



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-009151- -00000-0000

Fecha: 2013-01-18 15:08:56
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 51

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO ***UN NUEVO CONJUGADO DE GRANULOCITO COLONIA-
ESTIMULANTE FACTOR (G-CSF) CON POLIETILENO GLICOL***

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE ***CLOSED JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD"***

DOMICILIO ***MOSKOVSKAYA, RUSIA***

74. APODERADO ***JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS***

22. BOGOTÁ, D.C., _____

DIRECCIÓN DE NU...
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/RU2011/000532	Fecha 19/07/2011
Publicación Internacional No.		WO2012/021088 A1	Fecha 16/02/2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
UN NUEVO CONJUGADO DE GRANULOCITO COLONIA-ESTIMULANTE FACTOR (G-CSF) CON POLIETILENO GLICOL			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
1 CLOSED JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD"			[1]
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN Petrovo Dalnee, Krasnogorsky district, CIUDAD DEPARTAMENTO/ESTADO MOSKOVSKAYA obl., 143422 PAÍS DE RESIDENCIA		No. TELÉFONO CORREO ELECTRÓNICO NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN RUSIA	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. CHERNOVASKAYA, 2. DENISOV, 3. RUDENKO, 4. KLENOVA, 5. MOROZOVA, 6. MOROZOV,		Tatyana Veniaminovna Lev Alexandrovich Elena Georgievna Angelina Vsevolodovna Elena Leonidovna Dmitriy Valentinovich	RU RU RU RU RU RU
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. RU		MOSKOVSKAYA obl., 142380	ul.Sportivnaya, 11-24, pos. Ljubuchany, Chekhovsky raion
2. RU		MOSKOVSKAYA obl., 142380	Ogorodny per. 11, Klimovsk,
3. RU		MOSKOVSKAYA obl., 142380	ul.Sportivnaya, 11-17, pos. Ljubuchany Chekhovsky raion
4. RU		MOSCOW, 115470	ul. Nagatinskaya, 15-2/142
5. RU		MOSCOW, 109263	ul. Yunyh lenincev, 18/1-21
6. RU		MOSCOW, 119071	Leninsky prosp., 35-54
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
DELGADO VILLEGAS		JAIME EDUARDO	C.C. 19.270.955 T.P. 43.308 C.S.J.
DIRECCIÓN		No. TELÉFONO	
Avda. Carrera 24 No. 37 - 31 Of. 202		2444096	
CIUDAD		CORREO ELECTRÓNICO	
BOGOTA D.C.		mde@mdelaw.com	
PAÍS		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	
COLOMBIA			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. OFICINA RUSA DE PATENTES		RU	2010133875 13-08-2010
2.			

2

11

DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI

☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12

DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI

☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13

REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI

☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas

Universidades públicas o privadas

Entidades sin ánimo de lucro

☐

☐

☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14

AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA

☐ SI

☒ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15

COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO

N°

Fecha

16

FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

APODERADO

17

ANEXOS

Documentación Técnica

Solicitud Internacional en castellano

1.

☒ Descripción

N° de folios: 34

2.

☒ Reivindicaciones

N° Reivindicaciones: 17

3.

☒ Dibujos y/o figuras

N° folios: 10

4.

☒ Resumen.

5.

☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.

6.

☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.

7.

☐ Arte final 12 x 12.

8.

☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9.

☐ Poderes, si fuera el caso.

10.

☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.

11.

☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.

12.

☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.

13.

Reducción de tasas

Micro, pequeñas o medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.

☐ Hoja de información complementaria.

☐ Otros, especificar

14.

☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

15.

☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.

16.

☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.

17.

☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

PI02-F06 vr4 (2012-04-19)

UN NUEVO CONJUGADO DE GRANULOCITO COLONIA- ESTIMULANTE FACTOR (G-CSF) CON POLIETILENO GLICOL

3

La presente invención está relacionada con farmacéuticas y medicina, específicamente, a nuevos conjugados fisiológicamente activos de granulocita colonia-estimulante factor (G-CSF) en particular, al nuevo conjugado G-CSF con polietileno glicol, ideal para uso médico, por ejemplo, para el tratamiento de leucopenia, principalmente varias clases de neutropenia en pacientes tratados con quimo-terapia mielosupresiva, pacientes bajo estricta célula hematopoiética de trasplante, pacientes con neutropenia crónica, pacientes con SIDA y otras infecciones.

G-CSF es un factor hematopoiético crecido que estimula la proliferación, diferenciación y maduración de granulocitos (Metclaf, 1992). La introducción de exógenos G-CSF causa un incremento rápido, específico y dependiente de neutrofilis en sangre periférica (Welte et al, 1985; Hartung et al, 1995).

El gen humano G-CSF fue clonado y expresado en células bacterianas y mamales y como resultado, varias variantes de recombinante humano G-CSF (rhG-CSF) ha sido desarrolladas y purificadas (Nagata et al., 1986; Souza et al., 1986; Komatsu et al., 1987).

Hay dos variantes de rgG-CSF – filgratismo y lenogratismo, obtenidas de células E.coli y CHO respectivamente. Filgratismo consisten en 175 aminoácidos, no es glicosilada y tiene la misma secuencia aminoácida que la proteína natural, pero contiene un residuo metionino adicional y el N-término de la molécula, Lenogratismo consiste en 174

aminoácidos, es glicosilado y su secuencia aminoácida es totalmente consistente con aquella de la G-CSF natural humana. u

Varios productos rhG-CSF con diferencia en glicosilación y/o secuencia de proteína están disponibles para uso clínico para tratamiento de neutropenia como resultado de quimioterapia, idiopatía, neutropenia congénita y cíclica, para el tratamiento de infecciones severas en combinación con antibióticos y en pacientes de SIDA neutropénica (Molineux, 2004).

De igual manera, el uso clínico de rhG-CSF ha sido limitado por la rápida absorción del sitio de inyección subcutánea, inestabilidad proteolítica, gran volumen de distribución, rápida liberación y media vida corta de suero (Mashkovsky, 2006; de Wit et al., 1996).

Como resultado, el rhG-CSF debe ser administrado a pacientes con una inyección diaria para óptima efectividad. Un monitoreo diario de conteo completo de glóbulos blancos periféricos debe ser realizado.

La eficacia terapéutica del G-CSF puede ser mejorada por el uso de formas medicinales de larga actuación, en las cuales la molécula nativa de proteína es químicamente unida al glicol monometóxico polietileno (mPEG). La PEGilación del G-CSF lleva a una mejorada farmacocinética, incrementada media vida reducida liberación, reducida fluctuación y concentración en la sangre, reducción de inmunogenicidad y toxicidad, actividad incrementada in vivo y estabilidad incrementada (Molineux, 2003; Molineux, 2004).

Las propiedades biológicas del PEG-G-CSF conjugados son enormemente dependientes del peso molecular y clase del mPEG usado activado. Los grupos reactivos funcionales del PEG activado pueden ser adjuntados a un sitio específico en proteínas,

5
principalmente en un amino, un sulfidril u otro grupo nucleofílico. En la mayoría de los casos, el sitio preferido de la modificación es el grupo amino de lisina y el N-término de la cadena polipéptida (Kinstler et al., 1996, Roberts et al., 2002). Un amplio rango de derivados mPEG ha sido utilizado para amino PEGilación, por ejemplo: PEG-triazina, PEG-succinimidil carbonato, PEG-succinimidil succinato, PEG tresilato, PEG-aldehído, PEG-N-Hidrosuccinimida-ester activado, etc).

Hay varios conjugados conocidos de PEG-G-CSF.

La patente US 2007/0014762 describe producción de PEG-G-CSF conjugados utilizando una variedad de mPEG activados con un peso molecular de 5000 Da, en particular mPEG-succinimidil, butanoato, mPEG-succinimidil propionato, mPEG-succinimidil ametilbutonoato. Para obtener los conjugados el rhG-CSF derivado de células CHO fue utilizado, conteniendo varias sustituciones de aminoácido en diferentes posiciones. La reacción conjugación fue conducida a pH 7-9. El PEG-G-CSF resultante consistió en varios isómeros posicionales; cada uno conjugado con PEG 5000 a diferentes sitios con grupos amino-epsilon de residuos de lisina y grupo amino-alfa de N-terminal aminoácido. El PEG-G-CSF conjugado fue purificado por intercambio de iones en cromatografía en una columna de SP-Sefarosa.

