016973. Un reactivo bifuncional adecuado es, por ejemplo, el Bis-NHS. El reactivo puede tener la fórmula general Z-R¹-Z en la que cada Z es un grupo funcional y puede ser el mismo o diferente y R¹ es un radical orgánico bifuncional. Preferentemente, R¹ se selecciona del grupo que está compuesto de alcanediilo, arileno, alcarileno, heteroarileno y alquilheteroarileno, cualquiera de los cuales puede ser sustituido y/o interrumpido por enlaces carbonilo, éster, sulfuro, éter, amida y/o amina. Especialmente preferente es el alcanediilo C₃-C₆. Lo más preferentemente, R¹ corresponde a la parte apropiada del reactivo bifuncional adecuado.

ES 2 344 670 T3

De conformidad con un segundo aspecto de esta invención proporcionamos un compuesto con la fórmula general (I)

5



10

en la que

15

m es al menos uno;

XB se deriva de B-XH que es el GCSF o una proteína parecida al GCSF en donde XH es NH₂ ó SH;

20

L es un enlace, un grupo de enlace o está compuesto de un polipéptido o un oligómero sintético;

GlyO es una unidad sacárida aniónica;

en la que el grupo de enlace, si lo hubiera presente, tiene la fórmula general -Y-C(O)-R¹-C(O)-;

25

en la que Y es NR² ó NR²-NR² y R¹ es un radical orgánico bifuncional tal y como se ha definido anteriormente; y R² es H ó un alquilo C₁₋₆.

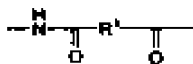
30

En este aspecto de la invención el GCSF está unido al extremo no reductor del polisacárido. La unidad polisacárida terminal es una unidad de ácido siálico. Las otras unidades sacáridas del polisacárido están representadas por GlyO y pueden ser las mismas o diferentes. Entre las unidades sacáridas adecuadas se incluyen la heparina, el ácido hialurónico o el sulfato de condroitina.

35

Cuando el GCSF está unido directamente al polisacárido, el grupo L es un enlace. Sin embargo, el grupo L puede estar derivado alternativamente de un reactivo que contenga N-maleimida, vinilsulfona, N-yodoacetamida, ortopiridilo ó N-hidroxisuccinimida. El reactivo puede poseer la fórmula general Z-R¹-Z tal y como se ha definido anteriormente. En esta realización, L es típicamente un grupo

40



Preferentemente, XH es NH₂ y es la amina N-terminal del GCSF o la proteína parecida al GCSF. De forma alternativa, NH₂ puede ser la amina primaria de la cadena lateral de un aminoácido lisina.

45

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto novedoso tal y como se ha definido anteriormente y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

50

La composición farmacéutica puede tener la forma de una suspensión acuosa. Las suspensiones acuosas contienen los compuestos novedosos mezclados con los excipientes adecuados para la elaboración de suspensiones acuosas. Las composiciones farmacéuticas pueden tener la forma de una suspensión homogénea o acuosa estéril inyectable. Esta suspensión puede estar formulada de conformidad con la técnica conocida utilizando agentes humectantes o dispersantes adecuados y agentes de suspensión.

55

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de forma oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica, tópica o intratraqueal para su uso en seres humanos o su uso veterinario.

60

Las composiciones pueden además comprender un aditivo de formulación. Por aditivo de formulación nos referimos a un excipiente que es capaz de estabilizar el GCSF bien internamente o externamente, tal y como aparece descrito en Wang *et al* (1999). El excipiente puede ser un estabilizador, un solubilizador o un ión metálico. Entre los ejemplos adecuados de aditivos de formulación se incluyen uno o más tampones, estabilizadores, surfactantes, sales, polímeros, iones metálicos, azúcares, polioles o aminoácidos. Estos pueden utilizarse solos o combinados.

65

Los estabilizadores típicamente actúan mediante la desestabilización del estado desnaturalizado de una proteína, lo que lleva a un cambio creciente de la energía libre de Gibbs para desplegar la proteína. El estabilizador es preferentemente un azúcar o un poliol, por ejemplo la sacarosa, el sorbitol, la trehalosa, el glicerol, el manitol, la lactosa y el etilenglicol. Un tampón estabilizador es el fosfato de sodio.

ES 2 344 670 T3

El solubilizador es preferentemente un surfactante, preferentemente un surfactante no iónico. Entre los ejemplos adecuados se incluyen Tween 80, Tween 20, Tween 40, Pluoronic F68, Brij 35 y Triton X100.

5 El ión metálico es preferentemente divalente. Entre los iones metálicos adecuados se incluyen Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+} .

El aditivo de formulación también puede ser un polímero seleccionado de entre el PSA, el PEG o la hidroxibeta-ciclodextrina.

10 Entre los aminoácidos y los derivados de los aminoácidos adecuados para su uso como el aditivo de formulación se incluyen la histidina, la glicina, otros aminoácidos similares y el aspartato sódico.

15 Otro aspecto de esta invención es una composición que comprende una población de derivados polisacáridos aniónicos del GCSF o de una proteína parecida al GCSF, en la que los derivados están compuestos de entre 2 y 200 unidades sacáridas y en la que la población está compuesta básicamente solo de derivados N-terminal de la proteína.

20 Por "población" nos referimos a que hay más de un derivado polisacárido en la composición. Los derivados pueden constar de los mismos números o de diferentes números de unidades sacáridas. Preferentemente, la polidispersidad del polisacárido en la composición es menor de 1,3, más preferentemente menor de 1,1. Los polisacáridos preferentes son según se han detallado anteriormente para los otros aspectos de esta invención.

25 En la población, básicamente todo el GCSF se derivatiza solamente en la amina N-terminal. Con esto, queremos decir que el 85%, preferentemente al menos el 90%, lo más preferentemente al menos el 95% de la proteína en la población se derivatiza con PSA solamente en la amina N-terminal.

El grado de derivatización en el extremo N-terminal se puede medir utilizando técnicas bien conocidas en este campo, tales como el mapeo peptídico y la degradación de Edman.

30 Un aspecto adicional de la invención es un compuesto tal y como se ha descrito anteriormente para su uso en terapia.

35 De conformidad con un aspecto final de la invención, proporcionamos un método para producir un N-derivado polisacárido del GCSF o de una proteína parecida al GCSF en el que un polisacárido aniónico que está compuesto de 2-200 unidades sacáridas se hace reaccionar químicamente con el GCSF o la proteína parecida al GCSF.

40 Según se observará en este aspecto de la invención, el polisacárido puede reaccionar ante cualquier grupo del GCSF o de la proteína parecida al GCSF. Por ejemplo, el polisacárido puede reaccionar con un grupo amina, amida, arilo, aldehído, cetona, guanidino, imidazol, hidroxilo, carboxilo o sulfhidrilo. Preferentemente, el grupo es un grupo amina, más preferentemente un grupo amina terminal. La amina puede ser de forma alternativa la cadena lateral amínica de un aminoácido, tal como un aminoácido lisina. El polisacárido también puede reaccionar ante cualesquiera residuos de carbohidratos del GCSF, tales como en los grupos glicol pendientes.

45 Los polisacáridos pueden estar enlazados a cadenas laterales de aminoácidos mediante métodos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, un polisacárido puede estar acoplado a las cadenas laterales del extremo C-terminal, -COOH ó carboxilo de Asp o Glu mediante acoplamiento *in vitro*. Los grupos tiol de los aminoácidos cisteína también pueden estar enlazados a polisacáridos mediante acoplamiento *in vitro*. Estos métodos se describen más detalladamente en WO03/055526, en particular la tabla de las páginas 6 y 7. En esta referencia, el acoplamiento *in vitro* también se utiliza para enlazar la parte de una molécula de un oligosacárido al grupo amida en la cadena lateral de Gln. También se describen métodos de acoplamiento *in vitro* para enlazar partes de moléculas de oligosacáridos con grupos guanidino e imidazol de residuos de Arg e His respectivamente. Cada uno de estos métodos puede utilizarse para derivatizar el GCSF de la presente invención.

55 El polisacárido también puede reaccionar con una forma modificada del GCSF. Por ejemplo, uno o más grupos del GCSF puede que haya(n) sufrido una transformación química, por ejemplo, mediante reducción u oxidación. Por ejemplo, puede generarse un carbonilo reactivo en el lugar del grupo amino terminal del GCSF utilizando condiciones de oxidación.

60 Los polisacáridos adecuados para utilizar en el método de esta invención son los descritos anteriormente para los compuestos novedosos.

Los compuestos de la invención pueden ser elaborados mediante cualesquiera de los métodos adecuados descritos en el estado anterior de la técnica. Por ejemplo, un método típico se describe en nuestra anterior solicitud de patente WO 92/22331.

65 Típicamente, el polisacárido aniónico se ha activado antes de la derivatización al GCSF. Por ejemplo, puede tener un grupo aldehído reactivo y la reacción de derivatización puede llevarse a cabo bajo condiciones de reducción. El grupo aldehído reactivo puede elaborarse mediante oxidación controlada de un grupo hidroxilo del polisacárido. Lo más preferentemente, este aldehído reactivo se genera en un paso preliminar, en el que el polisacárido se hace reac-

ES 2 344 670 T3

cionar bajo condiciones de oxidación controlada, por ejemplo utilizando peryodato de sodio, en una solución acuosa. Preferentemente, la oxidación es una oxidación química, aunque también pueden utilizarse enzimas que son capaces de llevar a cabo este paso. El grupo aldehído reactivo puede estar en el extremo no reductor o en el extremo reductor del polisacárido. El GCSF, típicamente el extremo N-terminal, puede entonces reaccionar con el grupo aldehído reactivo para producir un aducto que, cuando se reduce, produce el derivado N-terminal del GCSF.

La activación del polisacárido debería llevarse a cabo preferentemente bajo tales condiciones que básicamente no haya ninguna división a mitad de la cadena de la estructura básica del polisacárido, es decir, que básicamente no haya una reducción en el peso molecular. El oxidante es, de forma adecuada, el perrutenato, o, preferentemente, el peryodato. La oxidación puede llevarse a cabo con peryodato en una concentración de entre 1 mM y 1 M, con un pH de entre 3 y 10, a una temperatura de entre 0 y 60°C y durante un periodo de tiempo de entre 1 minuto y 48 horas.

Las condiciones adecuadas de reducción para la reacción de derivatización pueden utilizar hidrógeno con catalizadores o, preferentemente hidruros, tales como los borohidruros. Estos pueden inmovilizarse tal como el borohidruro soportado en Amberlite (marca registrada). Preferentemente se utilizan hidruros de metal alcalino tales como el borohidruro de sodio como agente reductor, en una concentración de entre 1 μ M y 0,1 M, con un pH de entre 5,0 y 10, una temperatura de entre 0 y 60°C y durante un periodo de tiempo de entre 1 minuto y 48 horas. Las condiciones de la reacción se seleccionan de tal manera que los grupos carboxilo pendientes en el material de inicio no sufran reducción.

Otros agentes reductores adecuados son los cianoborohidruros bajo condiciones de acidez, por ejemplo, el cianoborohidruro de metal alcalino o el cianoborohidruro soportado en polímero, el ácido L-ascórbico, el metabisulfito sódico, el L-selectride, el triacetoxiborohidruro, etc.

Otros derivados activados de los polisacáridos pueden tener utilidad en la presente invención, incluyendo los que poseen grupos funcionales pendientes tales como NHS, tal y como se describe en nuestra anterior solicitud de patente WO 06/00540.

En una realización, el aldehído reactivo se encuentra en el extremo reductor del polisacárido y el extremo no reductor se ha neutralizado de tal manera que no reaccione con los grupos pendientes del GCSF.

La reactividad del extremo reductor del ácido colomínico, aunque débil hacia las proteínas objetivo, es suficiente como para dar problemas a la hora de elaborar conjugados químicamente definidos.

La química adecuada para preparar un polisacárido con un aldehído reactivo en el extremo reductor del polisacárido se describe en nuestra anterior solicitud WO 05/016974. El proceso implica un paso preliminar de oxidación selectiva seguido de una reducción y después de más oxidación para producir un compuesto con un aldehído en el extremo reductor y un extremo no reductor neutralizado.

WO 2005/016973 describe los derivados del ácido polisiálico que son útiles para la conjugación de proteínas, en particular aquellos que poseen fármacos con sulfhidrilo libre. El compuesto de ácido polisiálico se hace reaccionar con un reactivo heterobifuncional para introducir un grupo funcional pendiente para la conjugación sitio-específica con grupos de sulfhidrilo. Los polisacáridos aniónicos utilizados en la presente invención también se pueden derivatizar con un reactivo heterobifuncional de esta manera.

El polisacárido se puede derivatizar antes de que reaccione con el GCSF. Por ejemplo, el polisacárido puede reaccionar con un reactivo bifuncional.

El polisacárido puede someterse a un paso preliminar de reacción, en el que se forma un grupo seleccionado de un grupo amina primario, un grupo amina secundario y de una hidracina en el sacárido terminal, que es preferentemente el ácido siálico, seguido de un paso de reacción en el que esto se hace reaccionar con un reactivo bifuncional para formar un producto intermedio de reacción, tal y como se describe más detalladamente en WO 2006/016168. El producto intermedio puede entonces reaccionar con el GCSF o la proteína parecida al GCSF. El reactivo bifuncional puede poseer la fórmula general Z-R¹-Z, tal y como se ha definido anteriormente.

