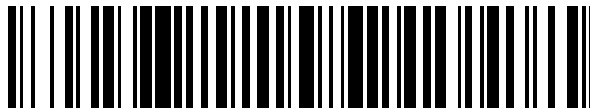


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 863**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/535** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2006 E 09010623 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2174951**

54 Título: **Mutante de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y polipéptido químicamente del mismo**

30 Prioridad:

**20.07.2005 KR 20050065746**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**12.11.2013**

73 Titular/es:

**MOGAM BIOTECHNOLOGY RESEARCH  
INSTITUTE (100.0%)  
341 POJUNG-DONG, KIHEUNG-KU  
YONGIN-SI, KYONGGI-DO 446-799, KR**

72 Inventor/es:

**KANG, KWAN-YUB y  
HONG, JEONG-WOON**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 428 863 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Mutante de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y polipéptido conjugado químicamente del mismo.

## Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un mutante de factor estimulante de colonias de granulocitos humano (G-CSF) y a un conjugado químico del mismo como adyuvante en el tratamiento del cáncer para inhibir la leucocitopenia estimulando la formación de colonias de granulocitos neutrófilos a partir de células de médula ósea cuando se administra un fármaco anticancerígeno, e induciendo la diferenciación de las células de médula ósea hasta el estadio final, y más particularmente, a un mutante de factor estimulante de colonias de granulocitos humano (G-  
10 CSF) modificado mediante inserción de un aminoácido en un sitio específico en el G-CSF y un conjugado químico del mismo con un polímero no proteico tal como polietilenglicol (PEG).

## Técnica anterior

15 Las actividades hematopoyéticas humanas se llevan a cabo principalmente en la médula ósea y se producen diversas clases de células sanguíneas a través de una variedad de rutas complejas. Las actividades hematopoyéticas están controladas por glicoproteínas específicas, que se denominan generalmente factores estimulantes de colonias (CSF). Los CSF se han identificado y distinguido según sus actividades. Es decir, los CSF, que sirven como factores de crecimiento cuando se cultivan células sanguíneas en medios semisólidos, estimulan la formación clonal de monocitos, granulocitos u otras células hematopoyéticas. Por ejemplo, el CSF de granulocitos (G-CSF) y el CSF de macrófagos (M-CSF) estimulan la formación *in vitro* de colonias de granulocitos neutrófilos y macrófagos, respectivamente mientras que CSF múltiple, también conocido como interleucina-3 (IL-3), estimula la  
20 proliferación clonal de diversos tipos de células sanguíneas y de tejidos, tales como granulocitos, macrófagos, megacariocitos, glóbulos rojos o similares.

25 Específicamente, se sabe que el G-CSF, que es una citocina de instrucción de la división y diferenciación de células madre intermedulares y leucocitos fuera de la médula ósea, fomenta la actividad fagocítica de los neutrófilos estimulando la diferenciación y/o proliferación de células progenitorias neutrófilas y activando los neutrófilos maduros, y la reactividad de factores quimiotácticos ((Metcalfe, *Blood*) 67:257 (1986); (Yan, *et al.*, *Blood*) 84(3): 795-799 (1994); (Bensinger, *et al.*, *Blood*) 81(11):3158-3163(1993); (Roberts, *et al.*, *Expt'l Hematology*) 22:1156-1163 (1994); (Neben, *et al.*, *Blood*) 81(7): 1960-1967 (1993)).

30 El tratamiento de tumores malignos se realiza generalmente mediante radioterapia y/o quimioterapia, lo que da como resultado de manera indeseable una reducción brusca de los leucocitos y una disminución de la inmunidad que se produce como consecuencia de la reducción de leucocitos, provocando de ese modo importantes inconvenientes cuando el tratamiento terapéutico mediante radioterapia y/o quimioterapia se realiza a lo largo de un periodo prolongado de tiempo. Inicialmente se notificaron los G-CSF como adyuvantes que podían tratar de manera eficaz el cáncer activando la capacidad de inmunización de un paciente (Lopez *et al.*, *J. Immunol.* 131(6):2983-2988, 1983; Platzer *et al.*, *J. Exp. Med.* 162:1788-1801, 1985), y actualmente se usan eficazmente para el tratamiento de una  
35 variedad de cánceres y leucemia intratable.

40 La investigación de los G-CSF comenzó inicialmente con el hallazgo de que están presentes materiales de CSF de granulocitos en el medio de cultivo de la línea celular de carcinoma humano CHU-2 (Nomura *et al.*, *EMBO J.* 8(5):871-876, 1986) o línea celular de carcinoma de vejiga humano 5637 (Welte *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1526- 1530, 1985; Strige *et al.*, *Blood* 69(5): 1508-1523, 1987), y se purificó una proteína que tiene actividad de estimulación de colonias de granulocitos que tiene un peso molecular de 18 a 19 kDa (Nomura *et al.*, *EMBO J.* 5(5):871-876, 1986).

45 En primer lugar se aislaron los ADNc de G-CSF a partir de la línea celular de carcinoma de vejiga humano 5673 por L.M. Souza *et al.* (*Science*, 232 : 61-65(1986) (véase la publicación de patente coreana n.º 1998-77885), y luego se clonaron a partir de bibliotecas de ADNc de línea celular de carcinoma escamoso y macrófagos de sangre periférica (S. Nagata *et al.*, *Nature*, 319: 415-417 (1986); S. Nagata *et al.*, *EMBO J.*, 5: 575-581 (1986); Y. Komatsu *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 78: 1179-1181 (1987)).

50 Con la llegada de la tecnología génica recombinante, se reveló que se producen G-CSF como cuerpos de inclusión insolubles en el transcurso de la expresión de una gran cantidad de G-CSF a partir de *Escherichia coli* y se convirtieron en G-CSF activos mediante replegamiento. El G-CSF recombinante (rG-CSF) producido a partir de *E. coli* comprende una proteína identificada en SEQ ID NO:2 (175 aminoácidos), es decir, un G-CSF natural (174 aminoácidos) identificado en SEQ ID NO:1 y metionina N-terminal, y tiene un peso molecular de aproximadamente 19 kDa. Además, el G-CSF natural tiene un sitio de O-glicosilación en un aminoácido treonina (Thr) en la posición n.º 133 mientras que el rG-CSF derivado de *E. coli* no tiene ningún sitio de glicosilación. Sin embargo, se sabe que la  
55 presencia o ausencia del sitio de glicosilación y/o la metionina N-terminal tiene poco efecto sobre la actividad biológica (Souza *et al.*: *Science* 232, 1986, 61).

Los agentes terapéuticos de proteína biológica tales como G-CSF tienen ventajosamente alta selectividad y baja

toxicidad mientras que presentan un corto tiempo de retención *in vivo* y son inestables. Para superar tales inconvenientes, se ha desarrollado un método de conjugación de polímeros biocompatibles, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA) o polivinilpirrolidona, a proteínas biológicas (polipéptidos), por ejemplo, G-CSF o interferón. Una conjugación con PEG de este tipo impide la degradación de proteínas biológicas inhibiendo eficazmente las proteasas, aumenta la estabilidad y semivida de un agente terapéutico de proteína biológica impidiendo la excreción rápida del agente terapéutico de proteína biológica desde el riñón, y reduciendo la inmunogenicidad (Sada *et al.* J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139(1991)). Los documentos US 2003/0171284 y US 2004/0175800 también tratan de la pegilación de proteínas de la superfamilia de genes de la hormona de crecimiento.

En particular, los ejemplos de los agentes terapéuticos de proteína pegilada incluyen una formulación pegilada de adenosina diaminasa desarrollada como agente terapéutico de inmunodeficiencia combinada; una formulación pegilada de interferón desarrollada como agente terapéutico de hepatitis; formulaciones pegiladas de glucocerebrosidasa y hemoglobina, etcétera.

Además de PEG, generalmente se usan copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (o bien homopolímeros o bien copolímeros al azar) en el acoplamiento químico del agente terapéutico de proteína.

Dado que el PEG, que es un compuesto polimérico que tiene una fórmula general: HO-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-H, es sumamente hidrófilo, se une con una proteína para su uso en aplicaciones médicas, aumentando de ese modo la solubilidad. El PEG que se une a la proteína tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 100.000. Si el peso molecular de PEG supera 1.000, el PEG tiene significativamente baja toxicidad. Los PEG que tienen un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 6.000 están presentes sistémicamente y se metabolizan a través del riñón. En particular, los PEG ramificados que tienen un peso molecular de aproximadamente 40.000 están presentes en órganos tales como la sangre, el hígado, o similares, y se metabolizan a través del riñón.

La patente estadounidense n.º 4.179.337 da a conocer una composición de polipéptido soluble en agua, no inmunogénica, fisiológicamente activa que tiene polipéptidos acoplados a polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG) que tienen un peso molecular de 500 a 20.000 daltons. Para acoplar el PEG a un polipéptido, generalmente se usa un PEG activado. El PEG activado se prepara convirtiendo un grupo hidroxilo terminal del PEG en un grupo metil éter y el otro grupo hidroxilo terminal en un grupo electrófilo, acoplando de ese modo el PEG al polipéptido a través del grupo electrófilo. Sin embargo, puesto que una reacción de acoplamiento químico de este tipo es no específica, el componente pegilado en el sitio activo de la proteína, es decir, el polipéptido, reduce de manera indeseable la actividad de la proteína, de lo que se encuentra un ejemplo a partir del interferón- $\alpha$  pegilado, desarrollado por Roche y Schering. Un conjugado de PEG del interferón- $\alpha$  desarrollado por Roche y Schering es un conjugado en el que se combina una molécula de PEG con una molécula de interferón- $\alpha$ . Aunque la conjugación con PEG aumentó la semivida *in vivo* del interferón- $\alpha$  pegilado, se acoplan los PEG a diversos sitios del interferón- $\alpha$ , reduciendo de ese modo considerablemente la actividad biológica.

