



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 296 414**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99958044 .2**

86 Fecha de presentación : **16.11.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1131422**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2001**

54 Título: **Glucoproteínas recombinantes, procedimiento para su preparación, medicamentos que las contienen y su uso.**

30 Prioridad: **16.11.1998 DE 198 52 729**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

73 Titular/es: **Werner Reutter**
Thielallee 66
D-14195 Berlin, DE

72 Inventor/es: **Reutter, Werner;**
Tauber, Rudolf;
Horstkorte, Rüdiger;
Nöhring, Sabine;
Gohlke, Martin;
Nuck, Rolf;
Schmidt, Richard, R. y
Hauser, Charlotte

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

DESCRIPCIÓN

Glucoproteínas recombinantes, procedimiento para su preparación, medicamentos que las contienen y su uso.

La invención se refiere a nuevas glucoproteínas recombinantes que intervienen de múltiples maneras como sustancias mensajeras, sustancias señalizadoras, promotores, estimuladores e iniciadores en la circulación animal, en especial humana; a un procedimiento para su preparación, a agentes farmacéuticos que las contienen y a sus usos. La invención se refiere en particular a nuevas glucoproteínas humanas recombinantes (glucoproteínas hr), preferentemente a nuevos factores de diferenciación hr, en especial a la eritropoyetina hr; a nuevos factores de crecimiento hr, en especial al CSF (factor estimulador de colonias) hr, al GMCSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos) hr; a nuevos agentes trombolíticos hr, en especial al tPA (activador del plasminógeno tisular) hr y a la uroquinasa hr; a nuevos agentes profilácticos de la trombosis hr, en especial a la antitrombina III hr; a nuevos factores de coagulación hr, en especial al factor VIII hr y al factor IX hr; a nuevos interferones hr, en especial a los interferones α , β , y γ hr; y a nuevas interleucinas hr, en especial a la IL-2, IL-15, IL-16 e IL-17 hr; a un procedimiento para su preparación; a agentes farmacéuticos que las contienen y a sus usos.

Se denominan glucoproteínas a las proteínas que contienen carbohidratos (azúcares) unidos covalentemente. Las glucoproteínas, en particular las glucoproteínas humanas, actúan de sustancias mensajeras, sustancias señalizadoras, promotores, iniciadores o estimuladores de procesos metabólicos en animales y seres humanos que intervienen directa o indirectamente en estos procesos metabólicos. Habitualmente se generan en el cuerpo *in vivo* o por biosíntesis y, una vez que han cumplido su función específica, vuelven a ser eliminadas o degradadas por éste. Las glucoproteínas sintetizadas en el cuerpo de forma natural (las denominadas "glucoproteínas nativas") se caracterizan porque están sustituidas con un grupo acetilo en el grupo amino del resto aminoglucano. Estas glucoproteínas nativas que se pueden producir por vía natural *in vivo* o por vía biosintética (véase el documento DE-PS 4311580) constituyen para el ser humano y el animal agentes eficaces para estimular el crecimiento y la diferenciación de células humanas y animales del sistema inmune y para evitar la adhesión de leucocitos, trombocitos y células tumorales a células endoteliales vasculares; para la estimulación del sistema inmune, en especial de los linfocitos T, para la defensa antiinfecciosa, para el tratamiento de inmunodeficiencias, enfermedades tumorales incluidos los procesos de metastatización, enfermedades infecciosas e insuficiencia cardiovascular, en especial obstrucciones vasculares y septicemias; para la inhibición de la unión de un ligando a su receptor sialilado de la superficie celular; para la inhibición de la unión de un fago o una toxina microbiana a la célula huésped a través de un receptor sialilado mediante la modulación *in vivo* de ácidos neuramínicos; para la producción biosintética de ligandos o receptores con ácido neuramínico modificado y el uso de los mismos para la competición entre interacciones fisiológicas o patológicas de ligando y receptor; para la alteración *in vitro* del curso de las infecciones con virus de la inmunodeficiencia humana, así como para la prevención *in vivo* de las infecciones con virus de la inmunodeficiencia humana; y para el tratamiento de enfermedades parasitarias.

En los organismos animales las glucoproteínas constituyen componentes esenciales de las membranas celulares, así como componentes solubles de los líquidos corporales y de la matriz extracelular. Los carbohidratos están enlazados en cadenas (oligosacáridos) y pueden estar unidos de diferentes maneras al esqueleto proteico. Como componentes importantes de la membrana celular contienen ácido siálico (derivados del ácido 2-ceto-3-desoxi-D-glicero-D-galactonoalopiranosídico (KDN)), que desempeña un papel crucial en los procesos biológicos.

Los oligosacáridos se clasifican en diferentes grupos en función del tipo de enlace. En la mayoría de los casos los oligosacáridos de ácidos tioglucoproteicos están unidos de forma N-glucosídica a un resto asparagina de la cadena polipeptídica (N-glucanos). En este grupo se encuentran por una parte las glucoproteínas secretadas con diferentes funciones, por ejemplo enzimas, inmunoglobulinas y hormonas solubles, y por otra las glucoproteínas de membrana, por ejemplo enzimas de membrana, proteínas transportadoras y proteínas receptoras. Otro grupo lo forman los oligosacáridos unidos de forma O-glucosídica a través de un resto galactosa, N-acetilgalactosamina o xilosa a un resto serina o treonina de la cadena polipeptídica (O-glucanos). Coexisten también con los N-glucanos en las inmunoglobulinas y en otras glucoproteínas. Entre los O-glucanos también se encuentran los oligosacáridos de los proteoglucanos, que se caracterizan por una proporción especialmente elevada de carbohidratos. En estos glucoconjugados, presentes en la matriz extracelular, los oligosacáridos pueden estar unidos al esqueleto polipeptídico a través de un resto galactosa, N-acetilgalactosamina o xilosa.

Las glucoproteínas, compuestas por monosacáridos y proteína, se resumen a menudo junto con los glucolípidos bajo el nombre de glucoconjugados. Los componentes de azúcar de las glucoproteínas, que salvo en unas pocas excepciones constituyen menos del 50% de la glucoproteína total, están enlazados con la proporción peptídica a través de enlaces O- o N-glucosídicos disociables mediante glucosidasas. Como carbohidratos se encuentran en las glucoproteínas hexosas (galactosa, manosa, con menor frecuencia glucosa), N-acetilhexosamina, ácido N-acetilneuramínico, fucosa y otras. Para la identificación y determinación de las glucoproteínas es adecuada en primer lugar la cromatografía de afinidad con lectinas vegetales como ligandos (por ejemplo concanavalina A o aglutinina de germen de trigo u otras).

Entre las glucoproteínas se encuentran casi todas las glucoproteínas de membrana, proteínas de suero, proteínas de plasma, las sustancias de grupo sanguíneo, muchas enzimas y proteohormonas, todos los anticuerpos, las calonas, mucinas, lectinas, bindinas, fibronectina, el factor intrínseco y similares. Algunas glucoproteínas intervienen como proteínas de membrana o superficiales en la patogenicidad de los virus. Aquí, al igual que en el caso de otras interacciones celulares específicas de receptor, los componentes de carbohidrato son los responsables de los procesos

de reconocimiento a nivel molecular. Algunas bacterias y virus se adhieren a sus células diana a través de ciertas estructuras de azúcar dispuestas sobre los receptores.

Las estructuras oligosacáridas también son especialmente importantes en relación con la interacción célula-célula o célula-matriz. Así, los oligosacáridos de las glucoproteínas median la adhesión de células neuronales y la unión de linfocitos a células endoteliales específicas. Además, los oligosacáridos pueden servir de determinantes antigénicos de glucoproteínas. Las interacciones carbohidrato-carbohidrato también contribuyen de forma importante al reconocimiento celular específico durante la embriogénesis y la organogénesis. La transformación maligna de células viene acompañada de alteraciones características en las estructuras oligosacáridas de las glucoproteínas. Hasta qué punto las estructuras oligosacáridas de las células tumorales y de las glucoproteínas celulares son causa o efecto de la generación de tumores y de la metastatización no se ha esclarecido por completo hasta la fecha.

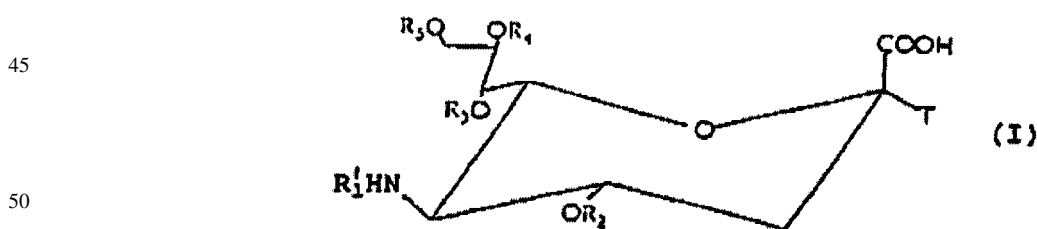
En los casos patológicos en los que participa el sistema inmune es necesario reforzar el sistema inmune mediante la administración de sustancias que estimulan las células del sistema inmune. Por lo tanto, la búsqueda de principios activos para la estimulación del sistema inmune constituye un objetivo preferido de la investigación farmacológica. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen agentes inmunoestimulantes eficaces con pocos o ningunos efectos secundarios.

El objetivo de la invención era, pues, descubrir nuevas sustancias con cuya ayuda fuera posible influir de forma aún más eficaz, específica y selectiva que hasta ahora en los procesos metabólicos regulados por glucoproteínas como sustancias mensajeras, sustancias señalizadoras, promotores, estimulantes e iniciadores. El objetivo de la invención era en particular descubrir nuevas glucoproteínas de este tipo como sustancias mensajeras, sustancias señalizadoras, estimulantes, promotores e iniciadores para el metabolismo humano y animal que se pudieran usar a dosis menores y, por lo tanto, presentaran menos efectos secundarios no deseados que las sustancias nativas correspondientes.

