

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 030**

51 Int. Cl.:

**C07K 17/08** (2006.01)  
**C07K 14/535** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 38/19** (2006.01)  
**A61K 31/04** (2006.01)  
**A61P 31/18** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2008 E 08706693 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2248832**

54 Título: **Un conjugado del G-CSF modificado por un polímero hidrosoluble**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.11.2014**

73 Titular/es:

**JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (100.0%)**  
**145 Renmin Eastern Road Xinpu District**  
**Lianyungang, Jiangsu 222002, CN**

72 Inventor/es:

**WANG, RUIJUN;**  
**SUN, CHANGAN;**  
**JIANG, TAO y**  
**WANG, YALI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 523 030 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

Un conjugado del G-CSF modificado por un polímero hidrosoluble

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un conjugado del G-CSF modificado por un polímero hidrosoluble con la fórmula (I): un polímero hidrosoluble-grupo conector-N-terminal del G-CSF, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, al procedimiento de preparación del mismo y a la composición farmacéutica que comprende el mismo. En particular, se refiere a un conjugado del G-CSF de fórmula general (II).

**Antecedentes de la invención**

10 El factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF) es producido por las células mononucleares y los fibroblastos. Puede estimular a los granulocitos para que formen colonias, y tiene un efecto estimulante sobre los neutrófilos. Mediante su combinación con los receptores de la membrana de la célula objetivo, el G-CSF estimula principalmente la hematopoyesis de los granulocitos y también promueve que las células madre hematopoyéticas multipotenciales entren en el ciclo celular; promueve la proliferación, la diferenciación y la maduración de los precursores hematopoyéticos mieloides, e impulsa la liberación de los neutrófilos en la sangre, mientras que  
15 aumenta el número de neutrófilos periféricos y mejora su función, tal como la fagocitosis, la actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo frente a células tumorales, etc. [Metcalf, Blood 67: 257 (1986); Yan y col., Blood 84 (3): 795 - 799 (1994); Bensinger, y col., Blood 81(11): 3158 - 3163 (1993); Neben, y col., Blood 81 (7): 1960 - 1967 (1993)]. Por lo tanto, el factor estimulante de las colonias de granulocitos recombinante se usa habitualmente en pacientes oncológicos sometidos a radioterapia o a quimioterapia, y en pacientes de leucemia tras un trasplante de médula ósea, como un tratamiento coadyuvante.  
20

Los G-CSFs humanos usados habitualmente en el mercado son Neupogen y Neutrogin, y el derivado del G-CSF humano, es decir Neu-wp. Los derivados del G-CSF o las proteínas variantes también son mencionados en numerosa literatura [tales como el documento US5581476, el documento US5214132, el documento US5362853, el documento US4904584]. Estas proteínas variantes tienen múltiples sustituciones de aminoácidos que se han diseñado para explorar un G-CSF que es más estable, más activo y más adecuado para su uso clínico.  
25

El G-CSF recombinante humano disponible comercialmente debe ser inyectado con frecuencia, y es difícil conseguir buenos efectos clínicos debido a su baja biodisponibilidad, a su corta semivida en el cuerpo humano y a su vulnerabilidad a las proteasas *in vivo*. La investigación muestra que la posibilidad de que las proteínas con aplicaciones terapéuticas se transformen en fármacos está muy aumentada tras ser modificadas con polietilenglicol para pasar a ser un conjugado de PEG - proteína. Este tipo de proteínas PEGiladas se han aplicado completamente en la práctica clínica [tal como Katre, Advanced Drug Delivery Systems, 10: 91(1993); Inada; y col.; J. Bioact y Compatible Polymers; 5: 343(1990)]. Los conjugados de proteína modificada con polietilenglicol no sólo tienen una mejor estabilidad física y química, sino también una mejor resistencia a las proteasas; además, al aumentar el peso molecular de los conjugados, se amplía la semivida de los conjugados *in vivo*. La toxicidad se reducirá debido a la  
30 baja posibilidad de producir anticuerpos *in vivo* y al reducido volumen de distribución de los conjugados en comparación con las proteínas originales. Las proteínas variantes del G-CSF o del G-CSF modificadas con PEG se han desvelado en numerosa literatura, tales como en el documento EP0335423, en el documento EP0401384, en el documento US5824778, en el documento US5985265, en el documento WO0044785, en el documento WO2001051510, en el documento US5824784, etc. Específicamente, de entre los conjugados modificados con polietilenglicol del G-CSFs desvelados por la patente US5985265, los conjugados modificados en el N terminal del G-CSF tiene las mejores actividades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Pero la selectividad del grupo amino es baja cuando la modificación con polietilenglicol se realiza a través de una reacción de acilación, por lo que generalmente se obtiene una forma mixta de la modificación en varias posiciones (grupo amino) del G-CSF por el polietilenglicol. Se requiere una separación y una purificación para obtener cada monómero con un bajo rendimiento,  
40 y son difíciles de aplicar en la elaboración industrial. En la patente US5824784, se usó aldehído de polietilenglicol con un elevado peso molecular para modificar directamente el G-CSF. Controlando estrictamente el pH de la reacción, pueden obtenerse conjugados modificados con PEG N-terminales relativamente específicos. Indiscutiblemente, sin embargo, la reacción con elevada selectividad se consigue mediante los diferentes Pka entre el grupo amino de la cadena lateral y el grupo amino N-terminal, lo que es muy difícil de controlar en la escala de producción. Además, debido al contenido variable en cada lote de aldehídos del aldehído de polietilenglicol con un elevado peso molecular, es difícil controlar la proporción de suministro entre los aldehídos macromoleculares y las proteínas, lo que afectará definitivamente al rendimiento de la reacción y a los costes de producción. Mientras tanto, la diferente actividad biológica de los conjugados producidos mediante aldehídos macromoleculares acoplados con diferentes grupos amino afectará también a la homogeneidad y a la actividad del producto final.  
45

55 El documento WO 2005/0055946 (D1) describe un GCSF glucopegilado.

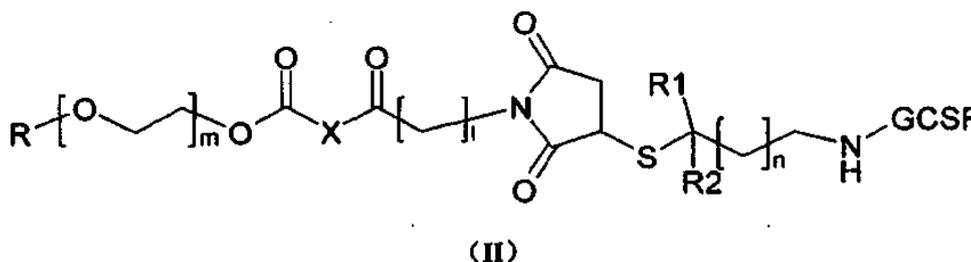
El documento WO 2007/019331 (D2) describe conjugados de una fracción del GCSF y un polímero.

