

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 253**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/765** (2006.01)

**A61P 37/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2006 E 06812660 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2081580**

54 Título: **Conjugado de polietilenglicol-G-CSF**

30 Prioridad:

**17.11.2006 KR 20060113721**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.12.2013**

73 Titular/es:

**DONG-A SOCIO HOLDINGS CO., LTD. (100.0%)  
Yongdu-dong) 64, Cheonho-daero, Dongdaemun-  
gu  
Seoul 130-823 , KR**

72 Inventor/es:

**JO, YEONG-WOO;  
YOO, WON-YOUNG;  
JEON, HYUN-KYU;  
CHOI, YUN-KYU;  
JANG, HYE-IN;  
KIM, BYONG-MOON;  
LEE, SUNG-HEE;  
KANG, SOO-HYUNG y  
YOO, MOO-HI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 433 253 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

Conjugado de polietilenglicol-G-CSF

## CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un conjugado de PEG de tres ramas-G-CSF.

## 5 TÉCNICA ANTERIOR

El factor estimulante de colonias (CSF), como una glucoproteína que actúa sobre la producción, división y actividad de células hematopoyéticas, se clasifica en factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de múltiples colonias (multi-CSF), etc.

10 Se sabe que G-CSF aumenta la liberación de neutrófilos maduros en sangre periférica facilitando la producción y división del precursor neutrófilo en la médula ósea; induce una actividad fagocítica activando neutrófilos maduros; representa una citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo; genera superóxidos; y aumenta la reactividad contra factor quimiotáctico.

15 El factor estimulante de colonias de granulocitos humano (hG-CSF) lo separaron por primera vez de la línea celular de carcinoma de vejiga 5637 Welt y col. en 1985, y hG-CSF recombinante (rhG-CSF) lo produjeron clonando el gen de la biblioteca de ADNc de una célula cancerosa Nagata y col. Souza y col. en 1986. El rhG-CSF actualmente usado en ensayos clínicos es filgrastim que une metionina en el extremo N de proteína sin glucosilación, producido en *Escherichia coli*, y lenograstim con glucosilación, producido en la célula de animal.

20 En caso de usar rhG-CSF clínicamente, rhG-CSF tiene que administrarse una vez o más al día para disminuir los leucocitos debido a que rhG-CSF tiene una corta duración del efecto farmacológico. Así, se han realizado muchos estudios para aumentar una semivida de circulación de rhG-CSF usando polímero soluble en agua, desarrollando así el fármaco para que tenga una larga duración de actividad y alta estabilidad, y disminuyendo la frecuencia de administración.

25 Y, el polietilenglicol en el polímero soluble en agua es fuertemente hidrófilo, y puede aumentar la solubilidad en el momento de unirse a proteína para el tratamiento. Por tanto, el polietilenglicol es eficaz en aumentar la cantidad de proteína molecular unida al mismo, manteniendo las principales funciones biológicas tales como actividad enzimática y unión a receptor. Así, el polietilenglicol puede disminuir la filtración del riñón y proteger eficazmente la proteína de la enzima proteolítica que descompone la proteína. Por tanto, se han realizado muchos estudios para encontrar procedimientos modificadores de proteína usando polietilenglicol debido a que tengan las ventajas de prevenir la descomposición de proteínas, aumentar la estabilidad y tiempo de circulación de la proteína, y disminuir la inmunogenicidad.

30 La patente coreana nº 0508358 desveló conjugados y un procedimiento de preparación de los mismos, en el que los conjugados tienen actividades biológicas y están en forma de unir un polímero de biocompatibilidad con el tiol del residuo de cisteína de G-CSF, en la relación molar de polímero: G-CSF a estequiométricamente 0,7~1,3:1, preferentemente 1:1. Pero, como el residuo de cisteína de G-CSF que no forma enlaces disulfuro en G-CSF es la parte de unión principal con el receptor de G-CSF, el conjugado que usa el residuo de cisteína tiene el inconveniente de que su efecto de proliferación real para neutrófilo es pequeño. Y, debido a que los conjugados se agregan inmediatamente para unir un PEG a residuos de cisteína de G-CSF, tiene la desventaja de que debe añadirse una pequeña cantidad de SDS al conjugado para prevenir la agregación para salvaguardo, y el SDS se eliminó por ultrafiltración para administrarlo *in vivo*.

40 La patente coreana nº 0507796 desveló conjugados de PEG-homodímero que se unen a un polipéptido activo biológico y un PEG, para aumentar la semivida *in vivo* del polipéptido. Particularmente, describió que el homodímero une un grupo amino de residuos de licina de polipéptido bioactivo de dos moléculas a un PEG para aumentar el tiempo residual y mantener actividades biológicas durante un largo tiempo. Pero los conjugados tienen menos actividad que los conjugados de mono-PEG debido a la conjugación de excesivos PEG y las características fisicoquímicas y biológicas de los  
45 conjugados no son uniformes debido a conjugación no específica.

Y se conoce el procedimiento de unión de rhG-CSF a SCM-MPEG lineal (éster succinimidil carboximetílico de metoxi PEG). Los conjugados de mono-PEG-G-CSF preparados mediante el procedimiento tienen 3 tipos de isómeros de posición modificados en los residuos del extremo N, de licina 35 y de licina 45. Particularmente, el conjugado modificado en licina 35 tiene la desventaja de PEG salientes del conjugado (patente coreana nº 0248111, patente de Estados Unidos  
50 nº 5.824.784).

La patente de Estados Unidos nº 5.951.974 desveló conjugados de unión de un SC-PEG lineal (polietilenglicol-carbonato de N-succinimida) a interferón alfa de recombinación génica. Los conjugados consisten en conjugados covalentes de

enlace de uretano en el grupo  $\epsilon$ -amino de residuos de licina de interferón, el grupo  $\alpha$ -amino de los residuos de cisteína del extremo N y un grupo amino de residuos de histidina. Pero los conjugados tienen la desventaja de PEG salientes del conjugado debido a que el enlace de uretano de los conjugados es inestable.

5 El polietilenglicol lineal comúnmente usado tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000- 25.000 dalton, pero tiene una limitación en la unión de muchas moléculas grandes lineales a proteína o péptido, con mantener sus actividades, debido a regiones activas biológicas limitadas de proteína y péptido.

10 La patente coreana nº 0254097 desveló conjugados que unen un PEG de dos ramas de una estructura esquelética de licina a interferón alfa de recombinación génica. Los conjugados tienen la ventaja de prevenir que el PEG se una a múltiples partes del interferón, y tienen 2 veces el peso molecular de PEG por el del PEG lineal debido a que dos PEG lineales se unen a una única parte del interferón. Pero los PEG de dos ramas pueden hidrolizarse a una única cadena para salvaguardar o para hacer reaccionar bajo una condición de álcali debido a que el PEG de dos ramas que tiene una estructura esquelética de licina tiene dos enlaces de uretano en el PEG.

15 Generalmente, se sabe que la actividad biológica, durabilidad, etc., de conjugados de unión de un PEG a proteína de recombinación génica depende del tamaño y la parte modificada en el PEG. Pero todavía no se ha mostrado si un tamaño de PEG en conjugados que unen PEG y rhG-CSF afecta o no actividades biológicas de una proteína. Por tanto, ha habido una necesidad en la materia de vencer las desventajas del procedimiento conocido mediante el control de un tamaño de PEG y unión a diversas estructuras esqueléticas de PEG para no reducir las bioactividades de G-CSF y para aumentar la estabilidad de partes de unión.

## DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

### 20 PROBLEMA TÉCNICO

El objetivo de la presente invención es proporcionar conjugados de polietilenglicol (PEG) de tres ramas-G-CSF preparados conjugando PEG de tres ramas y G-CSF que tienen alta estabilidad y las mismas o más bioactividades de G-CSF que conjugados de G-CSF y PEG-G-CSF conocidos en la técnica; un procedimiento de preparación de los mismos; y una composición farmacéutica que contiene los mismos.

### 25 SOLUCIÓN TÉCNICA

Para lograr el objetivo anterior, la presente invención proporciona conjugados de polietilenglicol de tres ramas (PEG)-G-CSF conjugados entre derivados de PEG de tres ramas y G-CSF.

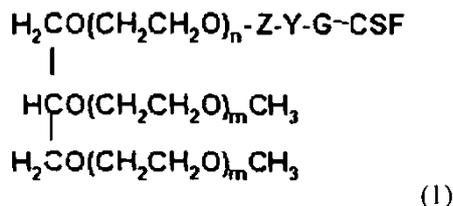
La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación de conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF que comprende conjugar derivados de PEG de tres ramas y G-CSF.

30 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende los conjugados.

La presente invención también proporciona un procedimiento de tratamiento de neutropenia, prevención de neutropenia, o facilitación del aumento del número de neutrófilos en el momento de la movilización de citoblastos hematopoyéticos a sangre periférica y trasplante de citoblastos hematopoyéticos, que comprende administrar el conjugado de la presente invención como componente eficaz.

35 La presente invención se explica en detalle más adelante.

Los conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF de la presente invención pueden prepararse conjugando polietilenglicol de tres ramas (PEG), representado por la siguiente fórmula general (1):



en la que

40 n es un número entero de 1 a 1.000;

m es un número entero de 10 a 1.000;

Z es  $(\text{CH}_2)_s$  o  $(\text{CH}_2)_s\text{NHCO}(\text{CH}_2)_s$  como adaptador de G-CSF y PEG en las que S es un número entero de 1 a 6;



5 quimioterapia o radioterapia para el cáncer; enfermedades infecciosas producidas por bacterias, virus y hongos; otras enfermedades infecciosas; enfermedades producidas por motivo genético o medioambiental tales como neutropenia crónica grave y leucemia; o enfermedades geriátricas producidas por otra parte. Por ejemplo, los síntomas producidos por la disminución de la función hematopoyética o disminución de la función inmunológica son neutropenia producida por quimioterapia para el cáncer para tumores de la sangre o cáncer sólido, neutropenia producida por síndrome mielodisplásico, neutropenia producida por anemia aplásica, neutropenia idiopática congénita y neutropenia causada por el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana.