No hay datos en actividad y pureza de los conjugados obtenidos en la patente.

Las desventajas del conjugado resultante son las siguientes:

1. Bajo peso molecular del mPEG conjugado al G-CSF;
2. Formación de varios isómeros posicionales, en los cuales el PEG conjugado con la molécula G-CSF a través de grupos libres

de amino de diferentes residuos de lisinas y el N-terminal aminoácido.

0

La patente EP 0401384 describe al PEG-G-CSF conjugado, obtenido utilizando mPEG linear y estructuras sub-encadenadas con un peso molecular de 4,500 – 10,000 Da, activado por diferentes grupos reactivos (succinimidil succinato, cloro-s-triazina, polioxitilenediamina). Estos PEG-G-CSF conjugados tenían un efecto prolongado in vivo, y el grado de prolongación fue dependiente de un peso molecular del conjugado PEG. Media vida del PEG-G-CSF conjugado con PEG 10 000 y G-CSF no modificado fue de 7.05 y 1.79 h, respectivamente.

Las desventajas del conjugado resultante son las siguientes:

El succinimidil succinato –PEG está preparado por reacción de mPEG con anhídrido succínico, seguido de activación de ácido carboxílico al ester succinimidil. El polímero medular contiene una segunda unión ester que permanece después de la conjugación reacción con una proteína. Esta unión es altamente susceptible a hidrólisis después que el polímero ha sido adjuntado a la proteína. No solo esta hidrólisis lleva a la pérdida de beneficios del PEG adjunto, si no que el succinato que queda en la proteína después de la hidrólisis puede actuar como un antígeno y llevar a inmunogenicidad de la proteína remanente. (Roberts, 2002).

1. Cloro-s-triazina mPEG derivada está disponible para conjugarse con los grupos funcionales de residuos de lisina y cistina, los cuales llevan al surgimiento de varios isómeros, algunos de los cuales están caracterizados por un lazo inestable. Más que eso, la triazina mPEG derivada actualmente no es utilizada por su gran toxicidad (Veronese & Pasut, 2005).

La patente EP 0335423 describe al G-CSF conjugado con triazina mPEG derivado con un peso molecular de 300 – 30 000 Da. Estos PEG-G-CSF conjugados tenían una acción prolongada. Su actividad específica estaba en el rango de 11 a 60% de actividad de G-G-CSF no modificado.

Las desventajas de este conjugado son:

1. Actividad específica baja.
2. Uso del mPEG-triazina derivados que resultaron en un número de isómeros posicionales, algunos de los cuales están caracterizados por un lazo inestable. Más que eso, el mPEG-triazina derivado actualmente no son usados por su alta toxicidad (Veronese & Pasut, 2005).

Como prototipo de la presente invención, un PEG-G-CSF conjugado como está descrito en la patente US 5,824,784 (ejemplo 2) ha sido escogida. La patente describe la reacción de la alquilación reducida de E.coli derivada de rhG-CSF con mPEG linear con un peso molecular de 6,000 a 25 000, con un grupo propionaldehído activado (ALD-mPEG). La PEGilación reacción fue conducida a pH 5. Bajo condiciones ácidas el aldehído es altamente selectivo para N-terminal α -amino por el bajo pK del α -amino comparado a otros nucleofilos. Procedimiento de pareja de aldehídos a través de base Schiff que es reducido in situ para dar una unión secundaria estable de amino (Kinstler et al., 1996).

La PEGilación N-terminal del rhG-CSF preparada de esta manera con PEG 20 kDa fue utilizada en el desarrollo de pegfilgrastimo ("Neulasta") utilizado en el tratamiento y prevención de diferentes estados neutropénicos.

90

El mono-mPEG-G-CSF conjugado fue aislado por intercambio de iones en cromatografía utilizando un SP Sefarosa columna HP. La actividad biológica del PEG-G-CSF resultante purificado conjugado fue de 68% de la actividad nativa G-CSF. El contenido del G-CSF no modificado en el conjugado resultante no fue mayor de 5%. Los parámetros farmacocinéticos del conjugado fueron mejores que aquellos del G-CSF no modificado. Experimentos animales han mostrado que la introducción del PEG-G-CSF conjugado llevó al conteo incrementado de glóbulos blancos y que el PEG-G-CSF conjugado tenía efecto prolongado mayor comparado al G-CSF no modificado. Cuando se utiliza una única dosis de G-CSF PEG-Conjugado, el contenido de glóbulos blancos de animales alcanzó un máximo después de 1 día de su inyección, este nivel fue mantenido durante el día y luego el nivel de glóbulos blancos bajó a una línea base de nivel 4 días después de su inyección. Con la introducción del G-CSF no modificado el máximo nivel de leucocitos en sangre de animales fue observado después de 1 día de su inyección, entonces el contenido de leucocitos rápidamente decreció.

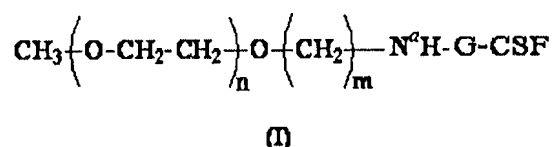
Las desventajas del conjugado resultante son:

1. Actividad específica baja del conjugado obtenido (68% de actividad del G-CSF no modificado);
2. La presencia de G-CSF no modificado en el conjugado.

El objetivo de la presente invención fue obtener un conjugado nuevo estable altamente purificado PEGilado de G-CSF con alta actividad, con más efecto prolongado, estabilidad mejorada, parámetros farmacocinéticos mejorados, con óptima combinación de parámetros de peso molecular de PEG y actividad específica, con alto grado de

pureza e ideal para uso médico, también como composiciones farmacéuticas basadas en conjugado reclamado.

El problema está resuelto con la creación de una molécula nueva activa funcional de PEG-G-CSF conjugada con la actividad de G-CSF, en la cual la molécula linear PEG con una masa molecular de 30 000 Da es conjugada con la molécula G-CSF por un lazo estable estrictamente a través del grupo amino alfa del N-término aminoácido (metionina) resultando un compuesto con la siguiente fórmula (I):



Donde:

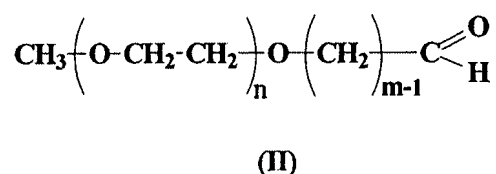
n – intergers de 681 a 1 000;

m – interger; ≥ 4 ;

N^aH-G-CSF – natural o recombinante polipéptido teniendo actividad de G-CSF

En el derivado conjugado un PEG linear con peso molecular de 30 000 – 40 000 Da está conjugado con el grupo amino alfa de N-término de molécula G-CSF aminoácido.

La selectividad de la modificación G-CSF vía alfa amino N-término aminoácido esta lograda a través del uso de aldehído activado mPEG con fórmula (I) general y la PEGilación reacción a pH ≤ 5 ;



10

n – intergers de 681 a 1 000; el peso molecular de PEG es alrededor de 30 000 – 40 000 Da;
m – interger ≥ 4 ;

El radio óptimo del peso molecular PEG y actividad G-CSF específica está logrado a través del uso de mPEG (I) activado con el valor de $m \geq 4$; el cual lleva a interacción más efectiva del conjugado reclamado con receptores resultantes en alta actividad biológica. La inmunogenicidad reducida, toxicidad y parámetros farmacocinéticos mejorados están logrados por el incremento del peso molecular de PEG adjunto. Nuevas formas de la invención en comparación con el prototipo son:

1. Derivados de aldehído del mPEG activado (fórmula II) son utilizados para la producción del reclamado PEG-G-CSF;
2. Fórmula estructural del PEG-G-CSF conjugado es nueva;
3. El peso molecular del PEG-IFN conjugado es incrementado debido al peso del PEG;
4. El nivel de actividad específica es más alto;
5. Los parámetros farmacocinéticos son mejorados.