Los ejemplos de PEG activados usados comúnmente incluyen (a) PEG-diclorotriazina, (b) tresilato de PEG, (c) succinimidil-carbonato de PEG, (d) benzotriazol-carbonato de PEG, (e) p-nitrofenil-carbonato de PEG, (f) triclorofenil-carbonato de PEG, (h) succinimidil-succinato de PEG, y similares (M.J. Roberts, M.D. Bentley, J.M. Harris, Chemistry for peptide and protein PEG conjugation, Advanced Drug Delivery Reviews 54 (2002) 459-476). Puesto que la reacción de acoplamiento químico es no específica, puede producirse un multímero que tiene múltiples PEG unidos al mismo o un isómero que tiene PEG unidos a diferentes sitios del mismo. El multímero y el isómero reducen la actividad biológica del producto pegilado, hacen difíciles una medición farmacocinética precisa y el proceso de purificación de la conjugación con PEG.

Para superar estos problemas, la patente estadounidense n.º 5.766.897 y el documento WO 00/42175 dan a conocer un método de acoplamiento selectivo de PEG a un residuo de cisteína (Cys) de proteína usando PEG-maleimida. Es necesaria una cisteína libre que no esté asociada con enlaces disulfuro para acoplar el PEG a la proteína a través de una conjugación con PEG específica de cisteína. En el G-CSF que contiene 5 cisteínas, se forman enlaces disulfuro entre las cisteínas en las posiciones 36 y 42 (basado en el G-CSF natural) y entre las cisteínas en las posiciones 64 y 74 (basado en el G-CSF natural), mientras que la cisteína en la posición 17 es una cisteína libre. La formación de los dos enlaces disulfuro entre la cisteína en la posición 36 y la cisteína en la posición 42 y entre la cisteína en la posición 64 y la cisteína en la posición 74 es importante de manera crítica en la construcción de G-CSF natural y el mantenimiento de la actividad biológica de G-CSF. Dado que la actividad biológica de G-CSF no se ve gravemente afectada por la sustitución de la cisteína en la posición 17, la cisteína en la posición 17, por serina, la construcción de G-CSF natural y la actividad biológica de G-CSF no pueden atribuirse a la sustitución de la cisteína en la posición 17 por serina (Winfield *et al.*: Biochem. J. 256, 1988, 213). Sin embargo, Piget *et al.* ha notificado que la cisteína en la posición 17 puede formar enlaces disulfuro intermoleculares o enlaces disulfuro intramoleculares según las condiciones de reacción, impidiendo de ese modo el replegamiento y disminuyendo la actividad biológica y la estabilidad de G-CSF (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 1986, 7643).

Mientras tanto, se ha notificado que la sustitución de la cisteína en la posición 17 de G-CSF, que es la única cisteína libre presente en G-CSF (Kyowa Hakko, Tokio, Japón), por serina produce un pequeño cambio en la actividad biológica de G-CSF (véase el registro de patente coreana n.º 10-0114369).

5 Uno de los agentes terapéuticos a modo de ejemplo desarrollados usando G-CSF mutante es Neu-up® (nombre del componente: nartograstim) fabricado por Kyowa Hakko, Tokio, Japón. Según se notifica, el G-CSF mutante mostró una actividad notablemente alta y una semivida *in vivo* más larga en comparación con G-CSF natural. Sin embargo, no se ha notificado aún ningún beneficio clínico del G-CSF mutante.

Un producto pegilado de la conjugación específica N-terminal entre G-CSF y PEG, denominado PEG-G-CSF, estaba disponible comercialmente de Amgen, Inc. (Neulasta®, pegfilgrastim).

10 El desarrollo de G-CSF mutante para conjugaciones químicas se ha propuesto por Maxygen Inc. (documento PCT/DK2001/00011). Según la publicación propuesta, sin embargo, no se han descrito bien las características del G-CSF mutante y los PEG-G-CSF producidos a partir del mismo. Los mutantes pueden prepararse de diversas maneras. Es decir, existen varios miles a varias decenas de miles de posibles mutantes según la selección de la ubicación de mutación, tipo de mutación (inserción, sustitución, delección), extensión de mutación (fragmento de ~ 1-  
15 2 residuos), y combinaciones de los mismos, y diferirían sus propiedades biológicas y propiedades fisicoquímicas para los respectivos casos. Aparentemente, diferirían los conjugados químicos producidos a partir de los mutantes.

20 Generalmente, la preparación de mutantes para formar enlaces químicos se diseña basándose en el conocimiento de sus estructuras. Según Osslund *et al.* (patente estadounidense n.º 5.581.476), se seleccionan los sitios de unión basándose en residuos accesibles, y se selecciona un sitio de unión que no se ve interferido por los enlaces químicos de una estructura en la que una molécula de G-CSF se conecta a un receptor de G-CSF para limitar el número de mutantes diana, seleccionando de ese modo los mutantes que van a estar sometidos realmente a la formación de enlaces químicos. Sin embargo, la selección de la posición de mutación con el conocimiento de la estructura de tal manera lo contemplará fácilmente un experto en la técnica.

25 Durante la adición e inserción asociadas con la mutación, el número de residuos añadidos e insertados y el carácter de la mutación (es decir, el tipo de residuos para la mutación) afectan considerablemente a la actividad biológica del mutante. El intercambio de un residuo hidrófobo y un residuo hidrófilo o el intercambio de un gran número de residuos y un pequeño número de residuos tiene un efecto sustancial sobre la estructura del mutante. Un experto en la técnica puede especular fácilmente con que tal efecto estructural conduciría a un cambio considerable en la actividad biológica y la estabilidad de G-CSF. Particularmente, la inducción de cisteína libre en G-CSF ejerce un efecto considerable sobre la estabilidad de proteína, tal como proponen Freeman ML *et al.* (Destabilization and  
30 denaturation of cellular protein by glutathione depletion, Cell Stress Chaperones. 1997 Sep; 2 (3): 191-8).

## Descripción

### Problema técnico

35 Para resolver los problemas anteriores, es un objetivo de la presente invención proporcionar un mutante de un factor estimulante de colonias de granulocitos humano (G-CSF) de cisteína inducida, que facilita la conjugación específica con un polímero biocompatible tal como polietilenglicol (PEG) induciendo la cisteína en un sitio específico de G-CSF, aumenta su tiempo de retención *in vivo* sin reducir la actividad biológica *in vivo* debido a la conjugación con el polímero biocompatible, ampliando de ese modo en última instancia la actividad biológica *in vivo*, y polipéptidos conjugados biocompatibles del mismo.

### 40 Solución técnica

El mutante de G-CSF y el conjugado químico del mismo según la presente invención se describirán ahora en mayor detalle.

45 En la presente invención, se expresa G-CSF que se produce de manera natural mediante SEQ ID NO: 1, y se expresa G-CSF recombinante (rG-CSF) mediante SEQ ID NO:2. A menos que se especifique de otro modo, el término G-CSF usado en la presente invención engloba tanto G-CSF natural como G-CSF recombinante.

50 Para lograr el objetivo de la presente invención, se proporciona un mutante de un factor estimulante de colonias de granulocitos humano (G-CSF). El mutante descrito comprende la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO:3, en el que un residuo de treonina (Thr) en la posición 133 de G-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO:1, se sustituye por un residuo de cisteína (Cys), y el residuo de Cys sustituido se une a un compuesto químico no proteico, para su uso en la inhibición de la leucocitopenia o para su uso como adyuvante en el tratamiento del cáncer.

Además, la presente descripción describe un mutante de un G-CSF, en el que un residuo de treonina (Thr) en la posición 133 de G-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO: 1, se sustituye por un residuo de cisteína (Cys), y se modifica un compuesto químico no proteico en el residuo de Cys sustituido.