La composición puede estar compuesta de conjugados de PEG-G-CSF de la presente invención o diluyente, antisépticos, solubilizante, emulsionante, adyuvante y/o vehículo farmacéuticamente aceptables.

10 Las composiciones de la presente invención pueden formularse para agente de inyección, cápsula, comprimido, fármaco líquido, píldora, pomada, ungüento ocular, colirio, agente de absorción transdérmica, pasta, cataplasma, aerosoles, etc.

15 Y la dosificación eficaz de G-CSF es muy pequeña, tal como 0,1 ~500 µg (preferentemente 5~50 µg). Y el fármaco que comprende 0,1 ~500 µg de G-CSF puede administrarse a un adulto, generalmente de 1 a 7 veces a semana. Así, la dosificación eficaz de la composición farmacéutica de la presente invención puede calcularse por una cantidad de administración conocida de G-CSF y un peso molecular de PEG usado en la presente invención. La dosificación eficaz de la composición farmacéutica de la presente invención puede variarse, pero generalmente una vez a semana, y la composición puede administrarse una vez o muchas veces al día dentro de un intervalo de dosificación diariamente eficaz.

20 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente la presente invención, y el alcance de la presente invención no pretende limitarse así de ningún modo.

### **EFFECTOS VENTAJOSOS**

25 Los conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF de la presente invención son más farmacéuticamente estables que los conjugados de PEG lineal o de dos ramas-G-CSF en el aspecto de PEG salientes de conjugados de PEG-G-CSF y formar los agregados de conjugados. Y los conjugados de la presente invención pueden usarse sin separaciones adicionales de isómeros de posición debido a que los conjugados consisten en isómeros de posición con actividades similares. Y la composición de la presente invención tiene los efectos de producción continua de neutrófilos y elevada semivida *in vivo*.

### **DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

30 La Fig. 1 es un dibujo esquemático que ilustra los resultados analíticos de una mezcla formada para preparar conjugados de PEG de tres ramas que tiene MW 23.000 Da y G-CSF según el Ejemplo 1, por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño.

La Fig. 2 es un dibujo esquemático que ilustra los resultados analíticos de una mezcla formada para preparar conjugados de PEG de tres ramas que tiene MW 43.000 Da y G-CSF según el Ejemplo 2, por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño.

35 La Fig. 3 es un dibujo esquemático que ilustra los resultados analíticos de una mezcla formada para preparar conjugados de PEG lineal que tiene MW 10.000 Da y G-CSF según el Ejemplo comparativo 1, por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño.

40 La Fig. 4 es un dibujo esquemático que ilustra los resultados analíticos de las purezas de conjugados de mono-PEG de tres ramas-G-CSF separados de la mezcla del Ejemplo 1, por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño.

La Fig. 5 es un dibujo esquemático que ilustra los resultados analíticos de las purezas de conjugados de mono-PEG de tres ramas-G-CSF separados de la mezcla del Ejemplo 2, por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño.

45 La Fig. 6 es un dibujo esquemático que ilustra los resultados analíticos de las purezas de conjugados de mono-PEG lineal-G-CSF separados de la mezcla del Ejemplo comparativo 1, por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño.

La Fig. 7 es un dibujo esquemático que ilustra los resultados analíticos de conjugados de mono-PEG de tres ramas-G-CSF separados de la mezcla del Ejemplo 1, por espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF).

50 La Fig. 8 es un dibujo esquemático que ilustra los resultados analíticos de conjugados de mono-PEG de tres

ramas-G-CSF separados de la mezcla del Ejemplo 2, por espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF).

5 La Fig. 9 es un dibujo esquemático que ilustra los resultados analíticos de conjugados de mono-PEG lineal-G-CSF separados de la mezcla de Ejemplo comparativo 1, por espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF).

La Fig. 10 es un dibujo esquemático que ilustra los resultados analíticos de los isómeros de posición que comprenden conjugados de mono-PEG de tres ramas-G-CSF separados de la mezcla del Ejemplo 1, por cromatografía de intercambio iónico.

10 La Fig. 11 es un dibujo esquemático que ilustra los resultados analíticos de la actividad biológica de los isómeros de posición de conjugados de mono-PEG de tres ramas-G-CSF separados de la mezcla del Ejemplo 1, según el Ejemplo experimental 1, mediante el procedimiento del Ejemplo experimental 2.

## MODO PARA LA INVENCION

### <Ejemplo 1> Preparación de conjugados de polietilenglicol de tres ramas (PEG MW 23.000 Da)-G-CSF

15 Se filtraron 10 mg de rhG-CSF (Dong-A Pharm. Co., Ltd.) a pH 8,5 y 50 mM de disolución de tampón borato de sodio. Luego se añadieron 9,2 mg de PEG de tres ramas que tiene N-hidroxisuccinimida (NOF Corporation, Japón) y el peso molecular de 23.000 dalton a la disolución en la relación molar de rhG-CSF : PEG de tres ramas de 1: 0,75. Y la disolución se agitó a 4 °C durante 90 min. La reacción se detuvo añadiendo HCl 100 mM para hacer el pH de la disolución 4 y diluyendo el volumen de la disolución 5 veces con agua destilada estéril. Entonces, la mezcla se entró en cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 20 mM de disolución de tampón acetato sódico (pH 4,0), y se separó el conjugado de PEG de tres ramas-G-CSF. La mezcla se fraccionó usando 0 ~ 1 M de gradiente de concentración de cloruro sódico (NaCl). La relación molar de PEG de tres ramas con respecto a G-CSF en los conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF se confirmó por HPLC y SDS-PAGE. Y se excluyeron los conjugados de di- o más (tri-, tetra-...)-PEG de tres ramas-G-CSF, G-CSF sin reaccionar que queda después de la reacción, etc. Y los eluatos se concentraron y se esterizaron por filtración para obtener el conjugado de mono-PEG de tres ramas-G-CSF en el que un G-CSF y un PEG de tres ramas (MW 23.000Da) están conjugados (o llamado conjugado de mono-PEG de tres ramas-G-CSF).

20 Se confirmó que la mezcla de reacción consistió en 35,4 % de conjugado de mono-PEG de tres ramas-G-CSF (mono-PEG-G-CSF), aproximadamente 59,4 % de G-CSF sin modificar por PEG, y los otros [conjugado de di-PEG de tres ramas-G-CSF (conjugado de di-PEG-G-CSF) y N-hidroxisuccinimida (NHS)], por una cromatografía de alta resolución de exclusión por tamaño (véase la Fig. 1, en la que 1 y 2 representan conjugado de di-PEG-G-CSF, 3 representa conjugado de mono-PEG-G-CSF, 4 representa G-CSF sin modificar por PEG y 5 representa NHS que sale del PEG de tres ramas). Y la pureza del mono-PEG de tres ramas-G-CSF separado de la mezcla se midió por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (véase la Fig. 4, en la que 2 representa conjugado de di-PEG-G-CSF y 3 representa conjugado de mono-PEG-G-CSF) y el peso molecular se midió por espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (véase la Fig. 7: el resultado analítico de mono-PEG de tres ramas-G-CSF por EM/MALDI-TOF). Y los isómeros de posición se separaron por columna analítica de resina de intercambio catiónico (SP-5WP, TOSOH) para confirmar que la relación para cada isómero de posición es aproximadamente 54 %: 33 %:10 % (véase la Fig. 10). Y se confirmó que cada isómero de posición tiene actividad muy similar en el experimento para actividad biológica de cada isómero de posición (véase la Fig. 11)

### 40 <Ejemplo 2> Preparación de conjugados de polietilenglicol de tres ramas (PEG MW 43.000 Da)-G-CSF

45 Se filtraron 10 mg de rhG-CSF (Dong-A Pharm. Co., Ltd.) a pH 8,5 y 50 mM de disolución de tampón borato de sodio. Luego se añadieron 17,2 mg de PEG de tres ramas con N-hidroxisuccinimida (NOF Corporation, Japón) y el peso molecular de 43.000 dalton a la disolución para preparar la relación molar de rhG-CSF : PEG de tres ramas de 1: 0,75. Y la disolución se agitó a 4 °C durante 90 min. Y la reacción se detuvo añadiendo HCl 100 mM para hacer el pH de la disolución 4 y diluyendo el volumen de la disolución 5 veces con agua destilada estéril. Y la mezcla se entró en cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 20 mM de disolución de tampón acetato sódico (pH 4,0), y se separó de la misma el conjugado de PEG de tres ramas-G-CSF. La mezcla se fraccionó usando 0 ~ 1 M de gradiente de concentración de cloruro sódico (NaCl). La relación molar de PEG de tres ramas con respecto a G-CSF en los conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF se confirmó por HPLC y SDS-PAGE. Y se excluyeron conjugados de di- o más (tri-, tetra...)-PEG de tres ramas-G-CSF, G-CSF sin reaccionar que queda después de la reacción, etc. Y los eluatos se concentraron y se esterizaron por filtración para obtener el conjugado de mono-PEG de tres ramas-G-CSF en el que un G-CSF y un PEG de tres ramas (MW 43.000Da) están conjugados (o se llama conjugado de mono-PEG de tres ramas-G-CSF).

