(11) Número de Publicação: **PT 744409 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 14/535 (2007.10) ***A61K 38/19*** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1995.02.23**

(30) Prioridade(s): **1994.02.23 JP 25735/94**

(43) Data de publicação do pedido: **1996.11.27**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.08.06**
215/2008

(73) Titular(es):
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD
1-6-1, OHTEMACHI, CHIYODA-KU, TOKYO 100-8185 **JP**

(72) Inventor(es):
MOTOO YAMASAKI **JP**
MASAMI OKABE **JP**
TOSHIYUKI SUZAWA **JP**
KEN KOBAYASHI **JP**
KUMIKO MARUYAMA **JP**

(74) Mandatário:
JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ACELERADOR DO CRESCIMENTO DAS PLAQUETAS**

(57) Resumo:

RESUMO

" ACELERADOR DO CRESCIMENTO DAS PLAQUETAS"

Uma colónia de granulócito humano que estimula os polipéptidos em que pelo menos um grupo amino, carboxilo, mercapto ou guanidino foi quimicamente modificado por um modificador químico; um acelerador do crescimento das plaquetas que contém o polipéptido; um método para tratar pacientes trombocitopénicos através da administração de uma dose eficaz do polipéptido; a utilização do polipéptido para produzir uma composição farmacológica eficaz no tratamento dos pacientes trombocitopénicos; e uma composição para tratar os pacientes trombocitopénicos que compreende uma dose eficaz do polipéptido em uma forma de dosagem farmacologicamente aceitável em conjunto com um portador farmacologicamente aceitável.

DESCRIÇÃO

" ACELERADOR DO CRESCIMENTO DAS PLAQUETAS"

Campo Industrial da Invenção

A invenção refere-se a uma colónia granulocítica humana quimicamente modificada que estimula o factor de polipéptido o qual é produzido por se modificar quimicamente, pelo menos, um do grupo amino, carboxilo, mercapto ou guanidino em uma molécula de polipéptido que tem uma colónia granulocítica humana que estimula a actividade do factor (a partir daqui designado como hG-CSF), e um agente que promove a produção de plaquetas que compreende o referido polipéptido, um método para tratar um paciente com uma contagem diminuida de plaquetas que compreende administrar uma quantidade eficaz do referido polipéptido ao paciente, a utilização do referido polipéptido para a produção de composições farmacêuticas as quais são úteis para o tratamento de pacientes com contagens diminuidas de plaquetas, e composições para o tratamento de pacientes com contagens diminuidas de plaquetas, o qual compreende uma quantidade eficaz do referido polipéptido em uma forma de dosagem farmacologicamente aceitável em conjunto com um portador farmacologicamente aceitável.

Técnica Antecedente

A interleucina 6 [F. Takatsuki *et al.*, *Cancer Research*, **50**, 2885-2890 (1990)], o factor inibidor da leucemia [D. Metcalf *et al.* *Blood*, **76**, 50-56 (1990)], o factor de células estaminais [P. Hunt

et al. Blood, **80**, 904-911 (1992)], o factor estimulador de colónia de macrófagos (M-CSF; pedido de patente de investigação japonêsa publicada No. 11705/94) e a trombopoietina [de Sauvage *et al. Nature*, **369**, 533 (1994)] são conhecidas como substâncias que possivelmente promovem a produção de plaquetas. Além disso, a conagenina [*Japanese Cancer Association* # 2235 (1992)], Y25510 [A 113ª reunião anual da Sociedade Farmacêutica do Japão, PB13-22 (1993)], os derivados de 2-piranona [pedido de patente japonêsa não investigada publicada No. 213758/93], e FK565 (WO93/23066) são conhecidas como substâncias de baixo peso molecular as quais possivelmente promovem a produção de plaquetas.

Sabe-se que o hG-CSF é um dos polipéptidos essenciais para o crescimento das células estaminais hemopoiéticas e a diferenciação leva à formação de vários tipos de hemócitos, e exerce um efeito promotor do crescimento, na maior parte dos granulócitos e, em particular nos neutrófilos.

Como um polipéptido modificado que apresenta actividade de hG-CSF em que os grupos são quimicamente modificados com um agente de modificação químico, um hG-CSF quimicamente modificado obtido através da modificação de pelo menos um grupo amino do polipéptido que apresenta actividade de hG-CSF com um derivado de polietileno glicol é conhecido (pedido de patente japonêsa não investigada publicada No. 316400/89, WO90/06952, pedido de patente japonêsa não investigada publicada No. 32559/92). Não tem sido conhecido que estes polipéptidos de hG-CSF quimicamente modificados exerçam um efeito promotor da produção de plaquetas.

Divulgação da Invenção

A invenção refere-se a um polipéptido quimicamente modificado em que pelo menos um do grupo amino, carboxilo, mercapto ou guanidina na molécula de polipéptido que tem actividade hG-CSF é quimicamente modificado, e um agente promotoro da produção de plaquetas que compreende o referido polipéptido, um método para tratar um paciente com contagens diminuidas de plaquetas que compreende administrar uma quantidade eficaz do referido polipéptido ao paciente, a utilização do referido polipéptido para a produção de composições farmacêuticas que são úteis para o tratamento de pacientes com diminuição de plaquetas, e composições para tratar um paciente com contagens diminuidas de plaquetas, que compreendem uma quantidade eficaz do referido polipéptido em uma forma de dosagem farmaceuticamente aceitável juntamente com um portador farmaceuticamente aceitável.

Mais especificamente, a invenção diz respeito a um polipéptido quimicamente modificado em que pelo menos um do grupo amino, carboxilo, mercapto ou guanidino na molécula de polipéptido que tem actividade de hG-CSF é quimicamente modificado com um derivado de polialquileno glicol ou um copolímero de estireno-ácido maleico, e um agente de promoção da produção de plaquetas que compreende o referido polipéptido, um método para tratar um paciente com contagens diminuidas de plaquetas que compreende administrar uma quantidade eficaz do referido polipéptido ao paciente, a utilização do referido polipéptido para a produção de composições farmacêuticas que são úteis para o tratamento de pacientes com contagens diminuidas de plaquetas, e composições para tratar um paciente com contagens diminuidas de plaquetas, que compreende uma quantidade eficaz do referido polipéptido em uma forma de dosagem farmaceuticamente aceitável juntamente com um portador farmaceuticamente aceitável.

Os derivados de polialquileno glicol incluem, por exemplo, derivados de polietileno glicol, derivados de polipropileno, e derivados de copolímero de polietileno-polipropileno.

Com referência mais específica aos agentes para modificarem quimicamente, pelo menos, um dos grupos amino, carboxilo, mercapto e guanidina, o agente de modificação química do grupo amino inclui, por exemplo, derivados de polialquileno glicol que têm a fórmula (I):

$$R^1(M)_n\text{-}X\text{-}R^2 \quad (I)$$

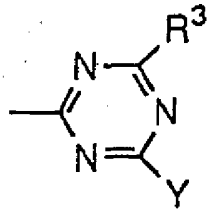
em que R^1 representa um grupo de alquilo ou de alcanoílo; M representa a fórmula:

$$-OCH_2CH_2-,\ -OCH_2CH_2CH_2-,$$

ou

$$-(OCH_2CH_2)_r-(OCH_2CH_2CH_2)_s-$$

em que r e s têm quaisquer valores integrais positivos variáveis, que são os mesmos ou diferentes; n quaisquer valores integrais positivos variáveis; X representa uma ligação singular, O, NH, ou S; e R^2 representa a fórmula:



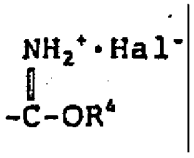
em que R^3 representa OH, halogéneo, ou a fórmula:

$$-X^a-(M^a)_{na}-R^{1a}$$

em que X^a, M^a R^{1a} e na têm o mesmo significado que o X, M, R^1 e n, acima mencionados, respectivamente, e Y representa halogéneo ou a fórmula:

$$-Z-(CH_2)_p-(O)_m-W$$

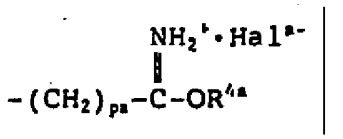
em que Z representa O, S, ou NH; W representa um grupo de carboxilo, um seu derivado activo, ou a fórmula:



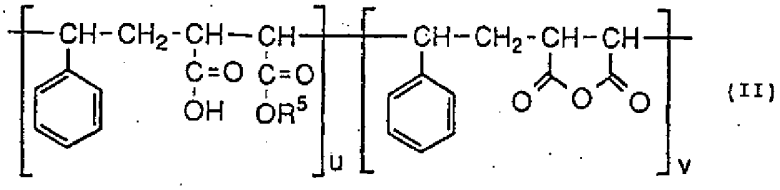
em que R^4 representa um grupo de alquilo; e Hal representa halogéneo, e p tem um valor integral de 1 a 6; e m tem um valor de 0 ou 1,

$$-(CO)_{ma}-(CH_2)_t-W^a$$

em que W^a e ma têm o mesmo significado como o W e m acima mencionados, respectivamente; e t tem um valor integral de 0 a 6, ou



em que Hal^a, pa e R^{4a} têm o mesmo significado que o Hal, p e R^4, acima mencionados, respectivamente, e os copolímeros de estireno-ácido maleico têm a fórmula (II):



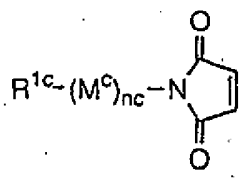
(II)

em que u e v têm quaisquer valores integrais positivos variáveis, que são os mesmos ou diferentes; e R^5 representa um átomo de

hidrogénio, ou um grupo de alquilo. Os agentes de modificação químicos de grupo carboxilo incluem, por exemplo, derivados de polialquileno glicol que têm a fórmula (III):

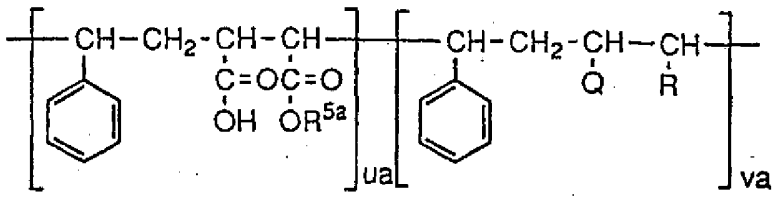
$$R^{1b}-(M^b)_{nb}-NH_2 \qquad (III)$$

em que M^b, R^{1b} e nb têm os mesmos significados que o M, R^1 e n, acima mencionados, respectivamente. Os agentes de modificação químicos de grupo de mercapto são derivados de polialquileno glicol que têm a fórmula (IV):



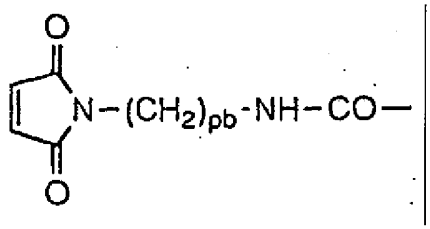
(IV)

em que M^c, R^{1c}, e nc têm os mesmos significados que o M, R^1 e n, acima mencionados, respectivamente, e os copolímeros de estireno-ácido maleico têm a fórmula (V):

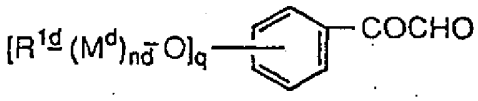


(V)

em que R^{5a}, ua, e va têm os mesmos significados que R^5 , U, e V, acima identificados, respectivamente, e um de Q e R representa um grupo de carboxilo, e o outro representa a fórmula:



em que pb tem os mesmos significados que o p acima identificado. O agente de modificação químico do grupo de guanidino inclui, por exemplo, derivados de polialquileno glicol que têm a fórmula (VI):



(VI)

em que q tem um valor de 1, ou 2, e M^d, R^{1d}, e nd têm os mesmos significados que M, R^1, e n, acima identificados, respectivamente.