El PEG-G-CSF reclamado conjugado es altamente purificado, con un efecto prolongado y está caracterizado por una alta actividad biológica específica (al menos 84-94% del G-CSF no modificado), la pureza de la proteína $\geq 97\%$, alta estabilidad termal, resistencia incrementada a la acción de enzimas proteína-degradantes, parámetros farmacocinéticos mejorados.

También la presente invención incluye composiciones farmacéuticas conteniendo el PEG-G-CSF reclamado conjugado en una efectiva cantidad como el ingrediente activo. Estas composiciones pueden incluir también portadores aceptables farmacéuticamente, agentes

portadores de pH (ácidos orgánicos e inorgánicos y sus sales, como el citrato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, portadores de acetato), estabilizadores (azúcar, alcoholes, aminoácidos, azúcar orgánica y azúcar alcohol, inositol, polietileno glicol, polímeros de aminoácidos, agente reductor sulfúrico, como la urea, glutatión, tioglicerol, etc., polipéptidos con peso molecular bajo en proteínas tales como suero albumina humano, inmunoglobulina, polímeros hidrofílicos como el polivinilpirolidone, monosacáridos como la manosa, xilosa, fructosa, glucosa, disacáridos como la lactosa, maltosa, sucrosa, trisacáridos como la rafinosa, y polisacáridos como el dextran), preservativos (fenol, bencil alcohol, metacresol, metil paraben, propil paraben, octadecil, dimetil bencil amonio clorhídrico, benzalkan, halogenidos, alkil parabenos), antioxidantes, (metionina, vitamina E, ácido ascórbico), agentes isotónicos (alcoholes de azúcar (sodio clorhídrico, sorbitol, manitol, arabitol, xilitol, etc.) surfactantes no ionicos y detergentes (polisorbato, poliolos, cristales compuestos), co-solventes, llenadores (almidón), agentes híbridos (ej. EDTA). Estas composiciones farmacéuticas pueden ser aplicadas en varias formas, por ejemplo, liofilizato o formulación líquida (inyecciones, atomizadores, gotas, etc.).

La presente invención también incluye medicinas basadas en el conjugado reclamado, en particular para el tratamiento de neutropenia.

El PEGilado G-CSF reclamado, basado también como composiciones farmacéuticas y productos medicinales puede ser usado para el tratamiento de neutropenia ocurrida después de la quimioterapia, para mejorar la tolerancia a drogas médicas inmunodepresivas en trasplante de médula, para mejorar el estado inmune de pacientes que sufren SIDA u otras infecciones, en particular candidiasis sistémica o invasiva.

12

El conjugado de la fórmula (I) con un llenador aceptable farmacéuticamente opcional, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables es administrado intravenosamente, subcutáneamente o por cualquier otro medio ideal. La ruta de administración varía dependiendo por ejemplo, en síntomas de edad, frecuencia de administración y el intervalo entre inyecciones dependiendo de la enfermedad y su severidad o del objetivo de administración (uso terapéutico o profiláctico), una cantidad efectiva de agente PEG-G-CSF es seleccionada de acuerdo a los factores anteriormente mencionados.

Para obtener el conjugado reclamado PEG-G-CSF un recombinado altamente purificado humano G-CSF (filgratismo, producido por CJSC "Biocad") fue utilizado también como butiraldehído mPEG derivados de fórmula (I) con una masa molecular de 30 000 – 40 000 Da.

La conjugación reacción fue conducida a pH bajo 5.0 en la presencia de un agente reductor a una temperatura bajo de los 20° C. El ratio molar de PEG/proteína fue de 2.5-5/1.

El progreso de la reacción fue monitoreado por SDS-PAGE in condiciones reducidas y por el RP-HPLC. El monoPEG-G-CSF (G-CSF con una sola cadena PEG por molécula) fue purificada de los productos de la reacción (G-CSF no modificado y formas no deseables de PEG-G-CSF, conteniendo dos o más cadenas de PEG por molécula proteína) por intercambio-cación cromatografía. La elución monoPEG-IFN conjugado fue realizada por un gradiente lineal de concentración de sodio clorhídrico de 0.05 a 0.2 M en la solución pH con pH bajo 5. El monoPEG-G-CSF purificado fue dializado en contra 10-50 mM de solución pH a pH 4-5, se le agregó sal o polisacáridos, o alcoholes, o polivinilpirrolidon, o monosacáridos y amino azucres o

proteínas o amino ácidos y detergentes no iónicos y almacenado en plástico o botellas de vidrio con superficie siliconada a $4 \pm 2^\circ \text{C}$.

3

Para caracterizar el resultante PEG-G-CSF conjugado en su pureza, homogeneidad, física-química, parámetros biológicos y farmacocinéticos, se investigaron en comparación con un G-CSF no modificado.

La invención propuesta está ilustrada por las siguientes figuras:

Fig. 1. Cinética de G-CSF PEGilación.

Fig. 2. Fase reversible de alto rendimiento líquido cromatograma (RP-HPLC) del PEG-G-CSF conjugado.

Fig. 3. Exclusión de tamaño de alto rendimiento líquido cromatograma (SEC-HPCL) del PEG-G-CSF conjugado.

Fig. 4. Análisis SDS-PAGE de PEG-G-CSF conjugado (línea 1) y G-CSF no modificado (línea 2).

Fig. 5. Masa MALDI espectral de G-CSF no modificado (A) y PEG-G-CSF conjugado (B).

Fig. 6. Comparación de masa espectral de péptidos tripticos de G-CSF (A) y PEG-G-CSF conjugado (B).

Fig. 7. Estabilidad termal de PEG-G-CSF conjugado (línea verde) y G-CSF no modificado (línea roja) a $+ (50 \pm 2)^\circ \text{C}$.

Fig. 8. Estabilidad proteolítica de PEG-G-CSF conjugado (línea verde) y G-CSF no modificado (línea roja).

Fig. 9. Inmunoreactividad de PEG-G-CSF conjugado (línea verde) y G-CSF no modificado (línea roja).

Fig. 10. Farmacocinética de PEG-G-CSF conjugado (línea verde) y G-CSF no modificado (línea roja).

Ejemplos de rendimiento específico de PEG-G-CSF método de producción y estudio de sus propiedades, a continuación:

EJEMPLO 1

Preparación de recombinante humano G-CSF (rhG-CSF, filgratismo)

El aislamiento y purificación de rhG-CSF fue realizada como está descrito en la patente RU 2278870.

EJEMPLO 2

Preparación de rhG-CSF pegilado

Solución de 50 ml de 1 M de sodio cianoborohídrido fue agregado a 2300 ml de pH (50 mM sodio acetato, pH 5.0 ± 0.2), conteniendo 2500 mg de rhG-CSF purificado, preparado de acuerdo al ejemplo 1. La mezcla fue agitada, entonces se agregaron 10 gramos de mPEG-BuirALD (metoxi-PEG-butilraldehído) sólido con un peso molecular promedio de 30 kDa. La mezcla conjugación reacción fue agitada durante 22 horas a $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Después de varios intervalos de tiempo

50 microlitros de muestra se tomaron de la mezcla reacción y la cinética de la formación PEG-G-CSF conjugado fue analizada utilizando SDS-PAGE en un 12.5% de gel en condiciones reducidas. Para eso, se agregó al selecto grupo de muestras 17 microlitros de pH conteniendo 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glicerol, 3% SDS, 15% 2-mercaptoetanol, 0.005% bromfenol azul y fue calentado durante 3 minutos en un baño de agua hirviendo. Las muestras en el volumen de 5 microlitros fueron cargadas dentro de cada pozo. El SDS-PAGE fue realizado utilizando mini Sistema Protean (BioRad). El gel fue pintado con Coomassie R-250. La cinética de G-CSF PEGilación es mostrada en la Fig. 1. A la hora cuando el contenido de PEG-G-CSF fue más de 70%, la reacción mezcla fue diluida 3 veces en 10 mM de pH sodio acetato, pH 4.8 ± 0.2 .