**Descripción de la invención**

En vista de las deficiencias de la técnica anterior, el propósito de la presente invención es proporcionar un conjugado del G-CSF con una nueva estructura, de fórmula general (II), o sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Otro propósito de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la preparación del conjugado de fórmula general (II) o de sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Otro propósito de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que contiene dichos conjugados o sales farmacéuticamente aceptables y usos de los mismos.

La presente invención se refiere a un conjugado de fórmula general (I) o a sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

El G-CSF se elige de entre el G-CSF natural, el G-CSF recombinante o el producto de una mutación génica que tenga la función del G-CSF, preferiblemente el G-CSF es un derivado del G-CSF establecido en las ID. SEC. N°: 1 - 10, más preferiblemente el G-CSF es la secuencia del G-CSF humano natural o Met-G-CSF establecida en la ID. SEC. N°: 1.

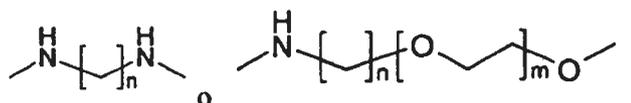


en la que,

R se elige de entre alquilo C<sub>1-4</sub> lineal o ramificado, preferiblemente R es metilo o etilo, más preferiblemente R es metilo;

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se eligen cada uno independientemente de entre hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub> lineal o ramificado; preferiblemente R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> son hidrógeno, metilo o etilo;

X se elige de entre O, S, NH,



1 es un número entero elegido de entre 1 - 20, preferiblemente 1 es un número entero elegido de entre 1 - 10, más preferiblemente 1 es un número entero elegido de entre 1 - 5;

m es un número entero elegido de entre 50 - 2.500, preferiblemente m es un número entero elegido de entre 100 - 1.000;

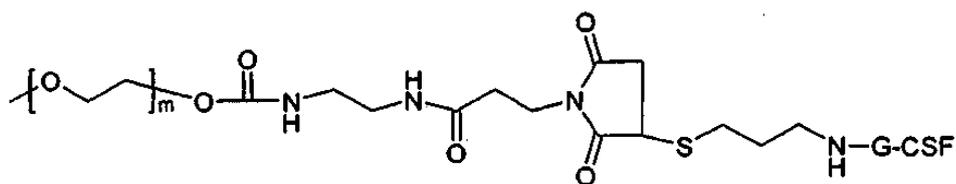
n es un número entero elegido de entre 1 - 20, preferiblemente n es un número entero elegido de entre 1 - 10, más preferiblemente n es un número entero elegido de entre 1 - 5;

el G-CSF se elige de entre el G-CSF natural, el G-CSF recombinante o los productos de una mutación génica con la función del G-CSF.

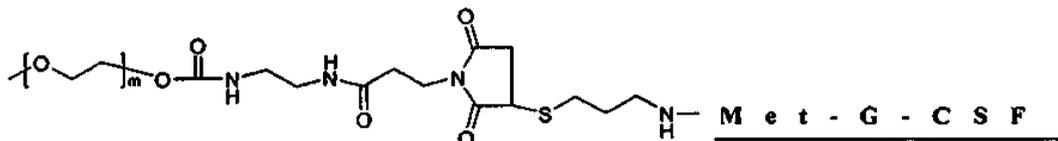
Además, la presente invención se refiere al anterior conjugado de fórmula general (II) o a sales farmacéuticas del mismo, en los que el G-CSF tiene una secuencia del G-CSF humano natural.

Además, la presente invención se refiere al anterior conjugado de fórmula general (II) o a sales farmacéuticas del mismo, en los que el G-CSF es Met-G-CSF (ID. SEC. N°: 1).

Los anteriores conjugados de fórmula general (II) incluyen:



m es un número entero elegido de entre 400 - 500;

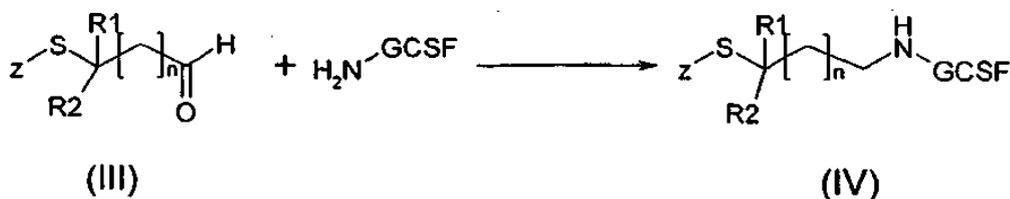


m es un número entero elegido de entre 400 - 500;

- 5 Adicionalmente, los conjugados de fórmula general (II) pueden reaccionar con ácidos para formar sales. Los ácidos usados se eligen de entre ácidos orgánicos o ácidos inorgánicos, en los que los ácidos orgánicos se eligen de entre ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido maleico o ácido p-toluensulfónico o mezclas de los mismos. Preferiblemente, los ácidos orgánicos son ácido acético, ácido trifluoroacético. Los ácidos inorgánicos se eligen de entre ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácido sulfónico o mezclas de los mismos. Preferiblemente el ácido inorgánico es el ácido clorhídrico.
- 10

Por otro lado, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de los conjugados de fórmula general (II) que incluye las siguientes etapas de:

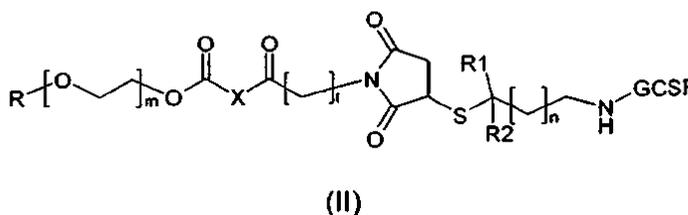
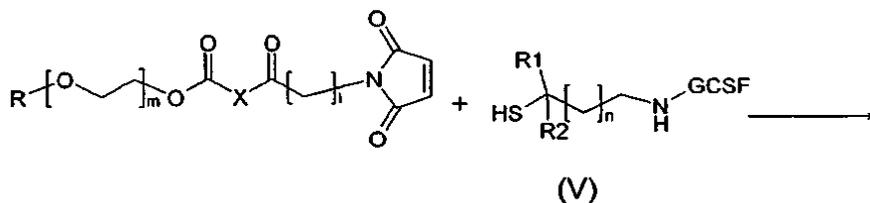
- 1) hacer reaccionar el compuesto de fórmula general (III) con el grupo amino N-terminal del G-CSF mediante una aminación reductora para obtener el compuesto de fórmula general (IV):