Hemos descubierto que ciertas condiciones de reacción potencian la derivatización selectiva en el extremo N-terminal del GCSF. Para potenciar la reacción selectiva en el extremo N-terminal, la reacción de derivatización debería llevarse a cabo en una primera solución acuosa de pH ácido, y el derivado polisacárido resultante debería después purificarse en una segunda solución acuosa de un pH más alto que el de la primera solución acuosa. Típicamente, el pH de la primera solución acuosa es menor de 7, y está preferentemente entre 4,0 y 6,0. El pH de la segunda solución acuosa está entre 6,5 y 9,5, preferentemente entre 6,5 y 8,5. El pH bajo de la reacción de derivatización potencia la derivatización selectiva en el extremo N-terminal de la proteína en vez de en cualesquiera sitios en mitad de la cadena.

Además, hemos descubierto que el uso de ciertos aditivos de formulación potencia la formación de un derivado del GCSF polisacárido estable y selectivo. El aditivo de formulación puede seleccionarse de entre uno o más tampones, estabilizadores, surfactantes, sales, polímeros, iones metálicos, azúcares, polioles o aminoácidos. Estos se pueden añadir al medio de reacción, o de forma alternativa se pueden añadir a la composición de producto final, como un estabilizador.

ES 2 344 670 T3

En una realización de esta invención, el aditivo de formulación es sorbitol, manitol, trehalosa o sacarosa. En una realización diferente, el aditivo de formulación es un surfactante no iónico. El aditivo de formulación puede ser de forma alternativa un polímero seleccionado de entre el PSA, el PEG o la hidroxibeta-ciclodextrina, por ejemplo, Tween 20, Tween 80, PEG. En una realización diferente el aditivo de formulación es un ión metálico divalente. Entre los iones metálicos divalentes preferentes se incluyen Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Sr^{2+} ó Fe^{2+} .

El aditivo de formulación puede ser un tampón. Preferentemente cuando el aditivo de formulación es un tampón, es fosfato de sodio o acetato de sodio.

La purificación del derivado polisacárido en el método de la presente invención puede llevarse a cabo utilizando una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Entre los ejemplos de métodos de purificación adecuados se incluyen la HIC (cromatografía de interacción hidrofóbica), la SEC (cromatografía de exclusión por tamaño), la HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento), la AEX (cromatografía de intercambio aniónico) y la MAC (cromatografía de afinidad metálica).

Se puede fraccionar una población de ácidos polisialícos que posean una amplia distribución de peso molecular en fracciones con polidispersidades inferiores, esto es, en fracciones con diferentes pesos moleculares medios. El fraccionamiento se lleva a cabo preferentemente mediante cromatografía de intercambio aniónico, utilizando para la elución un tampón básico adecuado, tal y como aparece descrito en nuestras anteriores solicitudes de patente WO 2005/016794 y WO 2005/03149. El método de fraccionamiento es adecuado para un material de inicio polisacárido así como para los derivados. La técnica puede así aplicarse antes o después de los pasos de proceso esenciales de esta invención. Preferentemente, la polidispersidad del derivado polisacárido resultante del GCSF es menor de 1,1.

La derivatización del GCSF de conformidad con esta invención, da por resultado una mayor vida media, una mejor estabilidad, una reducción de la inmunogenicidad y/o el control de la solubilidad y por consiguiente la biodisponibilidad y las propiedades farmacocinéticas del GCSF. El nuevo método es de especial valor para la creación de conjugados del GCSF monopolisialilado.

La invención viene ilustrada mediante los Ejemplos 1-10 y mediante las referencias a los siguientes dibujos:

La Figura 1 es un esquema de reacción que muestra la activación por la técnica anterior de la unidad terminal no reductora del ácido siálico;

La Figura 2 es un esquema de reacción que muestra la derivatización N-terminal o aleatoria de las proteínas;

La Figura 3a muestra la degradación del ácido colomónico (AC) de 24 kDa con diferentes pHs utilizando GPC de Triple Detección (Viscotek: RI + RALS + Viscosímetro);

La Figura 3b muestra los resultados de la cromatografía de permeación en gel (GPC) del AC fraccionado 400 mM de NaCl;

La Figura 4 muestra la caracterización del GCSF polisialilado mediante SDS-PAGE en presencia de aditivos de formulación;

La Figura 5 muestra la caracterización de SE-HPLC (lado izquierdo) y del GCSF polisialilado mediante SDS-PAGE (lado derecho);

La Figura 6 muestra la caracterización del GCSF mediante SE-HPLC;

La Figura 7 muestra la caracterización del GCSF polisialilado de 42 kDa mediante PAGE nativa;

La Figura 8 ilustra los resultados de la cromatografía de afinidad metálica inmovilizada del GCSF;

La Figura 9 ilustra la actividad *in vitro* del GCSF polisialilado en células MNFS 60;

La Figura 10 muestra los datos de SE-HPLC para la estabilidad de la formulación del GCSF polisialilado (GCSF del AC de 41 kDa);

La Figura 11 muestra los datos de FACS para el GCSF (número de neutrófilos);

La Figura 12 muestra la eficacia *in vitro* de las formulaciones del GCSF;

La Figura 13 muestra la caracterización del GCSF pegilado mediante SE-HPLC.

Ejemplos

Materialiales

5 Se obtuvieron carbonato de amonio, etilenglicol, polietilenglicol (8 kDa), cianoborohidruro de sodio (> 98% puro), metaperyodato de sodio y marcadores de peso molecular, sulfato de amonio, cloruro sódico, fosfato de sodio, sorbitol, Tween 20 y Tris de Sigma Chemical Laboratory, Reino Unido. El acetato de sodio y el fosfato de sodio provenían de BDH, Reino Unido. El ácido colomínico utilizado, los ácidos polisialícos lineales unidos con enlaces alfa-(2,8) de *E. coli* K1 (22,7 kDa de media, alta polidispersidad de 1,34, 39 kDa, p.d. de 1,4; 11 kDa, p.d. de 1,27) provenía de Carmida, Irlanda. Entre otros materiales se incluyeron 2,4-dinitrofenil hidracina (Aldrich Chemical Company, Reino Unido), la membrana de diálisis (límites de corte de 3,5 kDa y 10 kDa; Medicell International Limited, Reino Unido), Sefarosa SP HiTrap, PD-10 columnas, Q FF [columna de 1 ml ó 5 ml]; columna de Hitrap Butilo HP [de 1 ó 5 ml]; (Pharmacia, Reino Unido), geles de poli(acrilamida en tris-glicina (4-20% y 16%), tampón de carga y tampón de migración del dodecilsulfato sódico de tris-glicina (Novex, Reino Unido). El agua desionizada se obtuvo de una unidad de purificación de agua de Elgastat Opción 4 (Elga Limited, Reino Unido). Todos los reactivos utilizados eran de calidad analítica. Se utilizó un lector de placas (Dynex Technologies, Reino Unido) para las determinaciones espectrofotométricas en ensayos de proteínas o AC. Se adquirieron los ratones en Harlan, Reino Unido, y se aclimataron al menos durante una semana antes de utilizarlos. El GCSF se obtuvo de SILL, India.

20 Ejemplo 1

Bioensayo del GCSF

25 La determinación de la actividad biológica del G-CSF está basada en la estimulación de la proliferación de células M-NFS-60 mediante esta citoquina. Las células se incuban con diluciones en serie de preparados tanto de referencia como de G-CSF durante 48 horas. Se calcula la respuesta proliferativa de las células tras una incubación de 4 horas de duración con un sistema de teñido de células viables - mezcla de PMS (reactivo de acoplamiento electrónico). El MTS se ve bio-reducido mediante las células en un producto formazán que es soluble en un medio de cultivo tisular. La absorbencia del formazán a 492 nm puede medirse directamente a partir de placas de ensayo de 96 pocillos sin necesidad de un procesamiento adicional. La cantidad de producto formazán, según se mide a partir de la cantidad de absorbencia a 492 nm, es directamente proporcional al número de células vivas.

30 Debería utilizarse como referencia la Norma Internacional de la Organización Mundial de la Salud para el GCSF (derivado del ADN humano) 88/502, 10.000 UI/ampolla, contenido de 100 ng de G-CSF, NIBSC (*Instituto Nacional de Control y Estándares Biológicos*), Reino Unido.

Ejemplo 2

Determinación del ácido colomínico y la proteína

40 Se llevó a cabo una estimación cuantitativa de los ácidos polisialícos (como el ácido siálico) con el reactivo resorcinol mediante el método del resorcinol [Svennerholm, 1957] tal y como viene descrito en otras partes [Gregoriadis *et al.*, 1993; Fernandes y Gregoriadis, 1996, 1997]. La proteína se midió mediante el método colorimétrico de BCA o la absorbencia UV a 280 nm.

45 2.1. Activación del ácido colomínico

Se mezcló una solución de metaperyodato de sodio (NaIO_4) de 0,02 M (exceso molar 8 veces superior) recién preparada con AC a 20°C y la mezcla de reacción se agitó de forma magnética durante 15 minutos en la oscuridad. Después se añadió un volumen doble de etilenglicol a la mezcla de reacción para consumir el exceso de NaIO_4 y la mezcla se dejó para agitar a 20°C durante 30 minutos adicionales. El ácido colomínico oxidado se dializó (membrana de diálisis con límite de corte de peso molecular de 3,5 kDa) exhaustivamente (24 horas) contra un tampón de carbonato de amonio al 0,01% (con pH de 7,4) a 4°C. Se utilizó la ultrafiltración (sobre un límite de corte de peso molecular de 3,5 kDa) para concentrar la solución de ACO de la membrana de diálisis. Después de obtener la concentración con el volumen necesario, el filtrado se liofilizó y guardó a -40°C hasta que se volviera a utilizar. De forma alternativa, el AC se recuperó de la mezcla de reacción mediante la precipitación (dos veces) con etanol.

60 2.2. Determinación del estado de oxidación del AC y los derivados

Se llevó a cabo una estimación cualitativa del grado de oxidación del ácido colomínico con 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH), que produce 2,4-dinitrofenil-hidrazonas solubles en pequeñas cantidades en interacción con compuestos carbonilo. Se añadieron (AC) no oxidado/(ACO) oxidado al reactivo 2,4-DNFH (1,0 ml), las soluciones se agitaron y después se dejaron reposar a 37°C hasta que se observó un precipitado cristalino [Shriner *et al.*, 1980]. El grado (cuantitativo) de oxidación de AC se midió con un método [Park y Johnson, 1949] basado en la reducción de iones de ferricianuro en una solución alcalina a ferrocianuro férrico (azul de Prusia), que entonces se mide a 630 nm. En este ejemplo, se utilizó la glucosa como la norma.

ES 2 344 670 T3

2.3. Cromatografía de permeación en gel

Se disolvieron las muestras de ácido colomínico (AC y ACO) en NaNO₃ (0,2 M), CH₃CN (10%; 5 mg/ml) y se cromatografiaron en más de 2 columnas GMPW_{XL} con detección mediante índice de refracción (sistema GPC: bomba de disolvente GPC VE1121, detector RI VE3580 y cotejo con software Trisec 3 (Viscotek Europe Ltd.). Las muestras (5 mg/ml) se filtraron sobre una membrana de nylon de 0,45 μm y procesaron a 0,7 cm/min con 0,2 M de NaNO₃ y CH₃CN (10%) como la fase móvil.

Los resultados se muestran en la Figura 3b y las tablas 4 y 5 (véase la página 25).

2.4. Estabilidad del ácido colomínico

Las normas para la química de la Pegilación no pueden aplicarse a la polisialilación como tal debido a la diferencia en las propiedades fisicoquímicas de estas moléculas. El PSA es un polímero ácido alterable y permanece estable durante semanas en torno al pH neutro (Figura 3a). Los resultados en la Figura 3a muestran que con un pH de 6,0 y un pH de 7,4 el AC permanece estable durante 8 días, con un pH de 5,0 se produce una degradación lenta (tras 48 horas 92% del PM inicial), y con un pH de 4,0 se produce una degradación lenta (tras 48 horas 70% del PM inicial). El ácido polisialílico es enormemente hidrofílico mientras que el PEG es una molécula anfifílica por naturaleza. Cuando se lleva a cabo la polisialilación utilizando condiciones usadas para la Pegilación, se observa agregación y precipitación de las proteínas en muchos casos.