No grupo de modificação químico como usado na presente invenção, o grupo de alquilo representado por R^1, R^4, e R^5 inclui, por exemplo, grupos lineares ou ramificados que têm de 1 a 18 átomos de carbono taiś como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, iso-hexilo, heptilo, octilo, iso-octilo, decilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, e octadecilo; os grupos de alcanoílo representados por R^1 incluem, por exemplo, grupos lineares ou ramificados que têm de 1 a 18 átomos de carbono tais como formilo, acetilo, propionilo, butirilo, valerilo, pivaroílo, pentanoílo, lauroílo, myristoílo, palmitoílo, e estearoílo; o halogéneo representado por R^3, Y, e Hal inclui, por exemplo, átomos de cloro, bromo, e iodo; os derivados activos de um grupo de carboxilo representado por W incluem, por exemplo, haletos ácidos tais como cloreto ácido e brometo ácido, ésteres activos tais como éster de p-nitrofenilo e N-oxisuccinimida, e anidros misturados incluindo carbonato de monoetiléster e carbonato de monoisobutilo. Os símbolos n, r, s, u, e v significam valores integrais positivos de 1 a 1,000, e preferivelmente, n é de 7 a 500, e r, s, u e v são cada um entre 1 e 200. Os pesos moleculares de grupos de modificação químicos

variam de 500 a 100,000, e preferivelmente variam de 1,000 a 40,000.

Como os polipéptidos que têm actividade de hG-CSF da presente invenção, qualquer péptido que tem actividade de hG-CSF pode ser usado, e preferivelmente, os polipéptidos que compreendem a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:1, uma parte da referida sequência, ou a sequência de aminoácido, na qual uma parte de aminoácidos da referida sequência são substituídos por outros aminoácidos [*Nature*, **319**, 415 (1986), pedido de patente não examinado publicado japonês No. 267292/88, pedido de patente não examinado publicado japonês No. 299/88, e WO87/01132], podem ser utilizados. Uma forma de realização de polipéptidos que compreendem uma sequência de aminoácidos em que uma parte da sequência é substituída por outros aminoácidos (derivados de hG-CSF) é ilustrada na Tabela 1.

Tabela 1

Posição do aminoácido de terminal N (hG-CSF de SEQ ID NO:1)	aminoácido substituído em derivados de hG-CSF											
	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)	h)	i)	j)	k)	l)
2° (Thr)	*	Val	Cys	Tyr	Arg	*	Asn	Ile	Ser	*	Ala	*
4° (Leu)	Glu	Ile	Ile	Ile	Thr	Thr	Glu	Thr	Thr	*	Thr	*
5° (Gly)	Lys	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Tyr	*
6° (Pro)	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	*	Arg	*
18° (Cys)	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
*: aminoácido não substituído												

Na molécula dos péptidos que têm actividade de hG-CSF em que mais do que um grupo está, geralmente presente em relação a cada um dos grupos de amino, carboxilo, mercapto, e guanidino, um desses grupos é suficiente para ser quimicamente modificado.

Os péptidos que têm actividade de hG-CSF podem ser quimicamente modificados pela reacção dos agentes químicos incluindo derivados de polialquileno glicol, tal como derivados de polietileno glicol, derivados de polipropilenoglicol e derivados de copolímero de polietileno glicol-polipropileno glicol, e derivados de copolímero de estireno-ácido maleico, com o polipéptido (derivados de hG-CSF), que compreendem grupos de amino, carboxilo, mercapto, ou guanidino.

Como o método para a reacção do polipéptido que compreende grupos de amino, carboxilo, mercapto, ou guanidino com derivados de polietileno glicol ou derivados de polipropilenoglicol, os métodos convencionais [por exemplo, o pedido de patente não examinado publicado japonês No. 316400/89, *Biotech. Lett.*, **14**, 559-564 (1992), *Bio/Technology*, **8**, 343-346 (1990)] ou as suas modificações podem ser utilizados.

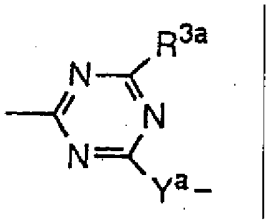
Como o método para a reacção com derivados de copolímero de polietileno glicol-polipropileno glicol, os métodos convencionais [por exemplo, o pedido de patente não examinado publicado japonês No. 59629/84, o pedido de patente não examinado publicado japonês No. 176586/85, WO89/06546, EP0539167A2] ou suas modificações podem ser utilizados.

Como o método para a reacção com derivados de copolímero de estireno-ácido maleico, os métodos convencionais [por exemplo, BIO INDUSTRY 5, 499-505 (1988), o pedido de patente não examinado publicado japonês No. 85922/89, o pedido de patente não examinado publicado japonês No. 99573/89] ou as suas modificações podem ser utilizados.

Como um exemplo do péptido quimicamente modificado com actividade de hG-CSF, os péptidos modificados obtidos através da ligação de pelo menos um grupo de amino do hG-CSF com um grupo descrito pela seguinte fórmula (Ia):

$$R^1-(OCH_2CH_2)_n-X-R^{2a}- \quad (Ia)$$

em que R^1 representa um grupo de alquilo ou de alcanoílo; n tem qualquer valor integral positivo variável; X representa uma ligação singular, O, NH, ou S; e R^{2a} representa a fórmula:



em que R^{3a} representa OH, halogéneo, ou a fórmula:

$$-X^a-(CH_2CH_2O)_{na}-R^{1a}$$

em que X^a, R^{1a} e na são idênticos ao referido X, R^1 e n, respectivamente, e Y representa uma ligação singular ou a fórmula:

$$-Z-(CH_2)_p-(O)_m-CO-$$

em que Z representa O, S, ou NH; p tem um valor integral de 1 a 6; e m tem um valor de 0 ou 1,

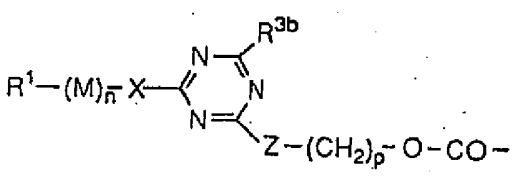
$$-(CO)_{ma}-(CH_2)_t-CO-$$

em que ma é idêntico ao referido m; e t tem um valor integral de 0 a 6.

Em cada grupo da fórmula (Ia), o grupo de alquilo, o grupo de alcanoílo, o halogéneo, e o valor integral positivo são definidos do mesmo modo àqueles na referida fórmula (I).

Além do mais, um novo hG-CSF quimicamente modificado ou um derivado de hG-CSF quimicamente modificado pode ser fornecido pela presente invenção.

Como o novo hG-CSF quimicamente modificado, os péptidos modificados obtidos através da ligação de pelo menos um grupo amino e um grupo descrito pela fórmula seguinte (Ib):



(Ib)

em que R^1 representa um grupo de alquilo ou de alcanoílo; M representa a fórmula:

$$-OCH_2CH_2-,\ -OCH_2CH_2CH_2-$$

ou

$$-(OCH_2CH_2)_r-(OCH_2CH_2CH_2)_s-$$

em que r e s têm quaisquer valores integrais positivos variáveis, que são os mesmos ou diferentes, n tem qualquer valor integral positivo variável; X representa uma ligação singular, O, NH, ou S; R^{3b} é idêntico a R^{3a}; Z representa O, S, ou NH; e p tem um valor integral de 1 a 6.

De 1 a 5 moléculas de derivados de polietileno glicol, derivados de polipropilenoglicol, derivados de copolímero de polietileno glicol-polipropilenoglicol ou derivados de copolímero de estireno-ácido maleico ligam-se a hG-CSF quimicamente modificados ou a derivados de hG-CSF quimicamente modificados. Consequentemente, o hG-CSF quimicamente modificado e os derivados de hG-CSF quimicamente modificados são utilizados na forma de uma mistura de 1 a 5 combinações moleculares, ou cada combinação fraccionada. No fraccionamento do hG-CSF quimicamente modificado e dos derivados de hG-CSF quimicamente modificados, várias cromatografias tais como cromatografia de troca de iões, cromatografia por filtração de gel, cromatografia de fase reversa, e cromatografia hidrofóbica, e fraccionamento de sulfato de amónio podem ser aplicadas, as quais são geralmente utilizadas no fraccionamento de polipéptidos de cadeia longa.

O grau de modificação química é confirmada pela redução nos grupos livres, o qual é determinado pelo acompanhamento da morbidade do hG-CSF quimicamente modificado utilizando eletroforese de gel de poliacrilamida de sulfato de dodecilo de sódio.

O ensaio da proteína na invenção foi realizado pelos seguintes métodos experimentais.

Método experimental 1

Na presente invenção, a concentração da proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. [Lowry, O.H. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)].

Método experimental 2

De acordo com o método de Laemmli [U.K. Laemmli: *Nature*, **227**, 680 (1970)], a eletroforese de gel de SDS-poliacrilamida foi realizada, e, depois as proteínas manchadas separadas no referido gel com azul brilhante Coomassie, a concentração da proteína foi determinada por meio de um cromatodigitalizador (CS-930, da firma Shimadzu Corporation).

Os seguintes exemplos experimentais servem para ilustrar a actividade farmacológica do hG-CSF quimicamente modificado e dos derivados de hG-CSF quimicamente modificados.

Exemplo experimental 1

Actividade de G-CSF e o efeito promotor sobre células leucémicas, as células de NFS-60 do hG-CSF quimicamente modificado e os derivados de hG-CSF quimicamente modificado.

A actividade do hG-CSF quimicamente modificado e os derivados de hG-CSF quimicamente modificado obtidos nos seguintes exemplos de Referência 4, 6, 8, 12, 15, 17, 19, 20 e no Exemplo 4 para as células da medula óssea de ratos foram determinados de acordo com o método de Okabe *et al.* [M. Okabe *et al.*, *Blood*, **75**, 1788 (1990)]. Além disso, a actividade da promoção do crescimento contra as células de NSF-60 [K. Holmes *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* E.U.A., **82**, 6687 (1985)] de acordo com o método de Asano *et al.* [Asano *et al. Jpn. Pharmacol. Ther.* **19**, 2767 (1991)]. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2

HG-CSF*1 (Derivados)	Compostos quimicamente modificados	Número de moléculas modificadas do composto que se ligam a uma molécula de hG-CSF	Actividade promotora de produção (%)*2	
			Células da medula óssea	Células de NFS60
Exemplo de Referência 3	Nenhum	0	100	100
Exemplo de Referência 3	Exemplo de Referência 4	3	18	21
Exemplo de Referência 3	Exemplo de Referência 6	1-4		15
SEQ ID NO:1	Exemplo de Referência 8	1-4		19
Exemplo de Referência 3	Exemplo de Referência 9	1-4		12
SEQ ID NO:1	Exemplo de Referência 11	1-3		17
Exemplo de Referência 3	Exemplo de Referência 12	1-3		33
Exemplo de Referência 3	Exemplo de Referência 15	1-4		11
Exemplo de Referência 3	Exemplo de Referência 17	3		24
Exemplo de Referência 3	Exemplo de Referência 17	2		40
Exemplo de Referência 3	Exemplo de Referência 17	1		61
Exemplo de Referência 3	Exemplo 4	3		17
Exemplo de Referência 3	Exemplo 4	2		24
Exemplo de Referência 3	Exemplo 4	1		53

*1: Origem do hG-CSF ou dos derivados de hG-CSF utilizados.