Se confirmó que la mezcla de la reacción consistió en 18,7 % de conjugado de mono-PEG de tres ramas-G-CSF

(conjugado de mono-PEG-G-CSF), aproximadamente 40,1 % de G-CSF sin modificar por PEG y los otros [conjugado de di-PEG de tres ramas-G-CSF (conjugado de di-PEG-G-CSF) y N-hidroxisuccinimida (NHS)] por cromatografía de alto rendimiento de exclusión por tamaño (véase la Fig. 2. en la que 2 representa conjugado de di-PEG-G-CSF, 3 representa conjugado de mono-PEG-G-CSF y 4 representa G-CSF sin modificar por PEG). Y la pureza de mono-PEG de tres ramas-G-CSF separado de la mezcla se midió por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (véase la Fig. 5, en la que 1 representa conjugado de oligo-PEG-G-CSF, 2 representa conjugado de di-PEG-G-CSF y 3 representa conjugado de mono-PEG-G-CSF), y el peso molecular se midió por espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (véase la Fig. 8; el resultado analítico de mono-PEG de tres ramas-G-CSF por EM/MALDI-TOF).

#### 10 <Ejemplo comparativo 1> Preparación de conjugados de polietilenglicol lineal (PEG MW 10.000 Da)-G-CSF

Se filtraron 10 mg de rhG-CSF (Dong-A Pharm. Co., Ltd.) a pH 8,5 y 50 mM de disolución de tampón borato de sodio. Y se añadieron 5,2 mg de PEG lineal con N-hidroxisuccinimida (NOF Corporation, Japón) y el peso molecular de 13.000 dalton a la disolución para preparar la relación molar de rhG-CSF : PEG lineal de 1: 0,75. Y la disolución se agitó a 4 °C durante 90 min. Y la reacción se detuvo añadiendo HCl 100 mM para hacer el pH de la disolución 4 y diluyendo el volumen de la disolución 5 veces con agua destilada estéril. Y la mezcla se entró en cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 20 mM de disolución de tampón acetato sódico (pH 4,0) y se separó de la misma el conjugado de PEG lineal-ramificado-G-CSF. La mezcla se fraccionó usando 0 ~ 1 M de gradiente de concentración de cloruro sódico (NaCl). La relación molar de PEG lineal con respecto a G-CSF en el conjugado de PEG lineal-G-CSF se confirmó por HPLC y SDS-PAGE. Y se excluyeron conjugados de di- o más (tri, tetra...)-PEG lineal-G-CSF, G-CSF sin reaccionar que queda después de la reacción, etc. Y los eluatos se concentraron y se esterilizaron por filtración para obtener el conjugado de mono-PEG lineal-G-CSF en el que un G-CSF y un PEG lineal (MW 13.000Da) están conjugados (o se llaman conjugado de mono-PEG lineal -G-CSF).

Se confirmó que la mezcla de la reacción consistió en 45,6 % de conjugado de mono-PEG lineal-G-CSF (conjugado de mono-PEG-G-CSF), aproximadamente 45,9 % de G-CSF sin modificar por PEG y los otros [conjugado de di-PEG lineal-G-CSF (conjugado de di-PEG-G-CSF) y N-hidroxisuccinimida (NHS)], por una cromatografía de alta resolución de exclusión por tamaño (véase la Fig. 3, en la que 1 representa conjugado de oligo-PEG-G-CSF, 2 representa conjugado de di-PEG-G-CSF, 3 representa conjugado de mono-PEG-G-CSF y 4 representa G-CSF sin modificar por PEG). Y la pureza de mono-PEG lineal-ramificado-G-CSF separado de la mezcla se midió por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (véase la Fig. 6, en la que 1 representa conjugado de oligo-PEG-G-CSF, 2 representa conjugado de di-PEG-G-CSF, 3 representa conjugado de mono-PEG-G-CSF y 4 representa G-CSF sin modificar por PEG), y el peso molecular se midió por espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (véase la Fig. 9).

#### 35 <Ejemplo comparativo 2> Preparación de conjugados de polietilenglicol lineal (PEG MW 20.000 Da)-G-CSF

Se filtraron 10 mg de rhG-CSF (Dong-A Pharm. Co., Ltd.) a pH 8,5 y 50 mM de disolución de tampón borato de sodio, y entonces se añadieron 8,0 mg de PEG lineal que tiene N-hidroxisuccinimida (NOF Corporation, Japón) y el peso molecular de 20.000 dalton a la disolución para preparar la relación molar de rhG-CSF : PEG lineal de 1: 0,75. Y la disolución se agitó a 4 °C durante 90 min. La reacción se detuvo añadiendo HCl 100 mM para hacer el pH de la disolución 4 y diluyendo el volumen de la disolución 5 veces con agua destilada estéril. Entonces la mezcla se entró en cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 20 mM de disolución de tampón acetato sódico (pH 4,0), y se separó de la misma el conjugado de PEG lineal-ramificado-G-CSF. La mezcla se fraccionó usando 0 ~ 1 M de gradiente de concentración de cloruro sódico (NaCl). La relación molar de PEG lineal con respecto a G-CSF en el conjugado de PEG lineal-G-CSF se confirmó por HPLC y SDS-PAGE. Y se excluyeron conjugados de di- o más (tri, tetra...)-PEG lineal-G-CSF, G-CSF sin reaccionar que queda después de la reacción, etc. Y los eluatos se concentraron y se esterilizaron por filtración para obtener el conjugado de mono-PEG lineal-G-CSF en el que un G-CSF y un PEG lineal (MW 20.000Da) están conjugados (o se llama conjugado de mono-PEG lineal-G-CSF).

#### 45 <Ejemplo comparativo 3> Preparación de conjugados de polietilenglicol de dos ramas (PEG MW 20.000 Da, estructura esquelética de licina)-G-CSF

Se filtraron 10 mg de rhG-CSF (Dong-A Pharm. Co., Ltd.) a pH 8,5 y 50 mM de disolución de tampón borato de sodio y luego se añadieron 9,1 mg de PEG de dos ramas que tiene N-hidroxisuccinimida (Nektar, EE.UU.) y el peso molecular de 20.000 dalton a la disolución para preparar la relación molar de rhG-CSF : PEG lineal de 1: 0,75. Y la disolución se agitó a 4 °C durante 90 min. La reacción se detuvo añadiendo HCl 100 mM para hacer el pH de la disolución 4 y diluyendo el volumen de la disolución 5 veces con agua destilada estéril. Entonces, la mezcla se entró en cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 20 mM de disolución de tampón acetato sódico (pH 4,0), y se separó de la misma el conjugado de PEG lineal-ramificado-G-CSF. La mezcla se fraccionó usando 0 ~ 1 M de gradiente de concentración de cloruro sódico (NaCl). La relación molar de PEG de dos ramas con respecto a G-CSF en el conjugado de PEG de dos ramas-G-CSF se confirmó por HPLC y SDS-PAGE. Y se

excluyeron conjugados de di- o más (tri, tetra...)-PEG de dos ramas-G-CSF, G-CSF sin reaccionar que queda después de la reacción, etc. Y los eluatos se concentraron y se esterilizaron por filtración para obtener el conjugado de mono-PEG de dos ramas-G-CSF en el que un G-CSF y un PEG de dos ramas (MW 20.000Da) están conjugados (o se llama conjugado de mono-PEG lineal-G-CSF).

- 5 **<Ejemplo comparativo 4>** Preparación de conjugados de polietilenglicol dos ramas (PEG MW 20.000 Da, estructura esquelética de glicina)-G-CSF

Se filtraron 10 mg de rhG-CSF (Dong-A Pharm. Co., Ltd.) a pH 8,5 y 50 mM de disolución de tampón borato de sodio. Y se añadieron 8,0 mg de PEG de dos ramas que tiene N-hidroxisuccinimida (NOF, Japón) y el peso molecular de 20.000 dalton a la disolución para preparar la relación molar de rhG-CSF : PEG lineal de 1: 0,75. La disolución se agitó a 4 °C durante 90 min. Y la reacción se detuvo añadiendo HCl 100 mM para hacer el pH de la disolución 4 y diluyendo el volumen de la disolución 5 veces con agua destilada estéril. Entonces la mezcla se entró en cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 20 mM de disolución de tampón acetato sódico (pH 4,0), y se separó de la misma el conjugado de PEG lineal-ramificado-G-CSF. La mezcla se fraccionó usando 0 ~ 1 M de gradiente de concentración de cloruro sódico (NaCl). La relación molar de PEG de dos ramas con respecto a G-CSF en el conjugado de PEG de dos ramas-G-CSF se confirmó por HPLC y SDS-PAGE. Y se excluyeron conjugados de di- o más (tri, tetra...)-PEG de dos ramas-G-CSF, G-CSF sin reaccionar que queda después de la reacción. etc. Y los eluatos se concentraron y se esterilizaron por filtración para obtener el conjugado de mono-PEG de dos ramas-G-CSF en el que un G-CSF y un PEG de dos ramas (MW 20.000 Da) están conjugados (o se llama conjugado de mono-PEG lineal-G-CSF).

- 20 **<Ejemplo comparativo 5>** Preparación de conjugados de mono-metoxipolietilenglicol-G-CSF que se unen en el residuo de  $\alpha$ -amino del extremo N

El conjugado del título se preparó mediante un procedimiento descrito en la patente coreana nº 0248111 y la patente de Estados Unidos nº 5.824.784. El procedimiento como se describe brevemente es del siguiente modo.