- 5 La presente descripción también describe un mutante conjugado de un G-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO:4, en el que SEQ ID NO:4 tiene la secuencia de aminoácidos en que un residuo de treonina (Thr) en la posición 133 de G-CSF identificado en SEQ ID NO: 1 se sustituye por un residuo de cisteína (Cys), y el residuo de cisteína (Cys) en la posición 17 en SEQ ID NO:1 se sustituye por serina (Ser), y se modifica el compuesto químico no proteico en el residuo de cisteína sustituido en la posición 133.
- 10 El compuesto químico no proteico es un polímero biocompatible activado que va a conjugarse químicamente con un grupo tiol de cisteína en la posición 133 y es preferiblemente un compuesto de una clase seleccionada del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), ácido policarboxílico y polivinilpirrolidona, que se une con una clase seleccionada del grupo que consiste en maleimida, vinilsulfona, yodoacetamida y disulfuro de ortopiridilo. Más preferiblemente, el compuesto químico no proteico es un polímero biocompatible de PEG-maleimida.
- 15 Además, el compuesto químico no proteico preferiblemente tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 kDa, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 kDa.
- 20 En otro aspecto, la invención proporciona un mutante de un factor estimulante de colonias de granulocitos humano (G-CSF), comprendiendo el mutante la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO:5, en el que se inserta un residuo de cisteína (Cys) entre un residuo de glicina (Gly) en la posición 135 y un residuo de alanina (Ala) en la posición 136 del G-CSF que tiene la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO:1.
- 25 La presente descripción también proporciona un mutante conjugado de un G-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO:5, en el que se inserta un residuo de cisteína (Cys) entre un residuo de glicina (Gly) en la posición 135 y un residuo de alanina (Ala) en la posición 136 del G-CSF que tiene la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO:1, y se modifica un compuesto químico no proteico en el residuo de cisteína insertado.
- 30 La presente descripción también proporciona un mutante conjugado de un G-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO:6, en el que se inserta un residuo de cisteína (Cys) entre un residuo de glicina (Gly) en la posición 135 y un residuo de alanina (Ala) en la posición 136 de G-CSF que comprende la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO:1, y un residuo de cisteína en la posición 17 se sustituye por un residuo de serina (Ser), y se modifica un compuesto químico no proteico en un residuo de cisteína (Cys) insertado en la posición 136.
- 35 El compuesto químico no proteico es un polímero biocompatible activado que va a conjugarse químicamente con un grupo tiol de cisteína en la posición 133 y es preferiblemente un compuesto de una clase seleccionada del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), ácido policarboxílico y polivinilpirrolidona, que se une con una clase seleccionada del grupo que consiste en maleimida, vinilsulfona, yodoacetamida y disulfuro de ortopiridilo. Más preferiblemente, el compuesto químico no proteico es un polímero biocompatible de PEG-maleimida.
- 40 Además, el compuesto químico no proteico preferiblemente tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 kDa, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 kDa.
- 45 El mutante de G-CSF útil en la práctica de esta invención puede ser una forma aislada de organismos mamíferos o, alternativamente, un producto de procedimientos de síntesis química, o de la expresión en huéspedes procariotas o eucariotas de secuencias de ADN exógenas obtenidas mediante clonación de ADNc o genómico o mediante síntesis de ADN. Los huéspedes procariotas adecuados incluyen diversas bacterias (por ejemplo, *E. coli*); los huéspedes eucariotas adecuados incluyen células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*) y de mamífero (por ejemplo, células de ovario de hámster chino, células de mono). Dependiendo del huésped empleado, el producto de expresión de G-CSF puede estar glicosilado o no glicosilado. El producto de expresión de G-CSF también puede incluir un residuo de aminoácido de metionina inicial. El mutante de G-CSF puede producirse a partir de organismos mamíferos transgénicos y puede obtenerse a partir de la leche, sangre u orina de vacas, ovejitas, cerdos, conejos, cabras y diversas especies de animales mamíferos. Para unir PEG a una cisteína libre inducida, es necesario preparar un mutante de un G-CSF que tiene una cisteína libre inducida en una posición en la que la pegilación se realiza fácilmente y se mantiene la actividad biológica incluso tras la unión de PEG. Para lograr este fin, los inventores de la presente invención indujeron una cisteína libre en una región de bucle CD estructuralmente flexible mediante sustitución o inserción, y conjugaron PEG a la cisteína libre inducida para producir G-CSF mutante. Luego, seleccionaron los mutantes de conjugados PEG-G-CSF que mantenían su actividad biológica y estabilidad estructural en el transcurso de la pegilación.
- 55 En la estructura de difracción de rayos X de G-CSF(PDB ID, 1bgc), se considera que la región de bucle CD es considerablemente flexible y que no ejerce un efecto grave sobre la estructura global de G-CSF. Por consiguiente, los presentes inventores prepararon mutantes que tenían cisteína inducida en el bucle CD (Gly<sup>126</sup>-Ser<sup>143</sup>) de rG-CSF identificado en SEQ ID NO:2. Tal como se observa a partir de varias estructuras cristalinas de rayos X (PDB ID,

lbgc), se esperaba que la región de bucle CD fuera una región flexible, poco clara estructuralmente, de modo que pudiera amortiguarse un cambio estructural debido a la pegilación. Además, los inventores pudieron predecir que la región de bucle CD sería una zona en la que los materiales poliméricos serían fácilmente accesibles debido a que tenía suficientes sitios externos para modificaciones químicas. Además, la región de bucle CD tenía una estructura de unión a receptor sin una región solapante con un receptor, lo que es ventajoso para formar enlaces químicos.

De tal manera, los inventores de la presente invención prepararon mutantes que tenían cisteína inducida en la región de bucle CD (126-Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser-143: SEQ ID NO:2) y luego seleccionaron los mutantes de conjugados PEG-G-CSF durante la pegilación. Los mutantes de cisteína inducida resultantes mostraron considerables diferencias en la estabilidad y el rendimiento de conjugación con PEG según la posición de inducción. Algunos mutantes mostraron alta estabilidad y altos niveles en la eficacia de expresión y purificación a la vez que mostraban escaso rendimiento de conjugación con PEG, lo que sugería que la conjugación con PEG no se realiza fácilmente en el microentorno alrededor del cual se producen las mutaciones debido a impedimento estérico o el efecto de los residuos cercanos. Además, algunos mutantes que tenían inestabilidad eran bastante difíciles de expresar y purificar, dando como resultado la formación de precipitados en una etapa de purificación.

Uno de los méritos esperados por la conjugación con PEG de G-CSF mutante de cisteína inducida es la precisión de la conjugación con PEG. La conjugación con PEG a lisina o la amina N-terminal de una proteína se lleva a cabo a través de (a) PEG-diclorotriazina, (b) tresilato de PEG, (c) succinimidil-carbonato de PEG, (d) benzotriazol-carbonato de PEG, (e) p-nitrofenil-carbonato de PEG, (f) triclorofenil-carbonato de PEG, (g) PEG-carbonilimidazol, y (h) succinimidil-succinato de PEG. La conjugación con PEG anterior es no específica y se conjugan el doble o más PEG equivalentes a lisina o amina N-terminal de la proteína. Aunque se conjuguen los mismos PEG equivalentes, se producen isómeros regionales que se conjugan a la posición al azar. Entonces, estos procedimientos aumentan el tiempo y el coste para deleccionar los conjugados producidos (MJ. Roberts *et al.*, Chemistry for peptide and protein PEG conjugation, Advanced Drug Delivery Reviews 54 (2002), 459-476). Otro mérito de la conjugación con PEG es seleccionar opcionalmente sitios de unión de PEG. Los sitios de unión de PEG son exhaustivos, incluyendo lisina, aspartato, glutamato, alfa-amina, carboxilo, etcétera. Por consiguiente, si un sitio de unión de PEG es una parte estructuralmente importante que afecta a la actividad, la conjugación con PEG puede degradar significativamente la actividad. Desde este punto de vista la pegilación específica por inducción de cisteínas se usaría ventajosamente en el desarrollo de conjugados de PEG para mantener la actividad biológica.

Puesto que un grupo tiol libre es sumamente reactivo, se oxida rápidamente (Rigo A *et al.*, Interaction of copper with cysteine: stability of cuprous complexes and catalytic role of cupric ions in anaerobic thiol oxidation, J Inorg Biochem. 2004, 98(9), 1495-501). Sin embargo, en algún caso, los residuos de tiol libre pueden formar enlaces disulfuro. Para producir la modificación química, los grupos tiol libre inducidos en una superficie de proteína pueden formar enlaces disulfuro intermoleculares, lo que da como resultado una oxidación o sedimentación secundaria, desactivando de ese modo la modificación química (Crow MK, *et al.*, Protein aggregation mediated by cysteine oxidation during the stacking phase of discontinuous buffer SDS-PAGE, Biotechniques 2001, 30(2), 311-6). Tal fenómeno indeseable se vuelve grave cuando los sitios de residuos de cisteína inducida se exponen al exterior. Por tanto, la selección de sitios de inducción de cisteína para una modificación química específica basada sólo en el conocimiento de la estructura puede encontrarse con graves problemas, por ejemplo, inestabilidad de la proteína debido a la cisteína libre (Grzegorz Bulaj, Formation of disulfide bonds in proteins and peptides, Biotechnology Advances 23 (2005) 87-92).