Ahora se ha descubierto que este objetivo se puede alcanzar de acuerdo con la invención sustituyendo en las glucoproteínas nativas antes mencionadas la sustitución acetilo presente de forma natural en el resto aminoglucano por otro grupo acilo, en particular por un grupo acilo C_3 - C_7 , o por un resto hidrocarbilo, en particular por un resto alquilo, alqueno o alquino C_3 - C_7 . Se ha observado que los nuevos compuestos así obtenidos presentan una farmacocinética modificada, en particular prolongada, en comparación con la vida media biológica (semivida) de las correspondientes glucoproteínas nativas conocidas y comerciales con un grupo N-acetilo en el resto aminoglucano. Estas nuevas glucoproteínas se pueden producir como se describe más adelante, en especial por ingeniería genética, obteniéndose glucoproteínas recombinantes, en particular glucoproteínas humanas recombinantes (glucoproteínas hr).

Debido a su farmacocinética modificada, en particular prolongada, estas sustancias pueden usarse en terapia a dosis bastante menores, de modo que también se pueden reducir considerablemente los efectos secundarios no deseados observados hasta ahora al usar las sustancias nativas correspondientes. Esto es especialmente válido cuando las nuevas glucoproteínas se usan en forma de sus derivados en los que los grupos OH de la porción monosacárida están acilados, preferentemente acetilados, una o varias veces.

De acuerdo con un primer aspecto, el objeto de la presente invención son nuevas glucoproteínas recombinantes, en particular glucoproteínas humanas recombinantes (glucoproteínas hr) de fórmula general (I)



en la que significan:

R'_1 un resto acilo C_3 - C_7 cíclico que puede presentar uno o varios grupos hidroxilo y/o carbonilo,

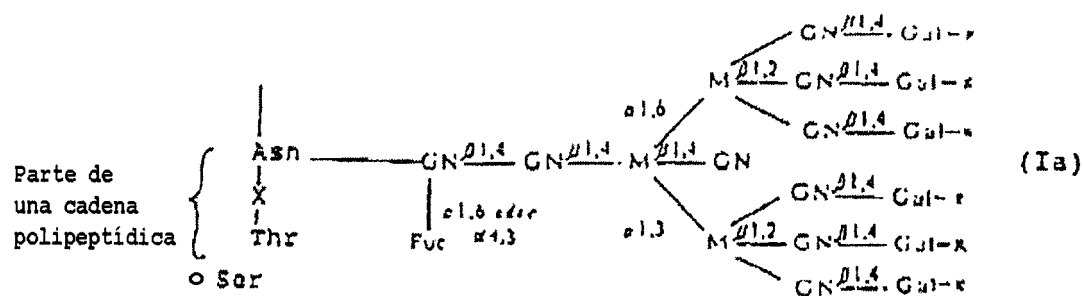
R_2 , R_3 , R_4 y R_5 , que pueden ser iguales o diferentes, respectivamente hidrógeno, un resto alquilo C_{1-20} lineal o ramificado; un resto alqueno C_{3-20} lineal o ramificado; un resto alquino C_{3-20} lineal o ramificado; un resto alqueno o alquino C_{4-20} con 2 o más enlaces dobles o enlaces triples respectivamente; un resto arilo C_{6-20} ; un resto acilo ($-\text{CO}-R_1$) lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con un total de 1 a 20 átomos de carbono que puede presentar uno o varios grupos hidroxilo; un resto aroilo C_{6-20} ; un resto carbonilamido de fórmula $-\text{CONH}_2$ o $-\text{CONHR}_1$; un resto tioacilo ($-\text{CS}-R_1$) lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con un total de 1 a 20 átomos de carbono; o un resto tiocarbamido de fórmula $-\text{CS}-\text{NH}_2$ o $-\text{CS}-\text{NHR}_1$; en los que R_1 representa respectivamente hidrógeno o un resto alquilo C_{1-20} lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado y en los que cada uno de los restos antes mencionados, a excepción de H, puede presentar uno o varios grupos halógeno, hidroxilo, epoxi, amino, mercaptano, fenilo, fenol o bencilo como sustituyente(s) y

T un resto mono-, di- u oligosacárido con hasta 40 restos azúcar enlazados entre sí de forma glucosídica, que representan anillos de furanosa y/o de piranosa, contienen 5 a 230 átomos de carbono y están unidos de forma N- u O-glucosídica a polipéptidos.

En la fórmula general (I) antes mencionada significan preferentemente:

R_2 , R_3 , R_4 y R_5 , que pueden ser iguales o diferentes, respectivamente hidrógeno, un resto alquilo lineal o ramificado con 1 a 7 átomos de carbono; un resto alqueno lineal o ramificado con 3 a 10 átomos de carbono; un resto alquino lineal o ramificado con 3 a 10 átomos de carbono; un resto alqueno o alquino con 2 o más enlaces dobles o enlaces triples, respectivamente, y 7 a 12 átomos de carbono; un resto fenilo; un resto acilo ($-\text{CO}-R_1$) lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con un total de 1 a 7 átomos de carbono, en especial un resto acetilo, incluidos sus análogos mono- o polihidroxilados; un resto aroflo con 6 a 10 átomos de carbono; un resto carbonilamido de fórmula $-\text{CONH}_2$ o $-\text{CONHR}_1$; un resto tioacilo ($-\text{CS}-R_1$) lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con un total de 1 a 7 átomos de carbono; o un resto tiocarbamido de fórmula $-\text{CS}-\text{NH}_2$ o $-\text{CS}-\text{NHR}_1$; en los que R_1 representa respectivamente hidrógeno o un resto alquilo lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con 1 a 20 átomos de carbono y cada uno de los restos antes mencionados, a excepción de H, puede estar sustituido una o varias veces con flúor, cloro, bromo o yodo, o grupos hidroxilo, epoxi, amino, mercaptano, fenilo, fenol o bencilo.

De acuerdo con otra forma de realización preferida de la invención, en la fórmula general (I) representa T un resto sacárido de estructura N-glucano de fórmula (Ia)



en la que significan:

Gal = galactosa,

GN = N-acetil-D-glucosamina,

M = D-manosa,

Fuc = fucosa,

Asn = asparagina,

X = cualquier aminoácido excepto prolina,

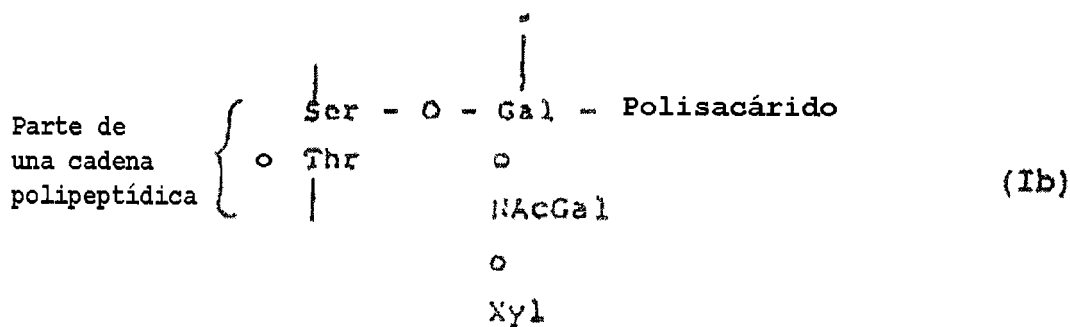
Thr = treonina,

Ser = serina,

* = punto de unión de T (1 a 6 restos moleculares),

y en la que los dos restos M periféricos pueden estar sustituidos con 1 a 3 trisacáridos; o

un resto sacárido de estructura O-glucano de fórmula general (Ib):



en la que significan:

Gal = galactosa,

Thr = treonina,

Ser = serina,

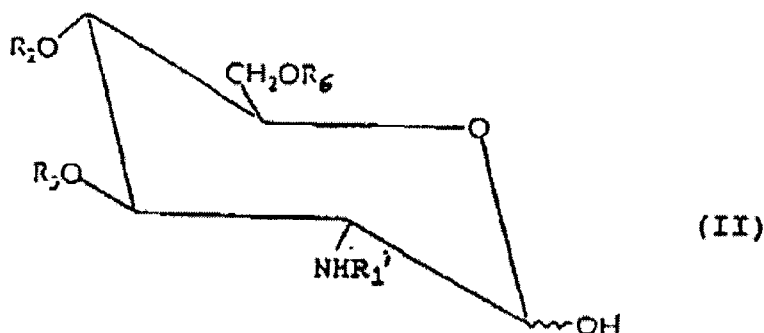
Xyl = xilosa,

NAcGal = N-acetil-galactosamina,

* = punto de unión de T,

pudiendo estar sustituida la galactosa (Gal) en las fórmulas (Ia) y (Ib) anteriores por 2-desoxi-galactosa o 2-desoxi-2-halogenuro(F, Cl, Br, J)-galactosa.

Especialmente cuando T es un resto sacárido de estructura N-glucano o un resto sacárido de estructura O-glucano, GN representa preferentemente un resto de fórmula general (II):



en la que R'_1 , R_2 y R_3 presentan los significados antes indicados, R_6 presenta los mismos significados que R_2 y R_3 y $-NHR'_1$ puede adoptar, además de la posición ecuatorial, la posición axial y en la que además, cuando $-NHR'_1$ está en posición ecuatorial, $-OR_2$ puede estar en posición axial y uno o varios o todos los grupos $-OR_2$, $-OR_3$, $-OR_6$ y/o el grupo OH libre pueden estar acilados mediante un resto acilo ($-\text{CO}-R_1$) lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con un total de 1 a 20, preferentemente 1 a 7 átomos de carbono, preferentemente mediante el resto acetilo ($-\text{CO}-\text{CH}_3$), incluidos sus análogos mono- o polihidroxilados.

Los restos R_1 a R_6 antes indicados representan preferentemente H o CH_3 o acilo C_1 - C_7 , en especial acetilo.

En el grupo HHR'_1 , R'_1 representa preferentemente un resto ciclopropanoílo que puede presentar uno o varios grupos hidroxilo y/o carbonilo.

Los nuevos compuestos antes indicados de acuerdo con la invención presentan una farmacocinética modificada, en particular prolongada, en comparación con la vida media biológica (semivida) de las correspondientes glucoproteínas naturales (nativas) conocidas y comerciales con $R'_1 = \text{acetilo}$.