Se agitaron 100 mM de fosfato de sodio que contiene 20 mM de NaCNBH<sub>3</sub> y 5 mg/ml de rhG-CSF a 4 °C. Y se añadieron 5 veces de moles de aldehído de metoxipolietilenglicol lineal (mPEG) (Nektar, EE.UU.) a la disolución, que se agitó durante 10 h. La reacción se detuvo añadiendo HCl 100 mM para hacer el pH de la disolución 4 y diluyendo el volumen de la disolución 5 veces con agua destilada estéril. Entonces, la mezcla se entró en cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 20 mM de disolución de tampón acetato sódico (pH 4,0) y se separó de la misma el conjugado de PEG lineal-ramificado-G-CSF. La mezcla se fraccionó usando 0 ~ 1 M de gradiente de concentración de cloruro sódico (NaCl). Y los eluatos se concentraron y se esterilizaron por filtración para obtener el conjugado de mono-mPEG-G-CSF en el que un G-CSF y un PEG de dos ramas (MW 20.000 Da) están conjugados (o se llama conjugado de mono-PEG lineal-G-CSF).

**<Ejemplo comparativo 6>** Preparación de conjugados de mono-metoxipolietilenglicol-G-CSF que se unen en el grupo tiol del residuo de cisteína de G-CSF

- 35 El conjugado del título se preparó mediante un procedimiento descrito en la patente coreana nº 0508358. El procedimiento como se describe brevemente es del siguiente modo.

Se añadió 1 mg de rhG-CSF (Dong-A Pharm. Co., Ltd.) a 1 ml de disolución de tampón fosfato de sodio (0,1 M) que tiene pH 8,5, y se añadieron 52,6 mg de polietilenglicol-maleimida (NOF, Japón) a la disolución. Y la disolución se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces se eliminaron los derivados de PEG que quedaron después de la reacción de la disolución por Centricon 30 (Amicon, EE.UU.). Y la disolución se concentró y se esterilizó por filtración para obtener el conjugado de mono-mPEG-G-CSF.

Las pruebas de propiedades y actividad farmacológica se realizaron usando los conjugados preparados anteriormente, y los resultados son del siguiente modo.

**<Ejemplo experimental 1>** Separación analítica de isómeros de posición de conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF

45 Se introdujeron 100 µg de conjugados de mono-PEG de tres ramas-G-CSF del Ejemplo 1 a una columna analítica de resina de intercambio catiónico (SP-SWP, TOSOH) equilibrada con 25 mM de tampón acetato sódico (pH 4,0, controlada con ácido acético glacial), y cada isómero de posición de los conjugados se separó por 100 mM de tampón acetato sódico, pH 7,8). Se confirmó que la relación de cada isómero de posición era aproximadamente 54 %: 33 %:10 % (véase la Fig. 10).

- 50 **<Ejemplo experimental 2>** Análisis de actividades biológicas de isómeros de posición de conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF

Se midieron actividades biológicas relativas de isómeros de posición de conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF del

Ejemplo 1 usando las de G-CSF.

Cepa de células NFS-60 cultivada en RPMI 1640 de crecimiento que contenía un 10 % de SBF y 1 ng/ml de rmlL-3 se lavó 3 veces con RPMI 1640 de ensayo que contenía un 5 % de SBF. Y la cepa de células se dividió en 100 ml ( $2 \times 10^5$  células/ml) en una placa de 96 pocillos. Entonces la muestra se diluyó con medio de ensayo para preparar una muestra de 200 ng/ml, y 9 muestras más de 200 ng/ml por gradiente de 5 veces, y las muestras se dividieron en 3 pocillos, cada uno de 100 ml, por concentración en placas de 96 pocillos que contenían las disoluciones de células.

Cada pocillo se cultivó a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> en estufa de incubación durante 48 h, se añadieron 40 µl de MTS a cada pocillo. Después de 2 h se midió una absorbancia de la muestra a 490 nm por un lector de ELISA. La CE<sub>50</sub> se calculó por una curva de dosis-respuesta y un análisis de regresión lineal del punto que comprendió la recta lineal de una curva patrón, y se determinaron las actividades de isómeros de posición (véase la Fig. 11). Los conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF de la presente invención tienen isómeros de posición que tienen actividades similares. Es decir, es necesario eliminar algunos isómeros de posición que tienen actividad relativamente menor debido a que los conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF de la presente invención están compuestos por conjugados con actividades uniformes.

**<Ejemplo experimental 3>** Prueba farmacocinética de los conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF

La prueba farmacodinámica se realizó para inyectar hipodérmicamente cada uno de G-CSF, los conjugados de PEG-G-CSF del Ejemplo 1 y los conjugados de PEG-G-CSF del Ejemplo 2 en ratas de ensayo (Sprague Dawley) que tenían de 240 ~ 260 g de pesos corporales. Después de inyectarles la cantidad de 400 µg por rata, las muestras de sangre se recogieron de las ratas a 0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 8 h, 12 h, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días y 7 días después de la inyección. Y las concentraciones de los conjugados de G-CSF en la muestra se analizaron cuantitativamente por un kit de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) (Biosource, EE.UU.).

La semivida en sangre de los conjugados de PEG-G-CSF del Ejemplo 1 y Ejemplo 2 aumentó 3 veces y 10,8, respectivamente, en comparación con la de G-CSF, y las áreas bajo la curva de concentración-tiempo en sangre de los conjugados del Ejemplo 1 y Ejemplo 2 también aumentaron 7,6 veces y 23,4 veces, respectivamente, en comparación con las de G-CSF [Tabla 1: Prueba farmacocinética de los conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF y G-CSF en rata (rata Sprague Dawley)]. Se confirmó por esta prueba que la farmacocinética del conjugado de PEG-G-CSF depende de un tamaño de PEG.

[Tabla 1]

	rhG-CSF	Ejemplo 1	Ejemplo 2
C <sub>máx</sub> (h)	1383,2	1676,8	1710,6
T <sub>máx</sub> (h)	1,5	12	36
t <sub>1/2</sub> (h)	2,9	8,7	31,2
ABC (ng*h/ml)	6246,9	47420,3	146196,1
*Las abreviaturas en la tabla anterior tienen los siguientes significados: T <sub>máx</sub> : tiempo para alcanzar la concentración máxima C <sub>máx</sub> : concentración máxima t <sub>1/2</sub> : semivida de eliminación ABC: área bajo la curva de concentración-tiempo.			

**<Ejemplo experimental 4>** Prueba de estabilidad de los conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF sobre PEG salientes de los conjugados

Los conjugados de PEG-G-CSF de los Ejemplos 1 y 2 y los Ejemplos comparativos 2, 3 y 4 se depositaron bajo pH 7 y 37 °C durante 7 días, y se analizaron los aspectos de PEG salientes en la longitud de tiempo por cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa, para estimar los grados de PEG salientes sobre una estructura esquelética, pesos moleculares y tipos ramificados de PEG.

En la estructura esquelética de PEG, los PEG salientes se produjeron más frecuentemente en el Ejemplo comparativo 2

usando PEG lineal. Sin embargo, los PEG salientes de los conjugados de los Ejemplos 1 y 2, y el Ejemplo comparativo 4, se produjeron menos frecuentemente que aquellos de los Ejemplos comparativos 2 y 3 (Tabla 2: Comparación de tasas de generación de G-CSF en conjugados de PEG-G-CSF que tienen diversas estructuras esqueléticas de PEG). Esta prueba confirmó que el conjugado de PEG de tres ramas-G-CSF es más estable que los conjugados de PEG lineal, de dos ramas-G-CSF, y el conjugado con una estructura esquelética de glicerol es más estable que los conjugados con una estructura esquelética de licina.

[Tabla 2]

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4
$\Delta$ (tasa de generación, %/día)	0,44	0,34	5,59	1,36	0,54

**<Ejemplo experimental 5>** Prueba de estabilidad de los conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF contra la formación de agregaciones según una estructura esquelética de PEG y un tipo de unión de PEG a G-CSF

Se probaron el conjugado de mono-PEG de tres ramas-G-CSF del Ejemplo 1; el conjugado de mono-PEG-G-CSF de los Ejemplos comparativos 2 y 4 que tiene un peso molecular similar al conjugado del Ejemplo 1 y diferente estructura esquelética del conjugado del Ejemplo 1; y el conjugado de mono-PEG-G-CSF del Ejemplo comparativo 5 que tiene diferente tipo de unión del conjugado del Ejemplo 1 para medir estabildades contra la formación de agregaciones. Cada muestra se recogió en 500  $\mu$ l, y el disolvente de las muestras se intercambi3ó 3 veces con 100 mM de disolución de tampón fosfato que tenía pH 7. Y las muestras se depositaron a 37 °C durante 14 días, y la formación de agregación de los conjugados se analizó por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño.

Los resultados del análisis de formación de la agregación representan que el conjugado de mono-PEG-G-CSF del Ejemplo 1 tuvo la mayor estabilidad en el aspecto de PEG salientes, y formó la mínima agregación (Tabla 3: Tasas de generación de conjugados de agregación según una estructura esquelética de PEG y un tipo de unión de PEG a G-CSF). Los conjugados de mono-PEG-G-CSF de los Ejemplos comparativos 2 y 4 usando PEG que tienen la misma estructura esquelética de glicerol que los PEG en el Ejemplo 1, y usando el mismo tipo de unión al Ejemplo 1, además del conjugado del Ejemplo 1, formaron alguna agregación. Sin embargo, los conjugados de mono-PEG-G-CSF del Ejemplo comparativo 3 que usaron PEG que tiene diferente estructura esquelética a la los PEG en el Ejemplo 1 (aunque usando el mismo tipo de unión que el Ejemplo 1) formaron mucha agregación. Y los conjugados de mono-PEG-G-CSF del Ejemplo comparativo 5 que usaron PEG que tiene diferente estructura esquelética a la de los PEG en el Ejemplo 1 y que usaron diferente tipo de unión a la del Ejemplo 1 formaron 2 veces o más de agregación en comparación con los conjugados del Ejemplo 1.