La mayor parte del G-CSF mutante de cisteína inducida preparado en la presente invención demostró baja eficacia de expresión y purificación. Para resolver el problema de inestabilidad de la proteína que tiene residuos de cisteína libre, COX G. N. *et al.* emplearon métodos concebidos especialmente para superar el problema de inestabilidad para la preparación de mutantes de cisteína inducida, tal como se describe en el documento WO 00/42175. Aunque tales métodos intentados mitigaban bastante la inestabilidad intrínseca de los mutantes de cisteína libre inducida, son bastante difíciles de aplicar a procesos de producción prácticos. Por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 00/42175, la expresión intracelular de una proteína es ventajosa para lograr la estabilidad de un mutante de cisteína inducida. Sin embargo, para purificar un mutante de cisteína inducida, el mutante de cisteína inducida debe secretarse en un espacio extracelular. El principio de la invención descrita en el documento WO 00/42175 reside en que se mantiene la estabilidad extracelular manteniendo el nivel de potencial redox constante usando un agente de acoplamiento redox, etc. Sin embargo, es bastante difícil mantener el potencial redox a un nivel constante a lo largo de un periodo prolongado de tiempo, particularmente durante una etapa de purificación. Sin embargo, en la presente invención, se prepararon selectivamente mutantes de cisteína inducida compatibles con las etapas generales de pegamiento y purificación, confirmando que los mutantes de cisteína inducida según la presente invención mantienen la estabilidad estructural incluso si tienen residuos de cisteína libre. El G-CSF mutante de cisteína inducida seleccionado en la presente invención se expresa en *E. coli*. como cuerpos de inclusión y se transforma en G-CSF mutante activo mediante la técnica de replegamiento general. La técnica de replegamiento general se realiza mediante la solubilización de un cuerpo de inclusión en urea o sal de guanidinio y eliminando la urea o sal de guanidinio mediante dilución o deleción para proporcionar la actividad biológica. Según la presencia o ausencia de enlaces disulfuro en la proteína, puede añadirse un agente de acoplamiento redox (forma o bien oxidada o bien reducida glutatión o cisteína) a la etapa de replegamiento (Ronald W *et al.*, Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation, Biotechnology Advances 23 (2005) 75-80). En la presente invención, se realizó el

replegamiento de la siguiente manera. Es decir, se disolvió preferiblemente el cuerpo de inclusión del G-CSF mutante de cisteína inducida en urea 6-8 M y se diluyó con urea 2-4 M en presencia de glutatión para replegarlos.

El polímero de PEG usado para la conjugación no tiene limitación particular sobre el peso molecular pero preferiblemente tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 2 kDa a 100 kDa, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10 kDa a 60 kDa. Se usa un método de acoplamiento de PEG-maleimida como polímero biocompatible a un residuo de tiol de cisteína inducida de G-CSF de cisteína inducida en la presente invención. Es decir, G-CSF se hizo reaccionar con PEG-maleimida de 20 kDa o 30 kDa para preparar el conjugado PEG-G-CSF de 20 kDa o 30 kDa.

En la reacción de conjugación con PEG de polímero biocompatible al residuo de tiol de G-CSF de cisteína inducida, la razón molar de PEG con respecto a G-CSF estaba preferiblemente en la razón de 2:1 a 200:1, y la temperatura de reacción estaba preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0 a aproximadamente 60°C. La reacción se llevó a cabo preferiblemente a un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,7, y el tiempo de reacción estaba preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. Tras realizar la pegilación en el método descrito en la presente invención, la conjugación entre PEG y G-CSF mutante se identificó mediante análisis por SDS-PAGE. Para obtener conjugados mono-PEG-G-CSF a partir de los reactantes conjugados, se aislaron derivados de mono-PEG-G-CSF usando cromatografía de intercambio catiónico. Los derivados aislados usando la cromatografía de intercambio catiónico se sometieron adicionalmente a cromatografía de exclusión molecular para aislar sólo conjugados mono-PEG-G-CSF que se retiraron con una cantidad trivial de G-CSF sin reaccionar.

Para medir la actividad biológica de los derivados de mono-PEG-G-CSF de la presente invención, se usaron métodos conocidos descritos en diversos documentos (Baldwin *et al.*, Acta Endocrinologica, 119:326, 1988; Clark *et al.*, J. Biol. Chem., 271(36):21969, 1996; y Bozzola *et al.*, J. endocrinol. Invest., 21:768, 1998). Los resultados de medición demostraron que los conjugados PEG-G-CSF según la presente invención tenían un aumento del tiempo de retención *in vivo* a la vez que mantenían un alto nivel de actividad biológica.

Se notificó que el filgrastim monopegilado de manera N-terminal tenía el 68% de la actividad biológica *in vitro* de filgrastim. (patente estadounidense n.º 5.824.784). En cambio, cada uno de los conjugados PEG-G-CSF según la presente invención tenía aproximadamente de 2,1 a aproximadamente 3,5 veces la actividad biológica *in vitro* (es decir, el 250-300%) de filgrastim. Además, la semivida *in vivo* de cada uno de los conjugados PEG-G-CSF según la presente invención era al menos aproximadamente 5 veces la del filgrastim. Además, era superior al filgrastim en la bioactividad de activación de neutrófilos. Los motivos de lo anterior son presumiblemente los siguientes. Es decir, la bioactividad y estabilidad de G-CSF no se ven afectadas por la posición seleccionada de la de cisteína inducida y la posición seleccionada es una posición en la que puede amortiguarse de manera flexible un cambio estructural debido a la pegilación de G-CSF.

#### Efectos ventajosos

La presente invención describe un mutante de un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) de cisteína inducida, que facilita la conjugación específica con un polímero biocompatible tal como polietilenglicol (PEG) induciendo cisteína en un sitio específico de G-CSF, aumenta su tiempo de retención *in vivo* sin reducir la actividad biológica *in vivo* debido a la conjugación con el polímero biocompatible, ampliando de ese modo en última instancia la actividad biológica *in vivo*, y polipéptidos conjugados biocompatibles del mismo. Además, dado que los conjugados PEG-G-CSF según la presente invención tenían mayor estabilidad plasmática que filgrastim en vista del perfil farmacocinético, una semivida 4,2-5,1 veces más larga *in vivo*, manteniendo de ese modo la actividad y ampliando el efecto terapéutico. Además, el efecto de activación de neutrófilos es superior al de filgrastim en la farmacodinámica.

#### Descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático de una reacción de conjugación de PEG-G-CSF

la figura 2 muestra el resultado del análisis por SDS PAGE (electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida) de un mutante purificado de G-CSF y conjugado de PEG según la presente invención;

la figura 3 muestra el resultado del análisis por SDS PAGE de los reactantes de conjugación de G-CSF-PEG según la presente invención;

la figura 4 muestra el resultado de medición de la farmacocinética *in vivo* de G-CSF-PEG conjugados según la presente invención; y

la figura 5 es una representación gráfica que ilustra el resultado de medición de la farmacocinética para comparar la actividad *in vivo* de activación de neutrófilos entre conjugados G-CSF-PEG.

**Mejor modo**

A continuación en el presente documento, se describirá la presente invención en mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no limitar la presente invención.

5 [Ejemplos 1 ~ 11] Preparación de G-CSF mutante conjugado mediante sustitución por cisteína de los aminoácidos en el bucle CD (Gly<sup>126</sup>-Ser<sup>143</sup>) de G-CSF identificado en SEQ ID NO:2

A. Preparación de G-CSF recombinante (rG-CSF)

El G-CSF recombinante (rG-CSF) usado en la presente invención se expresó usando la cepa (KFCC-10961) descrita en la patente coreana n.º 230579 concedida al solicitante de la presente invención. El G-CSF recombinante así preparado, que se deriva de *E. coli*, como filgrastim, tiene la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO:2.

10 En estos ejemplos, basado en el hecho de que se usa un G-CSF recombinante como G-CSF, al G-CSF recombinante preparado se le asigna un número de secuencia de aminoácidos basándose en la secuencia de aminoácidos identificada en SEQ ID NO:2.

B. Preparación de mutantes de cisteína inducida de G-CSF recombinante

15 Se preparó el mutante de G-CSF de cisteína inducida a partir de la cepa de expresión de G-CSF (KFCC-10961) descrita en la patente coreana n.º 230579. La cepa de expresión de G-CSF se cultivó en un medio de cultivo LB con agitación durante 12 horas y entonces se aisló un vector de expresión de G-CSF (pGW2) usando un kit de preparación de plásmidos fabricado por Quiagen, Inc. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el vector de expresión de G-CSF aislado (pGW2) como molde usando cebadores de mutación complementarios que contenían un gen de cisteína inducida (cadena doble de polinucleótido complementario que tiene una longitud de 30-40 pares de bases) enumerado en la tabla 1. El vector de expresión de G-CSF resultante clonado con PCR se trató entonces con una enzima DPN 1 que elimina el molde, para transformarse entonces en MC 1061 *E. coli* tratado con rubidio. Se cultivó el huésped transformado en un medio de cultivo de ampicilina para seleccionar las cepas transformantes. El tratamiento enzimático de PCR para la mutación y eliminación del molde se realizó usando ADN polimerasa pfuTurbo y enzima DPN que están disponibles a partir del kit para mutagénesis dirigida al sitio (kit para mutagénesis dirigida al sitio QuikChange, Stratagen, Inc.), respectivamente, según las directrices para el usuario. Se confirmó la mutación mediante análisis de secuenciación de bases a través de PCR usando un cebador (5'-GCGGATCCTGCCTGA-3').

C. Expresión de G-CSF mutante de cisteína inducida

30 Se cultivó G-CSF mutante de cisteína inducida en 5 ml de medios de cultivo LB complementados cada uno con ampicilina 5 µg/ml durante 12 horas para transferirse entonces a 500 ml de medios LB complementados con ampicilina 5 µg/ml para el cultivo con agitación. Cuando la densidad óptica (DO) de la cepa alcanzó 0,5, se añadió una concentración final del 1%(p/v) de arabinosa a los medios de cultivo respectivos y se cultivaron con agitación durante aproximadamente 7 horas, para sobreexpresar así el G-CSF mutante de cisteína inducida.