EJEMPLO 3

Purificación de PEG-G-CSF conjugado

La mezcla reacción diluida preparada de acuerdo al ejemplo 2 fue cargada dentro de una columna empacada con 300 mL de CM-sefariosa equilibrada con 10 mM de sodio acetato pH, pH 4.8 (pH A) a la taza flotante de 10 ml / min. Después de la carga del material la columna fue lavada para remover el material suelto con 1500ml de pH A. Un gradiente lineal 0-0.2 M de NaCl en pH A (6000 mL) fue utilizado para lavar el monoPEG-G-CSF de la columna a la taza flotante de 5 ml / min. Las fracciones (50 mL) fueron recolectadas y la absorbencia a 280 y 260 nm fue determinada. Las fracciones conteniendo proteína fueron analizadas por RP-HPLC y SDS-PAGE como está descrito en el ejemplo 2. Las fracciones conteniendo monoPEGilado G-CSF con una pureza de más de 95% fue acumulada, dializada contra 10 volúmenes de 1.6 mM de sodio

acetato pH, pH 4.0 ± 0.2 . Entonces la filtración estéril fue realizada y las muestra fueron almacenadas a 4.0 ± 0.2 °C. ✓

EJEMPLO 4

Análisis de pureza de PEG-G-CSF conjugado por fase reversible de alto rendimiento en líquido cromatografía (RP-HPLC).

El PEG-G-CSF purificado conjugado, preparado de acuerdo al ejemplo 3, fue diluido con 20 mM de sodio acetato pH 5.0 a una concentración de proteína de 0.3 mg / ml. El analítico RP HPLC fue realizado empleando aguas gradientes "Brisa" cromatografía en C4 de columna Simetría (4.6x150 mm) con detección UV a 214 nm. Se inyectaron 100 microlitros de la muestra obtenida dentro de la columna. El mono PEG-G-CSF es mostrado por RP_HPL (Fig. 2) lavada de la columna como uno solo, el pico simétrico debe ser altamente puro, juzgado por la presencia de sólo menores impurezas lavadas después del pico principal absorbente UV (Fig. 2). La cantidad de impurezas a menos de 1.15% del material lavado en el pico principal. Así, de los datos presentados se puede concluir que de acuerdo al RP-HPLC la pureza del reclamado PEG-G-CSF conjugado es de $\geq 98\%$.

EJEMPLO 5

Análisis de pureza de PEG-G-CSF conjugado por alto rendimiento de exclusión-tamaño cromatografía (SEC-HPLC).

El PEG-G-CSF conjugado purificado, preparado de acuerdo al ejemplo 3, fue diluido con 20 mM de sodio acetato pH 5.0 a una concentración de proteína de 0.3 mg / ml. El analítico SEC HPLC fue realizado empleando aguas "Brisa" cromatografía en una columna TSK

(7)

G3000SWX (30cm x 7.8 mm) con una detección UV a 214 nm. Se inyectaron 100 microlitros de la muestra obtenida dentro de la columna, Los resultados del SEC-HPLC se presentaron en la Fig. 3. Se vio que la muestra de PEG-G-CSF lavada de la columna como un pico simétrico distinto, constituyendo el 98.47%. De los resultados presentados en la Fig. 3, sigue que el reclamado PEG-G-CSF conjugado no contiene G-CSF libre modificado. El contenido de peso alto-molecular en el reclamado conjugado no excede de 1.53%. La pureza del reclamado PEG-G-CSF conjugado de acuerdo al SEC HPLC es más de 98%.

EJEMPLO 6

Determinación del nivel de endotoxina en el PEG-G-CSF conjugado

El contenido bacterial de endotoxinas (BE) en la muestra de PEG-G-CSF conjugado, preparada de acuerdo al ejemplo 3, fue determinado in vitro utilizando el método Limulus Amebocito Lisato (LAL) (examen de modificación de la capa gel) de acuerdo a los requerimientos de FFS 42-0002-00. Fue utilizado un juego de diagnóstico multi-componente "Asociados de CAPE COD Inc.", LAL-reagente PYROTELL® con sensibilidad de 0.03 EU / ml, Referencia Endotoxina Normal (CSE, 0.5 mg vial) y agua durante el examen-LAL. Los resultados presentados en la tabla 1 muestran que el contenido BE en la muestra PEG-G-CSF conjugado es menor que 3 EU (unidades de endotoxina) por mg de proteína, la cual es mucho más baja que el nivel de BE permisible para drogas basado en proteínas recombinantes.

Tabla 1. El contenido de endotoxinas bacteriales en el PEG-G-CSF conjugado

PEG-G-CSF conjugado	El contenido de endotoxinas bacteriales (EU / mg proteína)
PEG-G-CSF obtenido de acuerdo al ejemplo 3	≤ 3.0

EJEMPLO 7

Análisis de pureza del PEG-G-CSF conjugado por SDS-PAGE

La muestra de PEG-G-CSF conjugado purificado, preparado de acuerdo al ejemplo 3, fue analizada por SDS-PAGE como está descrito en el ejemplo 2. Las muestras conteniendo 40 microgramos ambos PEG-G-CSF y un G-CSF no modificado fueron cargados dentro de cada pozo. El gel fue pintado con Coomassie R-250. La figura 4 ilustra el perfil SDS-PAGE del PEG-G-CSF (línea 1) y el G-CSF no modificado (línea 2). El PEG-G-CSF purificado apareció como una sola banda difusa con un peso molecular aparente más alto que en un G-CSF no modificado. Se debe hacer notar que el valor exacto del peso molecular para proteínas PEGiladas podría no ser determinado por SDS-PAGE, desde la conjugación de moléculas PEG hidrofílicas a la proteína incrementa el radio Stokes de la proteína PEGilada. Como resultado, la movilidad electroforética del complejo PEG-proteína en el gel es disminuida y el valor de su peso molecular es mucho más alto que la suma de masas moleculares de una proteína no modificada y PEG.

EJEMPLO 8

Determinación del peso molecular de masa espectrométrica de PEG-G-CSF conjugado en comparación con el G-CSF no modificado

El matrix asistido de laser desorcpción de tiempo de pelea de espectrometría de masa (MALDI-TOF MS) fue utilizado para determinar la verdad del peso molecular de PEG-G-CSF. El MALDI TOF MS fue realizado con un Ultraflex II (Bruker Daltonics) espectrómetro de masa equipado con laser UV (Nd)., 1 microlitro de muestra PEG-G-CSF conjugado, preparado de acuerdo al ejemplo 3, y 0.3 microlitros de 2.5 solución de ácido dihidroxibenzóico (Aldrich, 10 mg x ml⁻¹ en 20% acetonitril en agua con 0.5% TFA) fueron mezclados y secados al aire. En la misma manera una muestra de G-CSF no modificada fue preparada.

La masa espectral fue obtenida en el modo positivo MS spectra, el promedio de errores de masa no excedió el 10-15 Da. El MALDI-TOF espectral de masa de un G-CSF no modificado y PEG-conjugado G-CSF en el rango m/z 10 000 – 50 000 son mostrados en la fig. 5.

La figura 5^a muestra que el espectro de la masa de G-CSF contiene el pico principal correspondiente a un ion cargado en solitario (M)⁺ con un peso molecular de 18.815 Da.

En el espectro de la masa del PEG-G-CSF conjugado que es mostrado en la figura 5B, un amplio pico espectral con un centro de masa de alrededor de 49 600 Da está presente. El amplio espectro es debido a la población heterogénea de las especies polímero PEG.

Considerando los pesos moleculares de G-CSF (19 295 Da) y PEG (30 000 Da), la masa obtenida de los conjugados (49 600) fue muy consistente con la suma de masa calculada de moléculas individuales.

Determinación del sitio PEGILACIÓN en el PEG-G-CSF conjugado

Se agregaron 5 microlitros de solución de tripsina modificada (Promega) en 0.05 M NH_4HCO_3 con una concentración de 15 mcgxml-1 a 5 microlitros de prueba PEG-G-CSF conjugado, preparado de acuerdo al ejemplo 3. La hidrólisis fue llevada a cabo durante 16 h a la temperatura de 37 °C, entonces se agregaron 10 microlitros 0.5 & TFA en 10% de solución acetonitril en agua a la solución y fue mezclado delicadamente. De la misma manera la muestra G-CSF no modifica fue preparada. Estos digestivos trípticos fueron analizados por MALDI-MS.