*2: Actividade relativa (%) quando a actividade do derivado de hG-CSF produzido no Exemplo de Referência é de 100%.

Exemplo experimental 2

Efeito promotor sobre a recuperação da diminuição de plaquetas no corpo total dos ratos expostos à radiação

Nos estudos ilustrados nas Tabelas 3 e 4, 5 ratos machos BALB/c (com 10 semanas de idade) foram utilizados, e no estudo ilustrado na Tabela 5, 4 ratos machos BALB/c (com 6 semanas de idade) foram utilizados. Depois de 3 Gy de irradiação corporal total (a partir daqui designado por Rx) por rato a partir de fonte radioactiva 137 Cs (RI-433, da firma Toshiba Corporation), estes ratos foram criados em uma gaiola limpa em um local de ambiente livre de patogénios específico. Água e alimentos estavam disponíveis para uma alimentação livre. Como controlos não tratados, os ratos sem irradiação foram destacados de forma semelhante.

O hG-CSF quimicamente modificado e os derivados de hG-CSF quimicamente modificados ilustrados nas Tabelas 3 a 5 foram dissolvidos em soro fisiológico, respectivamente, e administrados por via subcutânea numa única dose de 5 µg/0,2 mL por rato, em que a solução de um derivado de hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo) foi administrada uma vez no dia seguinte ao do Rx, ou duas vezes no dia seguinte ao do Rx e no 5° dia no estudo ilustrado na Tabela 3, e o hG-CSF quimicamente modificado e os derivados de hG-CSF quimicamente modificados foram administrados uma vez no dia seguinte ao do Rx nos estudos ilustrados na Tabela 4 e 5.

O sangue foi colectado sequencialmente a partir da veia na área do olho do murino, e a contagem de plaquetas foi determinada utilizando um contador automático de células (CC-180A, TOA MEDICAL ELECTRONICS CO., Ltd.). Os resultados são mostrados nas Tabelas 3 a 5.

Tabela 3

Administração de derivados de hG-CSF quimicamente modificados*1	Contagem média de plaquetas (%)*2					
	dias após o início da irradiação					
	0	5	9	11	13	20
Não tratado	100	95,7	37,7	53,5	59,5	80,6
Administrado no 1° dia	100	94,5	54,0	109,8	100,3	94,8
Administrado no 1° e no 5° dia	100	100,1	40,2	118,6	101,3	105,1

*1: Derivado de hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo) do Exemplo de Referência 4.
*2: Contagem média relativa de plaquetas (%) quando a contagem do grupo de controlo não irradiado é de 100.

Tabela 4

hG-CSF administrado de quimicamente modificado (derivados)	Contagem média de plaquetas (%)*						
	dias após o início da irradiação						
	0	6	8	9	10	11	12
Não tratado	100	88,9	36,2	42,1	51,2	67,6	74,2
Exemplo de Referência 8	100	101	41,1	63,2	98,5	126	133
Exemplo de Referência 9	100	103	41,0	66,3	98,9	142	159
Exemplo de Referência 11	100	84,1	34,5	51,6	81,3	112	130
Exemplo de Referência 12	100	93,1	42,4	66,1	92,7	145	140

*1: Contagem média relativa de plaquetas (%) quando a contagem do grupo de controlo não irradiado é de 100.

Tabela 5

hG-CSF administrado de quimicamente modificado (derivados)	Contagem média de plaquetas (%)*					
	dias após o início da irradiação					
	0	6	8	10	11	12
Não tratado	100	58,9	26,6	35,1	38,3	45,1
Exemplo de Referência 19	100	55,1	30,5	62,7	98,5	103,6
Exemplo de Referência 20	100	52,4	29,1	61,3	84,6	105,1

*1: Contagem média relativa de plaquetas (%) quando a contagem do grupo de controlo não irradiado é de 100.

Nos ratos que receberam 3 Gy do grupo de irradiação corporal total, a contagem de plaquetas diminuiu acentuadamente, alcançando o mínimo no dia 8 a 9 do Rx, e posteriormente aumentada gradualmente; no entanto, durante todos os estudos, a contagem de plaquetas não recuperou para o nível de pré-irradiação. No entanto, nos ratos que

recebem o hG-CSF quimicamente modificado e os derivados de hG-CSF quimicamente modificados, a redução da contagem de plaquetas foi reprimida, a contagem aumentou arcadamente no dia 8 a 9 após a irradiação, e a contagem recuperou totalmente para o seu nível de pré-irradiação no dia 11 a 12 após a irradiação. Um efeito semelhante também foi visto no grupo em que os agentes foram administrados no dia seguinte ao do Rx e no 5° dia.

Exemplo experimental 3

Efeito de promoção o reduzido na recuperação contra a redução de plaquetas no tratamento com fármaco anti-cancro

5-fluorouracil (5-FU, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), um agente anti-tumoral, foi administrado intraperitonealmente a 5 ratos BALB/C machos (com 9 semanas de idade), a uma dose de 100 mg/kg. No dia seguinte ao da administração de 5-FU, o hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo) obtido no Exemplo de Referência 4 foi dissolvido em soro fisiológico, e administrado por via subcutânea numa única dose de 5 µg/0,2 mL por rato. O sangue foi colectado sequencialmente a partir da veia de murino da área do olho, e as contagens de plaquetas foram determinadas utilizando um contador automático de células. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6

hG-CSF administrado de quimicamente modificado (derivados)	Contagem média de plaquetas (%)*2 dias após o início da administração de 5-FU				
	0	4	5	6	7
Não tratado	100	31,2	27,1	39,1	60,4
Administrado no 1° dia	100	42,3	43,6	68,3	103,7
*1: Derivado de hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo) do Exemplo de Referência 4.					

*2: Contagem média relativa de plaquetas (%) quando a contagem do grupo de controlo não irradiado é de 100.

No grupo de administração de 5-FU, a contagem de plaquetas diminuiu a partir do 4° dia de administração, atingiu o mínimo, no 5° dia e, em seguida, recuperou para o seu nível de pré-administração no 9° dia. No grupo de hG-CSF quimicamente modificado, a redução de plaquetas foi suprimida, e um efeito promotor claro sobre a recuperação foi notado após o 6° dia. No dia 7 após a administração, a contagem de plaquetas recuperou para o seu nível de pré-administração.

Exemplo experimental 4

Efeito promotor na recuperação contra a diminuição de plaquetas no transplante da medula óssea

Depois de 10 Gy de Rx de fonte radioactiva ^{137}Cs (RI-433, da firma Toshiba Corporation), 4 ratos machos BALB/c (com 8 semanas de idade) foram colocados em uma gaiola limpa em um local ambiental SPF. No dia a seguir à irradiação, eles foram transplantados com 2 x 10^6 células da medula óssea (sem lã de náilon aderente), da mesma estirpe. Após 2 horas, o hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo) obtido no Exemplo de Referência 4 foi dissolvido em soro fisiológico, e administrado por via subcutânea em uma dose única de 10 µg/0,2 mL, 20 µg/0,2 mL, ou 40 µg/0,2 mL por rato. O sangue foi colectado sequencialmente a partir da veia murina na área do olho e as contagens de plaquetas foram determinadas utilizando um contador automático de células. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7

Transplante de medula óssea	Dose de derivados de hG-CSF quimicamente modificados* (µg)	Contagem media de plaquetas (%) *2					
		Dias depois do início da irradiação					
		0	7	11	12	13	15
Não tratado	0	100	7,1	11,3	3,2	7,1	morto
Transplantado	0	100	6,3	15,8	29,1	52,3	75,8
Transplantado	40	100	6,6	21,4	42,0	81,5	118,7
Transplantado	20	100	6,9	23,9	46,6	86,1	117,6
Transplantado	10	100	7,9	17,6	43,8	79,8	108,7

*1: Derivados de hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo) do Exemplo de Referência 4.
*2: Contagem média relativa de plaquetas (%) quando a contagem do grupo de controlo não irradiado é de 100.

Todos os ratos que receberam 10 Gy de irradiação de corpo total experienciaram contagens de plaquetas seriamente reduzidas, e morreram ao fim de 2 semanas. Os ratos com células da medula óssea transplantadas não morreram, mas a diminuição da contagem de plaquetas continuou por mais de 2 semanas. Os ratos transplantados com medula óssea que recebem hG-CSF quimicamente modificado mostraram o efeito promotor na recuperação da contagem de plaquetas de uma maneira dependente da dose após o 11° dia, e recuperam para mais do que o seu nível de pré-irradiação no 15° dia após a irradiação.

Exemplo experimental 5 Ensaio de toxicidade aguda

4 ratos machos BALB/c com 5 a 10 semanas de idade receberam o hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo) obtido no Exemplo de Referência 4, a uma única dose de 25 µg por rato. Em um outro ensaio, após a administração de uma dose de 20 µg, foi administrado cada 20 µg adicional no 1°, 5° e 9° dia após a administração. Em ambos os testes, a mortalidade foi observada para verificar que os ratos não sofreram nenhuma modificação na condição saudável e que nenhum rato morreu.

Conforme descrito nos exemplos experimentais, o hG-CSF quimicamente modificado e os derivados de hG-CSF quimicamente modificados revelam um efeito promotor claro com vista à recuperação de contagens de plaquetas, de contagens de plaquetas seriamente reduzidas causadas pela irradiação, quimioterapia para o cancro, ou transplante de medula óssea, indicando assim a sua utilidade como um promotor da produção de plaquetas.

Além do hG-CSF quimicamente modificado e dos derivados de hG-CSF quimicamente modificados, outras citocinas ou promotores da produção de plaquetas de baixo peso molecular podem ser utilizados. Como outras citocinas, existem a interleucina 3, a interleucina 6, o factor inibidor da leucemia, o factor de células estaminais, o factor estimulador de colónia de macrófago, a trombopoietina. Como promotor da produção de plaquetas de baixo peso molecular, existem a conagenina, Y25510, os derivados de 2-piranona, FK565.

O hG-CSF quimicamente modificado e os derivados de hG-CSF quimicamente modificados podem ser utilizados por si sós ou em várias formas de dosagem. As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser produzidas por se misturar uniformemente uma dose eficaz como um componente activo do hG-CSF quimicamente modificado e dos derivados de hG-CSF quimicamente modificados e um portador farmacologicamente aceitável. Preferivelmente, essas composições farmacêuticas estão em uma forma de dosagem conveniente para a administração através de injeção.

As preparações injectáveis podem ser preparadas utilizando o hG-CSF quimicamente modificado ou os derivados de hG-CSF quimicamente modificados, e portadores tais como a água destilada, uma solução

de sal, uma solução de glicose, ou uma mistura de uma solução de sal e de uma solução de glicose. Nesta preparação, de acordo com um método convencional, as preparações podem ser preparadas sob a forma de uma solução, suspensão ou dispersão, usando um agente auxiliar adequado. Além disso, as preparações liofilizadas podem ser preparadas por se liofilizarem as referidas preparações. Embora a condição de liofilização não seja especificamente restrita, normalmente, as referidas preparações são congeladas a menos de -50 °C durante 1 a 5 horas, secas a uma temperatura de prateleira de -20 °C a 0 °C, e em um vácuo de 50 a 150 mTorr durante 24 a 48 horas, e posteriormente a uma temperatura de prateleira de 10 °C a 30 °C, e em um vácuo de 50 a 100 mTorr durante 16 a 24 horas para se obter a preparação liofilizada.

O promotor da produção de plaquetas da invenção pode incluir vários portadores comuns farmacêuticos, constituintes de medicação, diluentes, estabilizadores, ou inibidores de adsorção.