D. Replegamiento de G-CSF mutante de cisteína inducida

35 Se centrifugaron cepas del G-CSF mutante de cisteína inducida sobreexpresado para suspenderse en Tris 20 mM y NaCl 150 mM, y se perturbaron las cepas suspendidas usando un sonicador. Se centrifugaron las cepas perturbadas y se lavaron con desoxicolato sódico al 2% (p/v) para recuperar los cuerpos de inclusión. Se disolvieron los cuerpos de inclusión de los mutantes de cisteína inducida en urea 7 M, Tris 20 mM y NaCl 100 mM a pH 8,8, y se diluyeron 10 veces con urea 3,3 M, Tris 5 mM, glutatión reducido 2 mM y glutatión oxidado 0,2 M a pH 8,8. Se realizó la etapa de replegamiento con agitación a 4□ durante 18 horas.

E-1. Preparación de G-CSF mutante de cisteína inducida pegilado

45 Tras la valoración de un G-CSF mutante de cisteína inducida como muestra de replegamiento con HCl para alcanzar pH 4,5, se retiró el precipitado resultante mediante centrifugación. Para purificar el G-CSF mutante de cisteína inducida que tenía actividad, se inyectó fosfato de sodio 20 mM en una columna de flujo rápido de SP-sefarosa se equilibró a pH 4,0, se lavó usando un tampón de equilibración, se eluyó con un gradiente de concentraciones salinas de NaCl 100-5000 mM.

50 El pH de la muestra de G-CSF mutante de cisteína inducida eluida se ajustó a 6,8, y se añadió metoxi-PEG-maleimida que tenía un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa o aproximadamente 30 kDa (Shearwater, Inc, U.S.A.) a la disolución resultante de modo que la razón molar de G-CSF mutante de cisteína inducida:metoxi-PEG-maleimida se vuelve 1:2. Después, se permitió que se produjera la reacción a 4□ durante aproximadamente 18 horas con agitación lenta.

E-2. Preparación de vinilsulfona-G-CSF mutante de cisteína inducida pegilado

Tras ajustar el pH de la muestra efluente de SP-sefarosa del G-CSF mutante de cisteína inducida aislado mediante



el mismo método descrito en la sección E-1 a pH 7,5, se añadió metoxi-PEG-vinilsulfona que tenía un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa a la disolución resultante de modo que la razón molar de G-CSF mutante de cisteína inducida:metoxi-PEG-maleimida se vuelve 1:5. Después, se permitió que se produjera la reacción a 4°C durante aproximadamente 18 horas con agitación lenta.

5 E-3. Preparación de yodoacetimida-G-CSF mutante de cisteína inducida pegilado

Tras ajustar el pH de la muestra efluente de SP-sefarosa del G-CSF mutante de cisteína inducida aislado mediante el mismo método descrito en la sección E-1 a pH 7,0, se añadió metoxi-PEG-yodoacetimida que tenía un peso molecular promedio de aproximadamente 20 kDa a la disolución resultante de modo que la razón molar de G-CSF mutante de cisteína inducida:metoxi-PEG-yodoacetimida se vuelve 1:2. Después, se permitió que se produjera la reacción en una sala oscura a 4°C durante aproximadamente 48 horas con agitación lenta.

10 F. Aislamiento de cuerpo fusionado de derivado de mono-PEG-G-CSF

Tras ajustar el pH del G-CSF mutante de cisteína inducida pegilado preparado a pH 4,0, se diluyó 3 veces el producto resultante con una disolución tampón (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> monobásico 20 mM, pH 4,8), y se inyectó en una columna de flujo rápido SP-sefarosa equilibrada usando un tampón de equilibración tampón de equilibración mismo tampón, es decir, un tampón de equilibración que contenía un Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> monobásico 20 mM, pH 4,8. Después, se lavó el producto resultante con una disolución tampón (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> monobásico 20 mM, NaCl 50 mM, pH 4,8) y entonces se eluyó con un gradiente de concentraciones salinas de NaCl 50-500 mM. Para eliminar el G-CSF sin reaccionar del G-CSF mutante de cisteína inducida, se realizó cromatografía de exclusión molecular con el G-CSF mutante de cisteína inducida pegilado eluido de la columna de SP-sefarosa. Se concentró el efluente de SP-sefarosa y se inyectó en una columna Superdex 200 (2,5 X 50 cm, Pharmacia) equilibrada con una disolución tampón (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> monobásico 20 mM, NaCl 100 mM (pH 4,0)) y se eluyó con la misma disolución tampón a una velocidad de elución de 1 ml/min. Se determinó la pureza del G-CSF mutante de cisteína inducida pegilado aislado mediante análisis por SDS-PAGE.

La tabla 1 demuestra el rendimiento de conjugación y recuperación de cada uno de los mutantes de cisteína inducida pegilado preparados en los ejemplos 1 a 11 indicados en percentil (%).

Tabla 1

Mutante			
Ejemplo	Sitio de mutación	Recuperación de mutante (%)	Rendimiento de conjugación de maleimida-PEG (%)
1	Ala 128 Cys	0,01	0
2	Ala 130 Cys	8	3
3	Leu 131 Cys	30	3
4	Gln 132 Cys	50	35
5	Thr 134 Cys	50	70
6	Gln 135 Cys	40	70
7	Gly 136 Cys	18	0,01
8	Ala 137 Cys	62	30
9	Met 138 Cys	34	0,01
10	Ala 140 Cys	0,01	0
11	Ala 142 Cys	0,01	0

[En las tablas de la presente invención, la notación indicada en la columna de sitio de mutación, por ejemplo, "Ala 128 Cys", significa que el aminoácido numerado 128, es decir, Ala, se sustituye por Cys, y la notación se aplica con otros ejemplos de la misma manera]

30 [La recuperación de mutante significa el rendimiento de mutantes a través de replegamiento y purificación realizados para la conjugación de PEG-mutante, es decir, la proporción de un número de G-CSF mutante purificado con respecto al recuento global de G-CSF mutante expresado en cuerpos de inclusión].

[Rendimiento de conjugación de PEG significa una proporción de un número de G-CSF conjugados a PEG con respecto a un número total de G-CSF mutantes asociados con conjugación con PEG].

35 [Ejemplos 12 ~ 22] Preparación de conjugados de G-CSF mutante conjugado mediante sustitución de cisteínas en aminoácidos de G-CSF en bucle CD (Gly<sup>126</sup>-Ser<sup>143</sup>) y sustitución por serina de la cisteína en la posición 18

Se prepararon los mutantes objeto de las mismas maneras que en los ejemplos 1 a 11, excepto en que para preparar mutantes que englobaran tanto sustituciones de cisteínas (Cys) en aminoácidos con serinas como una sustitución de cisteína en la posición 18 por serina en un bucle CD (Gly<sup>126</sup>-Ser<sup>143</sup>), se realizó la mutación de cisteína inducida usando cepas de mutante de Cys 18 sustituida por Ser y se realizó la mutación de cisteína inducida de la misma manera descrita anteriormente. Los presentes inventores prepararon mutantes que tenían cisteína inducida

en el bucle CD de rG-CSF identificado en SEQ ID NO:2.

La tabla 2 demuestra el rendimiento de conjugación y recuperación de cada uno de los mutantes de cisteína inducida pegilados preparados en los ejemplos 12 a 22 indicados en percentil (%).

Tabla 2

Mutante			
Ejemplo	Sitio de mutación	Recuperación de mutante (%)	Conjugación de maleimida-PEG (%)
12	Ala 128 Cys, Cys 18 Ser	0,5	0
13	Ala 130 Cys, Cys 18 Ser	10	10
14	Leu 131 Cys, Cys 18 Ser	30	5
15	Gln 132 Cys, Cys 18 Ser	45	30
16	Thr 134 Cys, Cys 18 Ser	55	75
17	Gln 135 Cys, Cys 18 Ser	43	65
18	Gly 136 Cys, Cys 18 Ser	15	0,01
19	Ala 137 Cys, Cys 18 Ser	64	35
20	Met 138 Cys, Cys 18 Ser	30	0,01
21	Ala 140 Cys, Cys 18 Ser	0,01	0
22	Ala 142 Cys, Cys 18 Ser	0,01	0

5 [Ejemplos 23 ~ 28] Preparación de mutantes de conjugados de G-CSF mediante inserción de cisteínas (Cys) en bucle CD (Gly<sup>126</sup>-Ser<sup>143</sup>) de G-CSF

Se prepararon los mutantes objeto de las mismas maneras que en los ejemplos 1 a 11, excepto en que para preparar mutantes mediante inserción de cisteína (Cys) en un bucle CD (Gly<sup>126</sup>-Ser<sup>143</sup>), se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el vector de expresión de G-CSF aislado (pGW2) como molde usando cebadores de mutación complementarios que contenían un gen de cisteína inducida (la doble cadena de polinucleótido complementario tiene una longitud de 30-40 pares de bases) enumerado en la tabla 3.

10

La tabla 3 demuestra el rendimiento de conjugación y recuperación de cada uno de los mutantes de cisteína inducida pegilados preparados en los ejemplos 23 a 28 indicados en percentil (%).