Ejemplo 3

Preparación de conjugados proteína-AC N-terminales con aditivos de formulación

3.1. Preparación de conjugados GCSF-AC (método N-terminal)

El GCSF (18,8 kDa) se suministró como una solución (1,05 mg/ml en 10 mM de tampón de acetato de sodio, pH de 4,0 con un 5% de sorbitol, 0,025 mg/ml de polisorbato 80) y se guardó a 2-8°C. Se tomó la cantidad necesaria de GCSF en un eppendorf y se colocó en hielo. La cantidad de AC a añadir para la conjugación se calculó en base a la siguiente fórmula:

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

Se pesó la cantidad necesaria de AC. El AC se solubilizó en 10 mM de NaOAc, 5% de sorbitol, pH de 5,5 (aquí se utilizó el 20% del volumen del volumen de la reacción final), la mezcla se sometió ligeramente a agitación vorticial hasta que todo el AC se hubiera disuelto y después o bien se filtró introduciéndola en un nuevo eppendorf o se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf para eliminar cualquier material agregado/precipitado. Se añadió el volumen necesario de 10 mg/ml de solución madre de Tween 20, para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml del Tween 20 en la mezcla de la reacción final. Se añadió la cantidad necesaria de solución de proteína GCSF a la solución de AC para obtener un exceso molar de 10 (a pequeña escala) y de 9 (a gran escala) de AC y se mezcló ligeramente manteniendo la mezcla de la reacción en un agitador suave a 4±1°C. Se añadieron 100 mg/ml de solución de NaCNBH₃ para obtener 50 mM o 3, 17 mg/ml en la mezcla de la reacción final, se mezcló ligeramente y se comprobó el pH de la mezcla de la reacción final, en caso necesario se ajustó el pH a 5,5 con 1M de NaOH/HCl a 4±1°C. Por último, se ajustó el volumen de la reacción utilizando 10 mM de NaOAc, 5% de sorbitol, con pH de 5,5 para obtener una concentración proteica de 0,67 mg/ml en la mezcla de la reacción. El tubo se cerró herméticamente y se agitó a la temperatura deseada (4±1°C) durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante un método adecuado y se tomaron muestras para un ensayo de actividad *in vitro* en células MNFS 60, SDS-PAGE (utilizando 4-20% de gel de Tris glicina), SE-HPLC (columna de superose 6) y se comprobó el pH de la mezcla de la reacción. Para eliminar cualquier precipitado se centrifugó la mezcla de la reacción a 13000 rpm durante 5 minutos antes del análisis y purificación por SE-HPLC, el tampón preferente para la SE-HPLC era 0,1 M de fosfato de Na (con pH de 6,9).

Optimización

Se llevó a cabo una aminación reductiva con una gama de pesos moleculares del AC (29-52 kDa) en el GCSF para una derivatización N-terminal y aleatoria. Se estudiaron una serie de variables del proceso para las reacciones de conjugación: exceso molar de ACO de 10-20 (a pequeña escala) y 8-15 (a gran escala); reactivo = 50-100 mM de NaCNBH₃; tampón de la reacción = 10 mM de NaOAc; pH de 5,0-7,4; aditivos de formulación = 6 kDa de Tween 20/8 kDa de PEG (exceso de 10 M)/ 6 kDa de Tween 20+PEG; temperatura = 4±1°C, tiempo = 16-24 horas, etc.

ES 2 344 670 T3

Se descubrió que las condiciones de reacción optimizadas eran las siguientes: ACO = exceso molar de 10 (a pequeña escala) y 9 (a gran escala), reactivo = 50 mM de NaCNBH₃, tampón de reacción = 10 mM de NaOAc, pH de 5,5; aditivos = 0,5 mg/ml de Tween 20, temperatura = 4±1°C, tiempo = 22 horas.

5

3.2. Purificación y caracterización de conjugados GCSF-AC (método N-terminal)

La muestra restante de la mezcla de la reacción se diluyó con tampón A de AEX (20 mM de acetato de sodio, 50 mM de cloruro sódico, pH de 5,0) (1,5 ml de mezcla de la reacción + 9 ml de tampón A), el pH se comprobó y se ajustó si era necesario a un pH de 5,0, y se cargó en la columna de AEX previamente equilibrada con el tampón A de AEX. Se recogieron y etiquetaron las fracciones de carga. La columna se lavó con tampón A de AEX (al menos 5 volúmenes de columna), se recogieron las fracciones (cada fracción 1,5 volúmenes de columna) y se etiquetaron. El producto se eluyó con tampón B de AEX (50 mM de fosfato de sodio, 0,65 M de cloruro sódico, pH de 7,0), se recogieron las fracciones (cada fracción 1 volumen de columna; 6 columnas) y se etiquetaron. Si dos fracciones consecutivas no poseían ningún contenido proteico (UV a 280 nm), se llevaba a cabo el paso siguiente. Las muestras se conservaron en hielo durante la purificación. La concentración proteica se analizó mediante UV (280 nm) (la absorbencia de 1 mg/ml de GCSF era de aproximadamente 0,872). Se tomaron las muestras para SDS-PAGE y SE-HPLC. Para eliminar el AC libre de la mezcla, se utilizó HIC. Las muestras se concentraron, en caso necesario.

Las fracciones de AEX que contenían conjugado se combinaron y se añadió (NH₄)₂SO₄ para obtener una concentración de 2,75 M en la solución de carga. Esta solución se cargó después en la columna de HIC previamente equilibrada con el tampón A de HIC (10 mM de fosfato de sodio, 2,75 M de sulfato de amonio, pH de 6,5). Se recogieron las fracciones de carga (cada fracción 1,5 volúmenes de columna) y se etiquetaron. La columna se lavó con tampón A de HIC (al menos 5 volúmenes de columna; velocidad = 0,5 ml/minuto; (1,5 volúmenes de columna) se recogieron las fracciones y se etiquetaron. El producto se eluyó con tampón B de HIC (20 mM de fosfato de sodio con pH de 7,4) (velocidad = 5 ml/minuto); se recogieron las fracciones (fracción de 1 volumen de columna; 6 volúmenes de columna) y se etiquetaron. Las muestras se conservaron en hielo durante la purificación. Se analizó la concentración proteica mediante UV (280 nm).

Las fracciones de HIC que contenían el conjugado purificado se combinaron y se ajustó la composición del conjugado en la solución con solución de sorbitol al 50% y 10 mg/ml de solución de Tween 20 para obtener una composición final de 5% de sorbitol y 0,025 mg/ml de Tween 20. La solución se concentró entonces a 4±1°C y se analizó la concentración proteica mediante UV (280 nm). Se realizó una purificación adicional mediante SE-HPLC (por ejemplo para separar los conjugados de los agregados/proteína libre, etc.). El conjugado se filtró de forma estéril y se recogieron muestras para un ensayo de actividad y para caracterización mediante SDS-PAGE y SE-HPLC. En caso necesario, se extrajo una alícuota para un ensayo proteico y un ensayo de AC. El resto se guardó a 4±1°C hasta utilizarlo de nuevo y se estudió para conocer la estabilidad física mediante SE-HPLC.

Se estudiaron los efectos de varios procesos que afectaban a la estabilidad del GCSF en la solución y el grado de derivatización.

3.3.1. Preparación de conjugados GCSF-AC (Aleatorio)

Se suministró el GCSF (18,8kDa) como una solución (1,05 mg/ml en 10 mM de tampón de acetato de sodio, pH de 4,0 con un 5% de sorbitol, 0,025 mg/ml de polisorbato 80) y se guardó a 2-8°C. Se tomó la cantidad necesaria de GCSF en un eppendorf y se colocó en hielo. La cantidad de AC (por ejemplo AC oxidado o no oxidado) a añadir para la conjugación se calculó en base a la siguiente fórmula:

50

Cantidad de proteína (g)

55

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

60

65

Se pesó la cantidad necesaria de AC. El AC se solubilizó en 50 mM de fosfato de sodio, 5% de sorbitol, pH de 7,4 (aquí se utilizó el 20% del volumen de la reacción final). La mezcla se sometió ligeramente a agitación vorticial hasta que todo el AC se hubiera disuelto y después o bien se filtró introduciéndola en un nuevo eppendorf o se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf para eliminar cualquier material agregado/precipitado. Se añadió el volumen necesario de 10 mg/ml de solución madre de Tween 20, para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml del Tween 20 en la mezcla de la reacción final. Se añadió la cantidad necesaria de solución de proteína GCSF a la solución de AC para obtener un exceso molar de 11 (para 40 kDa) de AC y se mezcló ligeramente manteniendo la mezcla de la reacción en un agitador suave a 4±1°C. Se añadieron 100 mg/ml de solución de NaCNBH₃ para obtener 50 mM ó 3,17 mg/ml en la mezcla de la reacción final, se mezcló ligeramente

ES 2 344 670 T3

y se comprobó el pH de la mezcla de la reacción final, en caso necesario se ajustó el pH a 7,4 con 1 M de NaOH/HCl a $4\pm 1^\circ\text{C}$. Por último, se ajustó el volumen de la reacción utilizando 10 mM de NaOAc, 5% de sorbitol, pH de 7,4 para obtener una concentración proteica de 0,67 mg/ml en la mezcla de la reacción. El tubo se cerró herméticamente y se agitó a la temperatura deseada ($4\pm 1^\circ\text{C}$) durante 22 horas. La reacción se detuvo mediante un método adecuado y se tomaron muestras para un ensayo de actividad *in vitro* en células MNFS 60, SDS-PAGE (utilizando 4-20% de gel de Tris glicina), SE-HPLC y se comprobó el pH de la mezcla de la reacción. Para eliminar cualquier precipitado se centrifugó la mezcla de la reacción a 13000 rpm durante 5 minutos antes del análisis y purificación por SE-HPLC, el tampón preferente para la SE-HPLC era 0,1 M de fosfato de Na (pH de 6,9).

10

3.3.2. Purificación y caracterización de conjugados GCSF-AC (Aleatorio)

Los conjugados de GCSF monosialilado se purificaron de los otros conjugados de GCSF mediante HIC e IEC. La muestra restante de la mezcla de la reacción se diluyó con tampón A de AEX (20 mM de acetato de sodio, 50 mM de cloruro sódico con pH de 5,0) (1,5 ml de mezcla de la reacción + 9 ml de tampón A), se comprobó el pH y se ajustó en caso necesario a un pH de 5,0 y se cargó en la columna de AEX previamente equilibrada con tampón A de AEX. Se recogieron las fracciones de carga y se etiquetaron. La columna se lavó con tampón A de AEX (al menos 5 volúmenes de columna), se recogieron las fracciones (cada fracción 1,5 volúmenes de columna) y se etiquetaron. El producto se eluyó con tampón B de AEX (50 mM de fosfato de sodio, 0,65 M de cloruro sódico, pH de 7,0), se recogieron las fracciones (cada fracción 1 volumen de columna; 6 columnas) y se etiquetaron. Si dos fracciones consecutivas no poseían ningún contenido proteico (UV a 280 nm), se llevaba a cabo el paso siguiente. Las muestras se conservaron en hielo durante la purificación. La concentración proteica se analizó mediante UV (280 nm) (la absorbencia de 1 mg/ml de GCSF era de aproximadamente 0,872). Se tomaron las muestras para SDS-PAGE y SE-HPLC. Para eliminar el AC libre de la mezcla, se utilizó HIC. Las muestras se concentraron, en caso necesario.

25

Las fracciones de AEX que contenían conjugado se combinaron y se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para obtener una concentración de 2,75 M en la solución de carga. Esta solución se cargó después en la columna de HIC previamente equilibrada con el tampón A de HIC (10 mM de fosfato de sodio, 2,75 M de sulfato de amonio, pH de 6,5). Se recogieron las fracciones de carga (cada fracción 1,5 volúmenes de columna) y se etiquetaron. La columna se lavó con tampón A de HIC (al menos 5 volúmenes de columna; velocidad = 0,5 ml/minuto; (1,5 volúmenes de columna) se recogieron las fracciones y se etiquetaron. El producto se eluyó con tampón B de HIC (20 mM de fosfato de sodio con pH de 7,4) (velocidad = 5 ml/minuto); se recogieron las fracciones (fracción de 1 volumen de columna; 6 volúmenes de columna) y se etiquetaron. Las muestras se conservaron en hielo durante la purificación. Se analizó la concentración proteica mediante UV (280 nm). Las fracciones de HIC que contenían el conjugado purificado se combinaron y se ajustó la composición del conjugado en la solución con solución de sorbitol al 50% y 10 mg/ml de solución de Tween 20 para obtener una composición final de 5% de sorbitol y 0,025 mg/ml de Tween 20. La solución se concentró entonces a $4\pm 1^\circ\text{C}$ y se analizó la concentración proteica mediante UV (280 nm). Se realizó una purificación adicional mediante SE-HPLC (por ejemplo para separar los conjugados de los agregados/proteína libre, etc.). Los conjugados se filtraron de forma estéril y se recogieron muestras para un ensayo de actividad y para caracterización mediante SDS-PAGE y SE-HPLC. Se extrajo una alícuota para un ensayo proteico y un ensayo de AC. El resto se guardó a $4\pm 1^\circ\text{C}$ hasta utilizarlo de nuevo y se estudió para conocer la estabilidad física mediante SE-HPLC.

35

Se estudiaron los efectos de diversos procesos que afectaban a la estabilidad del GCSF en la solución y el grado de derivatización.