[Tabla 3]

muestra	Ejemplo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo comparativo 5
Tasa de generación (%)	6,81	7,89	50,5	7,91	15,3

En conclusión, el conjugado de mono-PEG de tres ramas-G-CSF del Ejemplo 1 es el más estable en tanto PEG salientes de los conjugados como en formar agregación. Es decir, este ventajoso efecto es de diferentes estructuras esqueléticas entre PEG ramificado y PEG ramificado usado en la presente invención.

**<Ejemplo experimental 6>** Ensayo de actividades de proliferación de neutrófilos de conjugados de PEG-G-CSF en el modelo animal al que se administra una medicina contra el cáncer

Las actividades de proliferación de neutrófilos de conjugados de mono-PEG de tres ramas-G-CSF del Ejemplo 1, conjugados de mono-mPEG (metoxipolietilenglicol)-G-CSF de los Ejemplos comparativos 5 y 6 que tienen diferente tipo de unión y diferente peso molecular de los conjugados del Ejemplo 2 se ensayaron por modelo de ratón al que se administró un agente contra el cáncer.

Ratones (BDF1) de 20 ~ 25 g se administraron con 200 mg/kg de un agente contra el cáncer (ciclofosfamida) para reducir el número de neutrófilos durante 2 días.

Y cada uno del conjugado del Ejemplo 1 y los conjugados de los Ejemplos comparativos 5 y 6 se administraron

subcutáneamente una vez, 1 mg/kg por ratón, y G-CSF se administró 8 veces por 0,125 mg/kg por ratón para preparar la cantidad de administración total, 1 mg/kg. Las sangres de los ratones se recogieron a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 12 días, y los números totales de leucocitos y neutrófilos se midieron por el instrumento de medición de hemocitos automático (HEMAVET 850, Drew Scientific Ltd., RU). Los periodos que empezaron la recuperación de neutrófilos disminuidos por un agente contra el cáncer y los tiempos requeridos para la recuperación de neutrófilos, en el conjugado del Ejemplo 1 y los conjugados de los Ejemplos comparativos 5 y 6, fueron similares. Sin embargo, el tiempo en alcanzar el máximo número de neutrófilos en el conjugado del Ejemplo 1 fue aproximadamente 12 h más rápido que en aquellos de los conjugados de los Ejemplos comparativos 5 y 6. El área bajo la elevada curva de recuento de neutrófilos-tiempo (AB-RN) del conjugado del Ejemplo 1 fue mayor (Tabla 4: Ensayo de actividades de proliferación de neutrófilos de conjugados de PEG-G-CSF en el modelo animal al que se administra una medicina contra el cáncer). Por tanto, se confirmó que el conjugado de mono-PEG de tres ramas-G-CSF tiene un rápido efecto de proliferación de neutrófilos.

[Tabla 4]

	G-CSF	Ejemplo 1	Ejemplo comparativo 5	Ejemplo comparativo 6
Aumento de neutrófilos †	2 días	2 días	2 días	2 días
Tiempo de recuperación de neutrófilos*	4,5 días	4,5 días	4,5 días	4,5 días
Pico de neutrófilos	6 días	5,5 días	6 días	6 días
AB-RN ( $\times 10^9$ células·día/l)	24,4	54,0	52,1	34,6

†: Tiempo para que los neutrófilos aumenten después de la administración de una medicina

\*: Tiempo para alcanzar  $1.000/\text{mm}^3$  o más neutrófilos después de la administración de una medicina contra el cáncer.

#### APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Los conjugados de PEG de tres ramas-G-CSF de la presente invención son farmacéuticamente más estables que los conjugados de PEG lineal o de dos ramas-G-CSF en términos de PEG salientes de conjugados de PEG-G-CSF y formación de agregados de los conjugados. Y los conjugados de la presente invención pueden usarse sin separaciones adicionales de isómeros de posición debido a que los conjugados consisten en isómeros de posición con actividades similares. Y la composición de la presente invención tiene los efectos de producción continua de neutrófilos y elevada semivida *in vivo*.



10. Una composición farmacéutica para su uso para tratar o prevenir síntomas producidos por la disminución de la función hematopoyética y la disminución de la función inmunológica, que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 como componente eficaz.
- 5 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la que los síntomas producidos por la disminución de la función hematopoyética y la disminución de la función inmunológica son cáncer sólido, neutropenia producida por quimioterapia para el cáncer para tumor de la sangre, neutropenia producida por síndrome mielodisplásico, neutropenia producida por anemia aplásica, neutropenia idiopática congénita y neutropenia producida por el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana.
- 10 12. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 para su uso para tratar neutropenia, prevenir neutropenia o facilitar el aumento del número de neutrófilos en el momento de la movilización de citoblastos hematopoyéticos a sangre periférica y trasplante de citoblastos hematopoyéticos.