Tabla 3

Mutante			
Ejemplo	Sitio de mutación	Recuperación de mutante (%)	Conjugación de maleimida-PEG (%)
23	130 Cys 131	45	45
24	131 Cys 132	40	20
25	134 Cys 135	45	0,01
26	135 Cys 136	50	37
27	136 Cys 137	75	85
28	137 Cys 138	25	15

15 [En las tablas de la presente invención, la notación indicada en la columna de sitio de mutación, por ejemplo, "130 Cys 131", significa que el aminoácido Cys se inserta entre aminoácidos numerados 130 y 131, y la notación se aplica con otros ejemplos de la misma manera]

[Ejemplos 29 ~ 34] Preparación de mutantes de G-CSF conjugados mediante inserción de cisteínas (Cys) en el bucle CD (Gly<sup>126</sup>-Ser<sup>143</sup>) de G-CSF y serina sustitución de cisteína en la posición 18

20 Se prepararon los mutantes objeto de las mismas maneras que en los ejemplos 23 a 28, excepto en que para preparar mutantes, englobando tanto la inserción de cisteínas (Cys) en aminoácidos como una sustitución de cisteína en la posición 18 por serina en un bucle CD (Gly<sup>126</sup>-Ser<sup>143</sup>), se realizó la mutación de cisteína inducida usando cepas mutantes de Cys 18 sustituida por Ser y se realizó la mutación de cisteína inducida de la misma manera descrita anteriormente.

25 La tabla 4 demuestra el rendimiento de conjugación y recuperación de cada uno de los mutantes de cisteína inducida pegilados preparados en los ejemplos 29 a 34 indicados en percentil (%).

Tabla 4

Mutante			
Ejemplo	Sitio de mutación	Recuperación de mutante (%)	Conjugación de maleimida-PEG (%)

29	130 Cys 131, Cys 18 Ser	50	40
30	131 Cys 132, Cys 18 Ser	45	15
31	134 Cys 135, Cys 18 Ser	55	0,01
32	135 Cys 136, Cys 18 Ser	40	43
33	136 Cys 137, Cys 18 Ser	85	70
34	137 Cys 138, Cys 18 Ser	23	20

La figura 2 muestra el resultado del análisis por SDS-PAGE de un conjugado con PEG purificado de G-CSF mutante preparado en el ejemplo 33 (M2\_S) en el que Cys 18 se sustituye por Ser y Cys se inserta entre Gly en la posición 136 y Ala 137, el conjugado con PEG purificado obtenido mediante conjugación a un PEG-maleimida de 20 kDa o PEG-maleimida de 30 kDa y purificando el mismo, que muestra una única banda.

5 La figura 3 muestra el resultado del análisis por SDS-PAGE de un conjugado con PEG de 20 kDa de G-CSF mutante preparado en el ejemplo 33 (M2\_S) en el que Cys 18 se sustituye por Ser y Cys se inserta entre Gly en la posición 136 y Ala 137.

10 Tal como se muestra en la figura 3, puesto que la reacción de conjugación de PEG-maleimida del G-CSF mutante de cisteína inducida es no específica para la cisteína inducida, podría obtenerse un mono-PEG-G-CSF sin formación de oligómero o polioligómero.

[Ejemplo experimental 1] Medición de la actividad *in vitro*

15 Se midieron las actividades biológicas de conjugados con PEG de G-CSF mutante de cisteína inducida preparados en los ejemplos 1 a 34 y se compararon con la actividad del filgrastim (G-CSF derivado de *E. coli*). Se realizó la medición de la actividad a través de proliferación celular de la línea celular de leucemia mieloide murina NFS-60 (ATCC X65622). Se cultivan células NFS-60 en un medio RPMI1640 que contiene 10% (v/v) de FBS (suero bovino fetal) y un 5% de disolución de medio de línea celular WEHI-1640, y se suspenden en un medio RPMI que contiene el 10% (v/v) de FBS para alcanzar una concentración de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/ml. Cada 50  $\mu$ l de la suspensión de células suspendidas se añadió a cada pocillo de placas de microtitulación de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo aproximadamente  $1 \times 10^4$  células.

20 Se diluyeron filgrastim y conjugados con PEG de mutantes de cisteína inducida, preparados en los ejemplos, con un medio RPMI 1640 que contenía el 10% (v/v) de FBS para alcanzar 15 ng/ml usando el ensayo proteico de BCA (ácido bicínico). Se realiza además una dilución de 3 veces con un medio RPMI 1640 que contiene el 10% (v/v) de FBS en 12 fases. Cada 100  $\mu$ l de las muestras así preparadas se añadió a los respectivos pocillos en los que se cultivan células NFS-60, de modo que las concentraciones de las muestras en el medio de cultivo disminuyeran de manera continua hasta que la concentración final de la muestra alcanzó un intervalo de 10000 a 0,05 pg/ml. Tras incubar en un incubador a 37°C durante 48 horas, se confirmó la proliferación de las células usando un aparato CellTiter96 TM (n.º de cat. G3580) (PROMEGA).

La tabla 5 demuestra los datos globales de rendimiento de conjugación y recuperación de mutantes de cisteína inducida pegilados preparados en los ejemplos 1 a 34.

30 La recuperación de mutante indica el rendimiento de un número de G-CSF mutantes purificados a partir de cuerpos de inclusión con respecto a un número total de G-CSF mutantes. Se determina que un mutante que tiene una recuperación relativamente alta conduce a un mutante de cisteína inducida que tiene una estabilidad relativamente alta. Mientras tanto, el rendimiento de conjugación con PEG indica una proporción de un número de G-CSF conjugados con PEG con respecto a un número total de G-CSF mutantes asociados con conjugación con PEG. Un mayor rendimiento de PEG significa que puede acoplarse fácilmente PEG a cisteína inducida. La actividad NFS60 indica la actividad biológica *in vitro* de un conjugado con PEG suponiendo que la actividad biológica *in vitro* de filgrastim es del 100%.

Tabla 5

Mutante				
Ejemplo	Sitio de mutación	Recuperación de mutante (%)	Conjugación de maleimida-PEG (%)	Actividad NFS 60 de conjugado con PEG (%) [basado en el 100% de filgrastim]
1	Ala 128 Cys	0,01	0	-
2	Ala 130 Cys	8	3	21
3	Leu 131 Cys	30	3	2
4	Gln 132 Cys	50	35	40
5	Thr 134 Cys	50	70	210
6	Gln 135 Cys	40	70	30
7	Gly 136 Cys	18	0,01	-
8	Ala 137 Cys	62	30	40

9	Met 138 Cys	34	0,01	-
10	Ala 140 Cys	0,01	0	-
11	Ala 142 Cys	0,01	0	-
12	Ala 128 Cys, Cys 18 Ser	0,5	0	-
13	Ala 130 Cys, Cys 18 Ser	10	10	21
14	Leu 131 Cys, Cys 18 Ser	30	5	5
15	Gln 132 Cys, Cys 18 Ser	45	30	45
16	Thr 134 Cys, Cys 18 Ser	55	75	230
17	Gln 135 Cys, Cys 18 Ser	43	65	45
18	Gly 136 Cys, Cys 18 Ser	15	0,01	-
19	Ala 137 Cys, Cys 18 Ser	64	35	55
20	Met 138 Cys, Cys 18 Ser	30	0,01	-
21	Ala 140 Cys, Cys 18 Ser	0,01	0	-
22	Ala 142 Cys, Cys 18 Ser	0,01	0	-
23	130 Cys 131	45	45	48
24	131 Cys 132	40	20	60
25	134 Cys 135	45	0,01	-
26	135 Cys 136	50	37	43
27	136 Cys 137	75	85	270
28	137 Cys 138	25	15	65
29	130 Cys 131, Cys 18 Ser	50	40	60
30	131 Cys 132, Cys 18 Ser	45	15	70
31	134 Cys 135, Cys 18 Ser	55	0,01	-
32	135 Cys 136, Cys 18 Ser	40	43	50
33	136 Cys 137, Cys 18 Ser	85	70	350
34	137 Cys 138, Cys 18 Ser	23	20	70

Tal como se muestra en la tabla 1, los mutantes de cisteína inducida preparados en el ejemplo 1, 10, 11, 12, 21 y 22 no se expresaron ni purificaron fácilmente. Entre los mutantes de cisteína inducida fácilmente cuando se expresan y purifican, la actividad biológica del mutante en el que Cys 18 se sustituye por serina no era considerablemente diferente de la del mutante que mantenía la cisteína en la posición 18 sin cambios. Sin embargo, el mutante de cisteína inducida que mantenía cisteína en la posición 18 experimentó una ligera reducción en la actividad biológica tras la pegilación. Este hallazgo concuerda con el informe de Park *et al.* (solicitud de patente coreana n.º 10-2003-0017606). Se cree que la conjugación con PEG se realizó en la cisteína en la posición 18.

Tras la etapa de selección, para efectuar la conjugación con PEG, es decir, pegilación, se realizó una etapa de selección final para determinar un G-CSF mutante (M1) en el que Thr 134 de G-CSF se sustituye por cisteína, un G-CSF mutante (M2) en el que se inserta Cys entre Gly 136 y Ala 137, G-CSF mutante (M1\_S) en el que Cys en la posición 18 se sustituye por Ser, y un G-CSF mutante (M2\_S) en el que Cys en la posición 18 se sustituye por Ser y se inserta Cys entre Gly 136 y Ala 137. Los mutantes M1, M1\_S, M2, y M2\_S pegilados se denominaron PEG-M1 de 20 kDa, PEG-M1\_S de 20 kDa, PEG-M2 de 20 kDa y PEG-M2\_S de 20 kDa, respectivamente.