45

3.4. Pegilación del GCSF (Comparativa)

El GCSF (18,8 kDa) se suministró como una solución (0,5 mg/ml en 10 mM de tampón de acetato de sodio, pH de 4,0 con un 5% de sorbitol, 0,025 mg/ml de polisorbato 80) y se guardó a $2-8^\circ\text{C}$. Se concentró la solución de GCSF para obtener aproximadamente 1,0 mg/ml de solución. Se tomó la cantidad necesaria de GCSF en un eppendorf y se colocó en hielo. La cantidad de PEG a añadir para la conjugación se calculó en base a la siguiente fórmula:

55

Cantidad de proteína (g)

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

60

Se pesó la cantidad necesaria de PEG 20K. Se solubilizó en 10 mM de NaOAc, 5% de sorbitol, pH de 5,5 (aquí se utilizó el 20% del volumen del volumen de la reacción final), la mezcla se sometió ligeramente a agitación vorticial hasta que todo el PEG se hubiera disuelto y después o bien se filtró introduciéndola en un nuevo eppendorf o se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf para eliminar cualquier material agregado/precipitado. Se añadió el volumen necesario de 10 mg/ml de solución madre de Tween 20, para

65

ES 2 344 670 T3

obtener una concentración final de 0,5 mg/ml del Tween 20 en la mezcla de la reacción final. Se añadió la cantidad necesaria de solución de proteína GCSF a la solución de PEG para obtener un exceso molar de PEG de 7,5 y se mezcló ligeramente manteniendo la mezcla de la reacción en un agitador suave a $4\pm 1^\circ\text{C}$. Se añadieron 100 mg/ml de solución de NaCNBH_3 para obtener 50 mM ó 3,17 mg/ml en la mezcla de la reacción final, se mezcló ligeramente y se comprobó el pH de la mezcla de la reacción final y en caso necesario se ajustó el pH a 5,5 con 1 M de NaOH/HCl a $4\pm 1^\circ\text{C}$. Por último, se ajustó el volumen de la reacción utilizando 10 mM de NaOAc , 5% de sorbitol y un pH de 5,5 para obtener una concentración proteica de 1 mg/ml en la mezcla de la reacción. El tubo se cerró herméticamente y se agitó a la temperatura deseada ($4\pm 1^\circ\text{C}$) durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante un método adecuado y se tomaron muestras para buscar la actividad *in vitro* en células MNFS 60, SDS-PAGE (utilizando 4-20% de gel de Tris glicina), SE-HPLC (columna de superose 6) y se comprobó el pH de la mezcla de la reacción. Para eliminar cualquier precipitado se centrifugó la mezcla de la reacción a 13000 rpm durante 5 minutos antes del análisis y purificación por SE-HPLC, el tampón preferente para la SE-HPLC era 0,1 M de fosfato de sodio (pH de 6,9). Los resultados se muestran en la Figura 13.

3.5. Cromatografía de afinidad metálica

El GCSF y los conjugados PSA-GCSF se purificaron del PSA y los subproductos de la mezcla de la reacción mediante cromatografía de afinidad metálica (Figura 8). La muestra para este experimento era 50 ug de GCSF en 75 uL de tampón de reacción + 75 ul de eluyente A. El tampón de reacción era 0,5 mg/mL de Tween 20; 5% de sorbitol; 10 mM de NaOAc ; pH de 5,0. El eluyente A era 10 mM de Tris/HCl ; pH de 7,0. El eluyente B era 20 mM de AcOH + 0,2 M de NaCl ; pH de 4,0. Gradiente: (t/min) = 0 a 12,5 (100% de A); t = 12,5 a 25 (30% de B); 25 a 40 (100% de B). El pico a 0,887 es el tampón y a 16,142 es el GCSF.

3.6. SE-HPLC de formulaciones de GCSF

Se llevó a cabo la HPLC en un Cromatógrafo Líquido (JASCO) equipado con un muestreador automático AS-2057 plus de Jasco refrigerado a 4°C , y un detector UV-975 UV/VIS de Jasco. Se registraron los datos mediante software EZchrom Elite en un IBM/PC. Las muestras de la SEC se analizaron con una fase móvil isocrática de 0,1 M de fosfato de Na, pH de 6,9; en una columna de Superose 6 (Figura 5) en presencia de Tween. La Figura 6 muestra únicamente un pico a $\text{TA} = 76,408$, que se atribuye al GCSF.

La tabla de picos para la SEC que se muestra en el lado derecho de la Figura 5 es la siguiente:

TABLA 1

Pico	TA	% Área	Especies
1	33,896	13,9	Agregado
2	60,871	85,7	AC38K-GCSF
3	76,229	0,4	GCSF

3.7. Inmunoelectrotransferencia de tipo Western (*Western blotting*) y electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS nativa

Se llevó a cabo una SDS-PAGE utilizando 4-20% de geles de trisglicina. Las muestras se diluyeron con tampón reductor o no reductor y se cargaron 5,0 ug de proteína en cada pocillo. Los geles se vertieron en un sistema de tampón de trisglicina y se tiñeron con azul de Coomassie. Se llevó a cabo una inmunoelectrotransferencia de tipo Western utilizando anticuerpo anti PSA (Figura 4). La Figura 4 muestra la SDS-PAGE de las formulaciones de GCSF (sitio-específicas; N-terminales). Se llevó a cabo una PAGE nativa en el 10% del gel de tris glicina (Figura 7).

3.8. Actividad *in vitro*

Se llevaron a cabo estudios *in vitro* en células MNFS 60 con conjugados de GCSF, PSA y PEG. Se midieron los valores EC_{50} y se compararon en diversas formulaciones de GCSF (Figura 9).

3.9. Estudios de estabilidad

Se guardaron los conjugados de GCSF estériles en 20 mM de fosfato de sodio, pH de 7,4; 5% de sorbitol y 0,025 mg/ml de Tween 20; a 4°C durante seis semanas. Se llevó a cabo una SE-HPLC de las muestras todas las semanas utilizando columnas de SEC bajo las condiciones siguientes: volumen de inyección de 100 ul, medida del caudal de 0,250 ml/min, tampón utilizado de 0,1 M de fosfato de sodio, pH de 6,9 (Figura 10).

ES 2 344 670 T3

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

Se estudió la eficacia *in vivo* de las formulaciones de GCSF en ratones hembra B6D2F1, de 7-8 semanas de edad, se inyectaron 5-15 μ g de dosis de proteína (misma actividad) en los ratones de forma subcutánea. Se dividieron los animales en siete grupos de cuatro. Se administraron formulaciones de GCSF a cada animal de cada grupo de la siguiente manera: GCSF (5 μ g), GCSF (15 μ g), conjugados GCSF-PSA (5-15 μ g), PBS, GCSF-PEG20 (NeulastaR; 5 μ g). Se extrajeron 50 μ l de sangre de cada animal y se analizó mediante FACS tras teñirla con anticuerpos específicos para los glóbulos blancos (Figuras 11 y 12).

10 Resultados

Activación de AC y determinación del grado de oxidación

El ácido colomínico (AC) es un homopolímero lineal unido con enlaces alfa-2,8 de residuos del ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). Se llevó a cabo una exposición de los ácidos colomínicos a la oxidación durante 15 minutos utilizando 20 mM de peryodato a temperatura ambiente. Se analizó la integridad de los residuos internos del Neu5Ac con enlaces alfa-2,8 después del tratamiento con peryodato mediante cromatografía de permeación en gel y las cromatografías obtenidas para el material (ACO) oxidado se compararon con las del AC nativo. Se descubrió que el AC oxidado y el nativo presentan unos perfiles de elución casi idénticos, sin existir evidencia de que los pasos sucesivos de oxidación provoquen una fragmentación significativa de la cadena polimérica.

Se llevó a cabo una medición cuantitativa del estado de oxidación del AC mediante la reducción de iones de ferricianuro en una solución alcalina a ferrocianuro (azul de Prusia) [Park y Johnson, 1949] utilizando la glucosa como la norma. La Tabla 2 muestra que se descubrió que el ácido colomínico oxidado poseía una cantidad mayor a la estequiométrica (>100%) del agente reductor, esto es, 112 mol % del contenido aparente de aldehído comprendiendo el poder reductor combinado del hemicetal de extremo reductor y el aldehído introducido (en el otro extremo, extremo reductor).

TABLA 2

Grado de oxidación de diversos productos intermedios del ácido colomínico en el método de reacción de oxidación doble utilizando glucosa como la norma (100%, 1 mol de aldehído por mol de glucosa; n = 3 \pm s.d.)

Especies de AC	Grado de oxidación
ácido colomínico (AC)	16,1 \pm 0,63
ácido colomínico-oxidado (ACO)	112,03 \pm 4,97
ácido colomínico-reducido (ACOR)	0; No detectable
ácido colomínico-oxidado-reducido-oxidado (ACORO)	95,47 \pm 7,11

45 Preparación, purificación y caracterización de los conjugados de GCSF

Se detalla a continuación el procedimiento para preparar y purificar conjugados de ácido colomínico (AC) del factor estimulante de colonias granulocíticas (GCSF) de una manera selectiva N-terminal llevando a cabo la reacción con un pH reducido (pH de 5,5) y a 4 \pm 1°C. Esto implica una conjugación en presencia de cianoborohidruro de sodio, seguido de una purificación utilizando cromatografía de intercambio iónico (AEX) para extraer el GCSF libre seguido de la extracción del AC mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). El pH bajo se utilizó para favorecer la derivatización selectiva del grupo alfa amino del extremo N-terminal, y también para minimizar la agregación de GCSF durante la reacción. La composición del tampón de reacción final era de 5% de sorbitol, 0,5 mg/ml de Tween 20 en 10 mM de NaOAc con un pH de 5,5.

Se confirmó la formación de los conjugados GCSF-AC y la estabilidad mediante SE-HPLC (cambio del tiempo de retención del GCSF-PSA en comparación con el GCSF; también co-elución de ambas partes de moléculas); cromatografía de intercambio iónico (unión de conjugados en la columna de AEC) y electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; cambio de bandas con especies de alto p.m. y PAGE nativa). Los conjugados utilizados en el ensayo de línea celular *in vitro* (en células MNFS-60) eran activos al ~40% en comparación con la proteína nativa. Los conjugados preparados sin aditivos de formulación llevaron a la agregación de proteína con bajo grado de derivatización. La Figura 5 muestra los datos de la SE-HPLC para la mezcla de la reacción de GCSF-AC de 39 kDa después de 24 horas, preparada en presencia de Tween 20. Las condiciones de caracterización eran: columna Superdex 200, tampón de bicarbonato amónico de 0,15 M con pH de 7,8. La formación de un conjugado GCSF-PEG se confirmó mediante una SE-HPLC (Figura 13). Los conjugados de GCSF-PSA y GCSF se purificaron satisfactoriamente del PSA y los subproductos de la mezcla de la reacción mediante cromatografía de afinidad metálica (Fig. 8). Se descubrió que los conjugados de GCSF eran estables incluso después de seis semanas de almacenamiento en 20 mM de fosfato de sodio, pH de 7,4 (Fig. 10).

ES 2 344 670 T3

La Tabla 3 muestra el análisis de los picos de la Figura 5.

TABLA 3

Pico	TA	% Área	Especies
1	31,683	8,80	agregado
2	42,683	11,77	(AC)2-GCSF
3	49,058	68,55	AC-GCSF
4	68,833	10,89	GCSF

La Tabla 4 muestra los valores de diversos parámetros utilizados y la Tabla 5 da el peso molecular y la polidispersidad de las fracciones de AC.

TABLA 4

Parámetros	Valores
Mn (Da)	26.666
Mw (Da)	27.956
Mz (Da)	31.129
Mp (Da)	22.969
Mw/Mn	1,048
IV (dt/g)	0,2395
Rh (nm)	4,683
Ramificaciones	0,00
Conc de la muestra (mg/ml)	5,600
Recuperación de la muestra (%)	90,71
dn/dc (ml/g)	0,156
dA/dc (ml/g)	0,000
Mark-Houwink a	-0,048
Mark-Houwink logK	-0,425

TABLA 5

Fracción de AC	Mw (kDa)	pd
475	97,2	1,285
450	52,3	1,109
425	37,9	1,062
400	28,0	1,048
375	19,0	1,080
*350	14,5	-
*300	10,0	-
*250	7,0	-

Se descubrió que los conjugados de PSA se mostraban activos en el ensayo de actividad *in vitro* (Figura 9). El estudio de eficacia *in vivo* muestra que los conjugados PSA-GCSF son tan buenos como los conjugados de PEG e infinitamente superiores al GCSF (Figuras 11 y 12).

Referencias

- 5 **Fernandes, A.I., Gregoriadis, G.**, Synthesis, characterization and properties of polysialylated catalase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1293 (1996) 92-96.
- Fernandes, A.I., Gregoriadis, G.**, Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1341 (1997) 26-34.
- 10 **Gregoriadis, G., McCormack, B., Wang, Z., Lifely, R.**, Polysialic acids: potential in drug delivery, *FEBS Letters*, 315 (1993) 271-276.
- Jain et al.**, Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity *in vivo*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1622 (2003) 42-49.
- 15 **Jain et al.**, The natural way to improve the stability and pharmacokinetics of protein and peptide drugs. *Drug delivery systems and sciences*, 4(2), (2004) 3-9.
- Park, J.T., Johnson, M.J.**, A submicrodetermination of glucose, *Journal of Biological Chemistry*, 181 (1949) 149-151.
- 20 **Shriner, R. L., Fuson, R.D.C., Curtin, D.Y., Morill, T.C.**, *The Systematic Identification of Organic Compounds*, 6ª edición, Wiley, Nueva York, 1980.
- Svennerholm, L.**, Quantitative estimation of sialic acid II: A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method, *Biochimica et Biophysica Acta*, 24 (1957) 604-611.
- 25 **Wang, W.**, Instability, stabilization and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *International Journal of Pharmaceutics*, 185 (1999) 129-188.