El sitio de conjugación PEG con una molécula G-CSF fue determinado por comparación de masa espectral de péptidos trípticos de PEG-G-CSF conjugado a un G-CSF no modificado. En el tríptico digestivo de PEG-G-CSF conjugado no tendría que haber correspondencia a la porción de proteína en donde la modificación ocurrió. La tabla 2 muestra la masa espectral de péptidos trípticos experimentales para un G-CSF no modificado y un PEG-G-CSF conjugado. La tabla muestra que la masa espectral de péptidos trípticos de un G-CSF no modificado casi coincide con aquellos del PEG-G-CSF conjugado. (Tabla 2). Pero en el digestivo tríptico del PEG-G-CSF conjugado no hay péptidos con masa molecular de 1432.7, presente en el digestivo tríptico de un G-CSF no modificado. La masa espectral experimentalmente obtenida de péptidos trípticos para un G-CSF no modificado y un PEG-G-CSF conjugado están presentadas en la Fig. 6, la cual muestra que no hay péptido con un peso molecular de 1432.7 en el digestivo tríptico de PEG-G-CSF conjugado. De acuerdo al análisis de masas teóricas de péptidos trípticos de G-CSF, el pico a

m / z 1432.7 corresponde al N-término de péptido de proteína (tabla 2). Su ausencia en el digestivo tríptico de PEG-G-CSF conjugado iguala la modificación del N-término Péptido, el cual se convierte en más pesado por el peso de PEG, el cual está fuera del área espectral estudiada. La conjugación de PEG con molécula G-CSF ocurrió solo al grupo libre de amino presente en este péptido – grupo amino del N-término metionina.

Tabla 2. Masa espectral experimental de péptidos trípticos de PEG-G-CSF conjugado y G-CSF no modificado comparado con valores teóricos.

Péptido experimental m/z		Péptidos teóricos		
G-CSF	PEG-G-CSF	Masa	Péptidos	Secuencia
1432.7	-	1432.75	1-14	MTPLGPASSLPQSF
747.4	747.4	747.36	18-23	CLEQVR
1129.6	1129.6	1129.61	20-29	EQVRKIQGDG
1359.7	1359.7	1359.7	42-53	LCHPEELVLLGH
2527.3	2527.3	2527.30	54-78	SLGIPWAPLSSCPSQ
953.6	953.6	952.56	55-63	LGIPWAPLS
818.4	818.4	817.41	61-68	PLSSCPSQ
2033.1	2033.1	2033.10	72-90	LAGCLSQHSGLFL
2104.1	2104.1	2104.14	75-93	CLSQLHSGLFLYQG
1241.7	1241.7	1241.68	158-167	LQSFLEVSYR

EJEMPLO 10

Determinación de actividad específica de PEG-G-CSF específico conjugado comparado con rhG-CSF no modificado

El PEG-G-CSF conjugado, preparado de acuerdo al ejemplo 3, diluido a una concentración de 0.2 ng / ml de RPMI medio y diluciones en serie de las muestras a ser probadas fueron preparadas en el medio de ensayo. Las diluciones en serie de un G-CSF no modificado y norma internacional de referencia de actividad G-CSF (1-st Norma Internacional 88/502, granulocita colonia factor estimulante humano, r ADN-derivado, 10000 IU/amp) fueron analizadas en paralelo. 100 microlitros de muestra de proteína diluida fueron agregados al examen de pozo de un botón plano de una placa de tejido cultura 96-pozo. Para bioensayos las células M-NFS fueron lavadas y resuspendidas en una concentración de 1.5×10^5 /ml en medio RPMI. 100 microlitros de célula suspensión fueron agregados a cada pozo y las placas incubadas a 37 °C en 5% CO₂, incubador de tejido cultura durante 50 horas. Entonces, en cada pozo se agregaron 20 microlitros de tinte Alamar azul (o similar, por ejemplo, MTT) y las placas incubadas bajo las mismas condiciones durante 14 horas.

El incremento en el número de células fue determinado utilizando un lector de microplaca por incremento de densidad óptica a una longitud de onda de 545 nm y 630 nm. La actividad específica biológica de las muestras examinadas (Bo) en IU / mg fue calculada utilizando la fórmula:

$$Bo = \frac{Ao}{C}$$

Donde, Bo – Actividad específica biológica de PEG-G-CSF ó G-CSF (IU / mg)

Ao – Actividad biológica de PEG-G-CSF ó G-CSF (IU / ml)

C – Contenido de proteína en la solución de PEG-G-CSF ó G-CSF (mg / ml)

Tabla 3. Actividad específica de PEG-G-CSF y G-CSF no modificado

3

Preparación	Actividad Específica (IU / mg)
PEG-G-CSF conjugado, preparado de acuerdo al ejemplo 3	$(0.845 \pm 0.091) \times 10^8$
G-CSF no modificado	$(1.00 \pm 0.081) \times 10^8$

EJEMPLO 11

Análisis de actividad termal de PEG-G-CSF en comparación de un G-CSF no modificado

Una muestra de PEG-G-CSF conjugado, preparado de acuerdo al ejemplo 3, diluido con 5 mM de pH sodio acetato, pH 4.0, conteniendo 140 mM NaCl, la concentración de proteína arriba de 0.28 mg / ml, fue colocada en un baño de agua a temperatura $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$ y a varios intervalos de tiempo el apareamiento de corriente en la solución de la proteína fue estudiada por la medida de absorbencia a 340 nm. Similarmente, el estudio de estabilidad termal de G-CSF no modificado fue realizado. La incubación de proteínas a temperatura $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$ lleva a la formación de agregados insolubles, resultando en corriente incrementada de solución proteína, lo cual puede ser medido determinando la densidad óptica de la solución a 340 nm. La Fig. 7 presenta los resultados del estudio, los cuales muestran que la corriente de la preparación del G-CSF no modificado incrementa con el tiempo de incubación, considerando la preparación de PEG-G-CSF permanece estable durante el período completo de observación. Estos datos indican que la estabilidad termal del reclamado PEG-G-CSF conjugado es mucho más alta que la del G-CSF no modificado.

Estabilidad proteolítica de PEG-G-CSF en comparación con un G-CSF no modificado

Una muestra de PEG-G-CSF conjugado, preparado de acuerdo al ejemplo 3, fue diluido en una concentración de 0.6 mg / ml, entonces 150 microlitros de 1M Tris-HCl, pH 8.5 fue agregado a 850 microlitros de muestra resultante, así que al final el pH de la muestra fue 7.4. Entonces 2 microlitros 0.5 M CaCl_2 fueron agregados a una concentración final de 1 mM, agitado, entonces 15 microlitros de tripsina (Promega, Gold) fueron agregados a una concentración final de 0.02 microgramos/ml. Similarmente la muestra conteniendo G-CSF no modificado fue preparada. Las muestras fueron incubadas a 37 °C. Submuestras (100 microlitros) fueron tomadas cada 60 minutos y 20 microlitros 10% SDS fueron agregados para parar la reacción trípica y el SDS-PAGE fue realizado, como está descrito en el ejemplo 1. Después de la electroforesis el gel fue pintado con Coomassie R-250 y el análisis densitométrico del gel pintado. El área de la banda principal fue determinada por un programa de computadora GelPro Analyser. El área de la banda principal en la muestra inicial (no tratada con tripsina) fue tomada al 100%. Fig. 8 presenta datos de la sensibilidad del PEG-G-CSF conjugado y G-CSF al tratamiento por tripsina. Es evidente que con el tiempo de incremento del tratamiento de tripsina el contenido de PEG-G-CSF y G-CSF se reduce, pero el reclamado PEG-G-CSF conjugado es más resistente a la acción de tripsina en comparación con el G-CSF no modificado.