[Ejemplo experimental 2] Medición de la farmacocinética

Se midió el tiempo de retención sérico de cada uno de los G-CSF mutantes de cisteína inducida conjugados con PEG de 20 kDa determinados en el ejemplo experimental 1, es decir, PEG-M1 de 20 kDa, PEG-M1\_S de 20 kDa, PEG-M2 de 20 kDa y PEG-M2\_S de 20 kDa. Para cada grupo, se inyectaron por vía subcutánea filgrastim (control) y PEG-M1 de 20 kDa, PEG-M1\_S de 20 kDa, PEG-M2 de 20 kDa y PEG-M2\_S de 20 kDa preparados en el ejemplos

5 a cada una de 5 ratas SD (ratas Sprague Dawly macho, de 6 semanas de edad, que pesaban 200-250 g) mediante 100 µg por kg de peso corporal, y se extrajeron muestras de sangre a las 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144 y 168 horas tras la inyección. Se coagularon las muestras de sangre a una temperatura a temperatura ambiente durante una hora, seguido por centrifugación durante 5 minutos a 10000 rpm usando una microcentrífuga, eliminando así las células. Se midió una cantidad de G-CSF en plasma mediante ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) usando un anticuerpo monoclonal.

La tabla 6 demuestra las semividas plasmáticas del grupo de prueba y del grupo de ensayo.

Tabla 6

	Control	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo	Ejemplo
	Filgrastim	PEG-M1 de 20 kDa	PEG-M1_S de 20 kDa	PEG-M2 de 20 kDa	PEG-M2_S de 20 kDa
Semivida plasmática (T <sub>1/2</sub> , h)	1,9	7,9	8,2	8,9	9,7

10 La figura 4 muestra el resultado de medición de la farmacocinética *in vivo* de conjugados G-CSF-PEG según la presente invención.

Haciendo referencia a la tabla 6 y la figura 4, el de 20 kDa de la presente invención mostró mayor estabilidad plasmática que filgrastim, es decir, una semivida 4,2-5,1 veces más larga *in vivo* que filgrastim, lo que sugiere que los conjugados con PEG de 20 kDa de G-CSF mutante de cisteína inducida según la presente invención mantuvieron la actividad *in vivo* durante un periodo más largo que filgrastim, mejorando de ese modo la eficacia terapéutica.

[Ejemplo experimental 3] Medición de la farmacodinamica del fármaco

20 Se midió la actividad de neutrófilos de cada uno de los de G-CSF mutantes de cisteína inducida conjugados con PEG de 20 kDa determinados en el ejemplo experimental 1, es decir, PEG-M1 de 20 kDa, PEG-M1\_S de 20 kDa, PEG-M2 de 20 kDa y PEG-M2\_S de 20 kDa. Para cada grupo, se inyectaron por vía subcutánea filgrastim (control) y PEG-M1 de 20 kDa, PEG-M1\_S de 20 kDa, PEG-M2 de 20 kDa y PEG-M2\_S de 20 kDa preparados en el ejemplos a cada una de 5 ratas SD (ratas Sprague Dawly macho, de 6 semanas de edad, que pesaban 200-250 g) mediante 100 µg por kg de peso corporal, y se extrajeron muestras de sangre mediante hemorragia ocular con el tiempo. Entonces, se contó el número de neutrófilos plasmáticos.

25 La figura 5 es una representación gráfica que ilustra el resultado de medición de la farmacocinética para la comparación de la actividad de neutrófilos *in vivo* entre conjugados G-CSF-PEG.

Tal como se muestra en la figura 5, la actividad de neutrófilos de cada uno de los de G-CSF mutantes de cisteína inducida conjugados con PEG de 20 kDa, es decir, PEG-M1 de 20 kDa, PEG-M1\_S de 20 kDa, PEG-M2 de 20 kDa y PEG-M2\_S de 20 kDa fue mucho mayor que la de filgrastim.

**Aplicabilidad industrial**

30 Tal como se describió anteriormente, la presente invención se refiere a un mutante de factor estimulante de colonias de granulocitos humano (G-CSF) como adyuvante en el tratamiento de cáncer para inhibir la leucocitopenia estimulando la formación de colonias de granulocitos neutrófilos a partir de células de médula ósea cuando se administra un fármaco anticancerígeno, e induciendo la diferenciación de las células de médula ósea hasta fases finales, y polipéptidos conjugados químicamente del mismo. Por consiguiente, la presente invención puede aplicarse ventajosamente a fines médicos y al tratamiento de enfermedades.

<110> MOGAM BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE

<120> MUTANTE DE FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS (G-CSF) Y POLIPÉPTIDO CONJUGADO QUÍMICAMENTE DEL MISMO