Embora a dose e a frequência da administração sejam decididas dependendo da forma de dosagem, da idade do paciente, do peso corporal, doença e condições subjectivas, geralmente, em um adulto, 15 µg a 1,5 mg, preferivelmente 25 a 500 µg do hG-CSF quimicamente modificado ou dos derivados de hG-CSF quimicamente modificados são administrados 1 a 7 vezes por semana. Quanto à via de administração, a injecção intravenosa ou subcutânea é utilizada. O promotor da produção de plaquetas da presente invenção, além disso, é utilizado como um supositório ou gotas nasais.

A invenção é adicionalmente ilustrada através dos exemplos seguintes.

Melhor Forma para a Realização da Invenção

Exemplo 1 Injecção

A injecção composta das seguintes composições foi preparada pelo método descrito a seguir.

10 mg do derivado de hG-CSF quimicamente modificado obtido no Exemplo de Referência 4 foram dissolvidos em 80 mL de solução de PBS, e adicionados 2 mg de polissorbato 80 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 100 mg de albumina de soro humano (Sigma, Ltd.), e 1,5 g de D-manitol, e ajustado para um volume de 100 mL com PBS. Depois de filtração asséptica através de um filtro de membrana descartável com uma porosidade de 0,22 μm, cada 2 mL da solução resultante foi assepticamente adicionada a um frasco de vidro para se obter a injecção (que contém 0,2 mg de ingredientes activos por frasco).

Prescrição

Derivado de hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo)	0,2 mg
Polissorbato 80	0,04 mg
Albumina de soro humano	2,0 mg
D-manitol	30 mg
NaCl	16 mg
KCl	0,4 mg
KH_2PO_4	0,4 mg
12-hidrato de Na_2HPO_4	5,8 mg
	2,0 mL

Exemplo 2 Injecção

A injecção composta das seguintes composições foi preparada pelo método descrito a seguir.

50 mg do derivado de hG-CSF quimicamente modificado obtido no Exemplo de Referência 4 foram dissolvidos em 80 mL de solução de PBS, e adicionados 2 mg de polissorbato 80 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), e 1,5 g de D-manitol, e ajustado para um volume de 100 mL com PBS. Depois de filtração asséptica através de um filtro de membrana descartável com uma porosidade de 0,22 µm, cada 2 mL da solução resultante foi assepticamente adicionada a um frasco de vidro para se obter a injecção (que contém 1,0 mg de ingredientes activos por frasco).

Prescrição

Derivado de hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo)	1,0 mg
Polissorbato 80	0,04 mg
D-manitol	30 mg
NaCl	16 mg
KCl	0,4 mg
KH_2PO_4	0,4 mg
12-hidrato de Na_2HPO_4	5,8 mg
	2,0 mL

Exemplo 3 Injecção

A injecção composta das seguintes composições foi preparada pelo método descrito a seguir.

10 mg do derivado de hG-CSF quimicamente modificado obtido no Exemplo de Referência 4 foram dissolvidos em 80 mL de solução de PBS, e adicionados 2 mg de polissorbato 80 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 100 mg de albumina de soro humano (Sigma, Ltd.),

e 1,5 g de D-manitol, e ajustado para aproximadamente pH 5 com ácido fosfórico e um volume de 100 mL com água destilada para injecção. Depois de filtração asséptica através de um filtro de membrana descartável com uma porosidade de 0,22 µm, cada 2 mL da solução resultante foi assepticamente adicionada a um frasco de vidro para se obter a injecção (que contém 0,2 mg de ingredientes activos por frasco).

Prescrição

Derivado de hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo)	0,2 mg
Polissorbato 80	0,04 mg
Albumina de soro humano	2,0 mg
D-manitol	30 mg
NaCl	12,8 mg
KCl	0,32 mg
KH_2PO_4	0,32 mg
12-hidrato de Na_2HPO_4	4,64 mg
ácido fosfórico	q.s.
	2,0 mL

Exemplo 4

35 mL de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,3) contendo 31,5 mg do derivado de hG-CSF obtido no Exemplo de Referência 3 foram ajustados para pH 8,7 com 5% de hidróxido de sódio, e adicionados 5,0 g de 2,4-bis(o-metoxipolietilenoglicol)-6-(1-aminopropiloxi-carboniloxi-4'-nitrofenil)-s-triazina, e a reacção foi realizada a 4 °C durante 7 dias. À referida solução de reacção, foi adicionado sulfato de amónio a uma concentração final de 0,7 M, e carregado em uma coluna (2,5 cm x 6,1 cm = 30 mL) de butil-Toyopearl 650M (da firma Tosoh Corporation) equilibrado com 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 M de sulfato de amónio a uma taxa de fluxo de

30 mL/hr. Depois de se lavar a coluna com 90 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 M de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 30 mL/h, a eluição foi realizada com um gradiente linear decrescente da concentração de sulfato de amónio de 0,7 a 0 M em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) em um volume total de 180 mL, a uma taxa de fluxo de 30 mL/hr. A substância desejads foi eluída a concentrações de sulfato de amónio entre 0,47 M e 0,16 M.

Sulfato de amónio foi adicionado a uma concentração final de 0,7 M para a fracção eluída, e carregado em uma coluna (2,5 cm × 12 cm = 60 mL) de butil-Toyopearl 650M (da firma Tosoh Corporation) equilibrado com 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 M de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 60 mL/hr. Depois de se lavar a coluna com 180 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 M de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 60 mL/hora, a eluição foi realizada com um gradiente linear decrescente da concentração de sulfato de amónio de 0,7 a 0 M em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) em um volume total de 600 mL, a uma taxa de fluxo de 60 mL/hr. A substância desejada foi eluída em concentrações de sulfato de amónio entre 0,38 M e 0,11 M. 200 mL da fracção eluída foi ultrafiltrado [corte Mr ou limite de peso molecular nominal 10.000: YM10 (da firma Amicon Co., Ltd.)] e concentrado para 6,5 mL. A referida solução concentrada foi carregada em uma coluna (2,5 cm x 45 cm = 220 mL) de Sephacryl S-300 (da firma Pharmacia Co., Ltd.) equilibrada com PBS a uma taxa de fluxo de 44 mL/hora e, em seguida, o PBS foi passado à mesma taxa de fluxo.

Após o início de PBS, o derivado de hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo) em que 3 moléculas de ácidos carboxílicos de polietileno glicol ligados a uma molécula de hG-CSF foi eluído com de 92 mL e

100 ml, o derivado de hG-CSF quimicamente modificados (di-tipo) em que 2 moléculas de ácidos carboxílicos de polietileno glicol ligado foi eluída de entre 100 mL e 104 mL, o derivado de hG-CSF quimicamente modificado (mono-tipo) em que uma molécula dos ácidos carboxílicos de polietileno glicol ligada foi eluída a de entre 116 mL e 120 mL, com 1,0 mg (rendimento, 3,0%), 1,4 mg (rendimento, 4,4%), e 1,1 mg (rendimento de 3,6%).

O número de moléculas dos derivados de polietileno glicol que se ligam a uma molécula do derivado de hG-CSF em mono-tipo, di-tipo, e tri-tipo foram confirmados por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

Também, nos seguintes exemplos de referência, o número de moléculas de ligação dos derivados de polietileno glicol e a pureza do derivado de hG-CSF quimicamente modificado foram confirmadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.

Exemplo de referência 1

Produção de 6-cloro-2,4-bis(o-metoxipolietilenoglicol)-s-triazina

20 g de metoxipolietilenoglicol com um peso molecular médio de 4.000 (da firma Nippon Oil and Fats Co., Ltd.) foram dissolvidos em 100 mL de tolueno anidro contendo 10 g de carbonato de sódio anidro, e aquecidos a 110 °C durante 30 minutos, e depois adicionados 500 mg de cloreto cianúrico, e aquecidos a 110 °C durante 24 horas. As substâncias residuais foram removidas, e 300 mL de éter de petróleo foram adicionados para a precipitação, e os referidos precipitados foram lavados várias vezes com éter de petróleo, e 10 g do cloreto objectivo foram obtidos (rendimento, 50%).

Exemplo de referência 2

Produção de éster de N-hidroxisuccinimida de 6-(3-carboxi propilamino)-2,4-bis (o-metoxipolietilenoglicol)-s-triazina

500 mg de cloretos obtidos no Exemplo de Referência 1 foi dissolvido em 9 mL de tetrahidrofurano anidro. Por outro lado, a solução acima foi adicionada a uma solução em que 10 mg de ácido butírico gama-amino e 28 µl de trietilamina foram dissolvidos em 1 mL de N,N-dimetilformamida anidro e, em seguida agitado à temperatura ambiente durante 16 horas. Após a dessecação sob pressão reduzida, 30 mL de cloreto de metileno e 15 mL de 10 mM de tampão fosfato (pH 10) para distribuição. A sua fase superior foi ajustada para pH 1 com 2N de ácido clorídrico, em seguida, 30 mL de cloreto de metileno foram acrescentados, e a distribuição foi conduzida novamente. A fase inferior foi fraccionada, seca com sulfato de sódio anidro, em seguida filtrada, concentrada sob pressão reduzida, e 150 mg de ácido carboxílico objetivo foram obtidos (rendimento de 30%).

150 mg do referido ácido carbónico e 3 mg de N-hidroxisuccinimida foram dissolvidos em 1 mL de cloreto de metileno anidro, e após a adição de 6 mg de N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) em gelo, foi agitado à temperatura ambiente durante 12 horas. A diciclo-hexilureia geradora (DCU) foi filtrada, exsicada sob pressão reduzida, e 100 mg do éster objectivo foram obtidos (rendimento, 67%).

Exemplo de referência 3

Os derivados de hG-CSF (Tabela 1, composto k), que compreendem a sequência de aminoácido definida em SEQ ID NO: 1 em que o primeiro aminoácido, treonina, foi substituído por alanina, o terceiro aminoácido, leucina, foi substituído por treonina, o quarto aminoácido, glicina, foi substituído por tirosina, o quinto aminoácido, prolina, foi substituído por arginina, e o décimo sétimo aminoácido, cisteína, foi substituído por serina, respectivamente, foram obtidos da seguinte forma:

E. coli W3110 estirpe A (Escherichia coli ECfBD28 FERM BP-1479) possuindo o plasmídeo pCfBD28 que compreende o ADN que codifica o referido derivado de hG-CSF foi cultivada em meio LG [10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extracto de levedura, 5 g de cloreto de sódio e 1 g de glicose foi dissolvido em 1000 mL de água, e o pH ajustado para 7,0 com NaOH] a 37 °C durante 18 horas, e 5 mL da cultura foi inoculada em 100 mL de meio MCG (0,6% de Na_2HPO_4, 0,3% de KH_2PO_4, 0,5% de cloreto de sódio, 0,5% de ácidos casamino, 1 mM de $MgSO_4$, 4 µg/mL de vitamina B_1, pH 7,2) contendo 50 µg/mL de ampicilina, a 30 °C durante 4 a 8 horas, e, em seguida, 10 µg/mL de ácido 3 β-indoleacrílico (a partir daqui designado por IAA), um derivado de triptofano foi adicionado, adicionalmente a cultura foi continuada durante 2 a 12 horas. A cultura foi centrifugada a 8000 rpm durante 10 minutos, as células foram recolhidas, e lavadas com 30 mM de cloreto de sódio e 30 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5). As células lavadas foram suspensas em 30 mL do referido tampão, e ultrassonicadas (BRANSON SONIC POWER COMPANY SONIFIER CELL DISRUPTOR 200, OUTPUT CONTROL 2) a 0 °C durante 10 minutos. Os referidos sedimentos ultrassonicados, foram centrifugados a 9000 rpm durante 30 minutos para se obterem granulados das células. A partir do sedimento, de acordo com o método de Marston *et al.*

[F.A.O. Marston *et al.*: *BIO/TECHNOLOGY*, **2**, 800 (1984)], o derivado de hG-CSF foi extraído purificado, solubilizado, e redobrado.