30

35

40

45

50

55

60

65

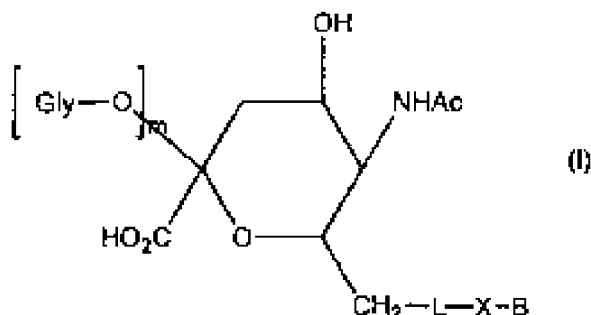
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es un derivado polisacárido N-terminal del GCSF, o de una proteína parecida al GCSF, en el que el polisacárido es el ácido polisiálico que posee al menos 2 unidades de ácido siálico unidas una a la otra a través de enlaces $\alpha 2,8$ ó $\alpha 2,9$ y está compuesto de entre 2 y 200 unidades sacáridas.

2. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1, en el que el polisacárido es un ácido polisiálico, que consta básicamente solamente de unidades de ácido siálico.

3. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en el que el polisacárido derivatiza el GCSF o la proteína parecida al GCSF en la unidad terminal reductora del polisacárido.

4. Un compuesto con la fórmula general (I)



en la que

m es al menos uno;

XB deriva de B-XH que es el GCSF o una proteína parecida al GCSF donde XH es NH_2 ó SH;

L es un enlace, un grupo de unión, o está compuesto de un polipéptido o un oligómero sintético;

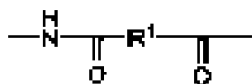
GlyO es una unidad de ácido siálico, donde las unidades de ácido siálico están unidas con enlaces $\alpha 2,8$ ó $\alpha 2,9$ las unas a las otras;

en la que el grupo de unión, si está presente, tiene la fórmula general $-\text{Y}-\text{C}(\text{O})-\text{R}^1-\text{C}(\text{O})-$;

en la que Y es NR^2 ó NR^2-NR^2 ; R^1 es un radical orgánico bifuncional seleccionado del grupo que está compuesto de alcanediilo, arileno, alcarileno, heteroarileno y alquilheteroarileno, cualquiera de los cuales puede ser sustituido y/o interrumpido por enlaces carbonilo, éster, sulfuro, éter, amida y/o amina;

y R^2 es H o un alquilo C_{1-6} .

5. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 4, en el que L es un enlace o es un grupo.



6. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 4 ó 5, en el que XH es NH_2 y es la amina N-terminal del GCSF o de la proteína parecida al GCSF.

7. Un compuesto de conformidad con la reivindicación 4 ó 5, en el que XH es NH_2 y es un grupo amina de la cadena lateral de un aminoácido lisina.

8. Un compuesto de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ácido polisiálico está compuesto de 80-180 unidades de ácido siálico.

ES 2 344 670 T3

9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1-8, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

10. Un compuesto de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso en terapia.

11. Un método para producir un N-derivado polisacárido del GCSF o de una proteína parecida al GCSF en el que un polisacárido aniónico, es decir, un ácido polisialílico que posea al menos 2 unidades de ácido siálico unidas con enlaces $\alpha 2,8$ ó $\alpha 2,9$ la una a la otra y que esté compuesto de 2-200 unidades sacáridas, se hace reaccionar químicamente con el GCSF o la proteína parecida al GCSF.

12. Un método de conformidad con la reivindicación 11, en el que el polisacárido aniónico posee un grupo aldehído reactivo que reacciona con el GCSF o con la proteína parecida al GCSF y la reacción de derivatización se lleva a cabo bajo condiciones de reducción.

13. Un método de conformidad con la reivindicación 12, en el que el grupo aldehído reactivo se encuentra en el extremo no reductor del polisacárido.

14. Un método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que el polisacárido reacciona con un grupo amina del GCSF o de la proteína parecida al GCSF.

15. Un método de conformidad con la reivindicación 14, donde la amina es un grupo amina terminal.

16. Un método de conformidad con la reivindicación 15, en el que la amina se deriva de la cadena lateral de un aminoácido lisina del GCSF o de la proteína parecida al GCSF.

17. Un método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 11-16, en el que el polisacárido aniónico o producto intermedio de la reacción reacciona con un grupo amina terminal del GCSF o de la proteína parecida al GCSF en una primera solución acuosa de pH ácido de entre 4,0-6,0; y el derivado polisacárido resultante se purifica en una segunda solución acuosa de un pH mayor que el de la primera solución acuosa en la gama entre 6,5-8,5.

18. Un método de conformidad con cualesquiera de las reivindicaciones 11-17, que se lleva a cabo en presencia de un aditivo de formulación seleccionado de entre uno o más tampones, estabilizadores, surfactantes, sales, polímeros, iones metálicos, azúcares, polioles o aminoácidos.

19. Un método de conformidad con la reivindicación 18, en el que el aditivo de formulación se selecciona de entre el sorbitol, la trehalosa, la sacarosa, los surfactantes no iónicos, los polímeros seleccionados de entre el PSA, el PEG y la hidrox-beta-ciclodextrina, los iones metálicos divalentes, y el tampón de acetato/fosfato de sodio.