En el caso de los nuevos compuestos de acuerdo con la invención se trata preferentemente

de glucoproteínas recombinantes, especialmente de glucoproteínas humanas recombinantes (glucoproteínas hr), preferentemente de factores de diferenciación hr, en particular de la eritropoyetina hr;

de factores de crecimiento hr, en especial de CSF hr (factor estimulador de colonias), GMCSF hr (factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos);

de agentes trombolíticos hr, en especial del activador de plasminógeno tisular hr (tPA) y la uroquinasa hr;

de agentes profilácticos hr de la trombosis, en especial de la antitrombina III hr;

de factores de coagulación hr, en especial del factor VIII hr y del factor IX hr;

de interferones hr, en especial de los interferones α , β , y γ hr; y

de interleucinas hr, en especial de IL-2, IL-15, IL-16 e IL-17 hr.

Las glucoproteínas recombinantes antes definidas de acuerdo con la invención, en especial las glucoproteínas hr, constituyen nuevas clases de sustancias que se pueden usar como potentes principios activos para el tratamiento de enfermedades en las que intervienen células de la respuesta inmune específica e inespecífica, células tumorales, leucocitos, trombocitos y células endoteliales vasculares. Los nuevos compuestos de acuerdo con la invención pueden actuar selectivamente a través de una modulación de los receptores de membrana que participan en la regulación del crecimiento y de la diferenciación, así como en la adhesión de células del sistema inmune, de tumores y de vasos. La inmunestimulación es necesaria en los procesos de curación de enfermedades infecciosas y tumorales. Además, los nuevos compuestos de acuerdo con la invención impiden la adhesión de leucocitos o de células tumorales a células endoteliales vasculares en caso de un choque séptico o una metastatización. Debido a su semivida biológica modificada, preferentemente prolongada, la administración de estas sustancias se puede llevar a cabo en una dosis claramente reducida. Cuando se usan sus derivados acilados, en especial acetilados, en los grupos OH del resto monosacárido, la dosificación se puede disminuir adicionalmente a aproximadamente la mitad. Las nuevas glucoproteínas recombinantes de acuerdo con la invención se pueden usar como estimulantes para las células del sistema inmune. De este modo es posible reforzar considerablemente el sistema inmune en los organismos inmunodeficientes. Se caracterizan por una elevada especificidad celular y unos efectos secundarios reducidos o completamente ausentes, así como por una alta estabilidad, en especial estabilidad biológica.

La invención se explica con más detalle a continuación haciendo referencia a la glucoproteína específica eritropoyetina hr pero sin limitarse a ella. Como resulta evidente para el experto, las realizaciones siguientes naturalmente también se aplican a las demás nuevas glucoproteínas hr antes enumeradas de la invención.

La eritropoyetina (EPO) humana es una glucoproteína con 166 aminoácidos, 3 sitios de glucosilación en las posiciones de aminoácidos 34, 38 y 83 y un peso molecular de aproximadamente 34.000 a 38.000. La proporción de cadenas laterales glucosiladas constituye aproximadamente el 40% del peso molecular (véanse Jacobs y col., "Nature" 313, 806-809 (1985); y Dordal y col., "Endocrinology" 116, 2293-2299 (1985)). La EPO se produce en el riñón y es transportada a su lugar de acción fisiológica, la médula ósea, por vía sanguínea.

La EPO se puede aislar de fuentes naturales, tales como la orina humana (véase, por ejemplo, Miyake y col., "J. Biol. Chem." 252, 5558-5564 (1977)), o bien se puede producir por ingeniería genética (véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-0148605 y 0267678). Su función fisiológica consiste en la estimulación de la eritropoyesis, es decir, en la estimulación del crecimiento y la diferenciación de células precursoras de eritrocitos. Se usa ampliamente como medicamento para pacientes anémicos, para pacientes postoperatorios y para pacientes que tras una extirpación de riñón reciben una hemodiálisis. En primer lugar sirve para el tratamiento de anemias de origen renal, es decir, de anemias causadas por una limitación o pérdida de la función de los riñones. La pérdida de la función de los riñones puede tener diferentes causas, por ejemplo un riego sanguíneo reducido, inflamaciones crónicas, traumatismos, extirpación, síndrome hepatorenal y medidas de diálisis condicionadas por estas enfermedades.

Se conoce ya un procedimiento para el aislamiento de la EPO a partir de orina humana que contiene EPO (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 3865801). Sin embargo, puesto que el contenido de EPO en la orina humana normal es extremadamente bajo y constituye del orden de aproximadamente 0,01 a 0,02% en peso de las proteínas totales en la orina, resulta difícil obtener la EPO eficazmente por esta vía. Por el documento EP 0116446 se conoce también un procedimiento según el cual se puede producir eritropoyetina de alta pureza y en el que se usa un polipéptido como anticuerpo. Este documento, sin embargo, no contiene datos sobre los rendimientos que se pueden obtener con él, y este procedimiento es relativamente difícil de realizar.

Desde hace algunos años se conoce el gen para la EPO humana, que se ha podido aislar y caracterizar a partir de un banco de genes hepáticos fetales. Desde 1985 está disponible para estudios genético-tecnológicos (véase Jacobs y col., "Nature" 313, 806-809 (1985)). La EPO se puede expresar en células animales con la ayuda de procedimientos de ingeniería genética.

La nueva EPO recombinante de acuerdo con la invención se puede producir (al igual que las demás nuevas glucoproteínas recombinantes antes mencionadas) por ingeniería genética partiendo de eritropoyetina pura procedente de un material con contenido en eritropoyetina obtenido a partir de sobrenadantes de cultivos celulares. Como células de cultivo se usan células eucariotas, sobre todo animales, en especial células CHO o células COS7 o células Nalm o fibroblastos transformados y no transformados, que se cultivan de forma conocida en sí en un medio de cultivo habitual, preferentemente en un medio FCS, RPMI 1640, HAT, Eagle-MEM, Dulbecco-MEM y/o Glasgow MEM, que como precursor de glucano contiene un monosacárido cíclico N-acilado C₃-C₇ para la biosíntesis, y la EPO hr obtenida dado el caso se acila, preferentemente se acetila, una o varias veces o por completo de manera conocida en sí (véase "Organicum") en los grupos OH del resto monosacárido, preferentemente mediante un anhídrido de ácido adecuado, en especial mediante anhídrido del ácido acético.

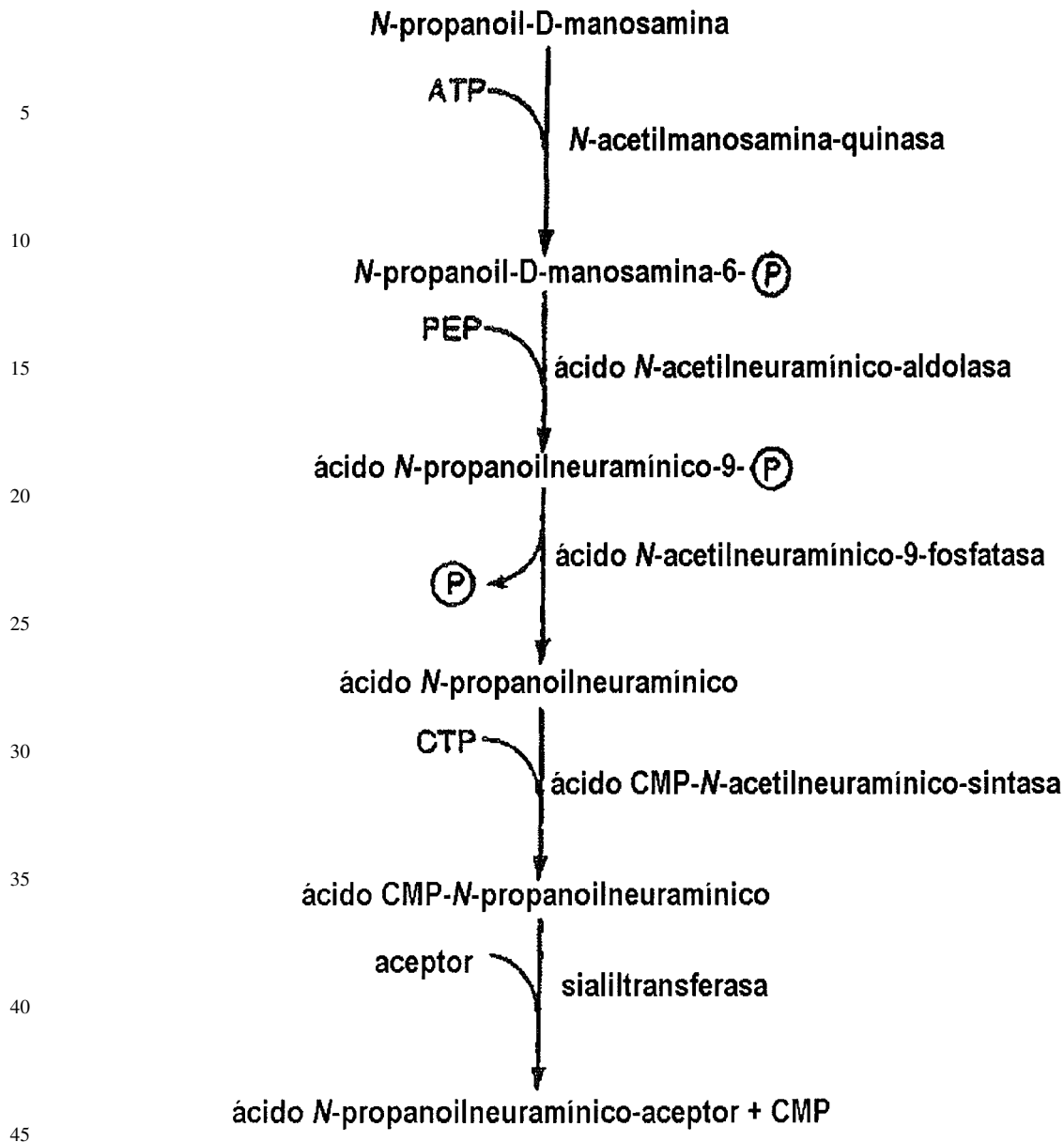
Según otro aspecto es objeto de la presente invención un procedimiento para la producción de las nuevas glucoproteínas recombinantes de la invención, definidas anteriormente, a partir de un material que contiene una o varias glucoproteínas recombinantes, en particular glucoproteínas humanas recombinantes, y que se ha obtenido a partir de sobrenadantes de cultivos celulares, caracterizado porque como células de cultivo se cultivan de forma conocida en sí células eucariotas, preferentemente animales, con especial preferencia células CHO o células COS7 o células Nalm o fibroblastos transformados o no transformados, en un medio de cultivo habitual que como precursor de glucano contiene un monosacárido cíclico N-acilado C₃-C₇ para la biosíntesis de los aminoazúcares en una concentración de 0,001 a 50 mmoles/l, preferentemente de 0,5 a 20 mmoles/l, a una temperatura de 18 a 40°C, preferentemente de 30°C, y a un pH de 6,0 a 8,2, preferentemente de 7,2, y el derivado N-acilado o el derivado N-hidrocarbonilado obtenido de la glucoproteína se separa y se obtiene de manera conocida en sí y, dado el caso, se acila, preferentemente se acetila, una o varias veces o por completo en los grupos OH u OR del monosacárido, preferentemente mediante un anhídrido de ácido adecuado, en especial mediante anhídrido del ácido acético.