- 15 2) eliminar el grupo protector del grupo tiol del compuesto de fórmula general (IV) para obtener el compuesto de fórmula general (V):



- 20 3) hacer reaccionar el compuesto de fórmula general (V) con mPEG-MAL mediante una adición de Michael para obtener el conjugado de fórmula general (II):



en la que,

R, R1, R2, G-CSF, X, 1, m, n se definen como anteriormente;

5 Z es un grupo protector de mercapto elegido de entre un grupo formilo, acetilo, propionilo, tritilo o terc-butilo, preferiblemente Z es un grupo acetilo.

Además, la presente invención también se refiere al uso del conjugado o de sales farmacéuticas del mismo proporcionados por la presente invención en la preparación de los medicamentos para el tratamiento de una leucopenia causada por radioterapia o por quimioterapia, del SIDA y de otras enfermedades inmunodeficitarias, de infecciones bacterianas.

10 Por otro lado, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene una cantidad farmacéuticamente eficaz del conjugado o de sales farmacéuticamente aceptables del mismo proporcionados por la presente invención y vehículos farmacéuticamente aceptables.

Además, la presente invención también se refiere al uso de dichas composiciones farmacéuticas en la preparación de los medicamentos para el tratamiento de la leucopenia causada por radioterapia o por quimioterapia, del SIDA y de otras enfermedades inmunodeficitarias, de infecciones bacterianas.

15 La presente invención desvela un nuevo conjugado del G-CSF modificado por PEG y un nuevo procedimiento de preparación del mismo. En comparación con los conjugados y los procedimientos de preparación tradicionales del mismo, existen las siguientes diferencias:

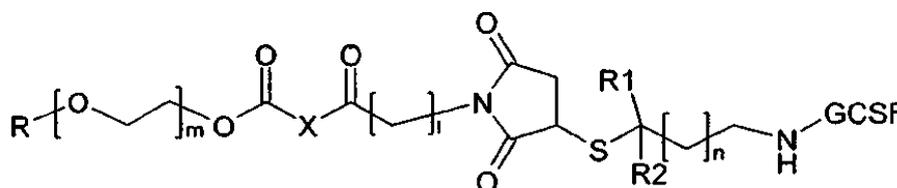
20 En primer lugar, la introducción de un grupo conector entre el PEG y el G-CSF puede asegurar la especificidad de la reacción en el N-terminal de la proteína, ya que la proteína modificada con moléculas pequeñas en su N-terminal puede ser fácilmente separada y purificada, asegurando la especificidad del sitio modificado;

En segundo lugar, dada la presencia del grupo tiol en el grupo conector, el control del pH del sistema de reacción asegurará que se lleve a cabo una reacción de adición de Michael con una elevada especificidad;

25 Además, debido a la existencia del grupo conector, también pueden unirse otros grupos funcionales, tal como la introducción de un grupo imido, de un grupo éster, que proporcione unas precondiciones para la liberación *in vivo* del G-CSF desde los conjugados.

Los conjugados de la presente invención o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos tienen la actividad fisiológica del G-CSF humano natural, y una semivida *in vivo* circulante más larga y una mejor actividad del factor estimulante de las colonias de granulocitos que el G-CSF.

30 Específicamente, la estructura del conjugado desvelado por la presente invención se muestra como (II):

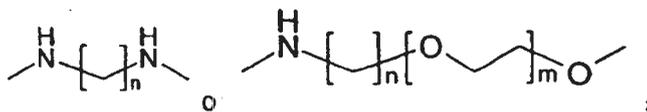


en la que,

R se elige de entre alquilo C<sub>1-4</sub> lineal o ramificado, preferiblemente R es metilo o etilo, más preferiblemente R es metilo;

5 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se eligen independientemente de entre hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub> lineal o ramificado; preferiblemente R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> son hidrógeno, metilo o etilo;

X se elige de entre O, S, NH,



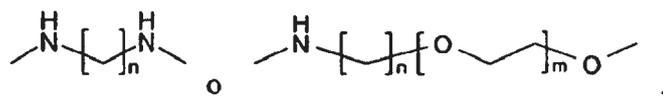
1 es un número entero elegido de entre 1 - 20, preferiblemente 1 es un número entero elegido de entre 1 - 10, más preferiblemente 1 es un número entero elegido de entre 1 - 5;

10 m es un número entero elegido de entre 50 - 2.500, preferiblemente m es un número entero elegido de entre 100 - 1.000;

n es un número entero elegido de entre 1 - 20, preferiblemente n es un número entero elegido de entre 1 - 5;

el G-CSF se elige de entre el G-CSF natural, el G-CSF recombinante o los productos de una mutación génica con la función del G-CSF.

15 Cuando X es O, S, hay un enlace éster susceptible de una hidrólisis *in vivo* por la esterasa en el grupo conector entre el PEG y el G-CSF. En ese momento, el G-CSF en su forma libre puede interactuar con su receptor para mostrar actividad biológica; cuando X es NH,



20 la actividad biológica se consigue principalmente por el conjugado *per se*. Por supuesto, debido a que el enlace imido también tiene la capacidad de liberar el G-CSF a través de una hidrólisis *in vivo*, no puede descartarse la posibilidad de que actúe el G-CSF libre.

25 En los procedimientos de preparación desvelados por la presente invención, se obtiene en primer lugar el intermedio (IV) mediante la reacción del grupo conector que contiene el grupo tiol con el grupo amino N-terminal del G-CSF mediante una aminación reductora. De hecho, el grupo conector y el grupo amino del G-CSF pueden estar conectados mediante varios procedimientos de reacción (tales como la reacción de varios ésteres activados con el grupo amino). Pero teniendo en cuenta la elevada selectividad de la reacción entre el grupo aldehído y el grupo amino N terminal, en la presente invención el conector es introducido mediante la reacción del grupo aldehído con el grupo amino N terminal mediante la aminación reductora. El agente reductor usado en la presente invención se elige de entre varios agentes reductores bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, los agentes reductores son cianoborhidruro de sodio, triacetoxi borhidruro.