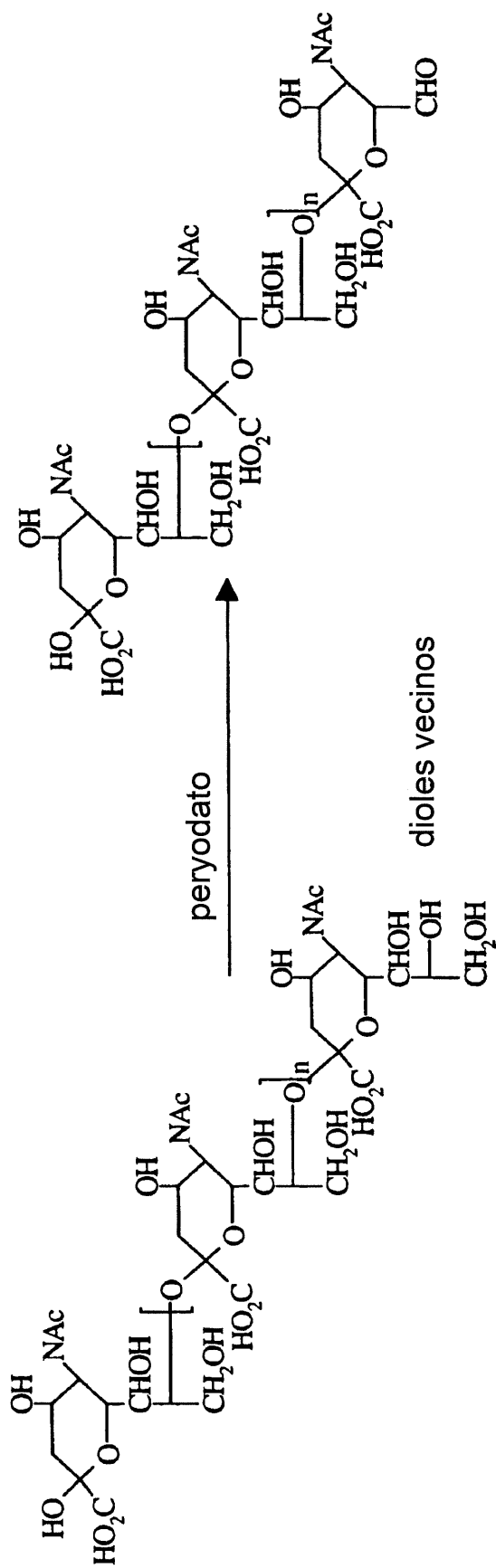


Figura 1

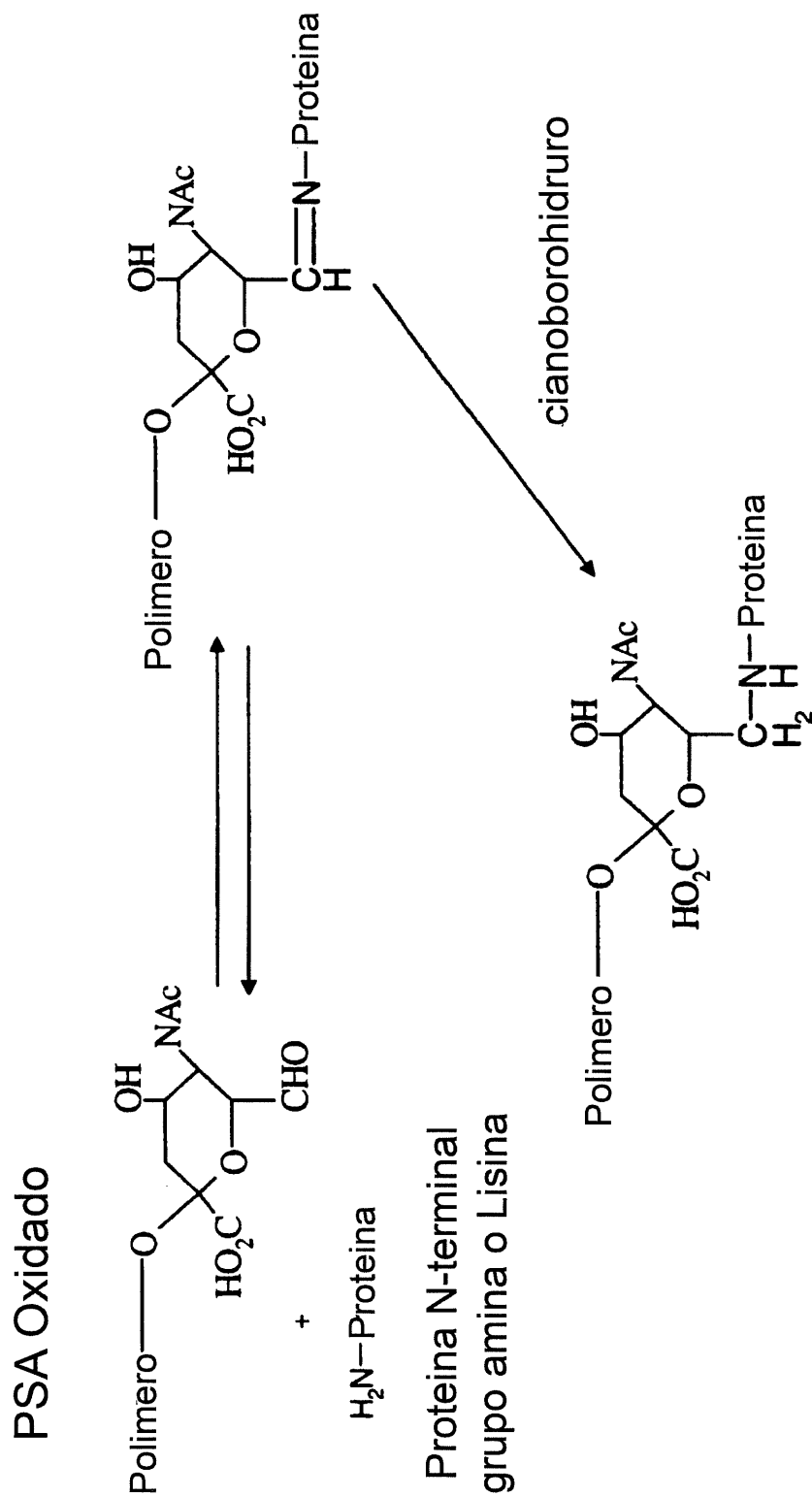


Figura 2

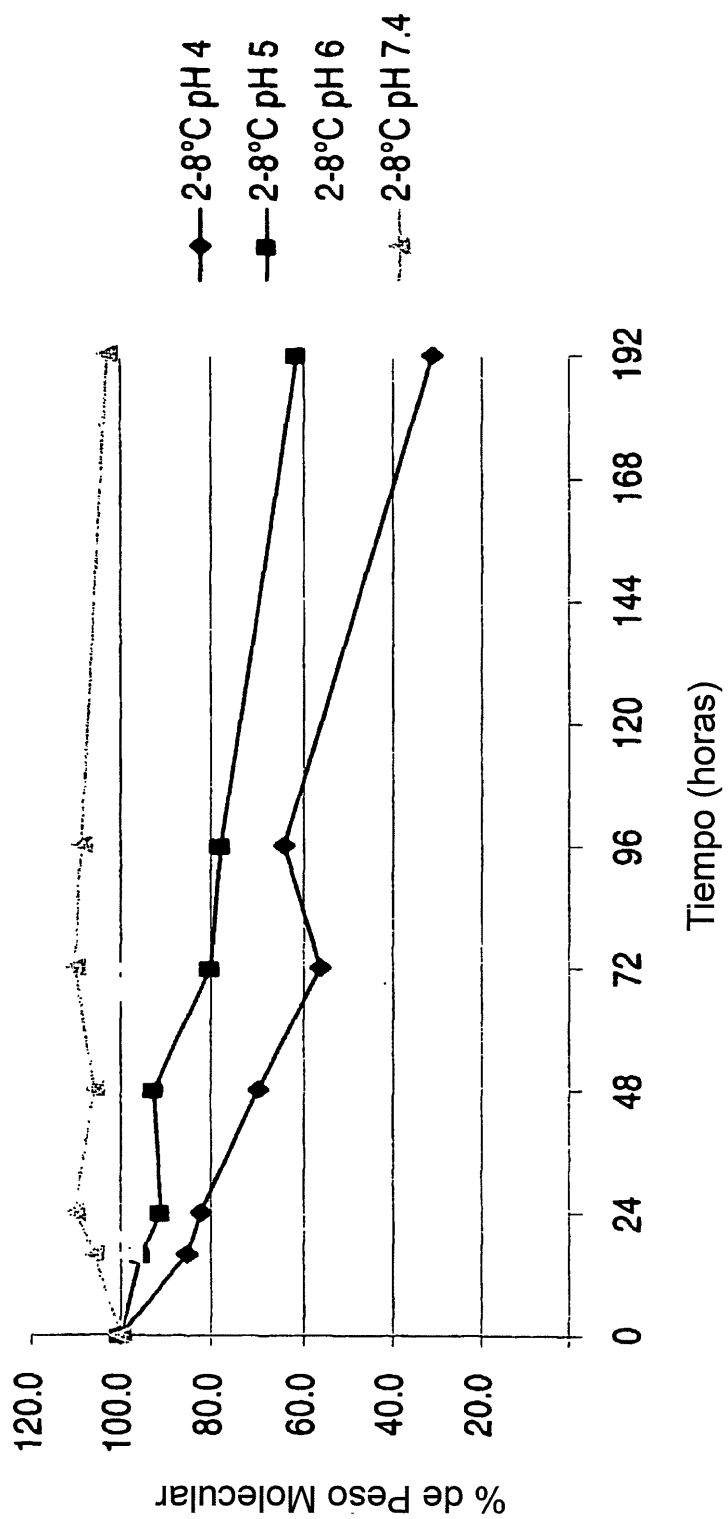


Figura 3a

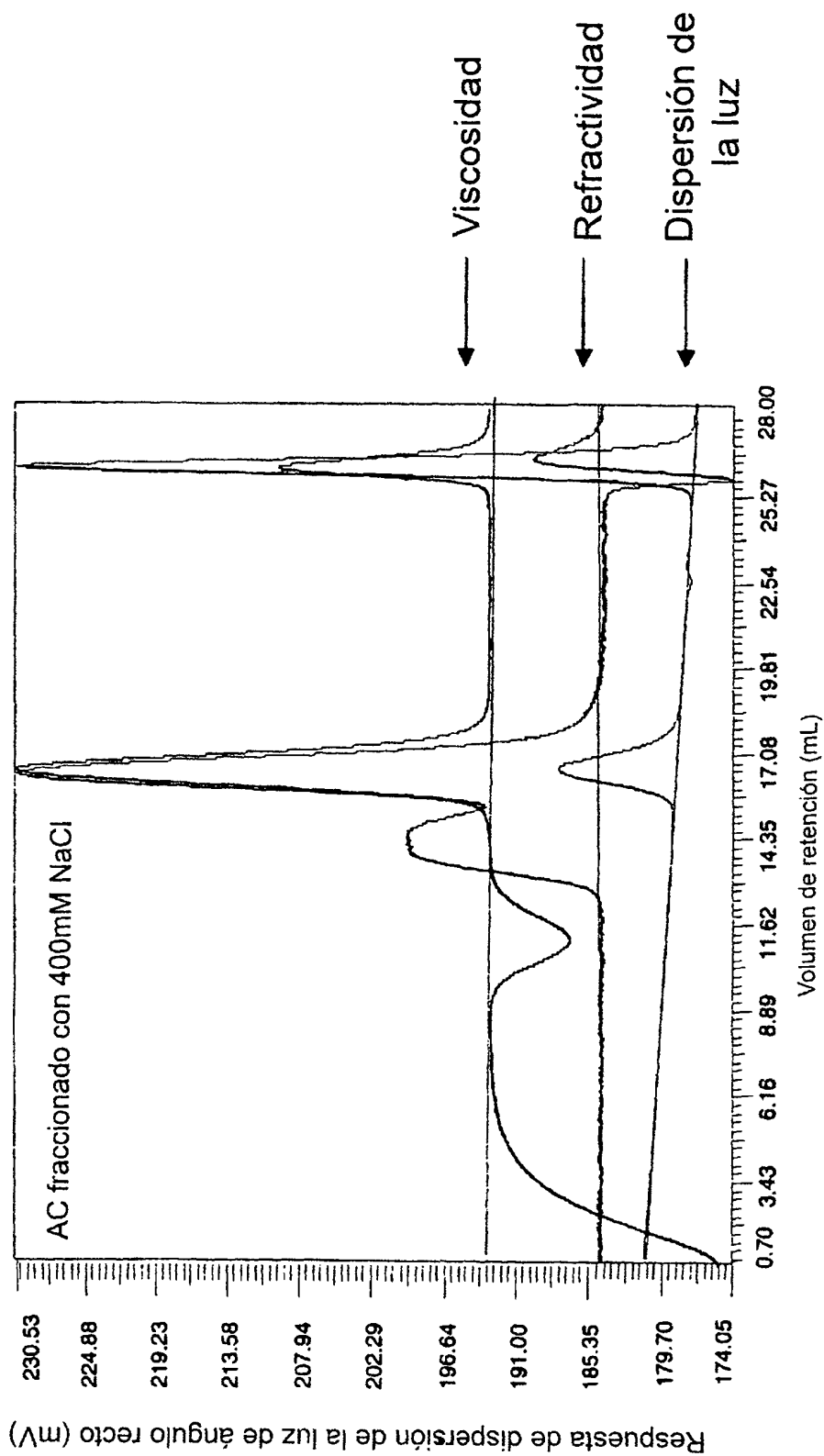


Figura 3b

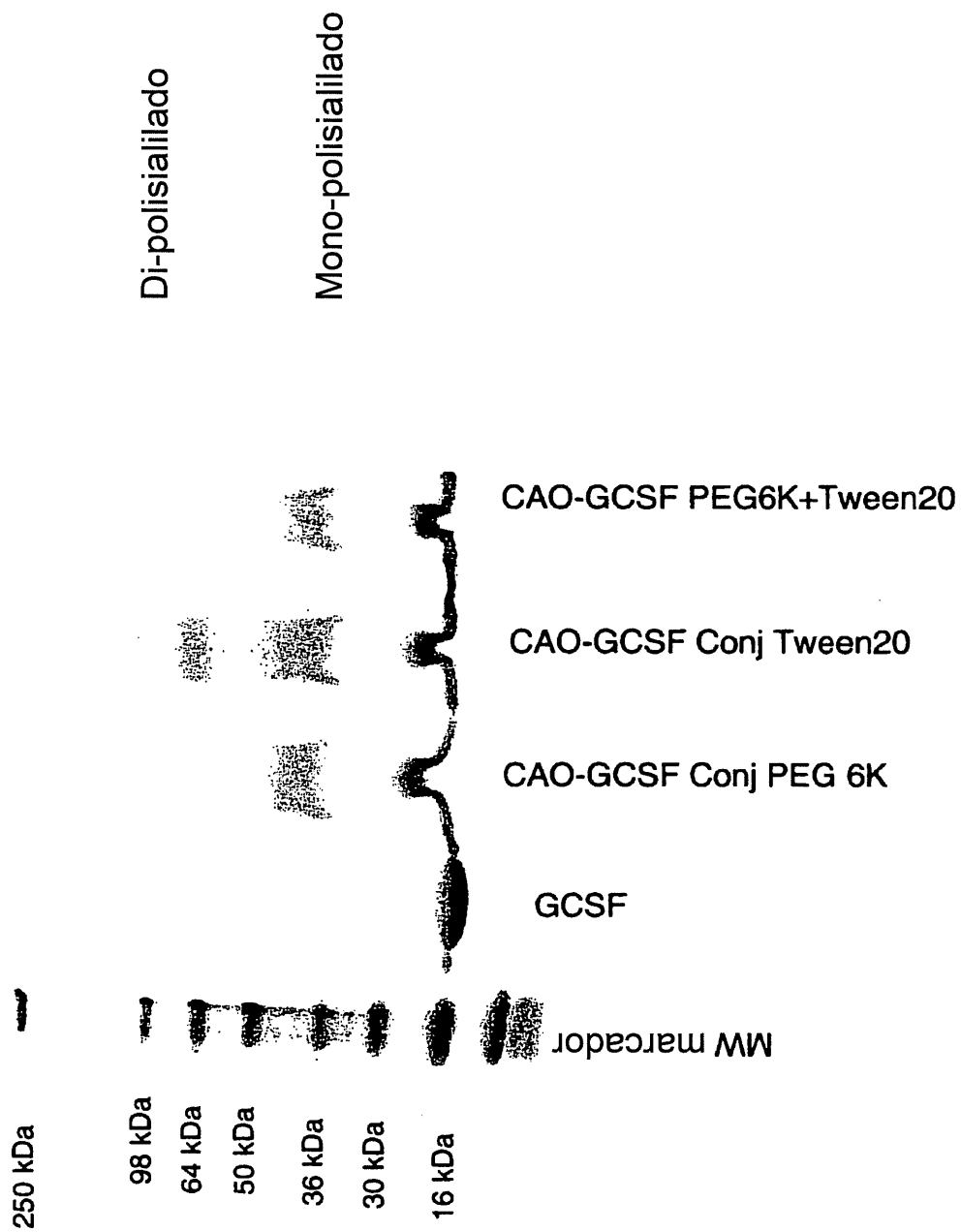
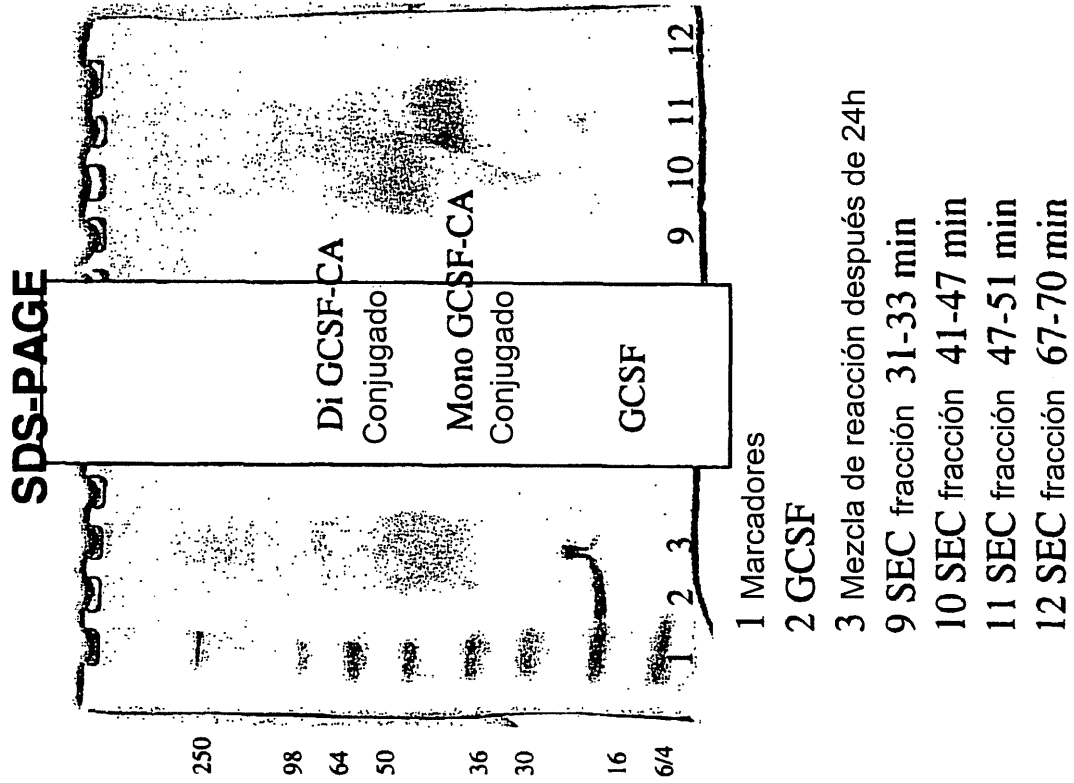


Figura 4



- 1 Marcadores
- 2 GCSF
- 3 Mezcla de reacción después de 24h
- 9 SEC fracción 31-33 min
- 10 SEC fracción 41-47 min
- 11 SEC fracción 47-51 min
- 12 SEC fracción 67-70 min