Fig. 1

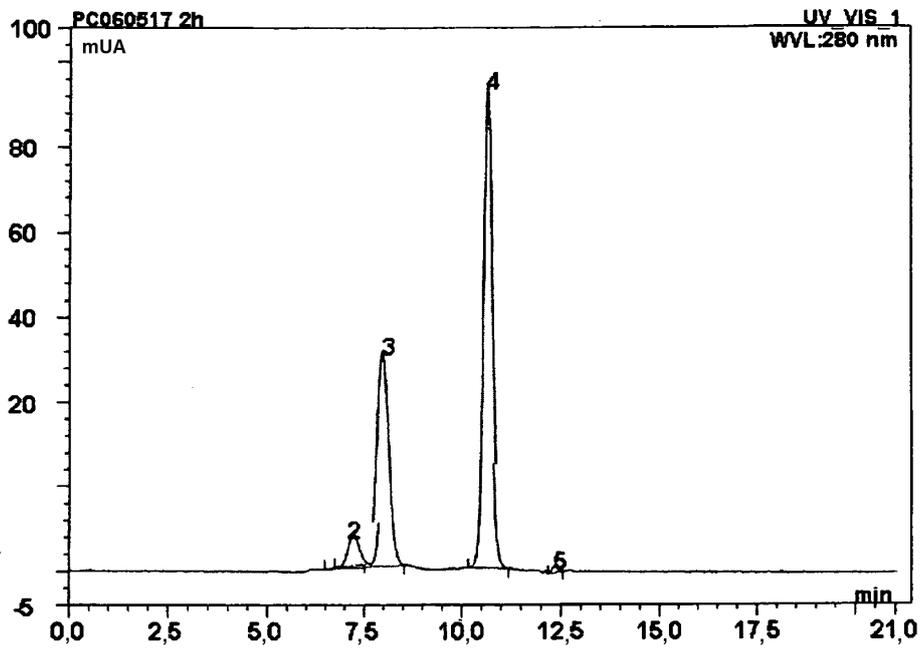


Fig. 2

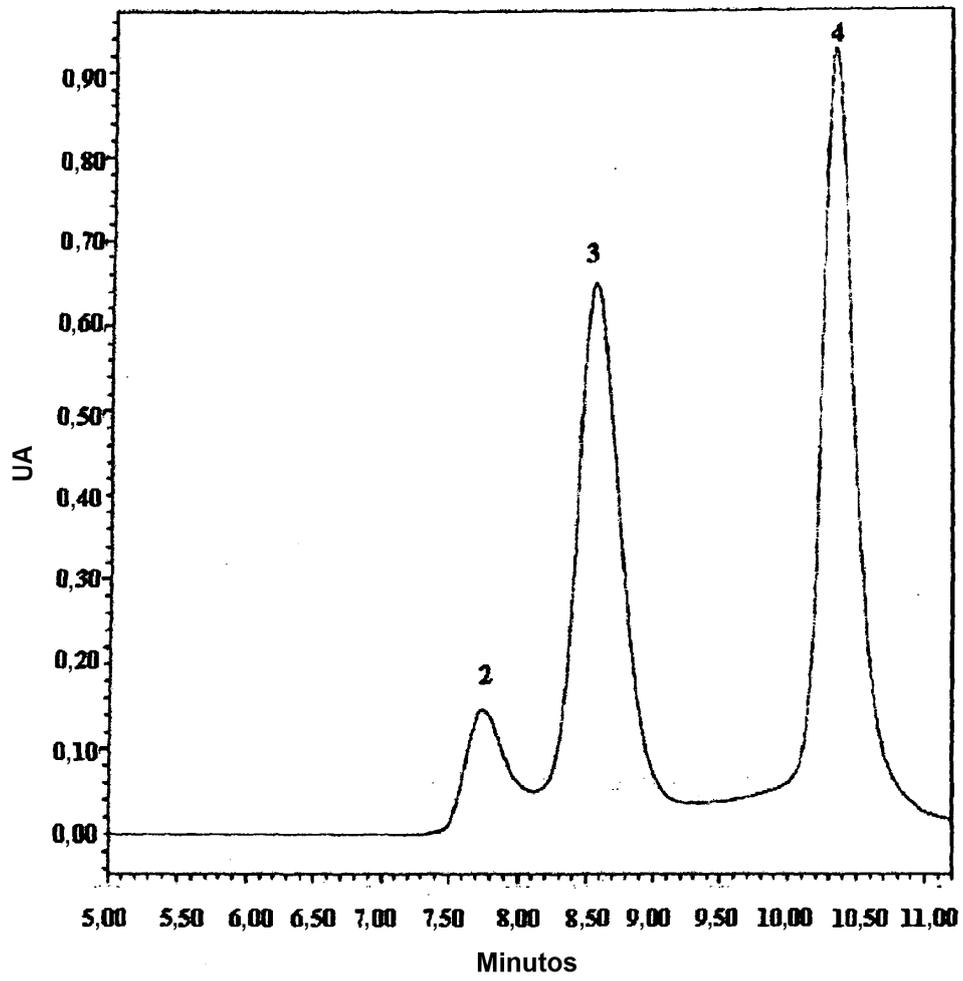


Fig. 3

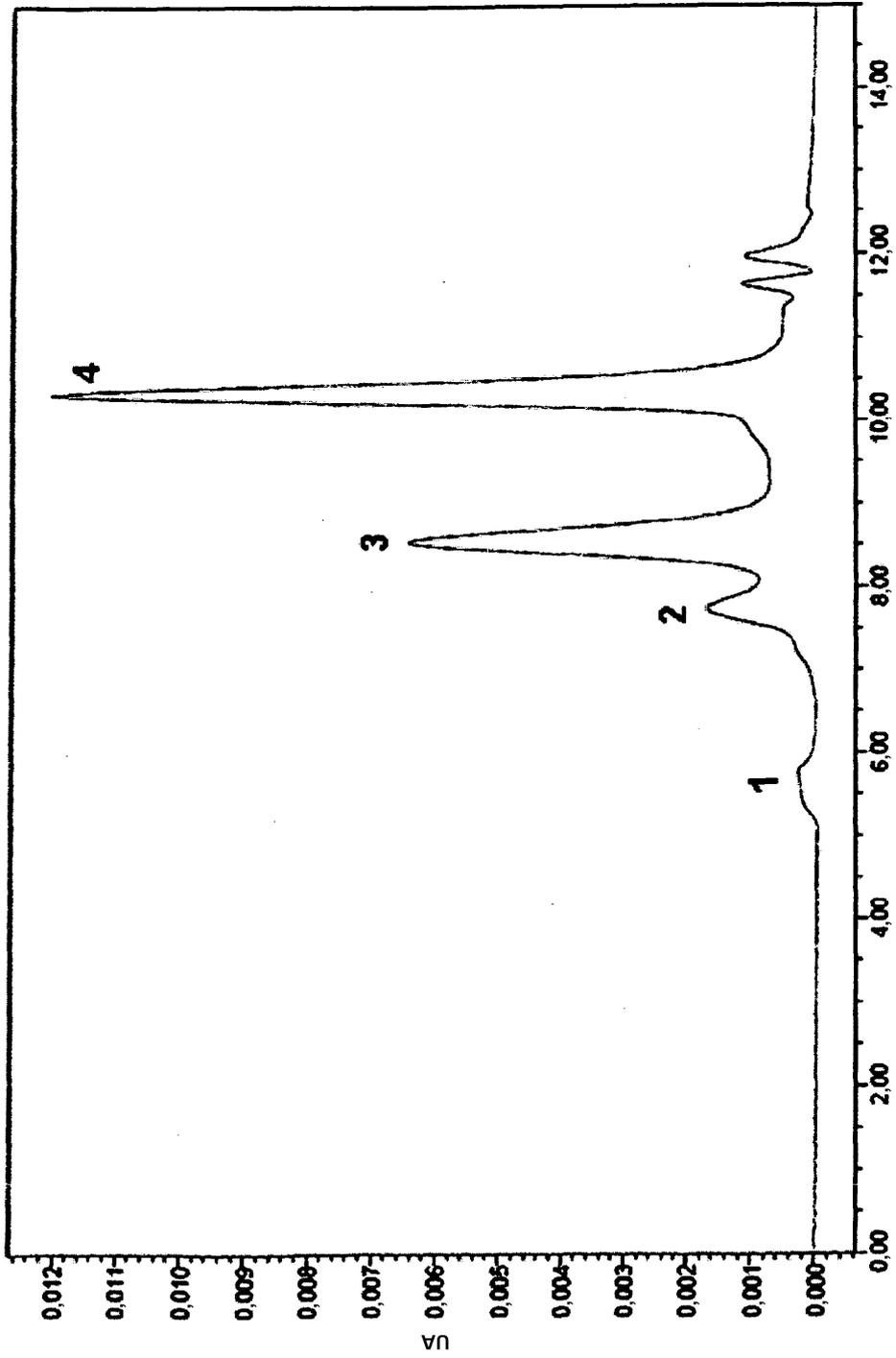


Fig. 4