Exemplo de referência 4

A 100 mL de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,2) contendo 300 mg do derivado de hG-CSF obtido no Exemplo de Referência 3, 800 mg do éster activado obtido no Exemplo de Referência 2 foram adicionados e, a reacção foi realizada a 4 °C durante 24 horas. Após a adição de 100 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0) contendo 0,7 M de sulfato de amónio, a mistura de reacção foi carregada em uma coluna (2,2 cm x 26 cm) de butil-Toyopearl 650M (da firma Tosoh Corporation) equilibrada com 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0) contendo 0,35 sulfato de amónio a uma taxa de fluxo de 100 mL/hr. Depois de se lavar a coluna com 100 mL de 10 mM tampão de Tris-HCl (pH 8,0) contendo 0,35 M de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 100 mL/h, a eluição foi realizada com um gradiente linear decrescente da concentração de sulfato de amónio de 0,35 a 0 M em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0) em um volume total de 400 mL, a uma taxa de fluxo de 100 mL/hr. A substância desejado foi eluída em concentrações de sulfato de amónio de entre 0 mM e 250 mM. 250 mL da fracção eluída foi ultrafiltrada [Corte Mr ou limite de peso molecular 10,000: YM10 (da firma Amicon Co., Ltd.)] e concentrada para 10 mL. A referida solução concentrada foi carregada em uma coluna (5,6 cm x 40 cm) de Sephacryl S-200 (da firma Pharmacia Co., Ltd.) a uma taxa de fluxo de 160 mL/hora e, em seguida, o PBS foi passado à mesma taxa de fluxo.

Depois de se passar o PBS, o derivado de hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo) em que 3 moléculas de ácidos carboxílicos de polietileno glicol ligadas a uma molécula de hG-CSF foram eluídas

de entre aproximadamente 360 mL e aproximadamente 400 mL, o derivado de hG-CSF quimicamente modificado (di-tipo) em que 2 moléculas de ácidos carboxílicos de polietileno glicol ligadas foram eluídas de entre aproximadamente 420 mL e aproximadamente 450 mL, o derivado de hG-CSF quimicamente modificado (mono-tipo) em que uma molécula de ácidos carboxílicos de polietileno glicol ligada foi eluída de entre aproximadamente 500 mL e aproximadamente 530 mL, com 2,1 mg (rendimento: 7%), 1,5 mg (rendimento: 5 %), e 1,5 mg (rendimento: 5%). Os níveis de pureza do mono-tipo, di-tipo, e tri-tipo são todos de mais de 90%.

Exemplo de referência 5

Produção de éster de N-hidroxisuccinimida de carboxilo de metilo de monometoxipolietileno glicol

4 g de carboxilo de metilo de monometoxipolietileno glicol suficientemente desidratados (da firma Nippon Oil and Fats Co., Ltd.) (0,8 mmol), com um peso molecular médio de 5,000 e 184 mg de N-hidroxisuccinimida (HONSu) foram dissolvidos em 40 mL de cloreto de metileno anidro, e adicionados 300 mg de DCC em gelo a uma corrente de árgon, e agitados durante 30 minutos. Posteriormente, retornando à temperatura ambiente, após a agitação durante 1,5 horas, uma matéria insolúvel (DCU) foi filtrada, e a filtrado foi concentrado para 16 mL sob pressão reduzida. A solução resultante foi adicionada gota a gota a 240 mL de éter etílico anidro para gerar um precipitado, e depois de se lavar o precipitado com éter etílico anidro, o solvente foi removido sob pressão reduzida, e 2,8 g do composto objectivo (0,56 mmol) foi obtido (rendimento: 70%).

Exemplo de referência 6

225 mL de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,3) contendo 202,5 mg do derivado de hG-CSF obtido no Exemplo de Referência 3 foi ajustado para pH 8,1 com 5% de hidróxido de sódio, e 1,1 g de éster de N-hidroxisuccinimida de carboxilo de metilo de monometoxipolietileno glicol obtido no Exemplo de Referência 5 foi adicionado ao referido hG-CSF contendo solução, e a reacção foi realizada a 4 °C durante 6 horas. Posteriormente, a solução de reacção foi obtida através da adição de 0,5 mL de solução aquosa contendo 26,7 mg de tris(hidroximetil)-aminometano. A solução de reacção foi centrifugada a 8,000 rpm, 4 °C, durante 40 minutos, e o sulfato de amónio foi adicionado a 370 mL do sobrenadante a uma concentração final de 0,68 M, e a solução foi carregada em uma coluna (5 cm x 6,6 cm = 130 mL) de butil-Toyopearl 650M (da firma Tosoh Corporation), com uma taxa de fluxo de 130 mL/hr.

Depois de se lavar a coluna com 390 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,68 M de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 130 mL/hora, a eluição foi realizada com 390 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) a uma taxa de fluxo de 130 mL/hr. A substância pretendida foi eluída de entre 35 mL e 80 mL. 45 mL da fracção eluída foram ultrafiltrados [corte Mr de limite de peso molecular nominal de 10,000: YM10] e concentrados para 30 mL. A referida solução concentrada foi carregada em uma coluna (5 cm x 51 cm = 1,000 mL) de Sephacryl S-200 (da firma Phamacia Co., Ltd.) equilibrada com PBS a uma taxa de fluxo de 200 mL/h, e, em seguida, o PBS foi passado à mesma taxa de fluxo. O polipéptido de hG-CSF quimicamente modificado foi eluído de entre cerca de 200 mL e cerca de 380 mL depois de passar o PBS, o qual era uma mistura das combinações de 1 a 4 moléculas de polietileno glicol (de mono-tipo a tetra-tipo) (peso total: 158 mg; rendimento: 78%).

Exemplo de referência 7

Produção de ésterde N-hidroxisuccinimida de carboxilo de metilo de monometoxipolietileno glicol

12 g de carboxilo de metilo de monometoxipolietileno glicol suficientemente desidratados (da firma Nippon Oil and Fats Co., Ltd.) (1,2 mmol), com peso molecular médio de 10,000 e 276 mg de HONSu foram dissolvidos em 120 mL de cloreto de metileno anidro, e adicionados 495 mg de DCC em gelo em uma corrente de árgon, e agitado durante 30 minutos. Posteriormente, retornando à temperatura ambiente, após agitação durante 1,5 horas, uma matéria insolúvel (DCU) foi filtrada, e o filtrado foi concentrado para 48 mL sob pressão reduzida. A solução resultante foi adicionada gota a gota a 720 mL de éter etílico anidro para gerar um precipitado, e depois de se lavar do precipitado com éter etílico anidro, o solvente foi removido sob pressão reduzida, e 10,0 g do composto objectivo (1,0 mmol) foram obtidos (rendimento: 83%).

Exemplo de referência 8

30 mL de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,3) contendo 40,8 mg de hG-CSF compreendendo a sequência de aminoácido SEQ ID NO: 1 foi ajustada para pH 8,3 com 5% de hidróxido de sódio, e adicionada a 326 mg de éster de N-hidroxisuccinimida de carboxilo de metilo de monometoxipolietileno glicol obtido no Exemplo de Referência 7 em gelo, e a reacção foi conduzida a 4 °C durante 6 horas. Posteriormente, a solução de reacção foi obtida por se adicionarem 0,1 mL de uma solução aquosa de 3,9 mg de tris-(hidroximetil)aminometano. Sulfato de amónio foi adicionado à solução de reacção a uma concentração final de 0,7 M, e carregado

em uma coluna (2,5 cm x 8,1 cm = 40 mL) de butil-Toyopearl 650M (da firma Tosoh Corporation), com uma taxa de fluxo de 40 mL/hr.

Depois de se lavar a coluna com 120 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 M de sulfato de amónio a uma taxa de fluxo de 40 mL/hora, a eluição foi realizada com um gradiente linear decrescente de concentração de sulfato de amónio de 0,7 a 0 M em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) em um volume total de 240 mL, a uma taxa de fluxo de 40 mL/hr. A substância desejado foi eluída a concentração de sulfato de amónio de entre 0,33 M e 0,05 M. 90 mL da fracção eluída foi ultrafiltrado [corte Mr ou limite de peso molecular nominal de 10,000: YM10 (da firma Amicon Co., Ltd.)] e concentrado a 6 mL. A referida solução concentrada foi carregada em uma coluna (2,5 cm x 45 cm = 220 mL) de Sephacryl S-300 (da firma Pharmacia Co., Ltd.) equilibrada com PBS a uma taxa de fluxo de 44 mL/hora e, em seguida, o PBS foi passado à mesma taxa de fluxo. O polipéptido de hG-CSF quimicamente modificado foi eluído de entre cerca de 60 mL e cerca de 102 mL após o início de PBS, que foi uma mistura das combinações das moléculas 1 a 4 de polietileno glicol (mono-tipo a tetra-tipo) (peso total, 9,5 mg; rendimento de 23%).

Exemplo de referência 9

338 mL de 50 M de tampão fosfato (pH 7,3) contendo 304,2 mg do derivado de hG-CSF obtido no Exemplo de Referência 3 foi ajustado para pH 8,1 com 5% de hidróxido de sódio, e 4,8 g de éster de N-hidroxisuccinimida de carboxilo de metilo de monometoxipolietileno glicol obtidas no Exemplo de Referência 7 foi adicionado ao referido hG-CSF contendo solução em gelo, e a reacção foi realizada a 4 °C durante 6 horas. Posteriormente, a solução de reacção foi obtida através da adição de 0,5 mL de uma solução aquosa contendo

58,1 mg de tris(hidroximetil)aminometano. A solução de reacção foi centrifugada a 8,000 rpm, 4 °C, durante 40 minutos, e o sulfato de amónio foi adicionado ao sobrenadante em uma concentração final de 0,68 M, e a solução foi carregada em uma coluna (5 cm x 7,1 cm = 140 mL) de butil-Toyopearl 650M (da firma Tosoh Corporation) equilibrada com 10 mM de tampão Tris HCl (pH 8,0) contendo 0,68 M de sulfato de amónio a uma taxa de fluxo de 140 mL/hr.

Depois de se lavar a coluna com 420 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0) contendo 0,68 M de sulfato de amónio a uma taxa de fluxo de 140 mL/hora, a eluição foi realizada com 420 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0) a uma taxa de fluxo de 140 mL/hr. A substância apontada foi eluída de entre 82 mL e 184 mL. A fracção eluída, 102 mL, foi carregada em uma coluna (10 cm x 50 cm = 3,900 ml) de Sephacryl S-300 (da firma Pharmacia Co., Ltd.) equilibrada com PBS a uma taxa de fluxo de 780 mL/hora, e depois o PBS foi passado à mesma taxa de fluxo. O polipéptido de hG-CSF quimicamente modificado foi eluído entre cerca de 1,600 mL e cerca de 2,070 mL após o início do PBS, o qual foi uma mistura das combinações das moléculas 1 a 4 de polietileno glicol (mono-tipo a tetra-tipo) (peso total: 216 mg; rendimento: 71%).