Como medio de cultivo se usa preferentemente un medio FCS, RPMI 1640, HAT, Eagle-MEM, Dulbecco-MEM y/o Glasgow-MEM.

Como precursor de glucano se usa N-acil-(C₃-C₇)-(en especial N-ciclopropanoil-, -D-glucosamina, -D-galactosamina o ácido N-acil-(C₃-C₇)-(en especial N-ciclopropanoil)-neuramínico cíclico, en especial -D-manosamina, o una mezcla de ellos.

Una de las características esenciales del procedimiento de acuerdo con la invención consiste en que se usa un medio de cultivo celular que como precursor de glucano contiene un monosacárido N-acilado correspondientemente para la biosíntesis de los aminoazúcares, por ejemplo N-ciclopropanoil-D-glucosamina o N-ciclopropanoil-D-galactosamina, que son adecuados para sustituir la N-acetil-D-glucosamina o la N-acetil-D-galactosamina o el ácido N-acetil-neuramínico por la N-ciclopropanoil-D-glucosamina o la N-ciclopropanoil-D-galactosamina o el ácido N-ciclopropanoil-neuramínico en la cadena de glucanos de la EPO secretada por las células en cultivo. Han resultado especialmente eficaces los precursores directos del ácido neuramínico, a saber, N-ciclopropanoil-D-manosamina o una mezcla de estos azúcares. La ruta metabólica de estos análogos de aminoazúcares se ha dilucidado (véase Kayser y col., "J. Biol. Chem." 267, 16934-16938 (1992)) y se representa a continuación para la N-propanoil-D-manosamina:

(Tabla pasa a página siguiente)



significando en la secuencia de reacciones antes mencionada:

ATP trifosfato de adenosina

PEP fosfoenolpiruvato

P fosfato

CTP trifosfato de citidina

CMP monofosfato de citidina

aceptor una proteína que se encuentra en estado glucosilado.

Para la glucosilación de proteínas se necesitan los siguientes monosacáridos: N-Acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, D-manosa, D-galactosa, L-fucosa, N-acetil-D-manosamina y ácido N-acetilneuramínico, que están enlazados entre sí de manera típica (véase E. Buddeke, "Grundriß der Biochemie", 9ª edición, pág. 185 en adelante (1994)).

Los monosacáridos enlazados entre sí para formar oligosacáridos (glucanos) están unidos con el polipéptido bien de forma N-glucosídica a través del aminoácido asparagina en la secuencia tripeptídica típica asparagina-cualquier

aminoácido (excepto prolina)-serina o treonina o cisteína (N-glucanos), o bien están unidos de forma O-glucosídica a través de serina (O-glucanos). En estos glucanos se puede sustituir la N-acetil-D-glucosamina por N-ciclopropanoil-D-glucosamina y/o la N-acetil-D-galactosamina por N-ciclopropanoil-D-galactosamina.

- 5 En el caso del azúcar terminal ácido N-acetilneuramínico se produce una sustitución por el ácido N-ciclopropanoilneuramínico.

Mediante la introducción de uno o varios de estos análogos de azúcar, que se pueden añadir al medio de cultivo celular solos o en mezcla, la EPO sintetizada y secretada por las células contiene una nueva estructura en la que
10 los monosacáridos nativos están sustituidos por nuevos monosacáridos químicamente modificados. Los compuestos completos obtenidos constituyen nuevos compuestos.

Estas nuevas eritropoyetinas metabólicamente modificadas presentan nuevas propiedades biológicas, en particular poseen una mayor estabilidad biológica. Ésta se explica actualmente por el hecho conocido de que las glucoproteínas
15 contienen restos ácido N-acetilneuramínico terminales que están enlazados con D-galactosamina (véase A. Rosenberg, "Biology of Sialic Acids", Plenum Press, Nueva York y Londres, páginas 7-67 (1995)). Su función en este enlace consiste en proteger a la galactosa de ser reconocida por las células y por sus receptores específicos de galactosa, lo que se ha podido demostrar mediante los estudios de G. Ashwell publicados en la referencia bibliográfica Schauer antes citada. Si estas galactosas terminales en las glucoproteínas son reconocidas, las glucoproteínas reconocidas, que,
20 en consecuencia, ya no llevan ácido N-acetilneuramínico, se conducen a la degradación intracelular. Este ácido N-acetilneuramínico, esencial para la estabilidad biológica, está sujeto a un recambio natural. Éste viene determinado fundamentalmente por neuraminidasas (o sialidasas) específicas que disocian el ácido N-acetilneuramínico. De este modo estas glucoproteínas envejecen y se conducen a la degradación natural. Estas neuraminidasas requieren para su plena actividad el grupo N-acetilo en el ácido N-acetilneuramínico.

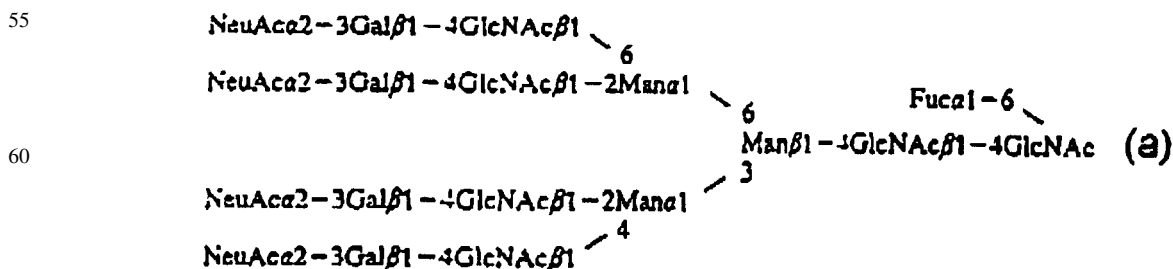
En los nuevos compuestos de EPO de acuerdo con la invención, el grupo N-acetilo natural está sustituido por grupos N-acilo C₃-C₇ cíclicos homólogos, por ejemplo por el grupo N-propanoil. Pero también los grupos N-acilo y N-hidrocarbilo antes mencionados son grupos de sustitución eficaces. Por lo tanto, la sustitución del ácido N-acetilneuramínico por los compuestos N-acílicos y/o N-hidrocarbólicos homólogos antes mencionados reduce la afinidad
30 de las neuraminidasas por estos ácidos N-acil- y/o N-hidrocarbilo-neuramínicos modificados. De este modo el ácido neuramínico modificado se disocia con una tasa mucho menor, permanece más tiempo unido a la hidroproteína y puede ejercer durante más tiempo la función protectora deseada. De esta forma la glucoproteína se vuelve más estable biológicamente. Esto significa que la EPO modificada como se ha descrito anteriormente, administrada por vía parenteral, puede permanecer más tiempo en el organismo. Así pues, permanece activa durante más tiempo. De este modo
35 se puede reducir la dosis de EPO, pues la EPO modificada de acuerdo con la invención presenta la misma actividad biológica en relación con la estimulación de la hematopoyesis que la EPO nativa. Además, la EPO modificada de acuerdo con la invención es más estable.

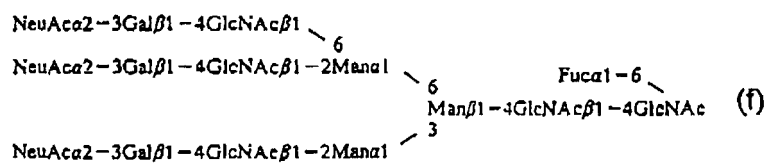
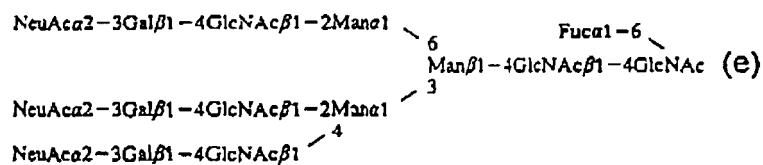
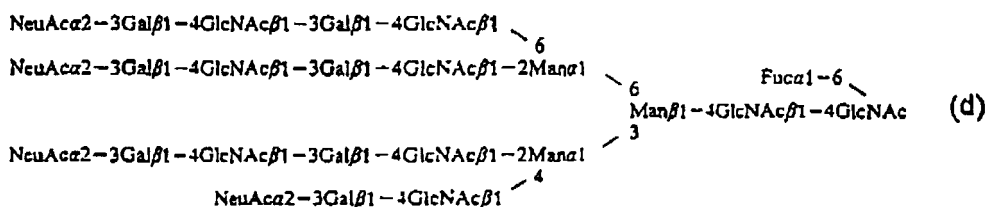
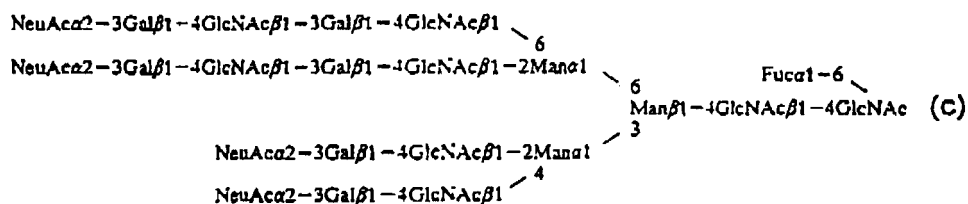
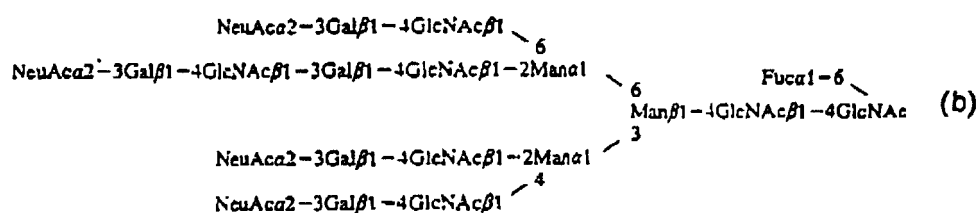
La descripción anterior del mecanismo biológico que se desarrolla en la producción y administración de la eritropoyetina hr naturalmente también se aplica a las demás glucoproteínas recombinantes de acuerdo con la invención, es decir, también a los factores de coagulación, interferones, interleucinas, factores de crecimiento, agentes trombolíticos y agentes profilácticos de la trombosis antes mencionados.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere en particular a los siguientes compuestos:

Eritropoyetina humana recombinante (eritropoyetina hr) para el tratamiento de anemias, en la que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C₃-C₇ cíclico, en especial por un resto N-ciclopropanoil, incluidos sus análogos mono- o
50 polihidroxilados y/o -cetilados.

Las nuevas eritropoyetinas hr de acuerdo con la invención presentan preferentemente un resto glucano seleccionado del siguiente grupo:

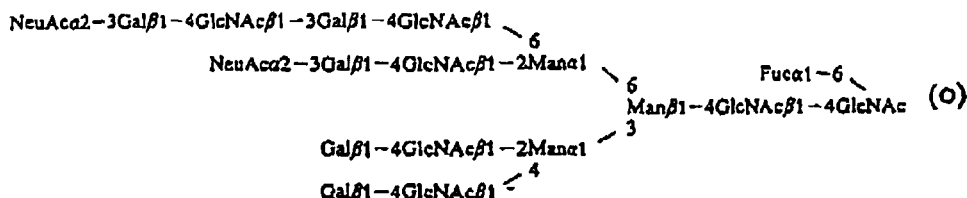
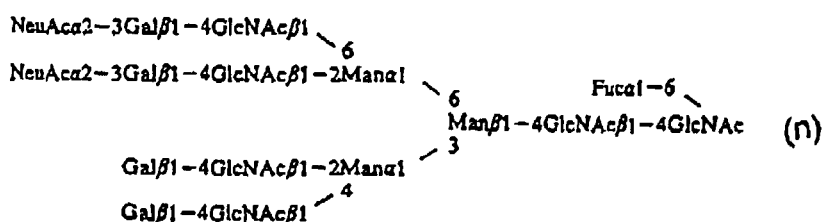




$$\begin{array}{l}
 \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6 \\
 \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6 \\
 \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-3 \\
 \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4
 \end{array}
 \begin{array}{l}
 \diagup \\
 \diagdown \\
 \diagup \\
 \diagdown
 \end{array}
 \begin{array}{l}
 \text{Fuc}\alpha 1-6 \\
 \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc} \\
 \text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}
 \end{array}
 \quad (g)$$

$$\begin{array}{l}
 \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-6 \\
 \quad \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6 \\
 \quad \quad \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc} \quad \text{Fuc}\alpha 1-6 \\
 \quad \quad \quad \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3 \\
 \quad \quad \quad \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-4 \\
 \quad \quad \quad \quad \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1
 \end{array}
 \quad (h)$$

[illegible][illegible]
$$\begin{array}{lcl}
 \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 & \begin{array}{l} \diagdown 6 \\ \diagup 3 \end{array} & \begin{array}{l} \text{Fuc}\alpha 1-6 \\ \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc} \end{array} \\
 \text{NeuAc}\alpha 2-3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1 & & \\
 \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1 & \diagup 4 &
 \end{array} \quad (1)$$
[illegible]



²⁰ en el que Ac en los restos NeuAc y/o uno o varios o todos Ac en los demás restos está(n) sustituido(s) respectivamente por un resto acilo C₃-C₇ cíclico, en especial por un resto N-ciclopropanoilo, incluidos sus análogos mono- o polihidroxilados y/o -cetilados.

Otras glucoproteínas hr preferidas de acuerdo con la invención son las siguientes:

Factores de crecimiento hr, en particular GCSF hr y/o GMCSF hr, para el tratamiento de enfermedades del sistema hematopoyético, en particular de la agranulocitosis o la trombopenia, sobre todo para la estimulación del crecimiento de los glóbulos blancos, en particular de los linfocitos, granulocitos y monocitos, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-
30 acilo C₃-C₇ cíclico, en especial por un resto N-ciclopropanoilo, incluidos sus análogos mono- o polihidroxilados y/o -cetilados;

35 Agentes trombolíticos hr, en particular tPA hr o uroquinasa hr, para el tratamiento de trombos o la profilaxis de la trombogénesis, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetil-neuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C₃-C₇ cíclico, en especial por un resto N-ciclopropanoilo, incluidos sus análogos mono- o polihidroxilados y/o -cetilados.

Agentes profilácticos de la trombosis, en particular antitrombina III hr, para la profilaxis de la trombogénesis, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C₃-C₇ cíclico, en especial por un resto N-ciclopropanoilo, incluidos sus análogos mono- o polihidroxilados y/o -cetilados;

45 Factores de coagulación hr, en particular el factor VIII hr y/o el factor IX hr, para el tratamiento de trastornos del sistema de coagulación condicionados por una deficiencia hereditaria o adquirida del factor VIII y/o factor IX, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C₃-C₇ cíclico, en especial por un resto N-ciclopropanoilo, incluidos sus análogos mono- o polihidroxilados y/o -acetilados;

Interferones hr, en particular los compuestos de interferón α hr, para el tratamiento de tumores malignos, en espe-
50 cial de melanomas, y de autoinmunopatías, en los que el grupo N-acetil natural de los restos glucano, en especial de
los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C₃-C₇ cíclico, en especial por un
resto N-ciclopropanoilo, incluidos sus análogos mono- o polihidroxilados y/o -cetilados;

55 Interferones hr, en particular los compuestos de interferón β hr, para el tratamiento de todas las formas de la esclerosis múltiple y de enfermedades víricas, sobre todo de la hepatitis B vírica, la hepatitis C vírica, la hepatitis D vírica y de encefalitis víricas, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C_3 - C_7 cíclico, en especial por un resto N-ciclopropanoilo, incluidos sus análogos mono- o polihidroxilados y/o -cetilados;

60 Interferones hr, en particular los compuestos de interferón γ hr, para el tratamiento de tumores malignos, de la hepatitis B vírica, la hepatitis C vírica, la hepatitis D vírica y de encefalitis víricas, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C₃-C₇ cíclico, en especial por un resto N-ciclopropanoílo, incluidos sus análogos mono- o polihidroxilados y/o -cetilados:

Interleucinas hr, en particular IL-2 hr, IL-15 hr, IL-16 hr e IL-17 hr, para el tratamiento de tumores malignos metastatizantes, en especial de melanomas, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de

los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C₃-C₇ cíclico, en especial por un resto N-ciclopropanoílo, incluidos sus análogos mono- o polihidroxilados y/o -cetilados.

En el caso de los nuevos compuestos de acuerdo con la invención se trata en especial de aquéllos en los que el grupo N-acetilo natural de la N-acetil-D-glucosamina se ha sustituido total o parcialmente por N-ciclopropanoílo mediante modulación bioquímica (ingeniería bioquímica) añadiendo el correspondiente derivado de N-acil-D-glucosamina o de N-acil-D-galactosamina o de ácido N-acilneuramínico, en especial de N-acil-D-manosamina, al medio de cultivo en una concentración final de 0,001 a 50,0 mM, en particular de 0,5 a 20 mM, en especial de 0,5 a 5 mM, en el medio, pudiendo estar sustituida la D-glucosa total o parcialmente por D-galactosa en el medio de cultivo mencionado; y

en especial de aquéllos en los que la D-galactosa natural se ha sustituido total o parcialmente por 2-desoxi-D-galactosa mediante modulación bioquímica (ingeniería bioquímica), añadiendo 2-desoxi-D-galactosa al medio de cultivo en una concentración final de 0,001 a 50,0 mM, en particular de 0,5 a 20 mM, en especial de 0,5 a 5 mM, en el medio.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a agentes farmacéuticos que como principio activo contienen al menos una glucosamina hr como se ha definido anteriormente, dado el caso en combinación con otros principios activos, así como con vehículos y/o coadyuvantes farmacéuticos habituales.

Los agentes farmacéuticos de acuerdo con la invención contienen como principio activo preferentemente una o varias glucoproteínas recombinantes, en particular glucoproteínas humanas recombinantes o una mezcla de derivados suyos N-acilados C₃-C₇ cíclicos con diferentes modificaciones.

Los agentes farmacéuticos de acuerdo con la invención preferentemente contienen el principio activo glucoproteico hr, que preferentemente está acilado, en especial acetilado, una o varias veces en el monosacárido, en una cantidad de 0,001 a 50% en peso, preferentemente de 0,1 a 20% en peso, en especial de 2 a 10% en peso.