EJEMPLO 13

Inmunoreactividad de PEG-G-CSF conjugado en comparación de un G-CSF no modificado

La inmunoreactividad del reclamado PEG-G-CSF conjugado fue determinada por una actividad de unión anticuerpo utilizando una modificación del ensayo ELISA con el uso de un juego de reagentes ProCon G-CSF (Proteína contorno LLC). El PEG-G-CSF conjugado, preparado de acuerdo al ejemplo 3, fue diluido en 10 mM Tris-HCl pH, pH 7.2, conteniendo 140 mM NaCl y 1% de suero albumina bovino a una concentración de 1 mkg/ml. Entonces 100 microlitros de las muestras obtenidas fueron agregados dentro de los pozos de la placa microtiter previamente recubierta con anticuerpos monoclonales contra G-CSF. Después de la incubación a 37 °C (60 min) de anticuerpos monoclonales a un epítoto independiente, etiquetado por biotin fue agregado dentro de los pozos. El complejo inmune resultante fue detectado utilizando estreptavidín, etiquetado por peroxidasa de rábano. Para el desarrollo de la reacción color en los pozos 100 microlitros de solución sustrato (200 microgramos / ml tetrametilbezidina ("Sigma") y 0.1% H₂O₂ en 0.05 M TB, pH 7.2 fueron agregados e incubados hasta el desarrollo del color azul. La reacción fue detenida introduciendo 50 microlitros 2 M de solución de ácido sulfúrico dentro de los pozos. Los resultados fueron tomados en cuenta, midiendo la absorbencia a una longitud de onda de 405 nm en un lector de microplaca "Multiscan" EX. Similarmente la inmunoreactividad del G-CSF no modificado fue estudiada. La interacción de un G-CSF no modificado con inmunoglobulinos fue tomada al 100%. De los resultados presentados en la Fig. 9 se ve que la inmunoreactividad del reclamado PEG-G-CSF conjugado es 25% de la inmunoreactividad del G-CSF no modificado.

EJEMPLO 14

Determinación de la estabilidad durante el almacenamiento del PEG-G-CSF

Una muestra, preparada de acuerdo al ejemplo 3, fue diluida a 1 mg / ml en 1.6 mM de vehículo sodio acetato pH 4.0 ± 0.2. De la muestra diluida los alicuos fueron tomados y colocados dentro de tubos estériles con pestaña, clase “Eppendorf”. Estos fueron almacenados a temperatura (6 ± 2) °C. La actividad específica y homogeneidad de PEG-G-CSF conjugado fue determinada a intervalos diferentes de tiempo de almacenaje. La homogeneidad de PEG-G-CSF fue analizada utilizando el SDS-PAGE y SEC-HPLC como está descrito en el ejemplo 1 y ejemplo 5, respectivamente. La tabla 4 muestra que el PEG-G-CSF conjugado es estable por al menos 24 meses cuando es almacenada a temperatura (6 ± 2) °C.

Tabla 4. La estabilidad del reclamado PEG-G-CSF conjugado a (6 ± 2) °C.

Parámetros	Vida en repisa (meses)				
	0	6	12	18	24
Actividad (IU / mg)	(0.84±0.09) x108	(0.75±0.15) x108	(0.9±0.10) x108	(0.80±0.15) x108	(0.86±0.07) x108
Homogeneidad por HPLC GF (%)	>95	>95	>95	>95	>95
Homogeneidad por EF en PAGE (%)	>98	>98	>98	>98	>98

EJEMPLO 15

Análisis fármaco cinético de PEG-G-CSF conjugado

Una muestra de 5 microgramos de PEG-IFN conjugado, preparada de acuerdo al ejemplo 3, fue inyectada intraperitonealmente a 20 ratones

de 20 g de la línea ICR. En paralelo, otro grupo de ratones fue inyectado con un G-CSF no modificado. Las muestras de sangre fueron tomadas con punción retro-orbital a diferente hora después de la inyección. El suero sanguíneo fue obtenido por método normal.

Las muestras de suero para medir cualquier nativo o monoPEGilado G-CSF fueron utilizadas en el ensayo ELISA con ratón monoclonal inmunoglobulina a diferentes epítopes de G-CSF humano.

Un pozo de placa microtiter fue recubierta con anticuerpos monoclonales en contra de G-CSF (250 ng/pozo en 100 microlitros de 20 mM Tris-HCl vehículo (TB), pH 9.0. Después de toda la noche de incubación a 4 °C, 200 microlitros de TB, pH 7.4 conteniendo 1% de suero albumina bovino (BSA) y 0.05% Tween-20 fue agregado dentro de los pozos para bloquear sitios de unión no específicos.

Entonces 100 microlitros del suero analizado, diluido por TB, conteniendo 1% BSA y 0.05% Tween-20 al radio de 1:2, 1:4 y 1:8 fueron agregados dentro de los pozos. En paralelo, para la construcción de la curva normal de calibración, conocidas concentraciones de muestras de PEG-G-CSF en el rango de 25 ng / ml a 600 ng / ml en vehículo TB conteniendo 1% BSA y 0.05% Tween-20 fueron agregados a los pozos. Después de la incubación durante 1 hora a 37 °C, anticuerpos monoclonales bioninilados anti humanos G-CSF y estreptavidín-peroxidasa conjugada fueron agregados dentro de los pozos secuencialmente. Después de la incubación y lavado para remover todas las enzimas no unidas, 100 microlitros de solución sustrato (100 mM de vehículo sodio acetato, pH 5.0, conteniendo 0.015% hidróxido peróxido y 0.2 mg / ml tretametilbenzidina) fueron agregados para inducir un producto de reacción coloreada. La reacción fue detenida agregando 2 M 2M H₂SO₄. La densidad óptica medida a 450 nm en el lector de microplaca. La concentración de G-

CSF en el suero fue determinada utilizando la curva de calibración tomando en cuenta la dilución del suero estudiado.

La curva de calibración creada con el nativo conocido de concentración G-CSF (en el rango de 6.25 ng / ml a 200 ng / ml en vehículo TB conteniendo 1% BSA y 0.05% Tween-20) fue utilizado en el análisis de G-CSF no modificado en farmacocinética.

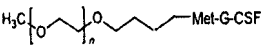
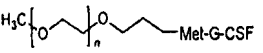
Los resultados del reclamado PEG-G-CSF farmacocinéticos comparados con el G-CSF no modificado son presentados en la Fig. 10. De los resultados sigue que el reclamado PEG-G-CSF conjugado tiene un efecto significativo prolongado. Con la administración del G-CSF no modificado su concentración en la sangre de animales alcanzó un máximo a 1 hora después de la inyección y entonces rápidamente decreció. Con la administración del PEG-IFN conjugado, un contenido máximo de G-CSF en sangre de animales fue observado después de 6 horas (figura 10) y entonces un decrecimiento lento de G-CSF en sangre fue observado durante 140 horas. Basado en los resultados (Fig. 10) los parámetros principales farmacocinéticos del reclamado PEG-G-CSF conjugado fueron calculados. Los resultados mostrados de absorción del sitio de inyección, volumen de distribución, distancia de PEG-G-CSF conjugado fueron significativamente lentos en comparación al G-CSF no modificado, lo que llevó a una circulación de largo alcance del reclamado PEG-G-CSF conjugado en la sangre (más de 140 horas).

EJEMPLO 16

Características comparativas del reclamado PEG-G-CSF conjugado y PEG-G-CSF conjugado como está descrito en el método prototipo

La comparación de la estructura, fisicoquímica básica y parámetros farmacokinéticos del reclamado PEG-G-GSF conjugado, obtenidos de acuerdo al ejemplo 3 con PEG-G-CSF conjugado como está descrito en el método prototipo fue realizado (tabla 5). Los datos presentados en la tabla 5 muestran un mejoramiento significativo de propiedades del reclamado PEG-G-CSF conjugado en comparación con conjugados del método prototipo.

Tabla 5. Los parámetros principales fisicoquímicos y farmacokinéticos del reclamado PEG-G-CSF conjugado comparado con el PEG-G-CSF conjugado como está descrito en el método prototipo (patente US 5,824,784).

Parámetros	PEG-G-CSF conjugados	
	Reclamado PEG-G-CSF	
G-CSF	Filgratismo	Filgratismo
Estructura PEG	Linear	Linear
Peso molecular PEG (kDA)	30-40	6-25
Fórmula estructural PEG-G-CSF conjugado		
Actividad específica % de G-CSF no modificado	84-94	68
Pureza de acuerdo al PAGE (%)	100	**
Resultados de pureza por HPLC	>98	**

30

(%)		
Resultados de pureza por GF HPLC (%)	>98	**
El contenido de endotoxinas bacteriales (EU/mg)	<3	**
Parámetros fármaco-cinéticos		
El radio de AUC PEG-G-CSF/G-CSF	18	**

*- Fórmula estructural de PEG-G-CSF conjugado, obtenida por el método prototipo dado en “WHO Drug Information”, 2002, v. 16, N. 1, 102, Lista 47.