35 En la preparación del intermedio (V), las diferentes condiciones de reacción se eligen de acuerdo con los diferentes grupos protectores del tiol. Cuando el grupo protector es tritilo o terc-butilo, se usan unas condiciones ácidas (tales como ácido trifluoroacético, ácido clorhídrico, ácido metansulfónico, etc.) para eliminar el grupo protector. Cuando el grupo protector es acetilo, propionilo, etc., se usan varios procedimientos, reactivos que son bien conocidos por la persona experta en la técnica para eliminar el grupo protector, preferiblemente se usa clorhidrato de hidroxilamina para eliminar el grupo protector a pH 5 - 7.

40 En la preparación del compuesto de fórmula general (II), la reacción se realiza controlando el pH y mediante el uso de la adición de Michael clásica. Dicha reacción tiene una buena selectividad de hasta más del 99 %. Después de la reacción, el producto de reacción puede separarse y purificarse mediante una cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC), una columna de intercambio iónico o una columna de gel.

En la presente invención, "alquilo C<sub>1-4</sub>" significa un alquilo lineal o ramificado, tal como el grupo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, y así sucesivamente.

45 En la presente invención, el G-CSF se elige preferiblemente de entre el G-CSF humano. La ausencia de variaciones en la secuencia interna de esta proteína puede reducir la antigenicidad de la proteína *in vivo* y reducir al máximo la formación de anticuerpos neutralizantes *in vivo* para mejorar la eficacia farmacológica. El G-CSF y sus proteínas variantes, incluyen, pero no se limitan a, Met-G-CSF, Trp-G-CSF, Asp-G-CSF, Glu-G-CSF, preferiblemente Met-G-CSF (para su secuencia, véase la ID. SEC. Nº: 1) que es expresada por E. coli, puede obtenerse mediante el uso de los procedimientos tradicionales de expresión génica referidos en la literatura.

El compuesto obtenido mediante la presente invención es administrado en unidades de dosificación. Dichas

unidades de dosificación pueden expresarse mejor como la composición farmacéutica mezclada con los compuestos activos y los excipientes farmacéuticos en forma de una formulación.

5 En la composición farmacéutica proporcionada por la presente invención, los conjugados de fórmula general (II) o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos son compuestos activos. La composición farmacéutica proporcionada por la presente invención puede usarse en la terapia coadyuvante para pacientes oncológicos sometidos a quimioterapia o a radioterapia, y para pacientes sometidos a un trasplante de médula ósea, con objeto de prevenir infecciones debidas a una reducción en la inmunidad. También puede usarse para el tratamiento de pacientes con leucopenia crónica o relativa, para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide aguda, con SIDA o con otras enfermedades inmunodeficientes, y también para el tratamiento de hongos, especialmente para las infecciones por candidiasis sistémicas o invasivas.

10 La dosis de administración de los conjugados de fórmula general (II) o de las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos es de 5 - 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , en la que " $\mu\text{g}$ " se refiere a la unidad de los conjugados de fórmula general (II) o de las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, "kg" se refiere a la unidad de peso corporal del mamífero. Se sabe que la dosis y la frecuencia de administración dependen de muchos factores, tales como sexo, la edad del paciente, el tipo de enfermedades que necesitan prevención o tratamiento en el paciente.

Pueden prepararse varias formas de formulación mediante la mezcla de los conjugados o de las sales farmacéuticamente aceptadas de los mismos proporcionados por la presente invención con vehículos farmacéuticos convencionales, que pueden ser administrados mediante diferentes vías tales como la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa.

## 20 Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un diagrama de MALDI-TOF-TOF del compuesto 1 proporcionado por la presente invención;

La Figura 2 muestra un diagrama de MALDI-TOF-TOF del compuesto 2 proporcionado por la presente invención;

La Figura 3 muestra el efecto del PEG-G-CSF, del G-CSF sobre el recuento de glóbulos blancos sanguíneos periféricos de los ratones tratados con ciclofosfamida;

25 La Figura 4 muestra el efecto del PEG-G-CSF, del G-CSF sobre el recuento de glóbulos rojos sanguíneos periféricos de los ratones tratados con ciclofosfamida;

La Figura 5 muestra el efecto del PEG-G-CSF, del G-CSF sobre el recuento de plaquetas periféricas de los ratones tratados con ciclofosfamida.

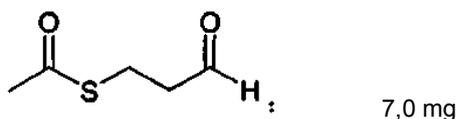
## Formas de realización preferidas

30 Para una descripción más detallada de la presente invención, se proporcionan los siguientes ejemplos.

### Ejemplo 1

#### Aminación reductora del Met-G-CSF

Met-G-CSF (pH = 5,0): 40 mg/140 ml



35 Cianoborhidruro de sodio: 176 mg

La disolución original de Met-G-CSF se dializó frente a una disolución de ácido acético 0,1 M / acetato de sodio, a partir de la cual se extrajeron 140 ml de una disolución que contenía 40 mg de proteínas. La pequeña molécula de aldehído (7,0 mg) se extrajo y se disolvió en acetonitrilo (300 ml), que se añadió a una disolución de proteínas, después se añadió cianoborhidruro de sodio (176 mg) y la reacción se llevó a cabo durante 3 horas a la temperatura ambiente con agitación.

40 La disolución de reacción se dializó frente a una disolución de PBS 0,1 M (pH = 6,2) que contenía EDTA 2 mM a 4 °C.

### Ejemplo 2

#### Desprotección del grupo protector del grupo tiol - grupo acetilo

45 Se añadieron 10 ml de clorhidrato de hidroxilamina 0,1 M preparado (pH = 6,3) a la disolución proteica preparada en el **Ejemplo 1** para llevar la concentración de clorhidrato de hidroxilamina a 50 mM. La reacción se llevó a cabo

agitando durante 30 minutos a la temperatura ambiente para liberar el grupo tiol mediante la eliminación del grupo acetilo.