Exemplo de referência 10

Produção de éster de N-hidroxisuccinimida de 6-(3-carboxi-propilamino)-2,4-bis (o-metoxipolietilenoglicol)-s-triazina

412 mg (4,0 mmol) de ácido butírico gama-amino foi dissolvido em 300 mL de 0,1 M de tampão borato (pH 10), e 20 g (2 mmol) de 6-cloro-2,4-bis(o-metoxipolietilenoglicol)-s-triazina (da firma SEIKAGAKU CORPORATION) foi adicionado em gelo, e agitado a 4 °C

durante a noite. Depois de se agitar adicionalmente a mistura à temperatura ambiente durante 6 horas, a solução foi ajustada para pH 1 com 1 N de ácido clorídrico, e extraída utilizando clorofórmio. A fase de clorofórmio foi seca com sulfato de sódio anidro, e separada por filtração após ser secada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, e o sólido gerador foi adicionado a acetona seca, e dissolvido. A referida solução de acetona foi concentrada sob pressão reduzida, e o ácido carboxílico objectivo foi recristalizado por se deixá-lo à temperatura ambiente, e 15,8 g (1,6 mmol) do referido cristalino foi obtido.

10 g (1,0 mmol) do referido ácido carboxílico e 230 mg de N-hidroxisuccinimida foram dissolvidas em cloreto de metileno anidro, e adicionados a 413 mg de DCC em gelo em uma corrente de árgon, e agitadas durante 30 minutos. Posteriormente, depois de a retornar à temperatura ambiente e agitá-la durante 1,5 horas, uma matéria insolúvel (DCU) foi filtrada, e o filtrado foi concentrado a 40 mL sob pressão reduzida. A solução resultante foi adicionada gota a gota em 600 mL de éter etílico anidro para gerar um precipitado, e depois da lavagem do precipitado com éter etílico anidro, o solvente foi removido sob pressão reduzida, e 7,7 g (0,77 mmol) do composto objectivo foi obtido (rendimento: 77%).

Exemplo de referência 11

30 ml de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,3) contendo 40,8 mg de hG-CSF compreendendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 1 foram ajustados para pH 7,2 com 5% de hidróxido de sódio, e 326 mg de éster de N-hidroxisuccinimida de 6-(3-carboxipropilamino)-2,4-bis(o-metoxipolietilenoglicol)-s-triazina obtido no Exemplo de Referência 10 foi adicionado em gelo, e a reacção foi conduzida a 4

°C durante 48 horas. Posteriormente, a solução de reacção foi obtida por se adicionarem 0,1 mL de uma solução aquosa de 3,9 mg de tris(hidroximetil)aminometano. O sulfato de amónio foi adicionado à solução de reacção a uma concentração final de 0,7 M, e carregada em uma coluna (2,5 cm × 8,1 cm = 40 mL) de butil-Toyopearl 650M (da firma Tosoh Corporation), com uma taxa de fluxo de 40 mL/hr.

Depois de se lavar a coluna com 120 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 M de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 40 mL/hora, a eluição foi realizada com um gradiente linear decrescente da concentração de sulfato de amónio de 0,7 a 0 M em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) em um volume total de 240 mL, a uma taxa de fluxo de 40 mL/hr. A substância desejada foi eluída a uma concentração de sulfato de amónio entre 0,35 M e 0,07 M. 90 mL da fracção eluída foi ultrafiltrada [corte Mr ou limite de peso molecular nominal 10,000: YM10 (da firma Amicon Co., Ltd.)] e concentrada para 6 mL. A referida solução concentrada foi carregada em uma coluna (2,5 cm x 47 cm = 230 mL) de Sephacryl S-300 (da firma Pharmacia Co., Ltd.) equilibrada com PBS a uma taxa de fluxo de 46 mL/hora e, em seguida, o PBS foi passado à mesma taxa de fluxo. O polipéptido de hG-CSF quimicamente modificado foi eluído com entre cerca de 110 mL e cerca de 145 mL após o início do PBS, que foi uma mistura das combinações das moléculas 1 a 3 de polietileno glicol (mono-tipo a tri-tipo) (peso total, 7,8 mg; rendimento: 19%).

Exemplo de referência 12

600 mL de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,3) contendo 540 mg do derivado de hG-CSF obtido no Exemplo de Referência 3 foram ajustadas para pH 7,2 com 5% de hidróxido de sódio, e 8,7 g de

éster de N-hidroxisuccinimida de 6-(3-carboxipropilamino)-2,4-bis(o-metoxipolietilenoglicol)-s-triazina obtido no Exemplo de Referência 10 foi adicionado em gelo e, a reacção foi conduzida a 4 °C durante 48 horas.

Posteriormente, a solução de reacção foi obtida pela adição de 0,5 mL de uma solução aquosa de 105 mg de tris-(hidroximetil) aminometano. A solução de reacção foi centrifugada a 8,000 rpm, 4 °C, durante 40 minutos, e o sulfato de amónio foi adicionado a 600 mL do sobrenadante a uma concentração final de 0,68 M, e a solução foi carregada em uma coluna (5 cm x 18 cm = 350 mL) de butil-Toyopearl 650M (da firma Tosoh Corporation) equilibrada com 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,68 M de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 350 mL/hr.

Depois de se lavar a coluna com 700 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,68 M de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 350 mL/hora, a eluição foi realizada com um gradiente linear decrescente da concentração de sulfato de amónio de 0,68 a 0 M em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) em um volume total de 2,800 mL, a uma taxa de fluxo de 350 mL/hr. A substância desejada foi eluída a concentração de sulfato de amónio entre 0,39 M e 0,20 M. 800 mL da fracção eluída foi ultrafiltrado [corte Mr 10,000: YM10 (da firma Amicon Co., Ltd.)] e concentrado para 100 mL. A referida solução concentrada foi carregada em uma coluna (10 cm x 50 cm = 3900 mL) de Sephacryl S-300 (da firma Pharmacia Co., Ltd.) equilibrada com PBS a uma taxa de fluxo de 780 mL/hora e, em seguida, o PBS foi passado à mesma taxa de fluxo. O polipéptido de hG-CSF quimicamente modificado foi eluído entre cerca de 1,750 mL e cerca de 2,250 mL após o início do PBS, que foi uma mistura de combinações das

moléculas 1 a 3 de polietileno glicol (mono-tipo a tri-tipo) (peso total: 303 mg; rendimento: 56%).

Exemplo de referência 13

Produção de 6-(3-carboxipropilamino)-2,4-bis(o-metoxipolietileno glicol)-s-triazina

100 g (8,33 mmol) de monometoxipolietilenoglicol suficientemente desidratado (da firma Nippon Oil and Fats Co., Ltd.), com um peso molecular médio de 12,000, 9,3 g de óxido de zinco (da firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 83,5 g de seiva molecular (tipo 4A) (da firma Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) foram dissolvidos em benzeno seco, e deixados em uma corrente de árgon durante a noite à temperatura ambiente. Posteriormente, a seiva molecular foi removida, e 42 g de seiva molecular foram novamente adicionados, e a solução foi deixada durante a noite, de forma semelhante. Em seguida, a seiva molecular foi removida, e a solução foi destilada a 80 °C em uma corrente de árgon utilizando um destilador, e o primeiro destilado de 50 mL, foi removido. Além disso, utilizando um extractor Soxhlet (para solo) carregado por 100 g de seiva molecular (tipo 4A), a solução foi desidratada com refluxo a 80 °C, em uma corrente de árgon durante a noite. Após o arrefecimento, 36 mg (4,0 mmol) de cloreto cianúrico foi adicionado à solução de reacção e de forma semelhante desidratado com refluxo durante 5 dias. O cloreto cianúrico recristalizado por éter etílico seca foi utilizado neste caso. Posteriormente, a solução foi arrefecida à temperatura ambiente, 300 mL de benzeno seco foi adicionado à solução, a solução foi centrifugada a 3,600 rpm durante 10 minutos, e os materiais insolúveis foram removidos. O sobrenadante foi concentrado sob pressão reduzida para 300 mL, e

adicionado gota a gota a 3,000 mL de éter etílico seco para gerar um precipitado. O referido precipitado foi recolhido, e lavado com éter etílico seco e, em seguida, o solvente foi removido sob pressão reduzida, e o precipitado seco foi obtido.

100 g do referido precipitado seco foi adicionado a 1,000 mL de 0,1 M de solução tampão de borato (pH 10), no qual 24 g (12,0 mmol) de ácido butírico gama-amino foram dissolvidos em 1000 mL de tampão, em gelo, e agitado a 4 °C durante a noite. Após agitação adicionalmente à temperatura ambiente durante 6 horas, a solução foi ajustada para pH 1,0 com 1N de ácido clorídrico, e extraída com clorofórmio. A fase de clorofórmio foi seca com sulfato de sódio anidro, e separada por filtração, e do solvente foi removido sob pressão reduzida. A acetona seca foi adicionada ao sólido branco gerador e o sólido foi dissolvido. A referida solução de acetona foi concentrada sob pressão reduzida, e feita para recristalizar por deixá-la à temperatura ambiente, e 90 g do produto bruto contendo aproximadamente 70 a 80% do composto alvo foi obtido. Este produto foi dissolvido em 6,000 mL de água destilada, e carregado em uma coluna de resina de troca de aniões HPA-75 (da firma Mitsubishi Chemical Corporation), que foi equilibrada com água destilada, depois de se passar previamente 12,000 mL de 2N de hidreto de sódio, e as fracções contendo o composto objecto como um ingrediente principal foram coletadas por eluição com água destilada. A solução resultante foi ajustada para pH 1,0 com 1N de ácido clorídrico, e extraída com clorofórmio. A fase de clorofórmio foi seca com sulfato de sódio anidro e separada por filtração, e o solvente foi removido sob pressão reduzida, e 43,6 g do composto objectivo altamente purificado foram obtidos (rendimento: 43%).

Exemplo de referência 14

Produção de éster de N-hidroxisuccinimida de 6-(3-carboxi-propilamino)-2,4-bis(o-metoxipolietilenoglicol)-s-triazina

25 g de 6-(3-carboxipropilamino)-2,4-bis(o-metoxipolietilenoglicol)-s-triazina que foi sintetizado e suficientemente seco, de acordo com o método do Exemplo de Referência 13 e 240 mg de N-hidroxisuccinimida foram dissolvidos em 400 mL de cloreto de metileno anidro, e adicionados a 431 mg de DCC em gelo em uma corrente de árgon, e agitados durante 30 minutos. Posteriormente, após o retorno à temperatura ambiente e agitação durante 1,5 horas, uma matéria insolúvel (DCU) foi filtrada, e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para 160 mL. A solução resultante foi adicionada gota a gota a 2,400 mL de éter etílico anidro para gerar um precipitado, e depois de se lavar o referido precipitado com éter etílico anidro, o solvente foi removido sob pressão reduzida, e 21,4 g (0,89 mmol) do composto alvo foi obtido (rendimento, 89%).