Los agentes farmacéuticos especialmente preferidos de la invención son aquéllos que como principio activo glucoproteico hr contienen:

- Eritropoyetina humana recombinante o derivados de ella como se han definido anteriormente;
- factores de crecimiento hr, en particular GCSF hr y/o GMCSF hr, como se han definido anteriormente;
- agentes trombolíticos hr, en particular tPA hr o uroquinasa hr, como se han definido anteriormente;
- agentes profilácticos de la trombosis hr, en particular antitrombina III hr, como se han definido anteriormente;
- factores de coagulación hr, en particular el factor VIII hr y/o el factor IX hr, como se han definido anteriormente;
- interferones hr, en particular los interferones α , β y γ hr, como se han definido anteriormente; o
- interleucinas hr, en particular IL-2 hr, IL-15 hr, IL-16 hr e IL-17 hr, como se han definido anteriormente.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la eritropoyetina humana recombinante y de sus derivados como se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de anemias, en especial de anemias de origen renal (por ejemplo, en una dosificación de 0,001 a 200 mg/kg de peso corporal);

al uso de los factores de crecimiento hr como se han definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades del sistema hematopoyético, en especial de la agranulocitosis o la trombopenia, sobre todo para la estimulación del crecimiento de los glóbulos blancos, en especial de linfocitos, granulocitos y monocitos (por ejemplo, en una dosificación de 0,001 a 1,0 mg/kg de peso corporal);

al uso de los agentes trombolíticos hr como se han definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trombos o para la profilaxis de la trombogénesis (por ejemplo, en una dosificación de 1 a 200 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 50 a 100 mg/kg de peso corporal);

al uso de los agentes profilácticos de la trombosis hr como se han definido anteriormente para la preparación de un medicamento para la profilaxis de la trombogénesis (por ejemplo, en una dosificación de 1 a 200 mg/kg de peso corporal, preferentemente de 50 a 100 mg/kg de peso corporal);

al uso de los factores de coagulación hr como se han definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos del sistema de coagulación condicionados por una deficiencia hereditaria o adquirida del factor VIII y/o del factor IX, por ejemplo, en una dosificación de 0,001 a 200, preferentemente de 0,1 a 50 mg/kg de peso corporal;

al uso de los interferones α hr como se han definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores malignos, en especial de melanomas, y de autoinmunopatías (por ejemplo, en una dosificación de 0,001 a 10 μ g/kg de peso corporal, en especial de 0,01 a 0,1 μ g/kg de peso corporal);

ES 2 296 414 T3

al uso de los interferones β hr como se han definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de todas las formas de la esclerosis múltiple y de enfermedades víricas, sobre todo de la hepatitis B vírica, la hepatitis C vírica, la hepatitis D vírica y de encefalitis víricas (por ejemplo, en una dosificación de 0,001 a 10 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, en especial de 0,01 a 0,1 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal);

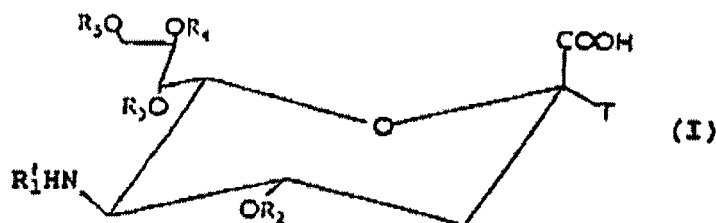
al uso de los interferones γ hr como se han definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores malignos, de la hepatitis B vírica, la hepatitis C vírica, la hepatitis D vírica y de encefalitis víricas (por ejemplo, en una dosificación de 0,001 a 0,1 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, en especial de 0,01 a 0,1 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal); y

al uso de las interleucinas hr como se han definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores malignos metastatizantes, en especial de melanomas (por ejemplo, en una dosificación de 0,001 a 200 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal).

Las glucoproteínas hr de acuerdo con la invención se administran preferentemente en una forma en la que los grupos OH y/u OR de su resto monosacárido están acilados, preferentemente acetilados, una o varias veces, pudiéndose reducir en este caso la dosificación de los derivados acilados o acetilados correspondientes a la mitad de las dosificaciones indicadas en los usos preferidos antes mencionados.

REIVINDICACIONES

1. Glucoproteínas recombinantes de fórmula general (I)



en la que significan:

R'_1 un resto acilo C_3 - C_7 cíclico que puede presentar uno o varios grupos hidroxilo y/o carbonilo,

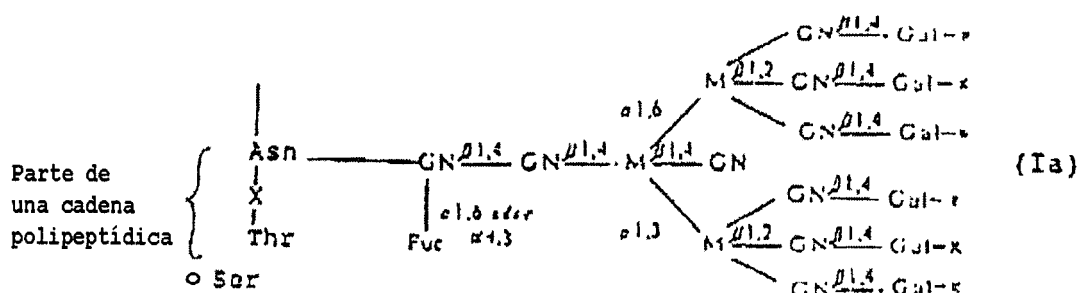
R_2 , R_3 , R_4 y R_5 , que pueden ser iguales o diferentes, respectivamente hidrógeno, un resto alquilo C_{1-20} lineal o ramificado; un resto alqueno C_{3-20} lineal o ramificado; un resto alquino C_{3-20} lineal o ramificado; un resto alqueno o alquino C_{4-20} con 2 o más enlaces dobles o enlaces triples respectivamente; un resto arilo C_{6-20} ; un resto acilo ($-CO-R_1$) lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con un total de 1 a 20 átomos de carbono que puede presentar uno o varios grupos hidroxilo; un resto aroilo C_{6-20} ; un resto carbonilamido de fórmula $-CONH_2$ o $-CONHR_1$; un resto tioacilo ($-CS-R_1$) lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con un total de 1 a 20 átomos de carbono; o un resto tiocarbamido de fórmula $-CS-NH_2$ o $-CS-NHR_1$; en los que R_1 representa respectivamente hidrógeno o un resto alquilo C_{1-20} lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado y en los que cada uno de los restos antes mencionados, a excepción de H, puede presentar uno o varios grupos halógeno, hidroxilo, epoxi, amino, mercaptano, fenilo, fenol o bencilo como sustituyente(s) y

T un resto mono-, di- u oligosacárido con hasta 40 restos azúcar enlazados entre sí de forma glucosídica, que representan anillos de furanosa y/o de piranosa, contienen 5 a 230 átomos de carbono y están unidos de forma N- u O-glucosídica a polipéptidos.

2. Glucoproteínas según la reivindicación 1, en las que en la fórmula general (I) significan:

R_2 , R_3 , R_4 y R_5 , que pueden ser iguales o diferentes, respectivamente hidrógeno, un resto alquilo lineal o ramificado con 1 a 7 átomos de carbono; un resto alqueno lineal o ramificado con 3 a 10 átomos de carbono; un resto alquino lineal o ramificado con 3 a 10 átomos de carbono; un resto alqueno o alquino con 2 o más enlaces dobles o enlaces triples, respectivamente, y 7 a 12 átomos de carbono; un resto fenilo; un resto acilo ($-CO-R_1$) lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con un total de 1 a 7 átomos de carbono, en especial un resto acetilo, que puede presentar uno o varios grupos hidroxilo; un resto aroilo con 6 a 10 átomos de carbono; un resto carbonilamido de fórmula $-CONH_2$ o $-CONHR_1$; un resto tioacilo ($-CS-R_1$) lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con un total de 1 a 7 átomos de carbono; o un resto tiocarbamido de fórmula $-CS-NH_2$ o $-CS-NHR_1$; en los que R_1 representa respectivamente hidrógeno o un resto alquilo lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con 1 a 20 átomos de carbono y cada uno de los restos antes mencionados, a excepción de H, puede estar sustituido dado el caso una o varias veces con flúor, cloro, bromo o yodo o con grupos hidroxilo, epoxi, amino, mercaptano, fenilo, fenol o bencilo.

3. Compuestos según la reivindicación 1 ó 2, en los que en la fórmula general (I), T representa un resto sacárido de estructura N-glucano de fórmula (Ia):



en la que significan:

Gal = galactosa,

ES 2 296 414 T3

GN = N-acetil-D-glucosamina,

M = D-manosa,

5 Fuc = fucosa,

Asn = asparagina,

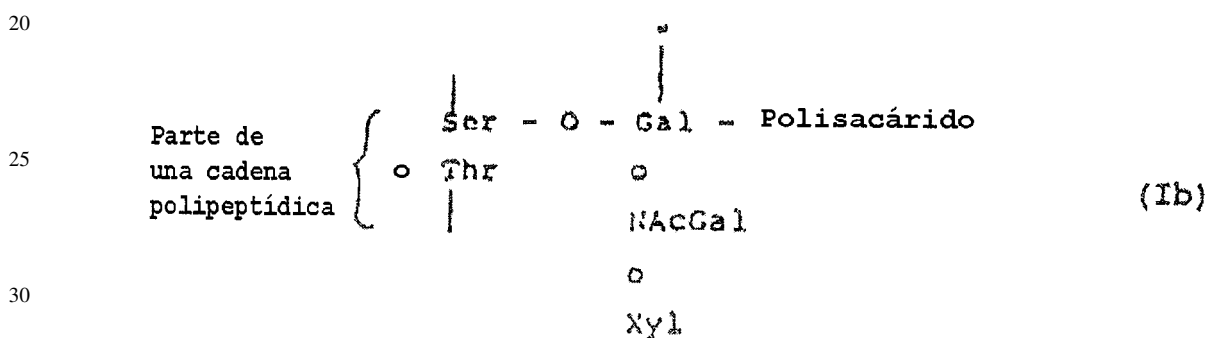
X = cualquier aminoácido excepto prolina,

10 Thr = treonina,

Ser = serina,

15 * = punto de unión de T (1 a 6 restos moleculares),

y en la que los dos restos M periféricos pueden estar sustituidos con 1 a 3 trisacáridos; o representa un resto sacárido de estructura O-glucano de fórmula general (Ib):



en la que significan:

35 Gal = galactosa,

Thr = treonina,

40 Ser = serina,

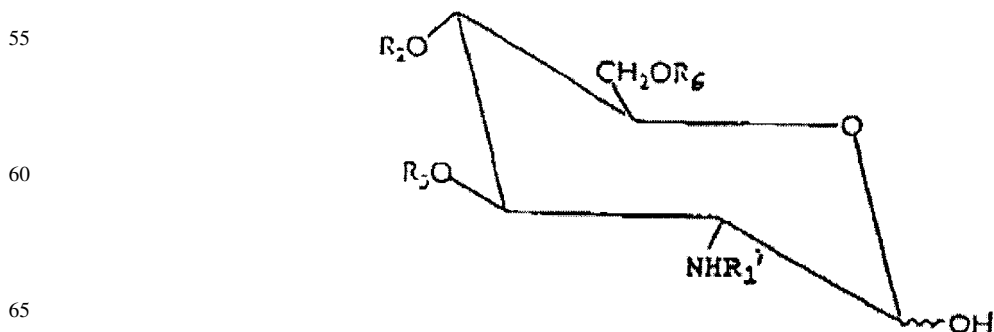
Xyl = xilosa,

NAcGal = N-acetil-galactosamina,

45 * = punto de unión de T,

pudiendo estar sustituida la galactosa (Gal) en las fórmulas (Ia) y (Ib) anteriores por 2-desoxigalactosa o 2-desoxi-2-halogenuro(F, Cl, Br, I)-galactosa.