### Ejemplo 3

#### Preparación de mPEG-Met-G-CSF (39 KD)

- 5 Se añadió mPEG-MAL (400 mg, 20 KD) a la disolución proteica preparada en el Ejemplo 2, y la reacción se llevó a cabo mediante agitación durante 60 minutos a la temperatura ambiente. La purificación se llevó a cabo después de un control por HPLC que mostraba que la reacción había terminado. El compuesto obtenido era el compuesto 1 de la presente invención. La estructura se confirmó mediante MALDI -TOF-TOF según se muestra en la Figura 1.

Condiciones de control:

- 10 Columna: Jupiter C4, 5 u, 300 Å, 150 \* 4,6  
Fase móvil: A: 0,05 % de TFA / H<sub>2</sub>O B: 0,05 % de TFA / CH<sub>3</sub>CN

Condiciones del gradiente:

	0'	30'	35'	36'
A	60 %	20 %	20 %	60 %
B	40 %	80 %	80 %	40 %

Condiciones de la purificación:

- 15 La columna (1,6 cm x 12 cm, el volumen era de aproximadamente 24 ml, caudal: 4 ml/min) se llenó con SP Sepharose HP,

Pretratamiento de la columna: la columna se lavó con un volumen de 5 veces el volumen de la columna de la disolución de NaOH 0,5 M; y después se lavó hasta pH neutro con agua purificada; finalmente la columna se equilibró HAc / NaAc 20 mM, pH 4,0, el volumen usado para equilibrar era 5 veces el volumen de la columna.

- 20 Carga de la muestra: la muestra desalinizada fue succionada directamente en la columna mediante el uso de una bomba;

Elución: en primer lugar la columna se eluyó con HAc / NaAc 20 mM, pH 4,0 cuyo volumen era 10 veces el volumen de la columna, para eliminar el exceso de PEG;

- 25 Entonces se estableció un gradiente salino del 0 al 50 % con un tiempo de análisis de 50 min a 4 ml/min. Las impurezas, los productos y las proteínas sin reaccionar diluyeron y fueron recogidos por turnos.

### Ejemplo 4

#### Preparación de mPEG-Met-G-CSF (59 KD)

- 30 El procedimiento de preparación y purificación es el mismo que el del **Ejemplo 3**, excepto porque el mPEG-MAL (400 mg, 20 KD) se sustituyó por mPEG-MAL (800 mg, 40 KD). El compuesto obtenido es el compuesto 2 de la presente invención, cuyo MALDI-TOF-TOF se muestra en la Figura 2.

### Ejemplo 5

#### Preparación de la disolución inyectable de mPEG-Met-G-CSF (39 KD) es decir, del compuesto 1

Acetato de sodio:	0,12 g
Polisorbato 20	35 mg
Sorbitol:	50 g

Compuesto 1:10 g

- 35 En la sala aséptica de preparación se pesaron acetato de sodio (0,12 g), polisorbato 20 (35 mg), sorbitol (50 g) y se disolvieron en agua inyectable (1.000 ml) con agitación. Se añadió el compuesto 1 (10 g) y se agitó hasta uniformidad, y se añadió el agua inyectable hasta un volumen final de 3.000 ml. Después de filtrar con una membrana microporosa de 0,22 µm, la disolución se envasó y se tapó con un tapón esterilizado y se selló.

Ensayo 1

Comparación del efecto entre el PEG-G-CSF y el G-CSF sobre el aumento en el recuento de glóbulos blancos sanguíneos periféricos

Nota: el PEG-G-CSF se refiere a los compuestos 1 de la presente invención.

5 1. Propósito del ensayo

Evaluar y comparar el efecto del PEG-G-CSF y del G-CSF sobre el aumento en el recuento de glóbulos blancos sanguíneos periféricos de los ratones tratados con ciclofosfamida.

2. Materiales y procedimientos:

10 El PEG-G-CSF, el G-CSF y la ciclofosfamida (CTX) fueron proporcionados por Jiangsu Hansoh Pharmaceutical Co., Ltd. y diluidos con disolución salina antes de su uso.

Los ratones Kunming hembra fueron adquiridos en el Shanghai Experimental Animal Center de la Chinese Academy of Sciences, con un peso de 18 - 22 g con un número de 10 animales en cada grupo.

15 Después de la adaptación de los animales al entorno, se administró ciclofosfamida mediante una inyección intraperitoneal, y se administró el PEG-G-CSF, el G-CSF mediante una inyección subcutánea al día siguiente. El PEG -G-CSF se inyectó subcutáneamente a 0,5, 1,0 mg / kg una vez; el G-CSF se inyectó subcutáneamente una vez al día durante 4 días consecutivos con las dosis de 0,1, 0,2 mg / kg. Después de la administración, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se contaron las células sanguíneas con un contador automático de células sanguíneas ABC.

3. Resultados

20 La inyección intraperitoneal de CTX disminuye significativamente el recuento de glóbulos blancos sanguíneos periféricos, de glóbulos rojos sanguíneos, de plaquetas (P promedio < 0,01 en comparación con el control, Figuras 3 - 5), lo que indica que el CTX es un fuerte inhibidor de la médula ósea.

25 Una única inyección subcutánea de PEG-G-CSF en ratones tratados con ciclofosfamida aumenta el recuento de glóbulos blancos sanguíneos periféricos. Cuando se administran 0,5 mg/kg, el recuento de glóbulos blancos vuelve a los niveles normales. Cuando se administran 1,0 mg/kg, el recuento de glóbulos blancos sanguíneos periféricos es incluso mayor que el nivel normal (P < 0,01 en comparación con el control, Figura 3). Sin embargo, el PEG-G-CSF no tiene un efecto obvio de aumento sobre el recuento de glóbulos rojos sanguíneos periféricos o sobre el recuento de plaquetas (Figura 4, 3), lo que indica que el efecto del PEG-G-CSF es específico.

30 La inyección subcutánea continua de G-CSF en ratones tratados con ciclofosfamida también aumenta el recuento de glóbulos blancos sanguíneos periféricos. Cuando se administran 0,1 mg/kg, el recuento de glóbulos blancos sanguíneos aumenta hasta el nivel normal; cuando se administran 0,2 mg/kg, el recuento de glóbulos blancos sanguíneos es mayor que el nivel normal (P < 0,01 en comparación con el control, Figura 3), lo que muestra una obvia dependencia de la dosis. Pero el G-CSF no tiene un efecto significativo sobre los glóbulos rojos sanguíneos periféricos, el recuento de plaquetas (Figuras 4, 5).