Exemplo de referência 15

560 mL de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,3) contendo 504 mg do derivado de hG-CSF obtido no Exemplo de Referência 3 foram ajustados para pH 7,3 com 5% de hidróxido de sódio, e 22,4 g de éster de N-hidroxisuccinimida de 6-(3-carboxipropilamino)-2,4-bis(o-metoxipolietilenoglicol)-s-triazina obtido no Exemplo de Referência 14 foi adicionado em gelo e, a reacção foi conduzida a 4 °C durante 48 horas. Posteriormente, a solução de reacção foi obtida pela adição de 0,5 mL de uma solução aquosa de 113 mg de tris (hidroximetil)-aminometano. O sulfato de amónio foi adicionado a uma concentração final de 0,7 M à solução de reacção, e a solução

foi carregada em uma coluna (5 cm x 25 cm = 500 mL) de butil-Toyopearl 650M (da firma Tosoh Corporation) equilibrada com 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 M de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 500 mL/hr. Depois de se lavar a coluna com 1,500 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 M de sulfato de amónio a uma taxa de fluxo de 500 mL/hora, a eluição foi realizada com um gradiente linear decrescente de concentração de sulfato de amónio de 0,7 a 0 M em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) em um volume total de 3,000 mL, a uma taxa de fluxo de 500 mL/hr. A substância desejada foi eluída a concentração de sulfato de amónio entre 0,55 e 0,08 M. O sulfato de amónio foi adicionado à fracção eluída em uma concentração final de 0,7 M, e carregado em uma coluna (5 cm x 15 cm = 300 mL) de butil-Toyopearl 650M (da firma Tosoh Corporation) equilibrada com 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 M de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 450 mL/hr. Depois de se lavar a coluna com 1,500 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 M de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 450 mL/hora, a eluição foi realizada com 900 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) a uma taxa de fluxo de 450 mL/hr. A substância desejada foi eluída entre 67 mL e 132 mL. A fracção eluída, 100 mL, foi carregada em uma coluna (5 cm × 50 cm = 1000 mL) de Sephadex G-25 (da firma Pharmacia Co., Ltd.) equilibrada com PBS a uma taxa de fluxo de 300 mL/hr. Posteriormente, o PBS foi passado pela mesma taxa de fluxo. O polipéptido de hG-CSF quimicamente modificado foi eluído entre cerca de 350 mL e cerca de 500 mL após o início do PBS, que foi uma mistura das combinações das moléculas 1 a 4 de polietileno glicol (mono-tipo a tetra-tipo) (peso total: 282 mg; rendimento: 56%).

Exemplo de referência 16

Produção de 4-nitrofeniloxicarbonil(o-metoxipolietilenoglicol)

5,5 g de metoxipolietilenoglicol suficientemente desidratado (da firma Nippon Oil and Fats Co., Ltd.) (0,55 mmol), com um peso molecular médio de 10,000 foram dissolvidos em 27,5 mL de cloreto de metileno seco, e 0,153 mL de trietilamina e 222 mg de cloroformato de 4-nitrofenilo foram adicionados e agitados em uma corrente de árgon, à temperatura ambiente durante 4 horas. Durante a agitação, o pH foi mantido a uma temperatura entre 7,5 e 8,5, adicionando trietilamina. A solução de reacção foi concentrada a 20 mL sob pressão reduzida, e adicionada gota a gota a 300 mL de éter etílico seco para gerar um precipitado. O referido precipitado foi recristalizado com acetato de etilo, e 4,8 g do composto alvo foi obtido por secagem sob pressão reduzida (0,48 mmol) (rendimento, 87%).

Exemplo de referência 17

45 mL de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,3) contendo 40,5 mg do derivado de hG-CSF obtido no Exemplo de Referência 3 foi ajustado para pH 8,7 com 5% de hidróxido de sódio, e 4,3 g de 4-nitrofeniloxicarbonilo o-metoxipolietilenoglicol) obtido no Exemplo de Referência 16 foi adicionado em gelo, e a solução de reacção foi obtida pela reacção deles a 4 °C durante 3 dias. O sulfato de amónio foi adicionado à solução de reacção a uma concentração final de 0,7 M, e carregado em uma coluna (2,5 cm x 12 cm = 60 mL) de butil-Toyopearl 650M (da firma Tosoh Corporation) equilibrada com 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 de sulfato de amónio com uma taxa de fluxo de 60 mL/hr. Depois de se lavar a coluna com 180 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) contendo 0,7 M de sulfato de amónio, a uma taxa de fluxo de 60 m/h, uma eluição foi

realizada com um gradiente linear decrescente de concentração de sulfato de amónio de 0,7 a 0 M em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5) em um volume total de 360 mL, a uma taxa de fluxo de 60 mL/hr.

Posteriormente, a porção não diluída remanescente foi eluída por se passar 180 mL de 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5). A substância desejada foi eluída em concentrações de sulfato de amónio de 0,4 M a 0 M. A fracção eluída, 210 mL, foi ultrafiltrada [corte Mr 10,000: YM10 (da firma Amicon Co., Ltd.)] e concentrada a 30 mL. A referida solução concentrada foi carregada em uma coluna (5 cm × 51 cm = 1000 mL) de Sephacryl S-300 (da firma Pharmacia Co., Ltd.) equilibrada com PBS a uma taxa de fluxo de 200 mL/h, e, em seguida, o PBS foi passado à mesma taxa de fluxo.

Após o início de PBS, o derivado de hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo) em que 3 moléculas de ácidos carboxílicos de polietileno glicol ligadas a uma molécula de hG-CSF foi eluída situando-se entre cerca de 285 mL e cerca de 305 mL, o derivado de hG-CSF quimicamente modificado (di-tipo) em que 2 moléculas de ácidos carboxílicos de polietileno glicol ligado foi eluído a entre cerca de 325 mL e cerca de 345 mL, o derivado de hG-CSF quimicamente modificado (mono-tipo) em que uma molécula dos ácidos carboxílicos de polietileno glicol ligada foi eluída entre cerca de 365 mL e cerca de 385 mL, com 6,2 mg (rendimento: 10,9%), 6,8 mg (rendimento: 11,9%), e 5,0 mg (rendimento: 8,8%).

Exemplo de referência 18

Produção de 6-(1-aminopropiloxicarboniloxi-4'-nitrofenil)-2,4-bis (o-metoxipolietilenoglicol)-s-triazina

120 mg (1,6 mmol) de 3-amino-1-propanol foi dissolvido em 200 mL de 0,1 M de tampão borato (pH 10), e 8 g (0,8 mmol) de 6-cloro-2,4-bis (o-metoxipolietilenoglicol)-s-triazina (da firma SEIKAGAKU CORPORATION) foi adicionado em gelo, e agitado a 4 °C durante a noite. A solução de reacção foi ajustada para pH 1,0 com 2 N de ácido clorídrico, e extraída com clorofórmio. Depois de se lavar duas vezes com 2 N de ácido clorídrico, a fase de clorofórmio foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, e acetona seca foi adicionada ao sólido gerador, e o sólido foi dissolvido. A referida solução de acetona foi concentrada sob pressão reduzida, e o derivado de polietileno glicol foi recristalizado por deixá-lo à temperatura ambiente, e 5,5 g da referida substância cristalina foi obtida (rendimento: 69%).

Posteriormente, 5,3 g (0,53 mmol) do referido derivado de polietileno glicol suficientemente seco foi dissolvido em 26,5 mL de cloreto de metileno seco, 0,147 mL de trietilamina foi adicionado, e 214 mg adicionais (1,06 mmol) de cloroformato de 4-nitrofenil foi adicionado, e agitado a 4 °C durante 4 horas. Posteriormente, a solução de reacção foi concentrada a 20 mL sob pressão reduzida, e adicionada gota a gota a 300 mL de éter etílico seco para gerar um precipitado. O precipitado foi lavado com éter etílico seco, e após a remoção do solvente sob pressão reduzida, recristalizado por acetato de etilo seca, e 4,6 g (0,46 mmol) do composto objectivo foi obtido através da sua secagem sob pressão reduzida (rendimento, 87%).

Exemplo de referência 19

287 mg de polietileno glicol activado M-SCM-20,000 (da firma Shearwater Polymer, Inc.) foi adicionado a 6,5 mL de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,5) contendo 29,25 mg do derivado de hG-CSF obtido no Exemplo de Referência 3, e a reacção foi realizada a 4 °C durante 6 horas, e, em seguida, a solução de reacção foi obtida por se adicionarem 35 µl de 50 mg/mL de tris(hidroximetil)aminometano. A referida solução de reacção foi carregada em uma coluna (2,5 cm x 45 cm = 220 mL) de Sephacryl S-300 (da firma Pharmacia Co., Ltd.) equilibrada com PBS a uma taxa de fluxo de 44 mL/hora e, em seguida, o PBS foi passado à mesma taxa de fluxo.

Após o início de PBS, o polipéptido de hG-CSF quimicamente modificado (di-tipo), em que 2 moléculas de ácidos carboxílicos de polietileno glicol ligado, foi eluído situando-se entre cerca de 96 mL e cerca de 104 mL, e 3,8 mg do referido di-tipo foi obtido (rendimento: 13,0%).

Exemplo de referência 20

98 mg de polietileno glicol activado SSPA-M-20,000 (da firma Shearwater Polymer Inc.) foi adicionado a 6,7 mL de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,5) contendo 28,8 mg do derivado de hG-CSF obtido no Exemplo de Referência 3, e a reacção foi realizado a 4 °C durante 24 horas e, em seguida, a solução de reacção foi obtida pela adição de 30 µl de 40 mg/mL de tris-(hidroximetil) aminometano. A referida solução de reacção foi carregada em uma coluna (2,5 cm x 45 cm = 220 mL) de Sephacryl S-300 (da firma Pharmacia Co., Ltd.) equilibrada com PBS a uma taxa de fluxo de 44 mL/hora e, em seguida, o PBS foi passado aí à mesma taxa de fluxo.

Após o início de PBS, o polipéptido de hG-CSF quimicamente modificado (tri-tipo) em que 3 moléculas de ácidos carboxílicos de polietileno glicol ligado, foi eluído situando-se entre os cerca de 78 mL e cerca de 98 mL e 2,0 mg do referido tri-tipo foi obtido (rendimento: 6,6%).

Utilização industrial

A presente invenção pode fornecer um polipéptido quimicamente modificado, em que pelo menos um grupo de amino, grupos de carboxilo, mercapto e guanidino em uma molécula de polipéptido tendo hG-CSF é quimicamente modificado, e um excelente agente de promoção da produção de plaquetas compreendendo o referido polipéptido modificado.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
<120> Acelerador do Crescimento de Plaquetas
<130> M/37274
<140> 95 909 967.2
<141> 1995-02-23
<150> JP H06-25735
<151> 1995-02-23
<160> 1
<170> Versão patenteada 3.2
<210> 1
<211> 175
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

```
Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu pro Gln Ser phe Leu Leu
1               5                  10                  15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly ASp Gly Ala Ala Leu
            20                  25                  30

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
        35                  40                  45

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
    50                  55                  60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
65                  70                  75                  80

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala leu Glu Gly Ile
                85                  90                  95

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala
            100                 105                 110

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala
        115                 120                 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
    130                 135                 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
                165                 170                 175
```