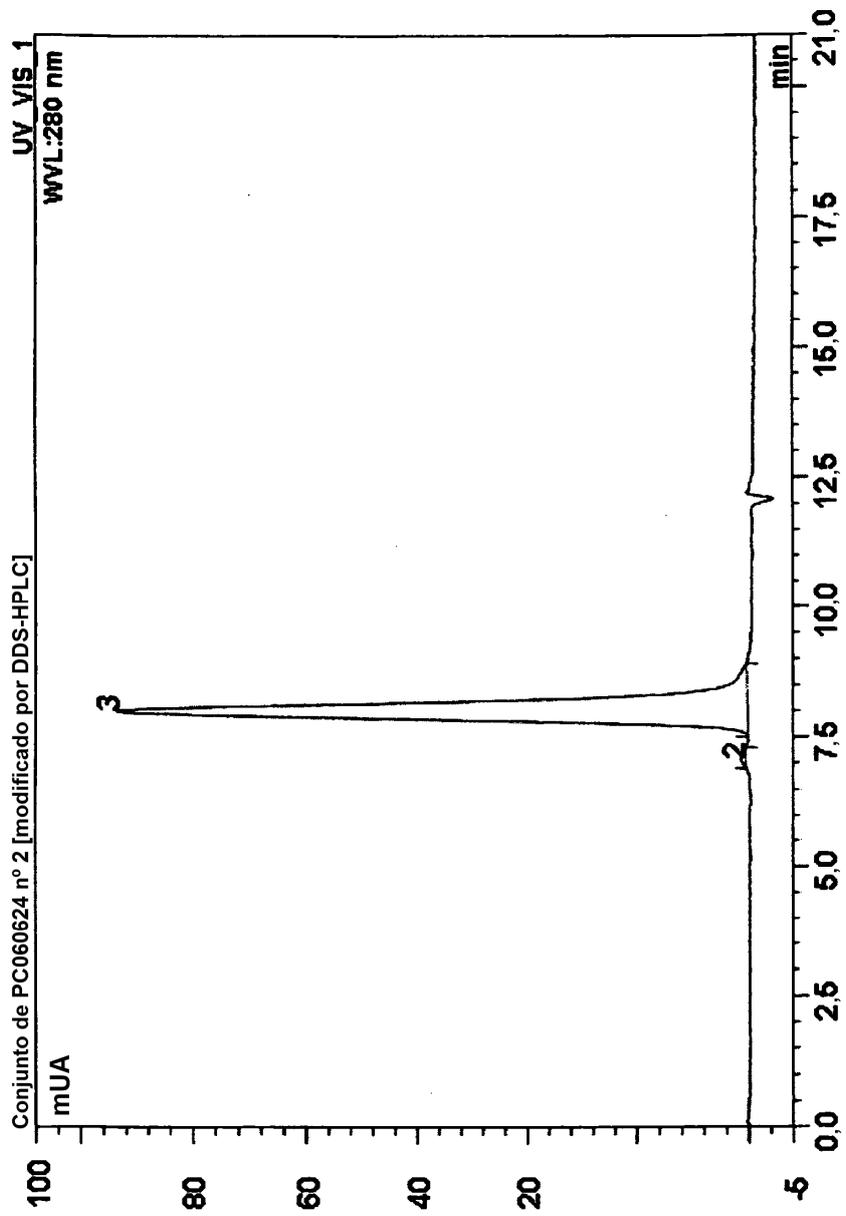


Fig. 5

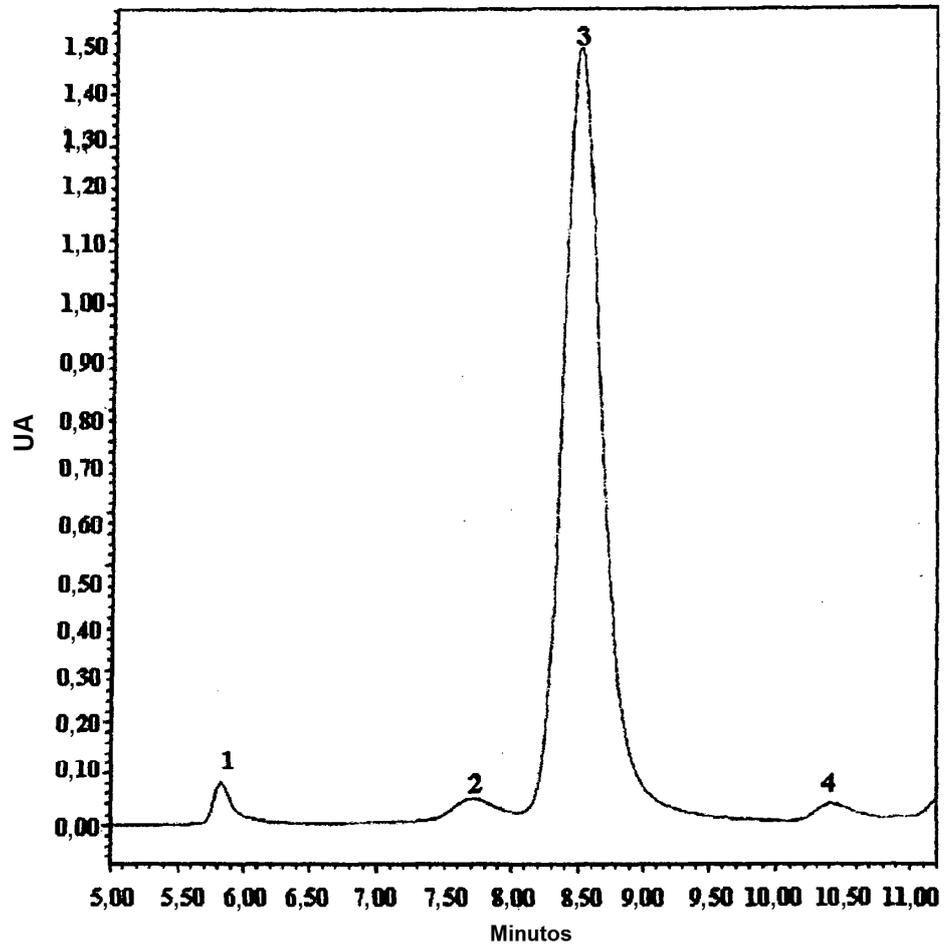


Fig. 6

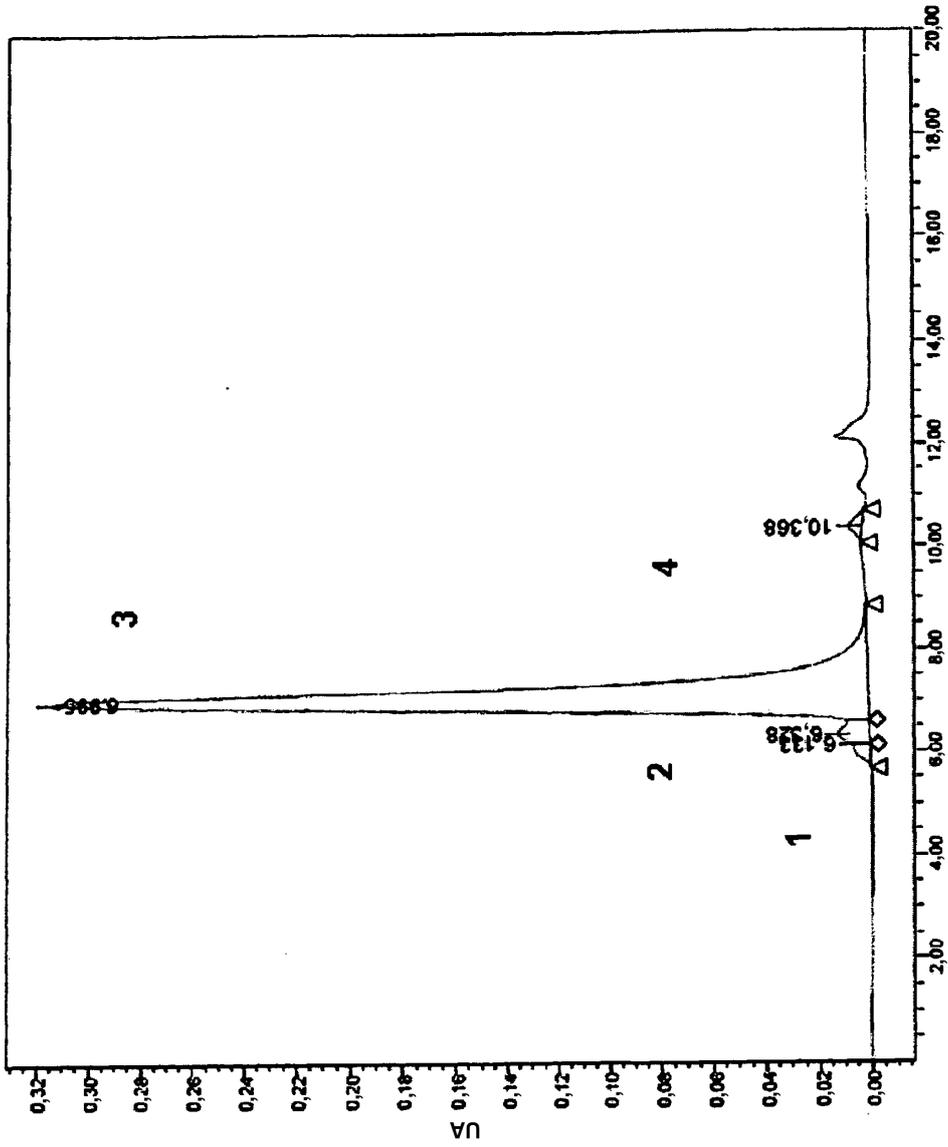


Fig. 7

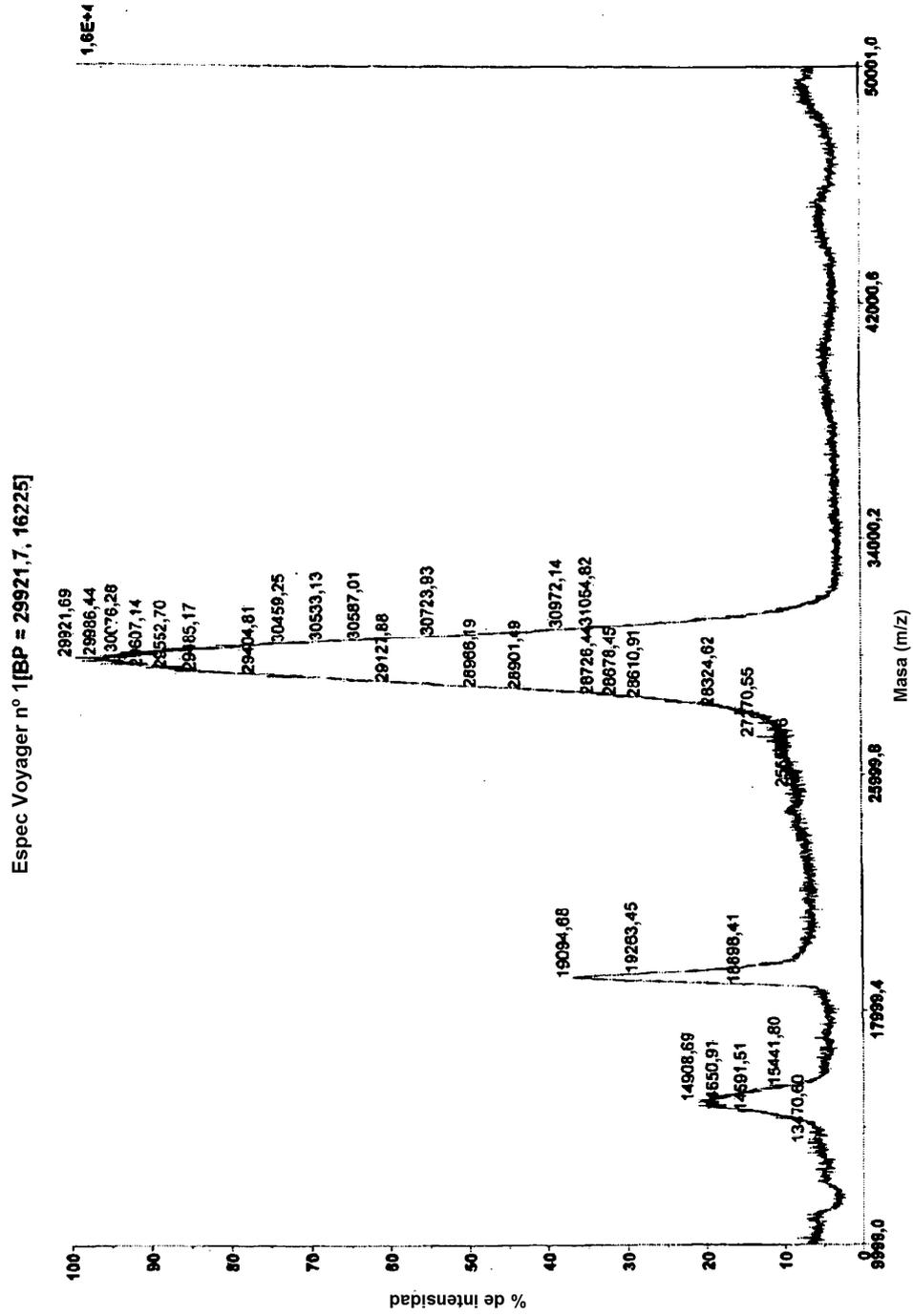