35 De acuerdo con los resultados, en el caso de que la cantidad total administrada sea equivalente en el PEG-G-CSF y en el G-CSF, una única inyección subcutánea de PEG-G-CSF y múltiples inyecciones subcutáneas de G-CSF tienen una eficacia equivalente sobre el recuento de glóbulos blancos sanguíneos periféricos en los ratones.

4. Conclusiones

40 El PEG-G-CSF y el G-CSF aumentan, ambos, significativamente el recuento de glóbulos blancos sanguíneos periféricos de los ratones tratados con ciclofosfamida. En el caso de que la cantidad total administrada sea equivalente, una única inyección subcutánea del compuesto 1 de la presente invención y múltiples inyecciones subcutáneas del G-CSF tienen una eficacia equivalente sobre el recuento de glóbulos blancos sanguíneos periféricos en los ratones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.  
<120> Conjugado del G-CSF modificado por un polímero hidrosoluble
- 50 <130> GECCX/P46708EP  
<140> EP 08706693.2  
<141> 18-02-08

<150> PCT/CN2008/070320  
 <151> 18-02-08

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213>

<400> 1

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

<210> 2  
 <211> 174  
 <212> PRT  
 <213>

<400> 2

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> 3  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213>

5

<400> 3

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

10

<210> 4  
 <211> 174  
 <212> PRT  
 <213>

15

<400> 4

```

Thr  Pro  Leu  Gly  Pro  Ala  Ser  Ser  Leu  Pro  Gln  Ser  Phe  Leu  Leu  Lys
1    5    10   15   20   25   30   35   40   45   50   55   60   65   70   75   80
Ser  Leu  Glu  Gln  Val  Arg  Lys  Ile  Gln  Gly  Asp  Gly  Ala  Ala  Leu  Gln
    20   25   30   35   40   45   50   55   60   65   70   75   80   85   90   95
Glu  Lys  Leu  Cys  Ala  Thr  Tyr  Lys  Leu  Cys  His  Pro  Glu  Glu  Leu  Val
    35   40   45   50   55   60   65   70   75   80   85   90   95   100  105  110
Leu  Leu  Gly  His  Ser  Leu  Gly  Ile  Pro  Trp  Ala  Pro  Leu  Ser  Ser  Cys
    50   55   60   65   70   75   80   85   90   95   100  105  110  115  120  125
Pro  Ser  Gln  Ala  Leu  Gln  Leu  Ala  Gly  Cys  Leu  Ser  Gln  Leu  His  Ser
    65   70   75   80   85   90   95   100  105  110  115  120  125  130  135  140
Gly  Leu  Phe  Leu  Tyr  Gln  Gly  Leu  Leu  Gln  Ala  Leu  Glu  Gly  Ile  Ser
    85   90   95   100  105  110  115  120  125  130  135  140  145  150  155  160
Pro  Glu  Leu  Gly  Pro  Thr  Leu  Asp  Thr  Leu  Gln  Leu  Asp  Val  Ala  Asp
    100  105  110  115  120  125  130  135  140  145  150  155  160  165  170  175
Phe  Ala  Thr  Thr  Ile  Trp  Gln  Gln  Met  Glu  Glu  Leu  Gly  Met  Ala  Pro
    115  120  125  130  135  140  145  150  155  160  165  170  175  180  185  190
Ala  Leu  Gln  Pro  Thr  Gln  Gly  Ala  Met  Pro  Ala  Phe  Ala  Ser  Ala  Phe
    130  135  140  145  150  155  160  165  170  175  180  185  190  195  200
Gln  Arg  Arg  Ala  Gly  Gly  Val  Leu  Val  Ala  Ser  His  Leu  Gln  Ser  Phe
    145  150  155  160  165  170  175  180  185  190  195  200  205  210  215
Leu  Glu  Val  Ser  Tyr  Arg  Val  Leu  Arg  His  Leu  Ala  Gln  Pro
    165  170  175  180  185  190  195  200  205  210  215  220  225

```

<210> 5  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213>

5

<400> 5

```

Trp  Thr  Pro  Leu  Gly  Pro  Ala  Ser  Ser  Leu  Pro  Gln  Ser  Phe  Leu  Leu
1    5    10   15   20   25   30   35   40   45   50   55   60   65   70   75   80
Lys  Cys  Leu  Glu  Gln  Val  Arg  Lys  Ile  Gln  Gly  Asp  Gly  Ala  Ala  Leu
    20   25   30   35   40   45   50   55   60   65   70   75   80   85   90   95
Gln  Glu  Lys  Leu  Cys  Ala  Thr  Tyr  Lys  Leu  Cys  His  Pro  Glu  Glu  Leu
    35   40   45   50   55   60   65   70   75   80   85   90   95   100  105  110
Val  Leu  Leu  Gly  His  Ser  Leu  Gly  Ile  Pro  Trp  Ala  Pro  Leu  Ser  Ser
    50   55   60   65   70   75   80   85   90   95   100  105  110  115  120  125
Cys  Pro  Ser  Gln  Ala  Leu  Gln  Leu  Ala  Gly  Cys  Leu  Ser  Gln  Leu  His
    65   70   75   80   85   90   95   100  105  110  115  120  125  130  135  140
Ser  Gly  Leu  Phe  Leu  Tyr  Gln  Gly  Leu  Leu  Gln  Ala  Leu  Glu  Gly  Ile
    85   90   95   100  105  110  115  120  125  130  135  140  145  150  155  160
Ser  Pro  Glu  Leu  Gly  Pro  Thr  Leu  Asp  Thr  Leu  Gln  Leu  Asp  Val  Ala
    100  105  110  115  120  125  130  135  140  145  150  155  160  165  170  175
Asp  Phe  Ala  Thr  Thr  Ile  Trp  Gln  Gln  Met  Glu  Glu  Leu  Gly  Met  Ala
    115  120  125  130  135  140  145  150  155  160  165  170  175  180  185  190
Pro  Ala  Leu  Gln  Pro  Thr  Gln  Gly  Ala  Met  Pro  Ala  Phe  Ala  Ser  Ala
    130  135  140  145  150  155  160  165  170  175  180  185  190  195  200
Phe  Gln  Arg  Arg  Ala  Gly  Gly  Val  Leu  Val  Ala  Ser  His  Leu  Gln  Ser
    145  150  155  160  165  170  175  180  185  190  195  200  205  210  215
Phe  Leu  Glu  Val  Ser  Tyr  Arg  Val  Leu  Arg  His  Leu  Ala  Gln  Pro
    165  170  175  180  185  190  195  200  205  210  215  220  225