** Sin datos.

EJEMPLO 17

Solución para inyección subcutánea 0.6 mg / ml, 1.0 mg / ml, 2.0 mg / ml, 3.0 mg / ml

La solución para inyección subcutánea utilizada como medicina conteniendo recombinante PEGilado granulocito colonia-estimulante factor humano (PEG-G-CSF) como un ingrediente activo y componentes adicionales farmacéuticamente aceptables en el siguiente radio:

Ingrediente activo: Recombinante PEGilado granulocito colonia-estimulante factor humano (PEG-G-CSF), - 0.6 – 3.0 mg

Excipientes:

Polisorbato 20 - 0.04 mg

Manitol - 50 mg

Trihidrato sodio acetato – 0.23 mg
Ácido acético glacial arriba de 4.0
Agua para inyección – arriba de 1 ml

EJEMPLO 18

Empaque para el producto finalizado, por ejemplo, una solución acuosa conteniendo PEG-G-CSF, obtenido de acuerdo al ejemplo

3

En jeringas de vidrio neutral de clase hidrolítica 1, con agujas soldadas, tapaderas protectoras, cubierto con tapaderas protectoras, tapado con tapón de jeringa.

Ó

En ampollas de vidrio neutral hidrolítico clase 1, tapado con cubierta de teflón de hule fluorizado o puntas de butil-hule con tapadera de aluminio.

EJEMPLO 19

Un juego conteniendo drogas medicinales, por ejemplo, una solución acuosa conteniendo PEG-G-CSF, obtenido de acuerdo al ejemplo 3, como un ingrediente activo

Un juego conteniendo 1 jeringa completa con el pistón en un empaque de contorno celular hecho de película polímero junto a instrucciones para el uso que están colocadas en un empaque de cartón.

Ó

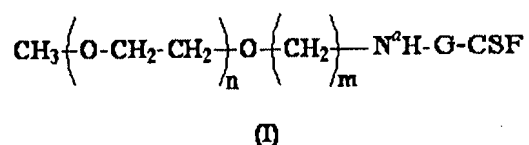
Un juego conteniendo 1 ampolla en el contorno de un blíster hecho de película polímero, junto a instrucciones para su uso, las cuales están dentro de un empaque de cartón.

32

REIVINDICACIONES



1. Una colonia estimulante humana granulocita factor conjugado con monometoxyglietileno glicol de fórmula (1).



Donde:

n – intergers de 681 a 1 000;

m – interger ≥ 4 ;

N^aH-G-CSF – Natural o recombinante polipéptido, teniendo actividad de G-CSF

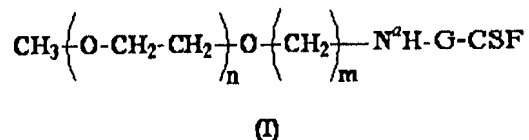
2. Un conjugado de acuerdo a la Reivindicación 1, donde el peso promedio molecular del polietileno glicol es de 30 a 40 kDa.
3. Un conjugado de acuerdo a la Reivindicación 2, en donde el peso molecular del polietileno glicol es 30 kDa.
4. Un conjugado de acuerdo a la Reivindicación 1, en donde m es interger 4 ó 6.
5. Un conjugado de acuerdo a la Reivindicación 1, en donde el grupo N-terminal es un residuo metionina (Met).
6. Una composición farmacéutica, teniendo actividad correspondiente a la colonia granulocita factor estimulante, conteniendo el conjugado de fórmula general (1) en la cantidad efectiva y excipientes farmacéuticamente aceptables.

7. Una composición farmacéutica de acuerdo a la Reivindicación 6, para uso medicinal en tratamiento de neutropenia de varios orígenes.
8. Una composición farmacéutica de acuerdo a la Reivindicación 6, conteniendo el conjugado de fórmula general (1) en la cantidad efectiva, polisorbato, manitol, trihidrato sodio acetato, ácido acético y agua para inyección a 1 ml.
9. Una composición farmacéutica de acuerdo a la Reivindicación 8, en donde el valor pH es de 3 a 5.
10. Una composición farmacéutica de acuerdo a la Reivindicación 8, en donde el valor pH es principalmente 4.
11. Un agente medicinal, teniendo la actividad correspondiente a que la colonia granulocita factor estimulante, incluyendo el conjugado de fórmula general (1).
12. Un agente medicinal de acuerdo a la Reivindicación 1 para el tratamiento de neutropenia de varios orígenes.
13. Uso de conjugado de fórmula (1) para la preparación de agente medicinal teniendo la actividad correspondiente al factor colonia estimulante granulocita.
14. Un método de profilaxis o tratamiento de neutropenia, involucrando administración de una cantidad efectiva del conjugado de fórmula (1).
15. Un contenedor herméticamente sellado en ambiente estéril conteniendo una formulación farmacéutica líquida de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 6 – 11.

- 33
16. Un contenedor de acuerdo a la Reivindicación 15, en donde el contenedor es una jeringa pre-llenada, una ampolla o un auto-inyector.
 17. Un juego, incluyendo el contenedor de acuerdo a la Reivindicación 15 y prescribiendo información.

RESUMEN

La presente invención se relaciona a farmacéuticos y medicina, específicamente, a un nuevo conjugado fisiológicamente de granulocita colonia estimulante factor (G-CSF) con la fórmula general:



Donde:

n – intergers de 681 a 1 000;

m – interger ≥ 4 ;

N^aH-G-CSF – Natural o recombinante polipéptido, teniendo actividad de G-CSF

La invención también está relacionada a medicinas conteniendo el conjugado reclamado de fórmula (1), composiciones farmacéuticas, el uso de conjugado de fórmula (1) para drogas y medicinas con granulocita colonia estimulante factor como un ingrediente activo, se aproxima a prevenir y/o tratar la neutropenia, el contenedor que contiene la composición farmacéutica.