<130> EP55945HV163pau

40 <140> por asignar

<141> por asignar

<150> DOCUMENTO PCT/KR2006/002841

<151> 19-07-2006

<150> 10-2005-0065746

<151> 20-07-2005

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

5 <211> 174

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de hG-CSF

10 <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

```

<210> 2

<211> 175

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de hG-CSF recombinante

<400> 2

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

<210> 3

<211> 174

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de hG-CSF sustituida por cisteína en la posición 133

<400> 3

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 Cys 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

<210> 4

<211> 174

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de hG-CSF sustituida por cisteína en la posición 133 y serina en la posición 17

<400> 4



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

<210> 5

<211> 175

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de hG-CSF con cisteína insertada entre la posición 135 y 136

<400> 5

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 Cys 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

<210> 6

<211> 175

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de hG-CSF con cisteína insertada entre la posición 135 y 136 y sustituida por serina en la posición 17

<400> 6

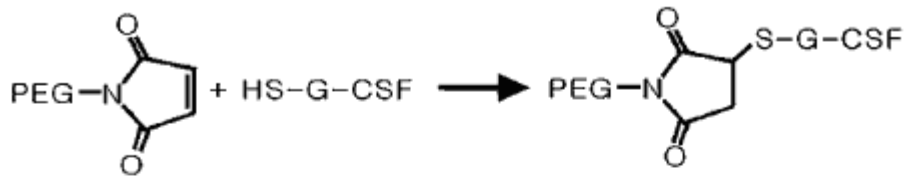
Thr<sub>1</sub> Pro Leu Gly Pro<sub>5</sub> Ala Ser Ser Leu Pro<sub>10</sub> Gln Ser Phe Leu Leu<sub>15</sub> Lys  
 Ser Leu Glu Gln<sub>20</sub> Val Arg Lys Ile Gln<sub>25</sub> Gly Asp Gly Ala Ala<sub>30</sub> Leu Gln  
 Glu Lys Leu<sub>35</sub> Cys Ala Thr Tyr Lys<sub>40</sub> Leu Cys His Pro Glu<sub>45</sub> Glu Leu Val  
 Leu Leu<sub>50</sub> Gly His Ser Leu Gly<sub>55</sub> Ile Pro Trp Ala Pro<sub>60</sub> Leu Ser Ser Cys  
 Pro<sub>65</sub> Ser Gln Ala Leu Gln<sub>70</sub> Leu Ala Gly Cys Leu<sub>75</sub> Ser Gln Leu His Ser<sub>80</sub>  
 Gly Leu Phe Leu Tyr<sub>85</sub> Gln Gly Leu Leu Gln<sub>90</sub> Ala Leu Glu Gly Ile<sub>95</sub> Ser  
 Pro Glu Leu Gly<sub>100</sub> Pro Thr Leu Asp Thr<sub>105</sub> Leu Gln Leu Asp Val<sub>110</sub> Ala Asp  
 Phe Ala Thr<sub>115</sub> Thr Ile Trp Gln Gln<sub>120</sub> Met Glu Glu Leu Gly<sub>125</sub> Met Ala Pro  
 Ala Leu<sub>130</sub> Gln Pro Thr Gln Gly<sub>135</sub> Cys Ala Met Pro Ala<sub>140</sub> Phe Ala Ser Ala  
 Phe<sub>145</sub> Gln Arg Arg Ala Gly<sub>150</sub> Gly Val Leu Val Ala<sub>155</sub> Ser His Leu Gln Ser<sub>160</sub>  
 Phe Leu Glu Val<sub>165</sub> Ser Tyr Arg Val Leu Arg<sub>170</sub> His Leu Ala Gln Pro<sub>175</sub>

**REIVINDICACIONES**

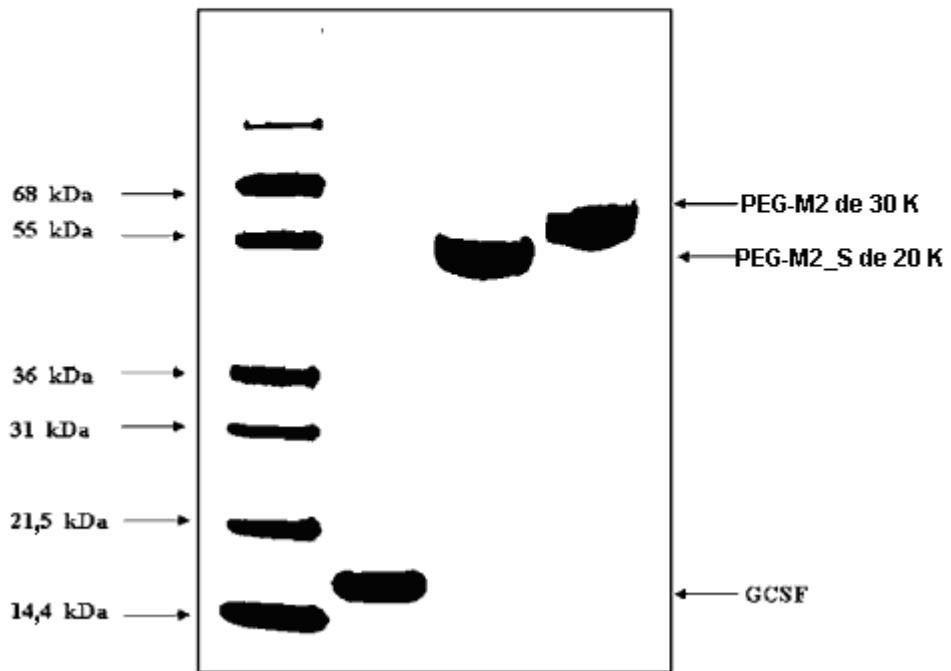
- 5 1. Un mutante de un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano, comprendiendo el mutante la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, en el que se inserta un residuo de cisteína (Cys) entre un residuo de glicina (Gly) en la posición 135 y un residuo de alanina (Ala) en la posición 136 del G-CSF de SEQ ID NO:1.
2. El mutante según la reivindicación 1, siendo el mutante una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 que tiene un residuo de cisteína en la posición 17 sustituido por un residuo de serina (Ser).
- 10 3. Un conjugado del mutante de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano según la reivindicación 1 ó 2, en el que se une un compuesto químico no proteico en el residuo de cisteína insertado.
4. El conjugado según la reivindicación 3, en el que el compuesto químico no proteico es un compuesto de una clase seleccionada del grupo que comprende polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), ácido policarboxílico y polivinilpirrolidona, que se une con una clase seleccionada del grupo que comprende maleimida, vinilsulfona, yodoacetamida y disulfuro de ortopiridilo.
- 15 5. El conjugado según la reivindicación 3, en el que el compuesto químico no proteico tiene un peso molecular en el intervalo de 2 a 100 kDa.
6. El conjugado según la reivindicación 4, en el que el PEG tiene un peso molecular en el intervalo de 5 a 100 kDa.
7. El mutante según la reivindicación 1 ó 2, para su uso como medicamento.
- 20 8. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, para su uso como medicamento.
9. El mutante según la reivindicación 1 ó 2, para su uso como medicamento en la inhibición de leucocitopenia o para su uso como adyuvante en el tratamiento del cáncer.
10. El conjugado según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, para su uso como medicamento en la inhibición de leucocitopenia o para su uso como adyuvante en el tratamiento del cáncer.
- 25 11. Uso del mutante según la reivindicación 1 ó 2, para la fabricación de un medicamento para inhibir la leucocitopenia o para la fabricación de un adyuvante para el tratamiento del cáncer.
12. Uso del conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, para la fabricación de un medicamento para inhibir la leucocitopenia o para la fabricación de un adyuvante para el tratamiento del cáncer.

30

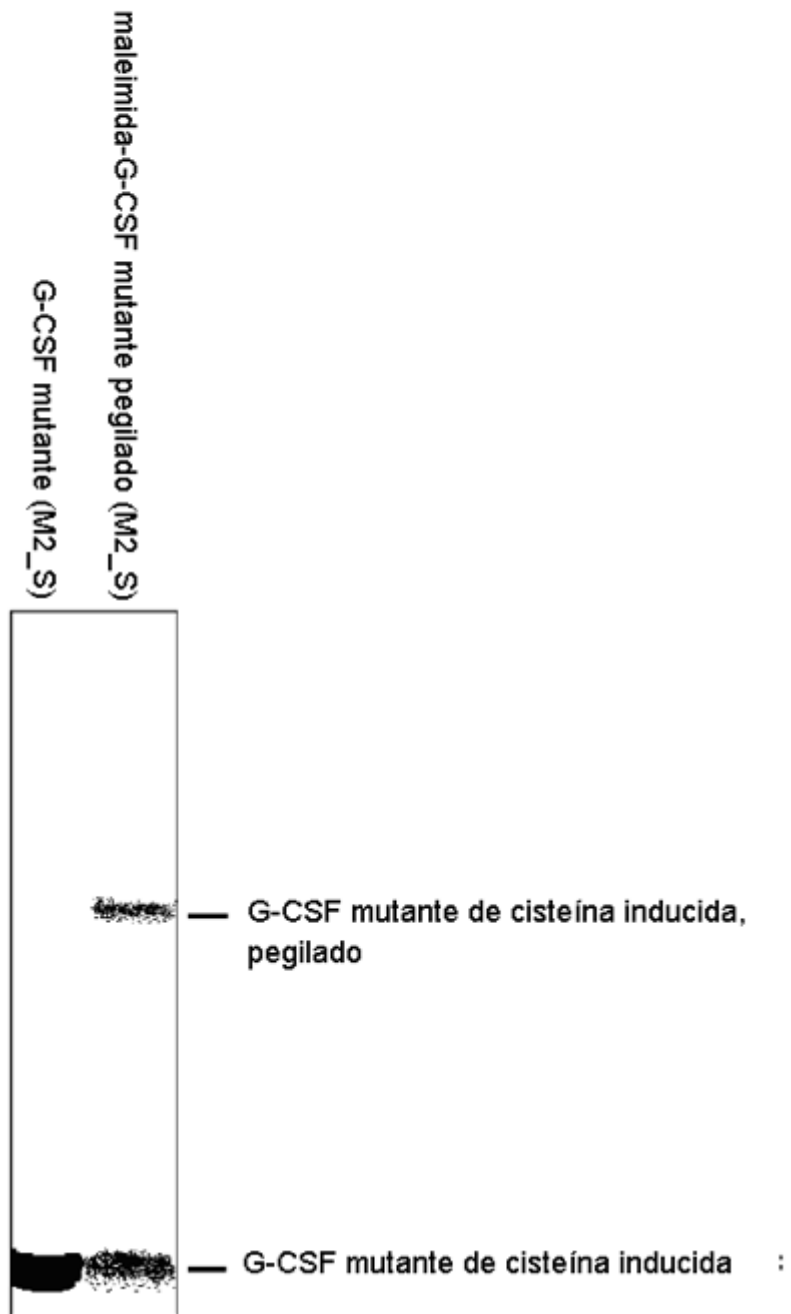
[Figura 1]



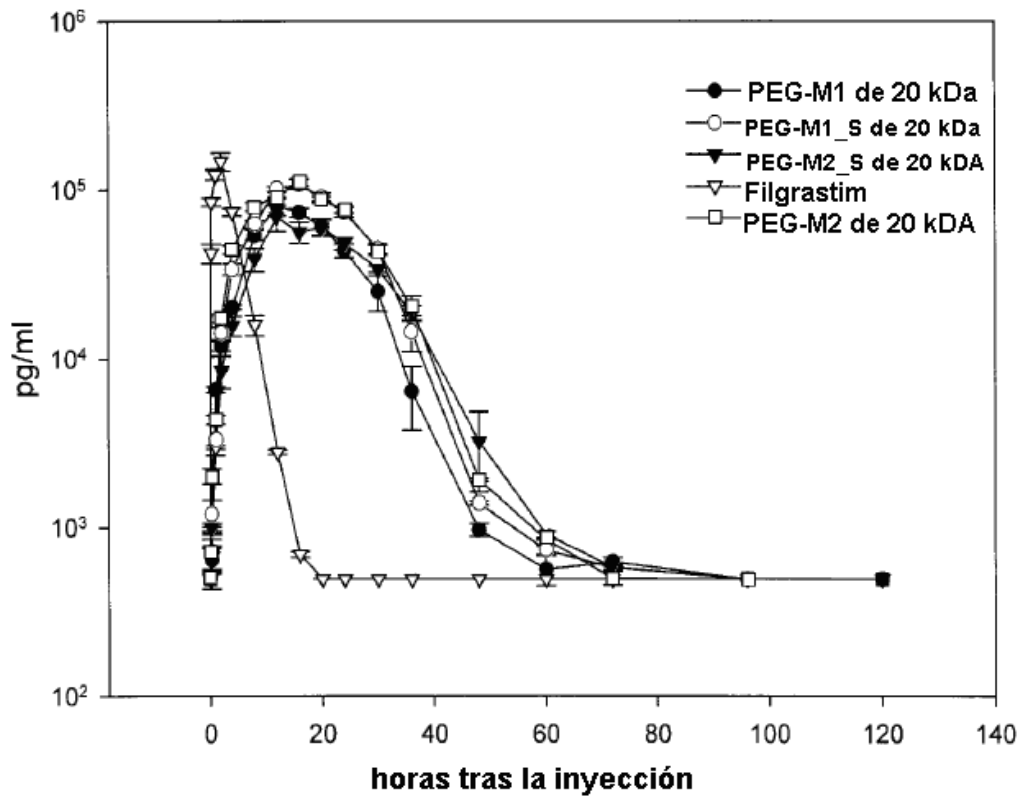
[Figura 2]



**Figura 3**



[Figura 4]



[Figura 5]