```

<210> 6  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213>

10

15

<400> 6

Trp Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Lys Ser 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> 7  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213>

5

<400> 7

Asp 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

10

<210> 8  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213>

15

<400> 8

Asp Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Lys Ser 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> 9  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213>

5

<400> 9

Glu 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

10

<210> 10  
 <211> 175  
 <212> PRT  
 <213>

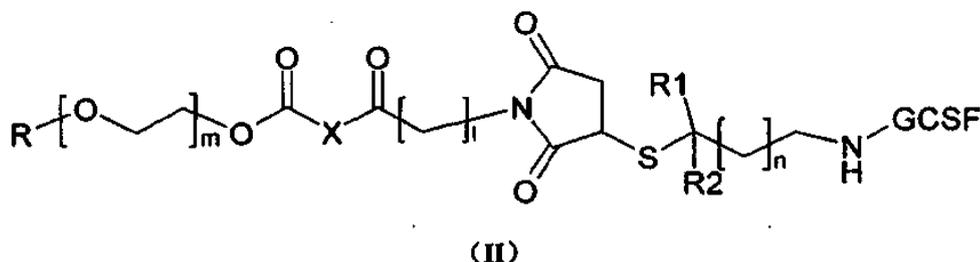
15

<400> 10

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

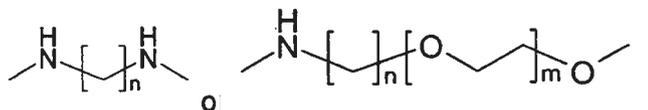
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de fórmula general (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

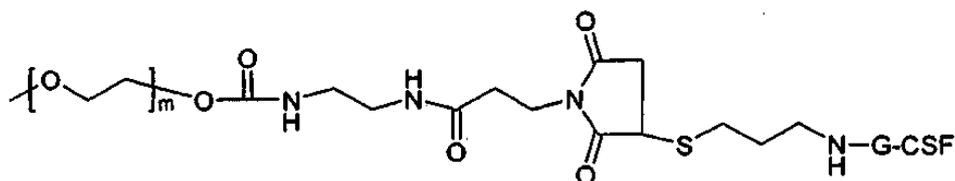


en la que,

- 5 R se elige de entre alquilo C<sub>1-4</sub> lineal o ramificado, preferiblemente metilo o etilo, más preferiblemente metilo; R1 y R2 se eligen cada uno independientemente de entre hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub> lineal o ramificado; preferiblemente hidrógeno, metilo o etilo; X se elige de entre O, S, NH,

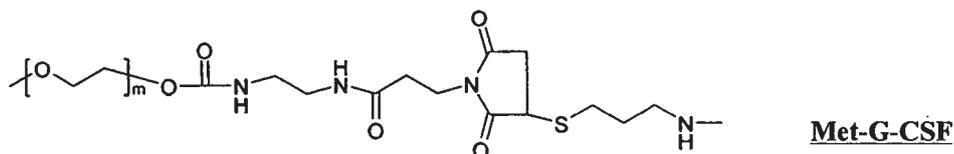


- 10 l es un número entero elegido de entre 1 - 20, preferiblemente de entre 1 - 10, más preferiblemente de entre 1 - 5; m es un número entero elegido de entre 50 - 2.500, preferiblemente de entre 100 - 1.000; n es un número entero elegido de entre 1 - 20, preferiblemente de entre 1 - 10, más preferiblemente de entre 1 - 5; el G-CSF se elige de entre el G-CSF natural, el G-CSF recombinante o el producto de una mutación génica que tenga la función del G-CSF.
- 15 2. Un conjugado o una sal farmacéutica aceptable del mismo de la reivindicación 1, en el que el G-CSF se elige de entre derivados del G-CSF de una proteína establecida en la ID. SEC. Nº: 1 - 10.
3. Un conjugado o una sal farmacéutica aceptable del mismo de la reivindicación 1, en el que la secuencia de dicho G-CSF es la secuencia del G-CSF humano natural.
- 20 4. Un conjugado o una sal farmacéutica aceptable del mismo de la reivindicación 1, en el que dicho G-CSF es el Met-G-CSF mostrado en la ID. SEC. Nº: 1.
5. Un conjugado o una sal farmacéutica aceptable del mismo de la reivindicación 1, en el que dicho conjugado incluye:



m es un número entero elegido de entre 400 - 500; o

25



m es un número entero elegido de entre 400 - 500.

6. Un conjugado o una sal farmacéutica aceptable del mismo de la reivindicación 1, en el que dicho conjugado reacciona con un ácido para formar una sal, en los que el ácido se elige de entre ácidos orgánicos o inorgánicos.



12. El uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 10 en la preparación de los medicamentos para el tratamiento de la leucopenia causada por radioterapia o por quimioterapia, SIDA y otras enfermedades inmunodeficitarias, de infecciones bacterianas.

5 13. Una composición farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento de la leucopenia causada por radioterapia o por quimioterapia, del SIDA y de otras enfermedades de inmunodeficiencia, de infecciones bacterianas.