Fig. 8

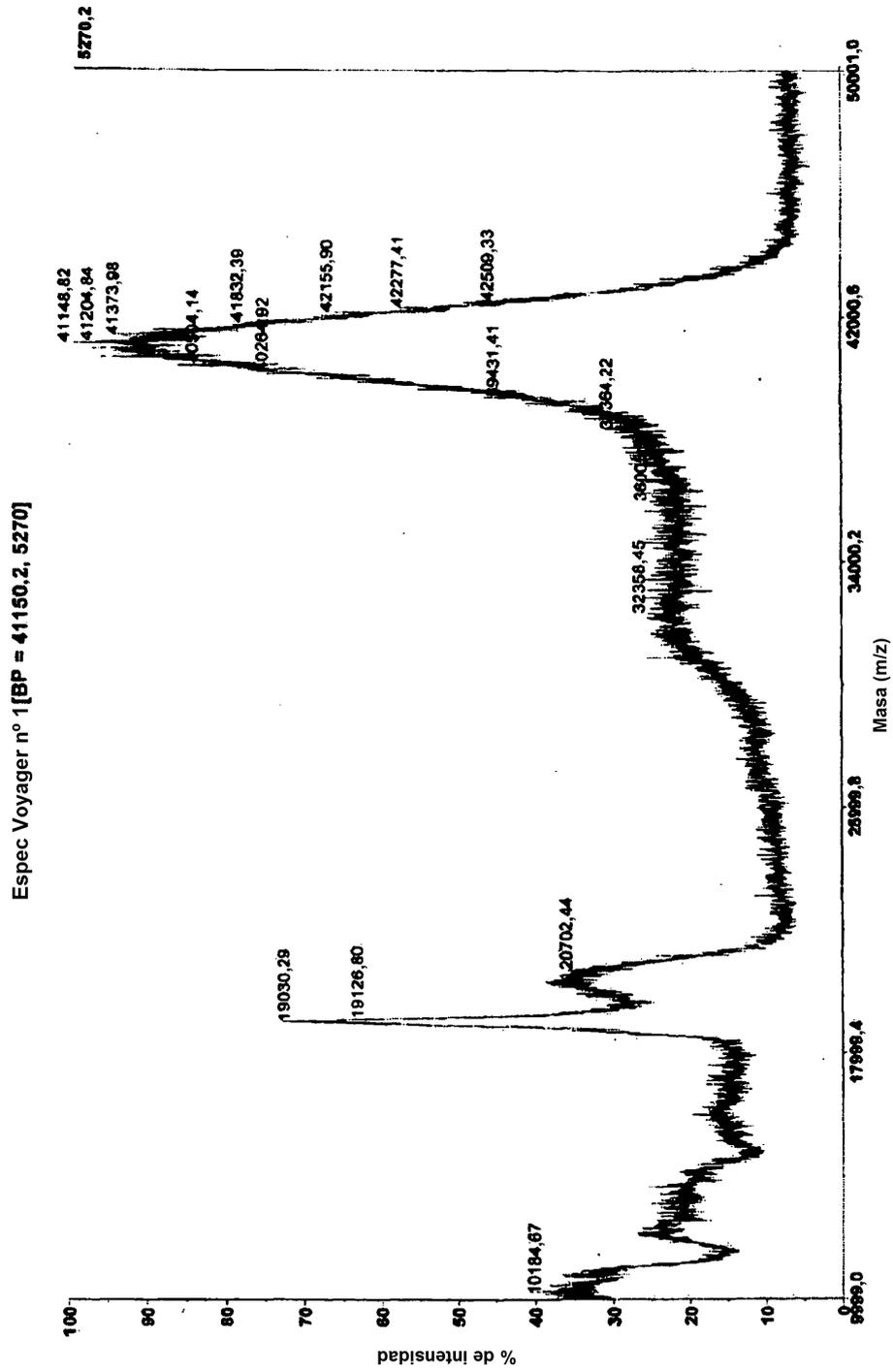


Fig. 9

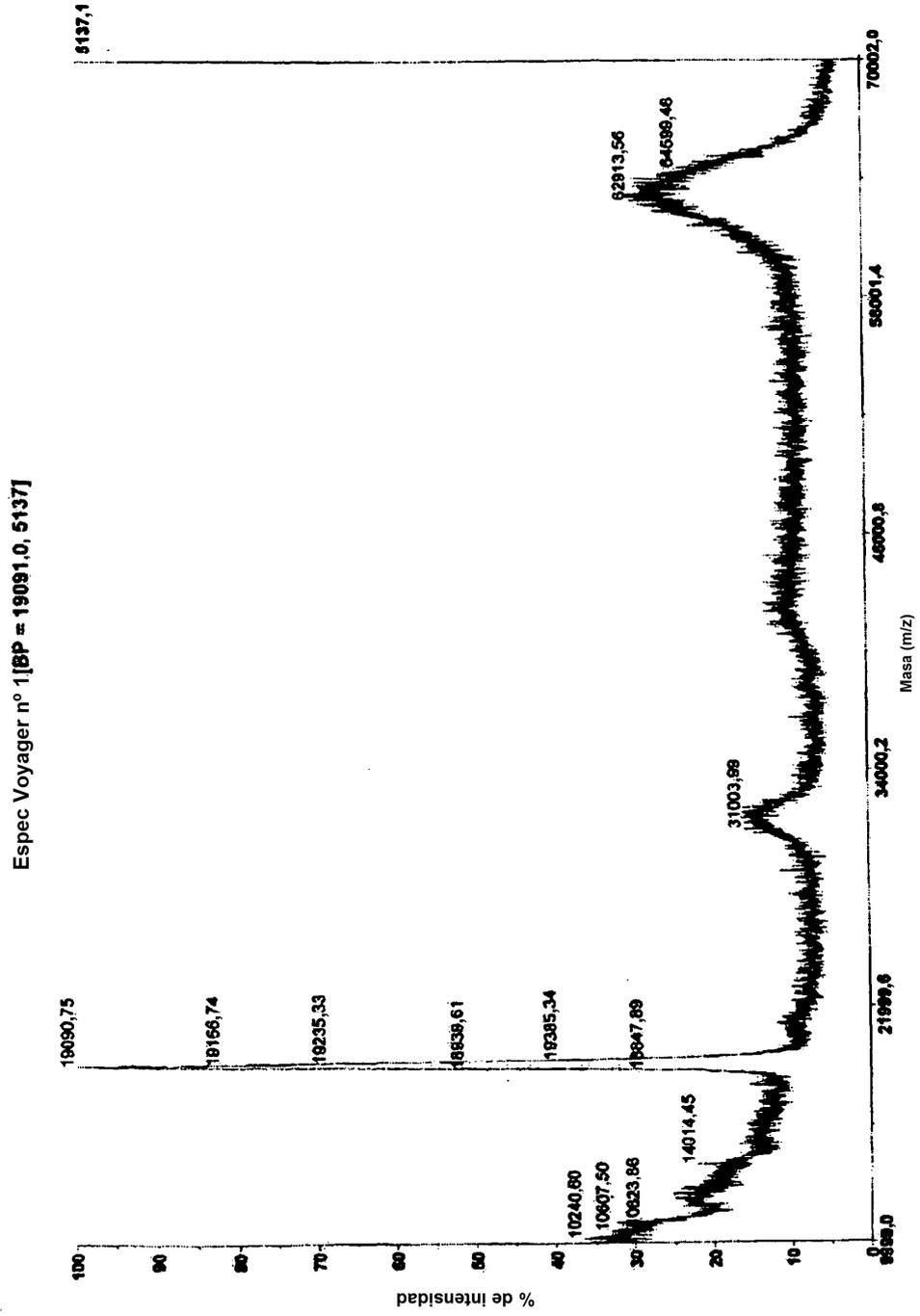
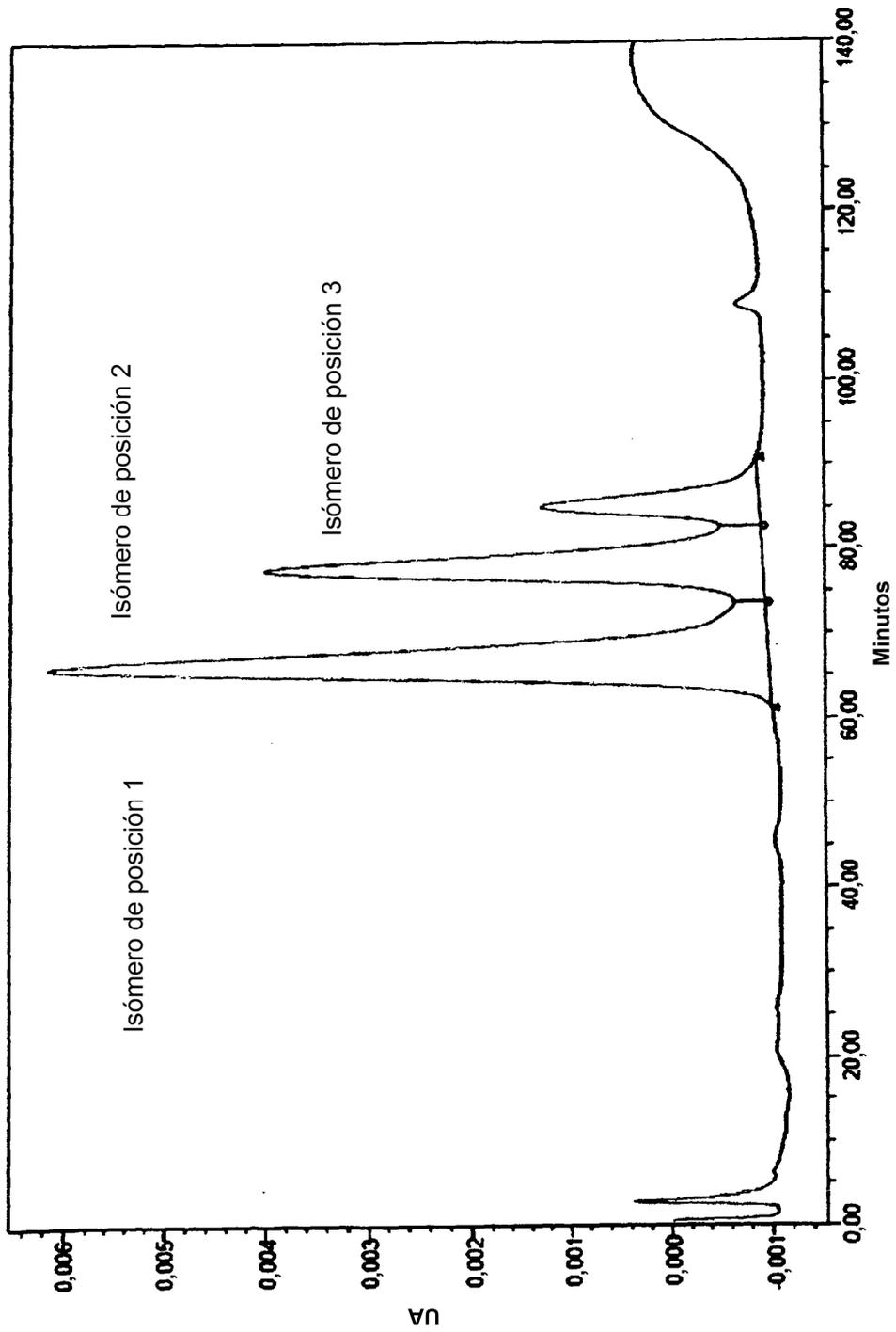


Fig. 10



**Fig. 11**