50 4. Compuestos según al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, en los que, cuando T significa un resto sacárido de estructura N-glucano o un resto sacárido de estructura O-glucano, GN representa un resto de fórmula general (II):



en la que R'_1 , R_2 y R_3 presentan los significados antes indicados, R_6 presenta los mismos significados que R_2 y R_3 y $-NHR'_1$ puede adoptar, además de la posición ecuatorial, la posición axial y en la que además, cuando $-NHR'_1$ está en posición ecuatorial, $-OR_2$ puede estar en posición axial y uno o varios o todos los grupos $-OR_2$, $-OR_3$, $-OR_6$ y/o el grupo OH libre pueden estar acilados mediante un resto acilo ($-\text{CO}-R_1$) lineal o ramificado, saturado o mono- o poliinsaturado con un total de 1 a 20, preferentemente 1 a 7 átomos de carbono, preferentemente mediante el resto acetilo, que puede llevar uno o varios grupos hidroxilo.

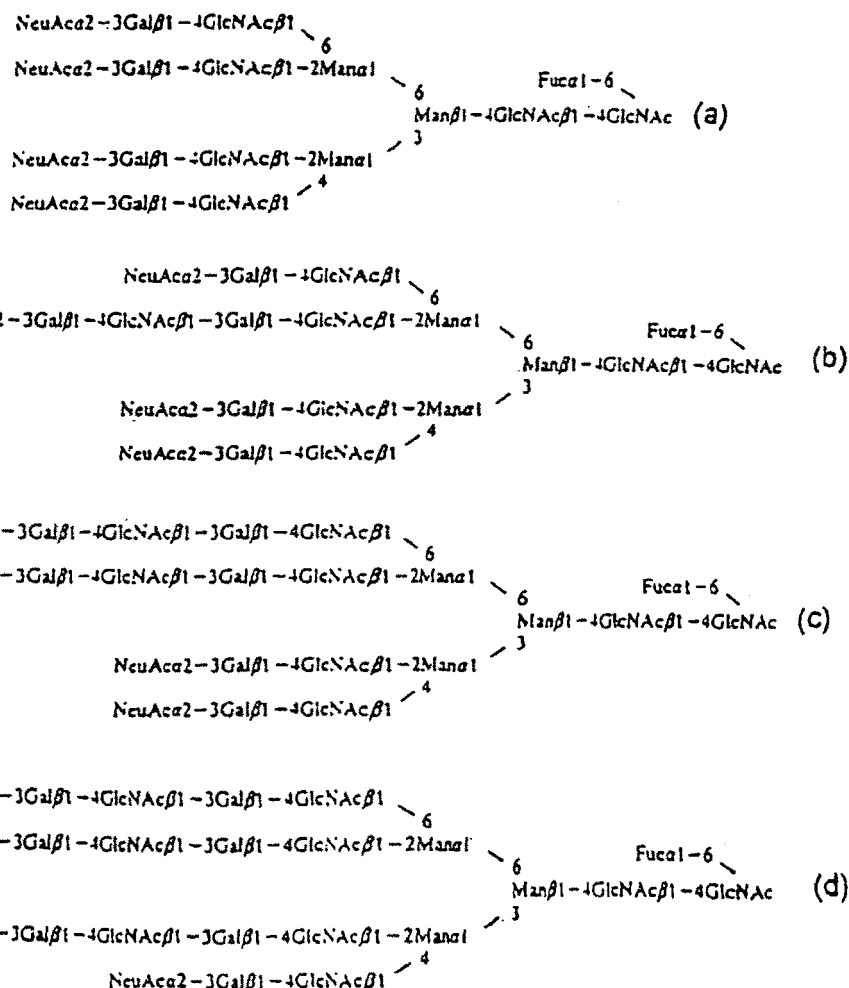
5. Compuestos según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, en los que R_1 a R_6 representan H o CH_3 o acilo C_1-C_7 , en especial acetilo.

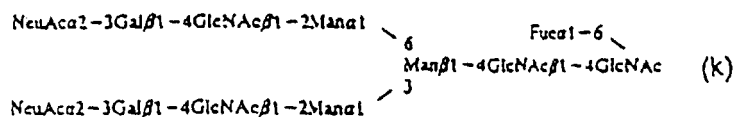
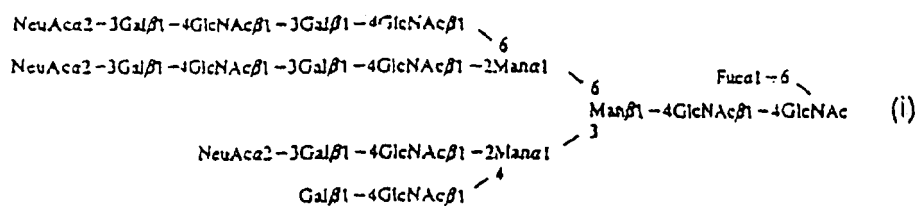
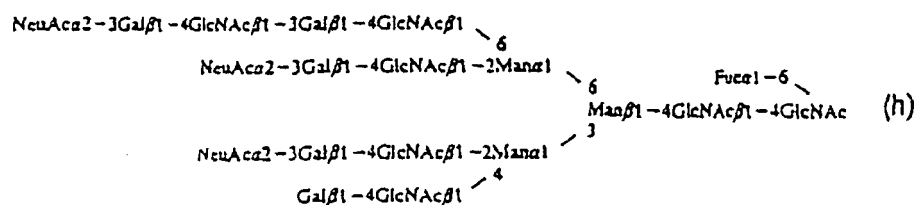
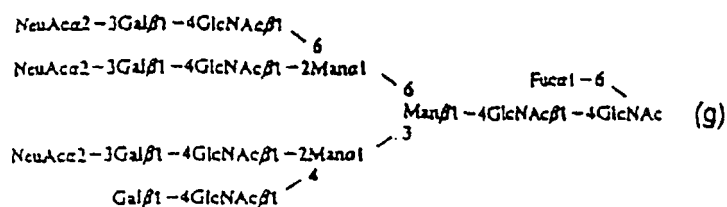
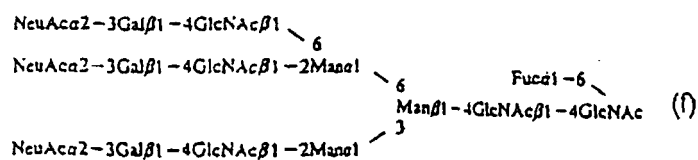
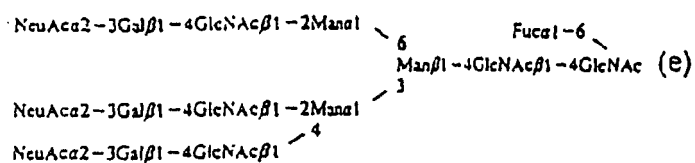
6. Compuestos según al menos una de las reivindicaciones 1 a 5, en los que el resto acilo C_3-C_7 de R'_1 es un resto ciclopropanoilo que puede presentar uno o varios grupos hidroxilo y/o carbonilo.

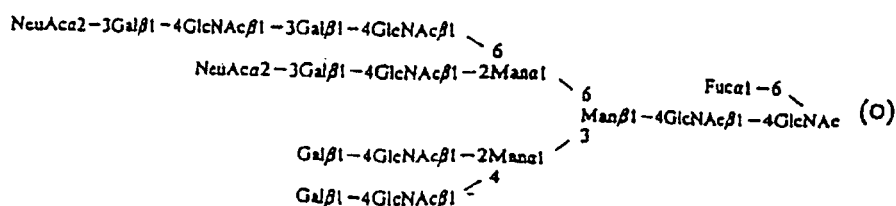
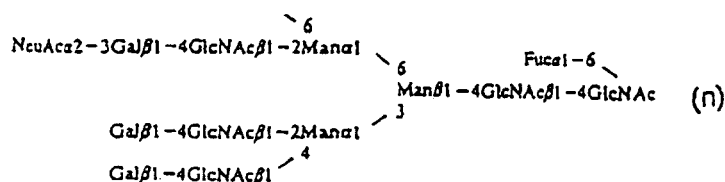
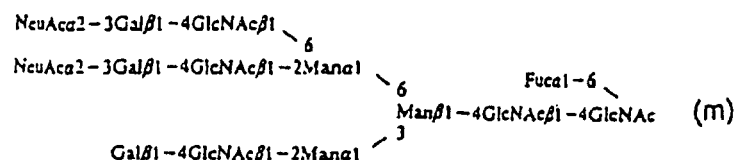
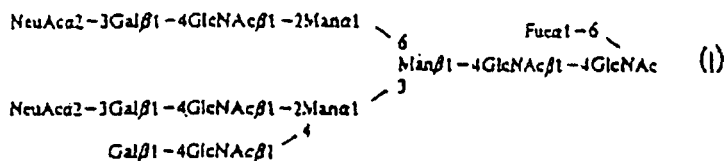
7. Compuesto según al menos una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que en el caso de la glucoproteína hr se trata de factores de diferenciación hr, en especial de la eritropoyetina hr; de factores de crecimiento hr, en especial de CSF hr (factor estimulador de colonias), GM-CSF hr (factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos); de agentes trombolíticos hr, en especial del activador de plasminógeno tisular hr (tPA) y la uroquinasa hr; de agentes profilácticos de la trombosis hr, en especial de la antitrombina III hr; de factores de coagulación hr, en especial del factor VIII hr y el factor IX hr; de interferones hr, en especial de los interferones α , β , y γ hr; y de interleucinas hr, en especial de IL-2 hr, IL-15 hr, IL-16 hr e IL-17 hr.