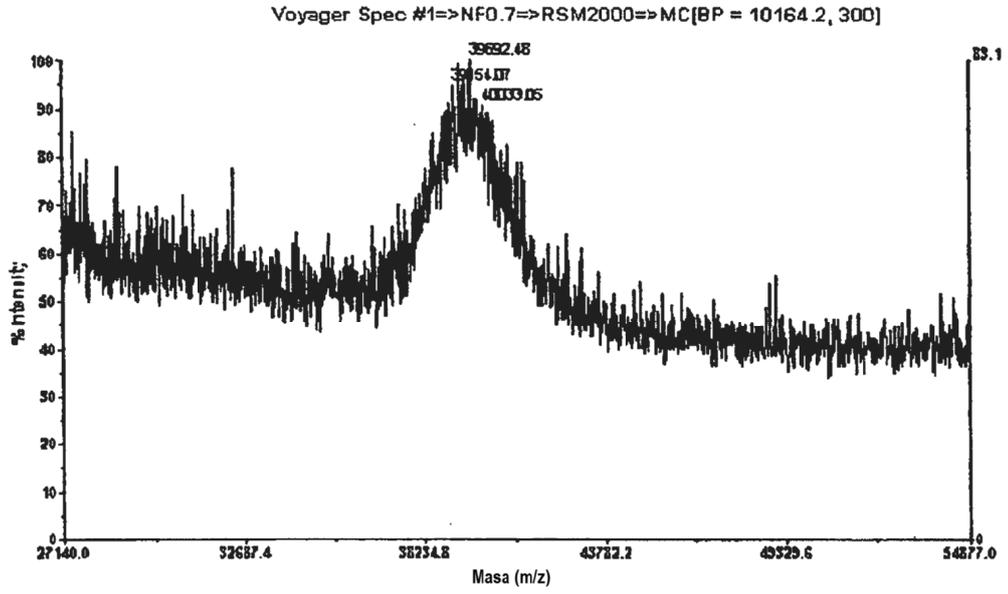


Figura 1

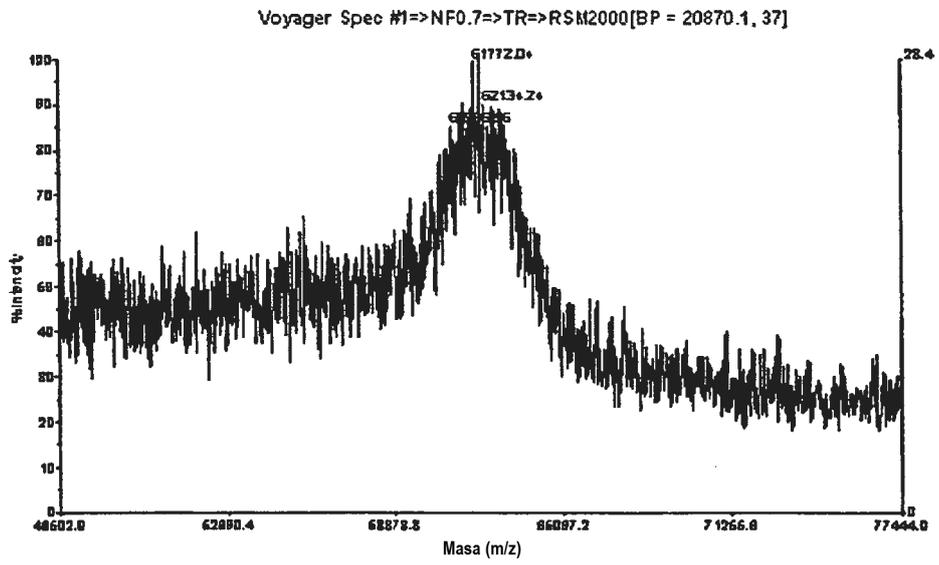


Figura 2

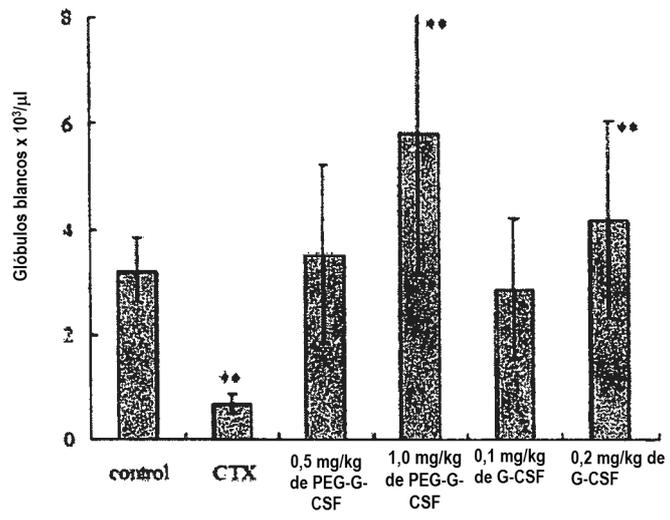


Figura 3

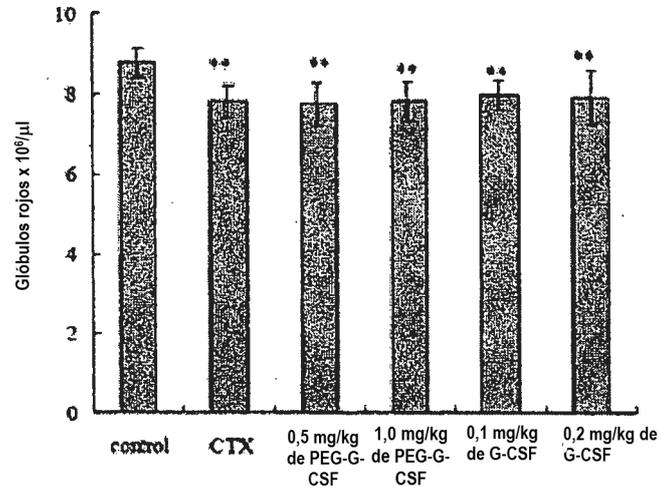


Figura 4

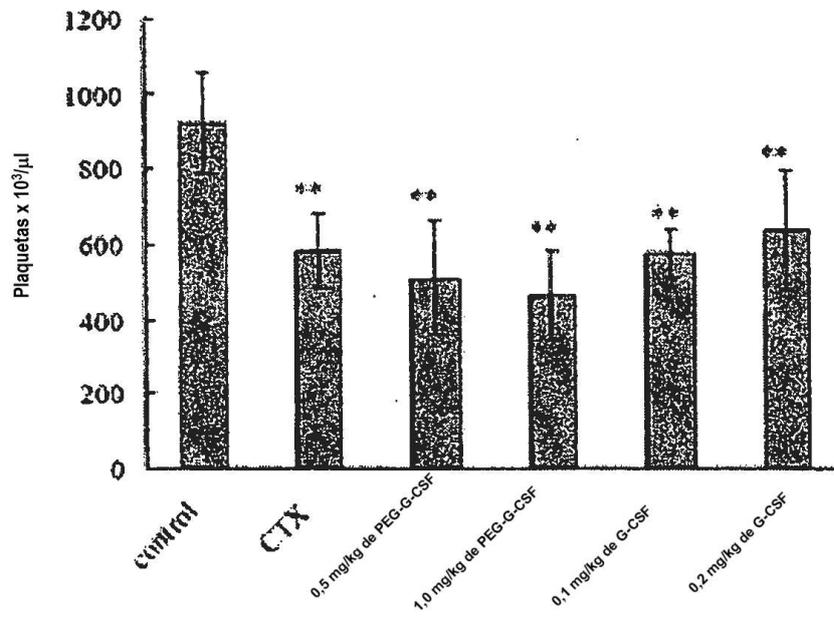


Figura 5