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

<120> Acelerador do Crescimento de Plaquetas

<130> M/37274

<140> 95 909 967.2

<141> 1995-02-23

<150> JP H06-25735

<151> 1994-02-23

<160> 1

<170> Versão patenteada 3.1

<210> 1

<211> 174

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
            20                  25                  30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
        35                  40                  45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
    50                  55                  60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
65                  70                  75                  80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
                85                  90                  95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
            100                 105                 110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
        115                 120                 125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
    130                 135                 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe
145                 150                 155                 160
```

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165 170

Lisboa, 23 de Outubro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um polipéptido quimicamente modificado em que pelo menos um grupo do grupo de amino, carboxilo, mercapto ou guanidino na molécula de um polipéptido que tem actividade estimuladora da colónia granulocítica humana é quimicamente modificado com um derivado de polialquileno glicol ou copolímero de estireno-ácido maleico para a produção de composições farmacêuticas para promover a produção de plaquetas dos pacientes com contagens de plaquetas diminuídas.

2. Utilização do polipéptido quimicamente modificado de acordo com a reivindicação 1 em que o polipéptido que tem actividade estimuladora da colónia granulocítica humana compreende uma sequência de aminoácido SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido seleccionada a partir dos grupos de (a) a (l):
(a) um sequência de aminoácido em que o quarto aminoácido, a leucina é substituído por ácido glutâmico, o quinto aminoácido, a glicina é substituído por lisina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;
(b) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por valina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por isoleucina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(c) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por cisteína, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por isoleucina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(d) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por tirosina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por isoleucina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(e) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por arginina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por treonina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(f) uma sequência de aminoácido em que o quarto aminoácido, a leucina é substituído por treonina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído por arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(g) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por asparagina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por ácido glutâmico, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a

prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(h) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por isoleucina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por treonina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(i) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por serina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por treonina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(j) uma sequência de aminoácido em que o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(k) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por alanina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por treonina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído por tirosina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por arginina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1; e

(l) uma sequência de aminoácido que o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina na SEQ ID NO: 1.

3. Utilização do polipéptido quimicamente modificado de acordo com a reivindicação 1 ou 2 em que um derivado de polialquileno glicol é um derivado de polietileno glicol, um derivado de polipropilenoglicol, ou derivado de copolímero de polietileno glicol-polipropilenoglicol.

4. Utilização do polipéptido quimicamente modificado de acordo com a reivindicação 1 ou 2 em que o agente de modificação químico do grupo amino é derivado de polialquileno glicol tendo a fórmula (I):

$$R^1(M)_n\text{-}X\text{-}R^2 \quad (I)$$

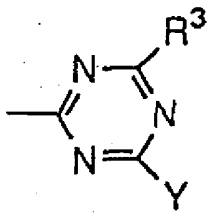
em que R^1 representa um grupo de alquilo ou de alcanoílo; M representa a fórmula:

$$-OCH_2CH_2-,\ -OCH_2CH_2CH_2-,$$

ou

$$-(OCH_2CH_2)_r-(OCH_2CH_2CH_2)_s-$$

em que r e s têm quaisquer valores integrais positivos variáveis, que são os mesmos ou diferentes; n tem quaisquer valores integrais positivos variáveis; X representa uma ligação singular, O, NH, ou S; e R^2 representa a fórmula:



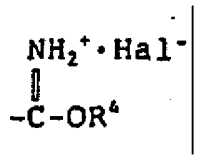
em que R^3 representa OH, halogéneo, ou a fórmula:

$$-X^a-(M^a)_{na}-R^{1a}$$

em que X^a, M^a R^{1a} e na têm o mesmo significado que o X, M, R^1 e n, acima mencionados, respectivamente, e Y representa halogéneo ou a fórmula:

$$-Z-(CH_2)_p-(O)_m-W$$

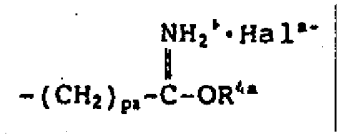
em que Z representa O, S, ou NH; W representa um grupo de carboxilo, um seu derivado activo, ou a fórmula:



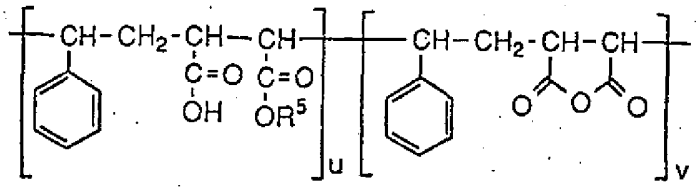
em que R^4 representa um grupo de alquilo; e Hal representa halogéneo, e p tem um valor integral de 1 a 6; e m tem um valor de 0 ou 1,

$$-(CO)_{ma}-(CH_2)_t-W^a$$

em que W^a e ma têm o mesmo significado como o W e m acima mencionados, respectivamente; e t tem um valor integral de 0 a 6, ou



em que Hal^a, pa e R^{4a} têm o mesmo significado que o Hal, p e R^4, acima mencionados, respectivamente, e os copolímeros de estireno-ácido maleico têm a fórmula (II):



(II)

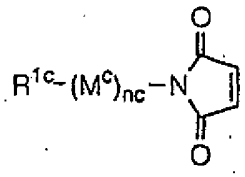
em que u e v têm quaisquer valores integrais positivos variáveis, que são os mesmos ou diferentes; e R^5 representa um átomo de hidrogénio, ou um grupo de alquilo.

5. Utilização do polipéptido quimicamente modificado de acordo com a reivindicação 1 ou 2 em que o agente de modificação químico do grupo de carboxilo é um derivado de polialquileno glicol que tem a fórmula (III):

$$R^{1b}-(M^b)_{nb}-NH_2 \qquad (III)$$

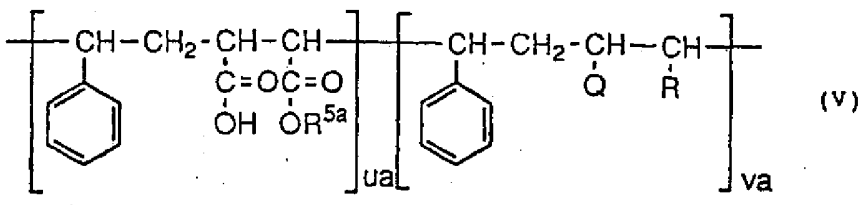
em que M^b, R^{1b} e nb têm os mesmos significados que o M, R^1 e n, acima mencionados, respectivamente.

6. Utilização do polipéptido quimicamente modificado de acordo com a reivindicação 1 ou 2 em que o agente de modificação químico do grupo de mercapto é um derivado de polialquileno glicol que tem a fórmula (IV):



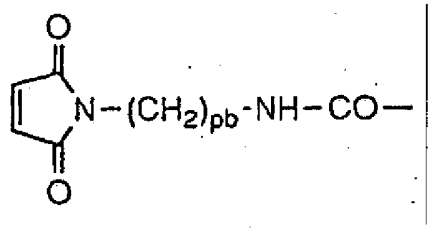
(IV)

em que M^c, R^{1c}, e nc têm os mesmos significados que o M, R^1 e n, acima mencionados, respectivamente, e os copolímeros de estireno-ácido maleico têm a fórmula (V):



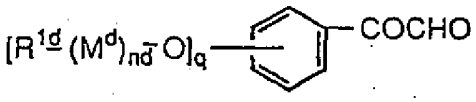
(V)

em que R^{5a}, ua, e va têm os mesmos significados que R^5 , U, e V, acima identificados, respectivamente, e um de Q e R representa um grupo de carboxilo, e o outro representa a fórmula:



em que pb tem o mesmo significado que o p acima identificado.

7. Utilização do polipéptido quimicamente modificado de acordo com a reivindicação 1 ou 2 em que o agente de modificação químico do grupo de guanidino é um derivado de polialquileno glicol que tem a fórmula (VI):



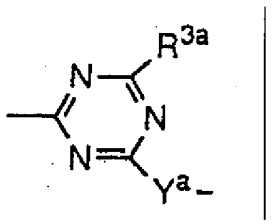
(VI)

em que q tem um valor de 1, ou 2, e M^d, R^{1d}, e nd têm os mesmos significados que M, R^1, e n, acima identificados, respectivamente.

8. Utilização de um polipéptido quimicamente modificado para a produção de composições farmacêuticas para promover a produção de plaquetas dos pacientes com contagens diminuídas de plaquetas em que pelo menos um dos grupos amino na molécula do polipéptido que tem actividade estimuladora de colónia granulocítica humana está ligado a um grupo representado pela seguinte fórmula (Ia)

$$R^1-(OCH_2CH_2)_n-X-R^{2a}- \quad (Ia)$$

em que R^1 representa um grupo de alquilo ou de alcanoílo; n tem qualquer valor integral positivo variável; X representa uma ligação singular, O, NH, ou S; e R^{2a} representa a fórmula:



em que R^{3a} representa OH, halogéneo, ou a fórmula:

$$-X^a-(M^a)_{nn}-R^{1a}$$

em que X^a, R^{1a} e na têm o mesmo significado que o X, R^1 e n, acima mencionados, respectivamente; M^a representa a fórmula:

$$-OCH_2CH_2-,\ -OCH_2CH_2CH_2-,$$

ou

$$-(OCH_2CH_2)_r-(OCH_2CH_2CH_2)_s-$$

em que r e s têm quaisquer valores integrais positivos variáveis, que são os mesmos ou diferentes; e Y^a representa uma ligação singular, a fórmula

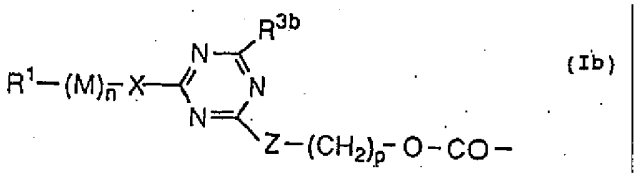
$$-Z-(CH_2)_p-(O)_m-CO-$$

em que Z representa O, S, ou NH; p tem um valor integral de 1 a 6; e m tem um valor de 0 ou 1,

$$-(CO)_{ma}-(CH_2)_t-CO-$$

em que ma é idêntico ao referido m; e t tem um valor integral de 0 a 6.

9. Polipéptido quimicamente modificado compreendendo um polipéptido que tem actividade estimuladora de colónia granulocítica humana em que pelo menos um grupo amino na molécula está ligado a um grupo da fórmula (Ib):



(Ib)

em que R^1 representa um grupo de alquilo ou de alcanoílo; M representa a fórmula:

$$-OCH_2CH_2-,\ -OCH_2CH_2CH_2-$$

ou

$$-(OCH_2CH_2)_r-(OCH_2CH_2CH_2)_s-$$

em que r e s têm quaisquer valores integrais positivos variáveis, que são os mesmos ou diferentes; n tem qualquer valor integral positivo variável; X representa uma ligação singular, O, NH, ou S; R^{3b} representa OH, halogéneo, ou a fórmula:

$$-X^a-(M^a)_{na}-R^{1a}$$

em que X^a, M^a R^{1a} e na têm o mesmo significado que o X, M, R^1 e n, acima mencionados, respectivamente, Z representa O, S ou NH; e p tem uma valor integral de 1 a 6.

10. Polipéptido quimicamente modificado de acordo com a reivindicação 9 em que o polipéptido que tem actividade

estimuladora da colónia granulocítica humana compreende uma sequência de aminoácido SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido seleccionada a partir dos grupos de (a) a (l):

(a) um sequência de aminoácido em que o quarto aminoácido, a leucina é substituído por ácido glutâmico, o quinto aminoácido, a glicina é substituído por lisina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(b) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por valina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por isoleucina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(c) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por cisteína, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por isoleucina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(d) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por tirosina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por isoleucina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(e) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por arginina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por treonina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(f) uma sequência de aminoácido em que o quarto aminoácido, a leucina é substituído por treonina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído por arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(g) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por asparagina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por ácido glutâmico, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(h) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por isoleucina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por treonina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(i) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por serina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por treonina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina, o sexto aminoácido, a

prolina é substituído por serina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(j) uma sequência de aminoácido em que o quinto aminoácido, a glicina é substituído pela arginina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1;

(k) uma sequência de aminoácido em que o segundo aminoácido, a treonina é substituído por alanina, o quarto aminoácido, a leucina é substituído por treonina, o quinto aminoácido, a glicina é substituído por tirosina, o sexto aminoácido, a prolina é substituído por arginina e, o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina, respectivamente, na SEQ ID NO: 1; e

(l) uma sequência de aminoácido que o décimo oitavo aminoácido, a cisteína é substituído por serina na SEQ ID NO: 1.

11. Composição para tratar, os doentes com contagens diminuídas de plaquetas, que compreende o polipéptido quimicamente modificado de acordo com a reivindicação 9 ou 10, na forma de dosagem farmaceuticamente aceitável com um portador farmaceuticamente aceitável.

12. Utilização do polipéptido quimicamente modificado de acordo com a reivindicação 10 para a produção de composições farmacêuticas para promover a produção de plaquetas dos pacientes com contagens diminuídas de plaquetas.

Lisboa, 23 de Outubro de 2008