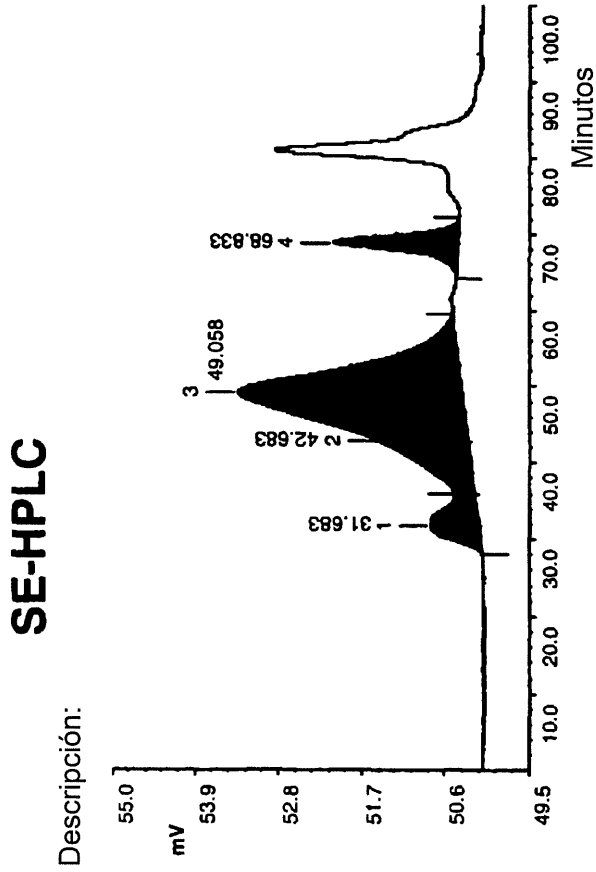


Figura 5

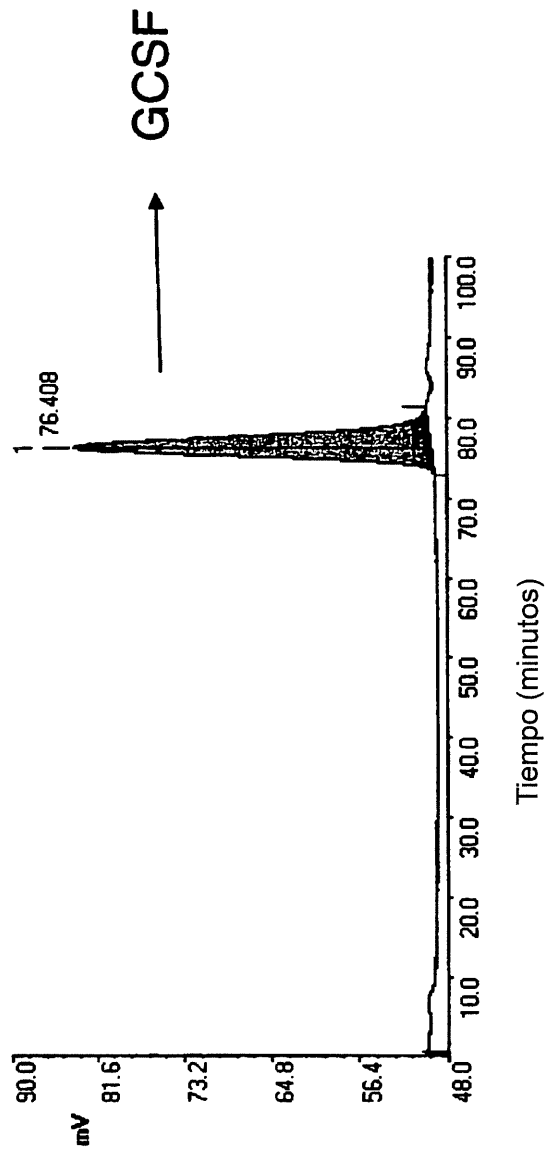


Figura 6

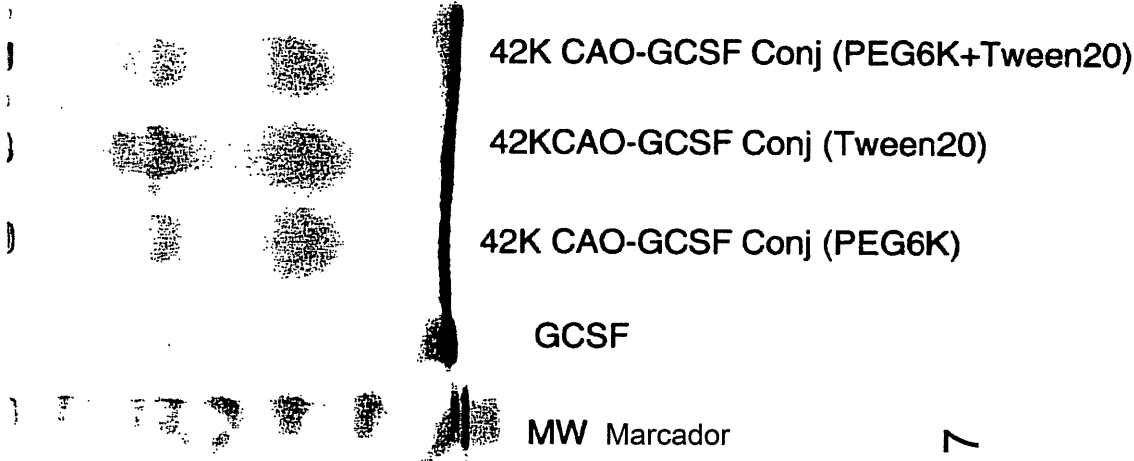


Figura 7

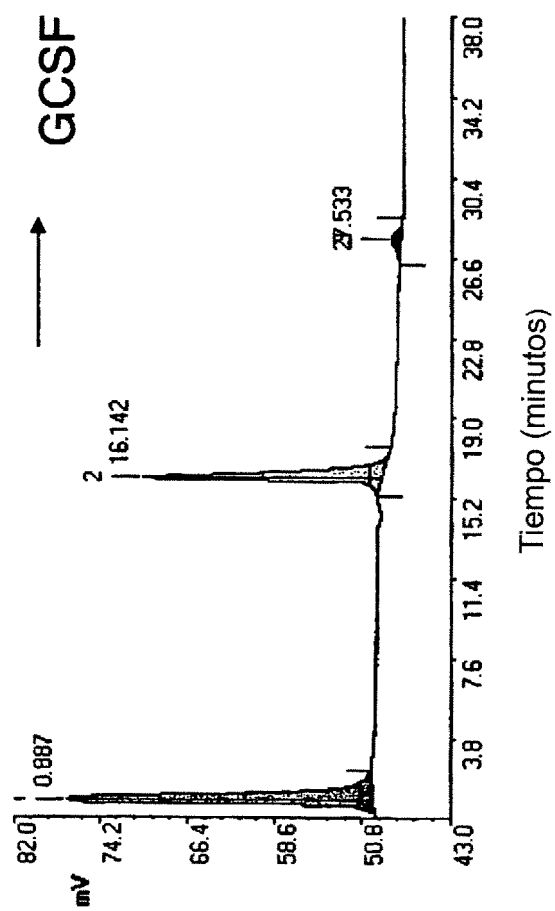


Figura 8

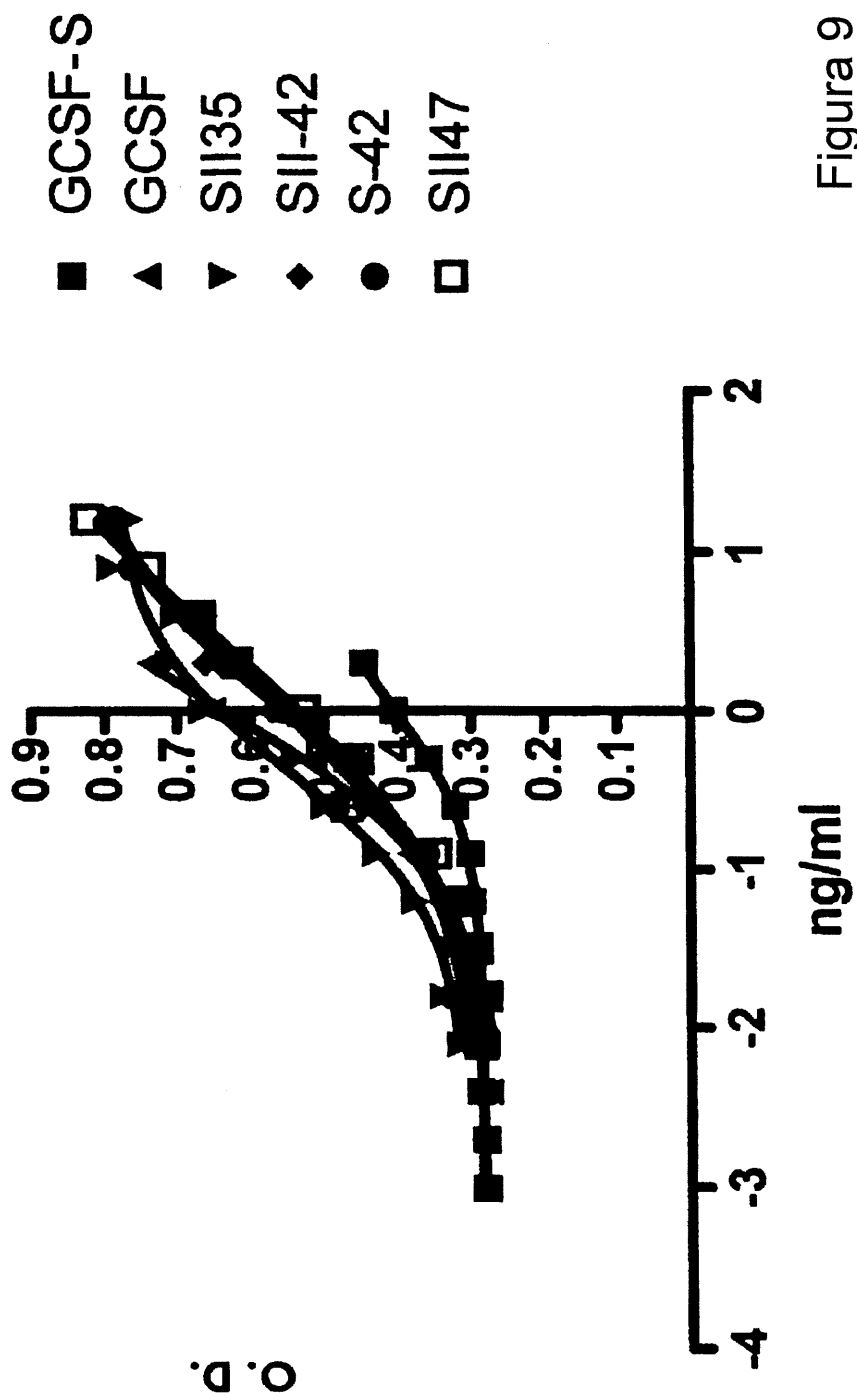


Figura 9

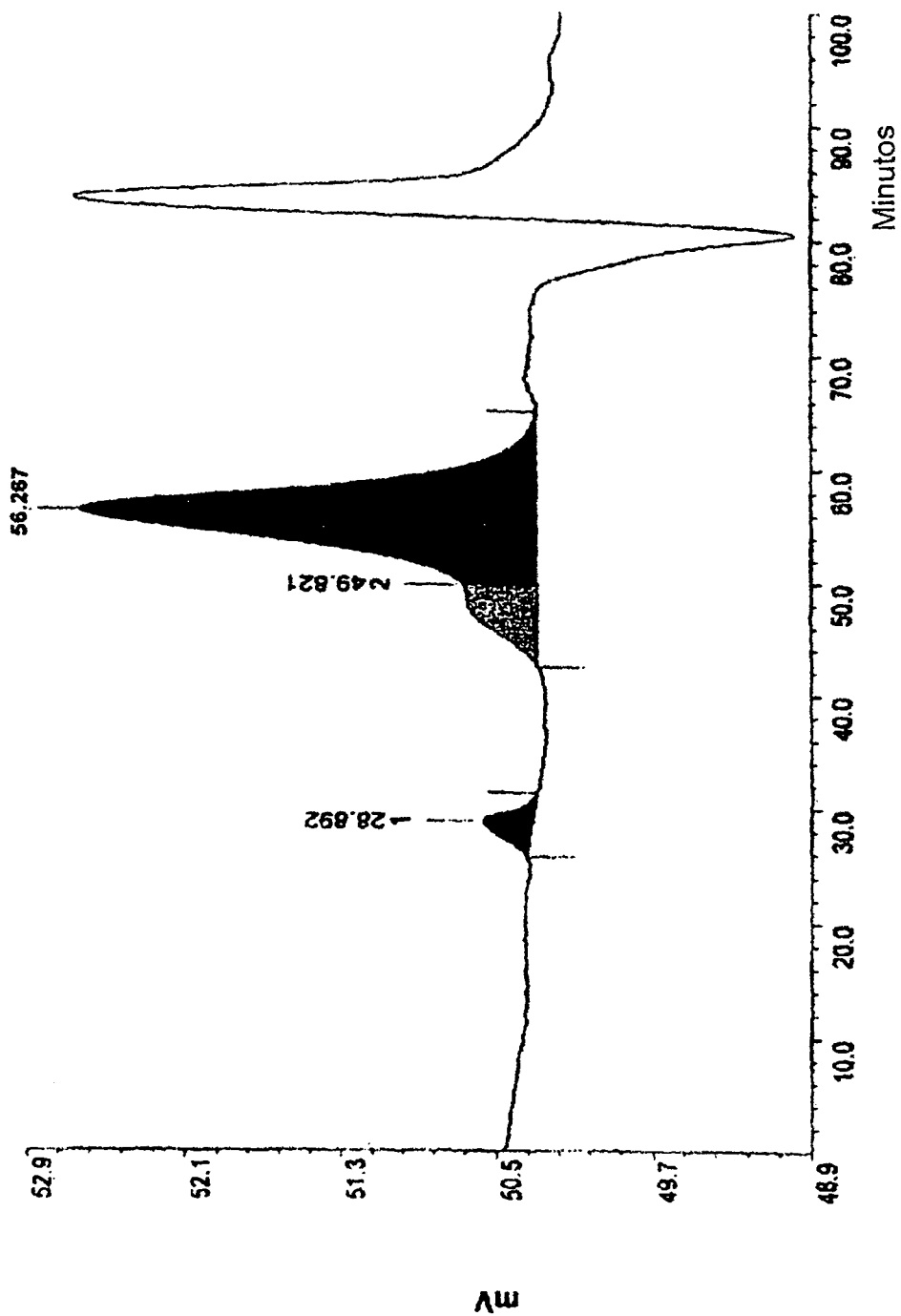


Figura 10

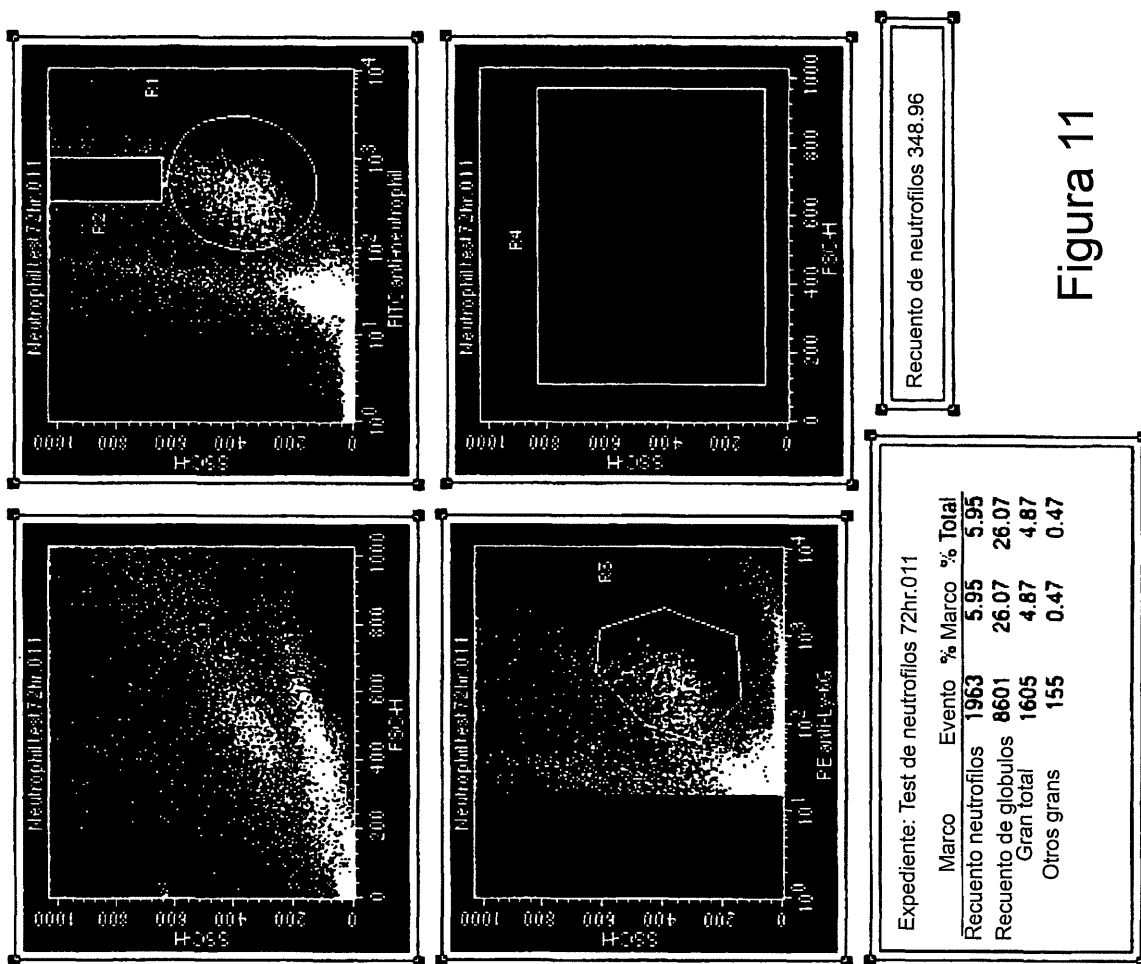


Figura 11

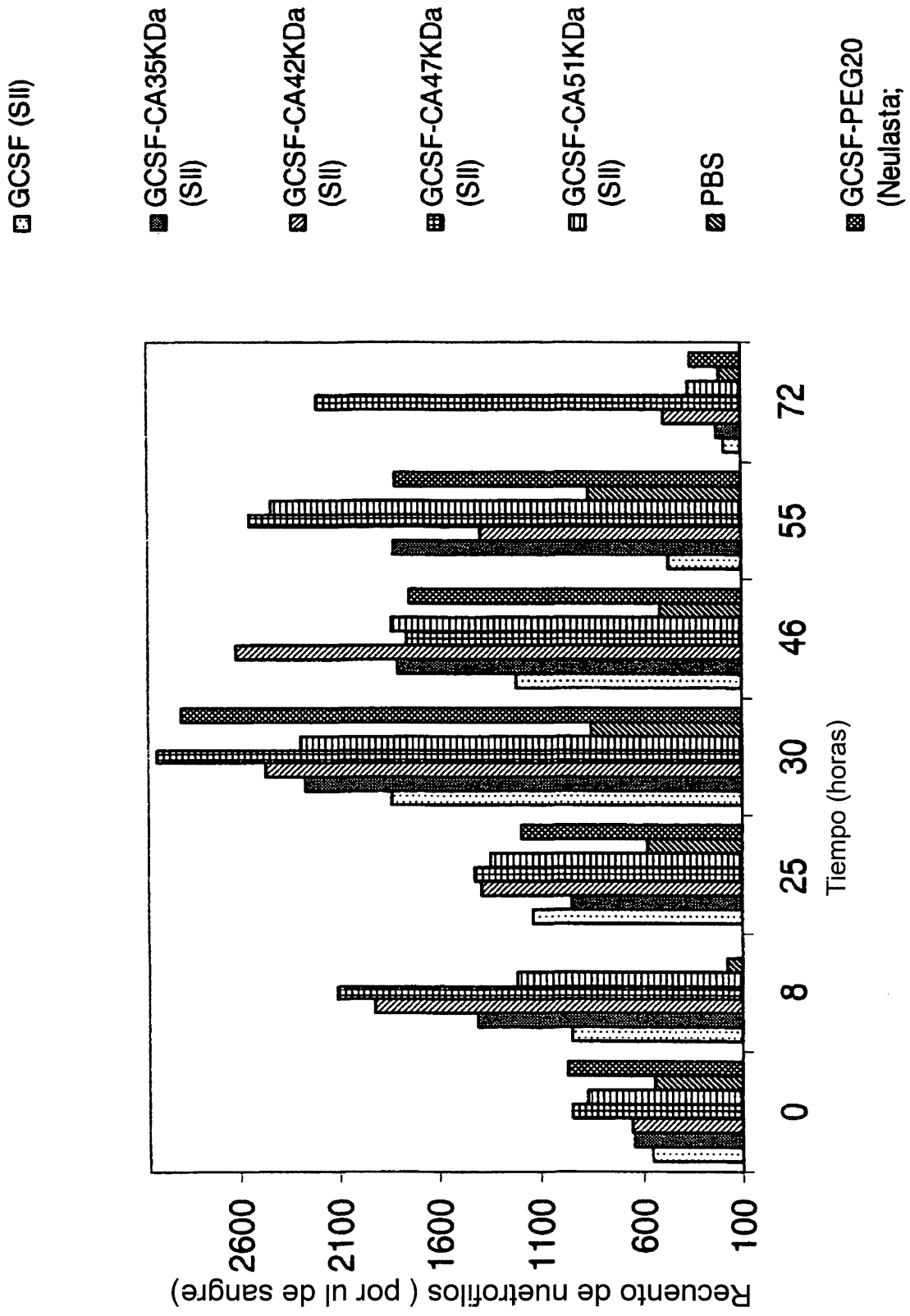


Figura 12

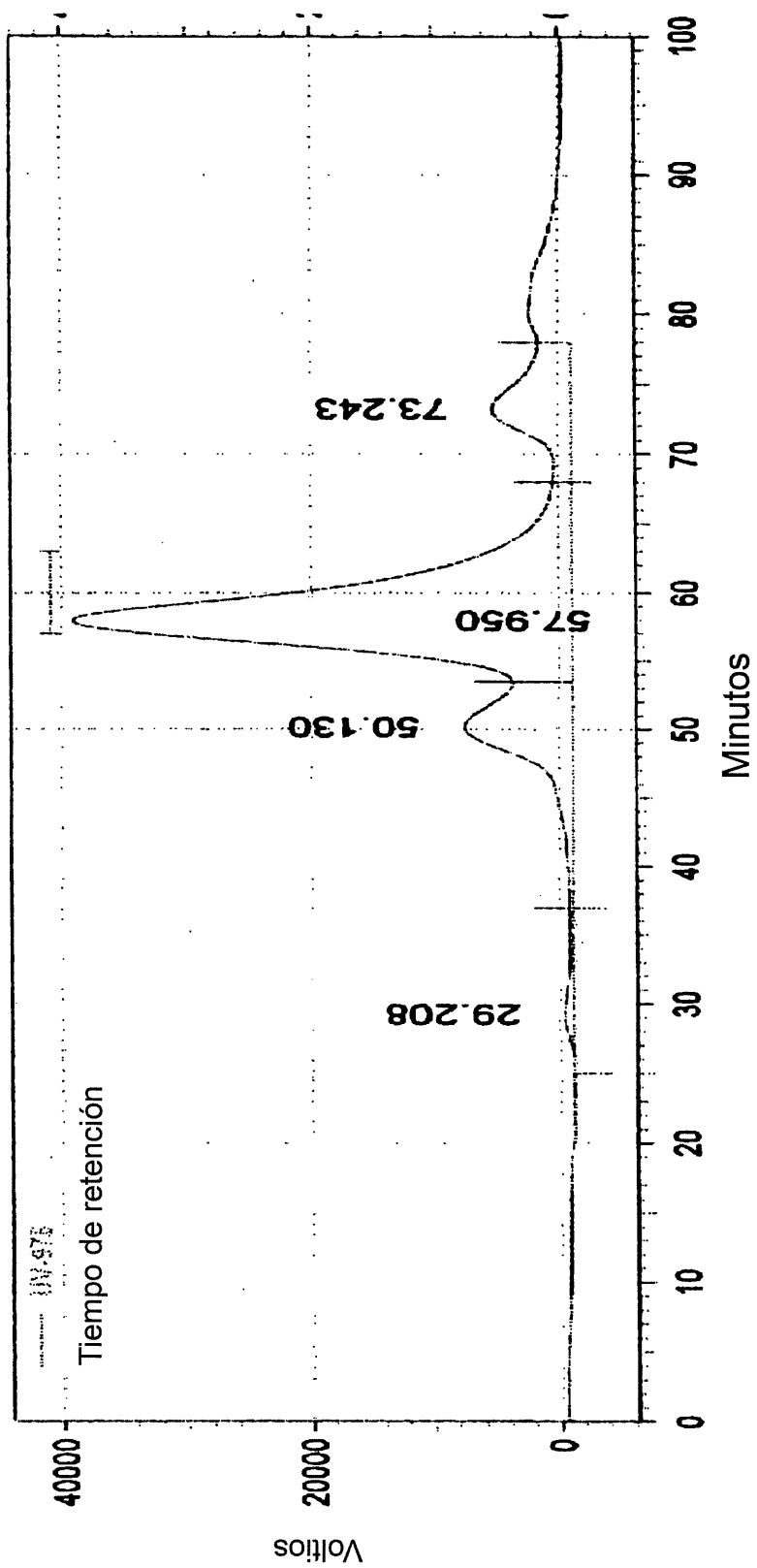


Figura 13

ES 2 344 670 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Lipoxen Technologies Ltd

5 <120> Derivatización del G-CSF

<130> HMJ04364WO

10 <150> EP06117830.7

<151> 25-07-2006

<160> 1

15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

20 <211> 207

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro Met Lys Leu Met Ala Leu Gln
1 5 10 15

30

Leu Leu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro
20 25 30

Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu
35 40 45

35

Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys
50 55 60

40

Leu Val Ser Glu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
65 70 75 80

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
85 90 95

45

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
100 105 110

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
115 120 125

50

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
130 135 140

55

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
145 150 155 160

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
165 170 175

60

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
180 185 190

65

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
195 200 205