8. Compuestos según la reivindicación 7, en cuyo caso se trata de la eritropoyetina humana recombinante (eritropoyetina hr) para el tratamiento de anemias, en la que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C_3-C_7 como se ha definido en la reivindicación 6.

9. Compuestos según la reivindicación 8, que presentan uno de los siguientes restos glucano:







en los que Ac en los restos NeuAc y/o uno o varios o todos los Ac en los demás restos está(n) sustituido(s) respectivamente por un resto acilo C₃-C₇ como se ha definido en la reivindicación 6.

10. Compuestos según la reivindicación 7, en cuyo caso se trata de factores de crecimiento hr, en particular de GCSF hr y/o GMCSF hr, para el tratamiento de enfermedades del sistema hematopoyético, en particular de la agranulocitosis o la trombopenia, sobre todo para la estimulación del crecimiento de los glóbulos blancos, en particular de los linfocitos, granulocitos y monocitos, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C₃-C₇ como se ha definido en la reivindicación 6.

11. Compuestos según la reivindicación 7, en cuyo caso se trata de agentes trombolíticos hr, en particular de tPA hr o uroquinasa hr, para el tratamiento de trombos o la profilaxis de la trombogénesis, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C₃-C₇ como se ha definido en la reivindicación 6.

12. Compuestos según la reivindicación 7, en cuyo caso se trata de agentes profilácticos de la trombosis hr, en particular de la antitrombina III hr, para la profilaxis de la trombogénesis, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C₃-C₇ como se ha definido en la reivindicación 6.

13. Compuestos según la reivindicación 7, en cuyo caso se trata de factores de coagulación hr, en particular del factor VIII hr y/o del factor IX hr, para el tratamiento de trastornos del sistema de coagulación condicionados por una deficiencia hereditaria o adquirida del factor VIII y/o del factor IX, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C₃-C₇ como se ha definido en la reivindicación 6.

14. Compuestos según la reivindicación 7, en cuyo caso se trata de interferones α hr, en particular de los compuestos de interferón α hr, para el tratamiento de tumores malignos, en especial de melanomas, y de autoinmunopatías, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C_3 - C_7 como se ha definido en la reivindicación 6.

15. Compuestos según la reivindicación 7, en cuyo caso se trata de interferones β hr, en particular de los compuestos de interferón β hr, para el tratamiento de todas las formas de la esclerosis múltiple y de enfermedades víricas, sobre todo de la hepatitis B vírica, la hepatitis C vírica, la hepatitis D vírica y de encefalitis víricas, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C_3-C_7 como se ha definido en la reivindicación 6.
16. Compuestos según la reivindicación 7, en cuyo caso se trata de interferones hr, en particular de los compuestos de interferón γ hr, para el tratamiento de tumores malignos, de la hepatitis B vírica, la hepatitis C vírica, la hepatitis D vírica y de encefalitis víricas, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C_3-C_7 como se ha definido en la reivindicación 6.
17. Compuestos según la reivindicación 7, en cuyo caso se trata de interleucinas hr, en particular de IL-2 hr, IL-15 hr, IL-16 hr e IL-17 hr, para el tratamiento de tumores malignos metastatizantes, en especial de melanomas, en los que el grupo N-acetilo natural de los restos glucano, en especial de los restos ácido N-acetilneuramínico terminales, está sustituido por un resto N-acilo C_3-C_7 como se ha definido en la reivindicación 6.
18. Compuestos según al menos una de las reivindicaciones 7 a 17, en los que el grupo N-acetilo natural de la N-acetil-D-glucosamina se ha sustituido total o parcialmente por N-ciclopropanoilo mediante modulación bioquímica (ingeniería bioquímica) añadiendo al medio de cultivo el derivado correspondiente de N-acil-D-glucosamina o N-acil-D-galactosamina o ácido N-acilneuramínico, en especial de N-acil-D-manosamina, en una concentración final de 0,001 a 50,0 mM, en particular de 0,5 a 20 mM, en especial de 0,5 a 5 mM, en el medio, pudiendo estar sustituida la D-glucosa total o parcialmente por D-galactosa en el medio de cultivo mencionado.
19. Compuestos según al menos una de las reivindicaciones 7 a 18, **caracterizados** porque la D-galactosa natural se ha sustituido total o parcialmente por 2-desoxi-D-galactosa mediante modulación bioquímica (ingeniería bioquímica) añadiendo 2-desoxi-D-galactosa al medio de cultivo en una concentración final de 0,001 a 50 mM, en particular de 0,5 a 20 mM, en especial de 0,5 a 5 mM, en el medio.
20. Procedimiento para la producción de glucoproteínas recombinantes según al menos una de las reivindicaciones 1 a 19 a partir de un material que contiene una o varias glucoproteínas recombinantes, en particular glucoproteínas humanas recombinantes, y que se ha obtenido a partir de sobrenadantes de cultivos celulares, en el que se cultivan células eucariotas a una temperatura de 18 a 40°C y un pH de 6,8 a 8,2, preferentemente en un medio de cultivo que como precursor de glucano contiene un monosacárido N-acilado C_3-C_7 para la biosíntesis de los aminoazúcares en una concentración de 0,001 a 50 mmol/L, y el derivado N-acilado obtenido de la glucoproteína se separa y se obtiene de manera conocida en sí a partir del residuo del cultivo y, dado el caso, se acila una o varias veces o por completo de manera conocida en sí en los grupos OH u OR del monosacárido.
21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que las células eucariotas son células animales, preferentemente células CHO o células COS7 o células Nalm o fibroblastos no transformados.
22. Procedimiento según la reivindicación 20 ó 21, en el que como medio de cultivo se usa(n) un medio FCS, RPMI 1640, HAT, Eagle-MEM, Dulbecco-MEM y/o Glasgow-MEM.
23. Procedimiento según la reivindicación 20, 21 ó 22, en el que como precursor de glucano se usa N-isopropanoil-, D-glucosamina, -D-galactosamina o ácido N-isopropanoil-neuramínico, en especial N-isopropanoil-D-manosamina, o mezclas de ellos.
24. Agente farmacéutico que como principio activo contiene al menos un compuesto según una o varias de las reivindicaciones 1 a 19, dado el caso en combinación con otros principios activos, así como con vehículos y/o coadyuvantes farmacéuticos habituales.
25. Agente farmacéutico según la reivindicación 24, **caracterizado** porque como principio activo contiene una o varias glucoproteínas humanas recombinantes o una mezcla de derivados N-acilados C_3-C_7 con diferentes modificaciones.
26. Agente farmacéutico según la reivindicación 24 ó 25 que contiene el (los) principio(s) activo(s) preferentemente acilado(s), preferentemente acetilado(s), una o varias veces en el monosacárido en una cantidad de 0,001 a 50% en peso, preferentemente de 0,1 a 20% en peso, en especial de 2 a 10% en peso.
27. Agente farmacéutico según las reivindicaciones 24 a 26 que como principio activo contiene el compuesto según las reivindicaciones 7 a 9.
28. Agente farmacéutico según las reivindicaciones 24 a 26 que como principio activo contiene el compuesto según la reivindicación 10.
29. Agente farmacéutico según las reivindicaciones 24 a 26 que como principio activo contiene el compuesto según la reivindicación 11.

ES 2 296 414 T3

30. Agente farmacéutico según las reivindicaciones 24 a 26 que como principio activo contiene el compuesto según la reivindicación 12.

31. Agente farmacéutico según las reivindicaciones 24 a 26 que como principio activo contiene el compuesto según la reivindicación 13.

32. Agente farmacéutico según las reivindicaciones 24 a 26 que como principio activo contiene el compuesto según la reivindicación 14.

33. Agente farmacéutico según las reivindicaciones 24 a 26 que como principio activo contiene el compuesto según la reivindicación 15.

34. Agente farmacéutico según las reivindicaciones 24 a 26 que como principio activo contiene el compuesto según la reivindicación 16.

35. Agente farmacéutico según las reivindicaciones 24 a 26 que como principio activo contiene los compuestos según la reivindicación 17.

36. Uso de los compuestos según las reivindicaciones 8 y 9 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de anemias, en especial de anemias de origen renal.

37. Uso de los compuestos según la reivindicación 10 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades del sistema hematopoyético, en especial de la agranulocitosis o la trombopenia, sobre todo para la estimulación del crecimiento de los glóbulos blancos, en especial de los linfocitos, granulocitos y monocitos.

38. Uso de los compuestos según la reivindicación 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trombos o la profilaxis de la trombogénesis.

39. Uso de los compuestos según la reivindicación 12 para la preparación de un medicamento para la profilaxis de la trombogénesis.

40. Uso de los compuestos según la reivindicación 13 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos del sistema de coagulación condicionados por una deficiencia hereditaria o adquirida del factor VIII y/o del factor IX.

41. Uso de los compuestos según la reivindicación 14 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores malignos, en especial de melanomas, y de autoinmunopatías.

42. Uso de los compuestos según la reivindicación 15 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de todas las formas de la esclerosis múltiple y de enfermedades víricas, sobre todo de la hepatitis B vírica, la hepatitis C vírica, la hepatitis D vírica y de encefalitis víricas.

43. Uso de los compuestos según la reivindicación 16 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores malignos, de la hepatitis B vírica, la hepatitis C vírica, la hepatitis D vírica y de encefalitis víricas.

44. Uso de los compuestos según la reivindicación 17 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores malignos metastatizantes, en especial de melanomas.

45. Uso de los compuestos según las reivindicaciones 1 a 19 en su forma acilada, preferentemente acetilada, una o varias veces en los grupos OH y/u OR del resto monosacárido para la preparación de un medicamento para los propósitos indicados en las reivindicaciones 36 a 44.