3

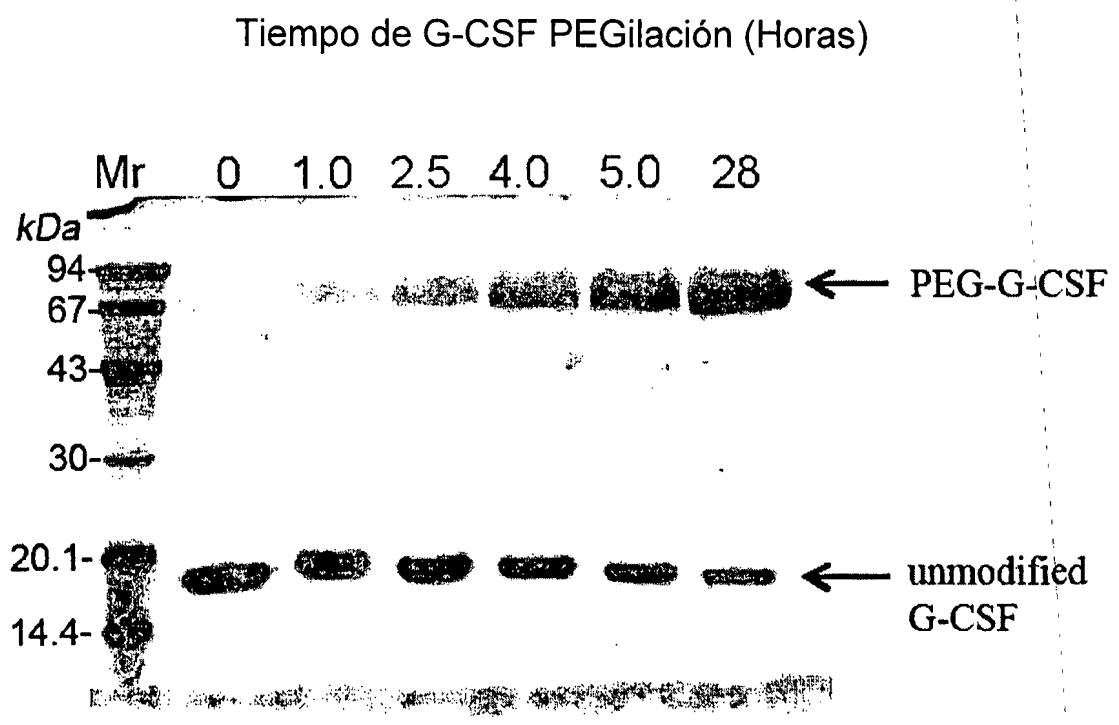
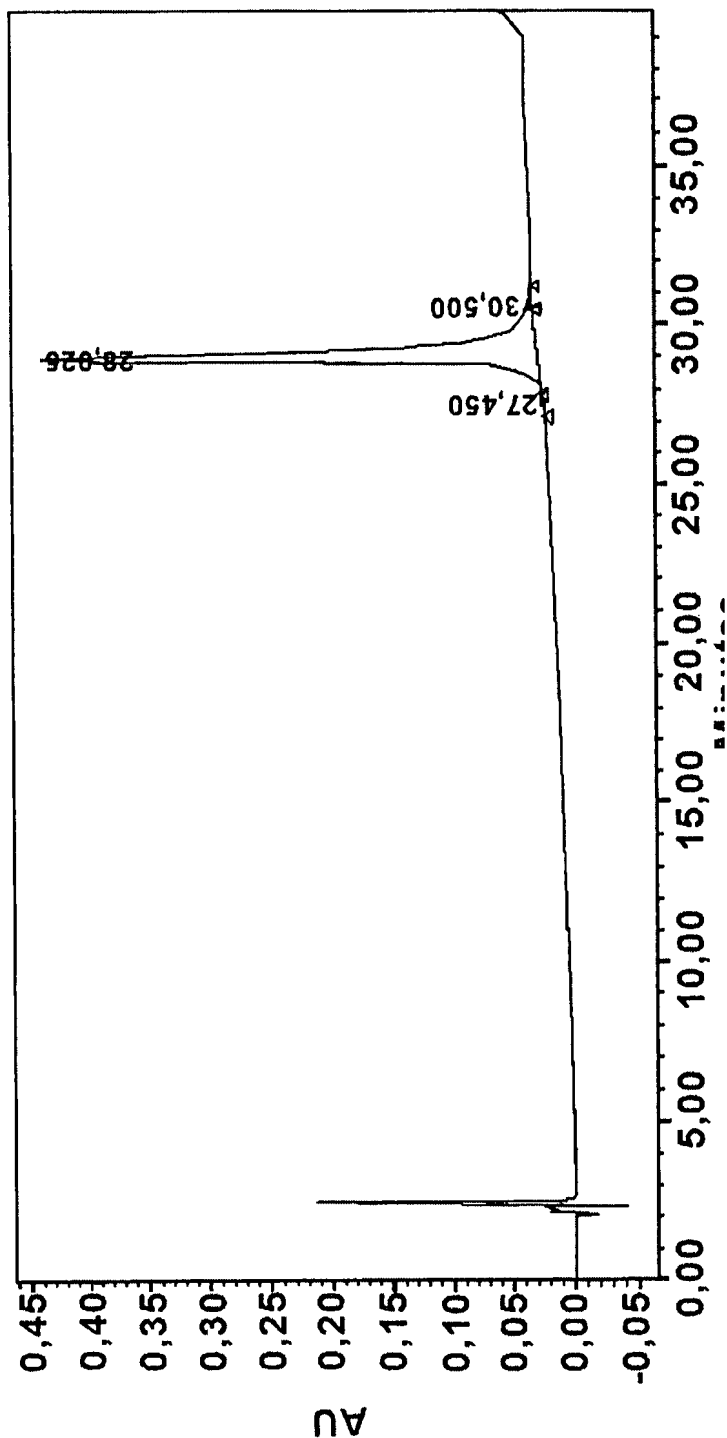
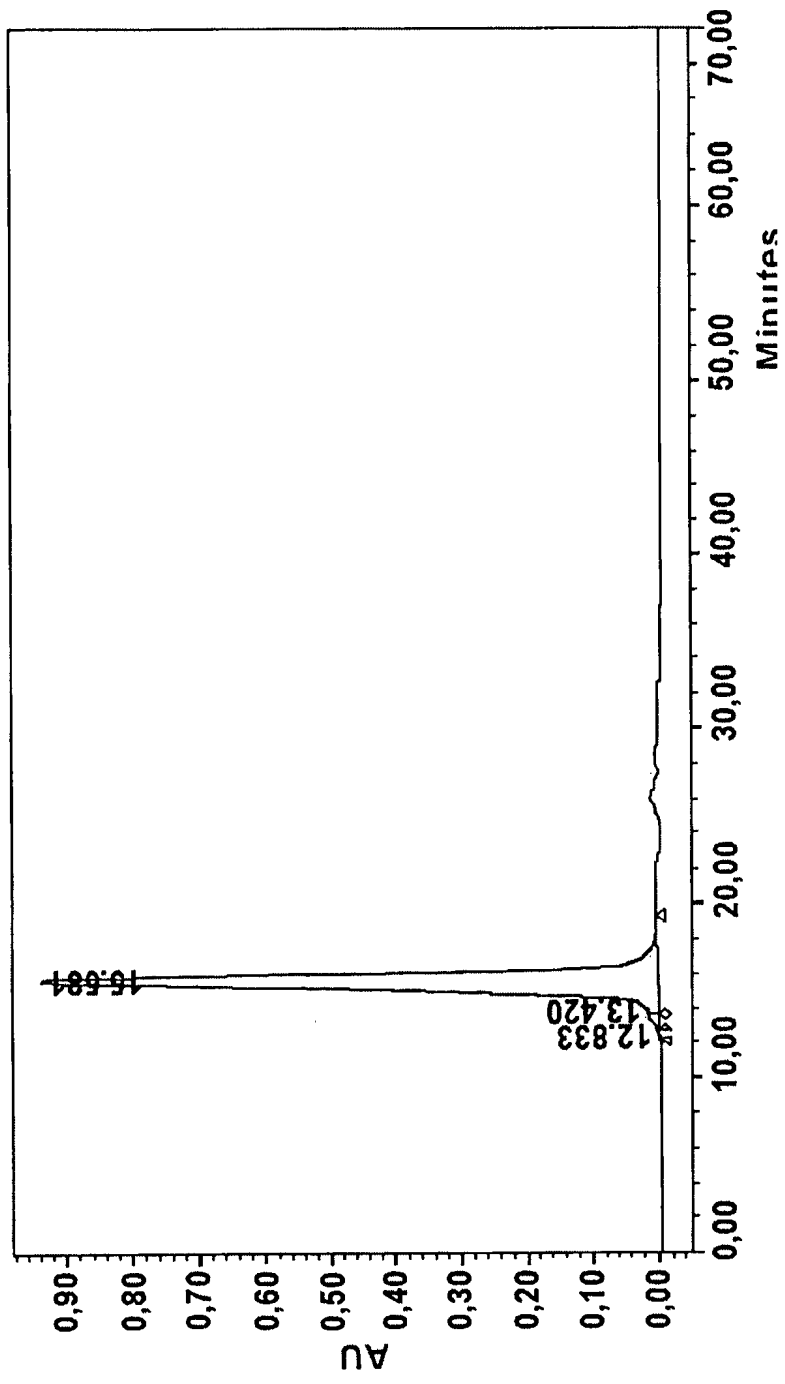


Fig. 1.



	RT (min)	Area (V'sec)	% Área	Peso (V)	% Altura	Resolución USP	Resolución (EP y JP)	Conteo de placa USP
1	27.4 50	6972	0.07	356	0.09			4,070489e+ 004
2	28.9 25	101446 14	98.8 5	4095 27	98.4 9	2,58501Be+0 003	263813e+0 005	5,406289e+ 004
3	30.5 00	110886	1.08	5928	1.43			

Fig. 2



	RT (min)	Área (V*sec)	5 Área	Altura (V)	% Altura
1	12.833	143314	0.26	5819	0.61
2	13.420	706319	1.27	19509	2.03
3	15.581	54861354	98.47	936020	97.37

Fig.3

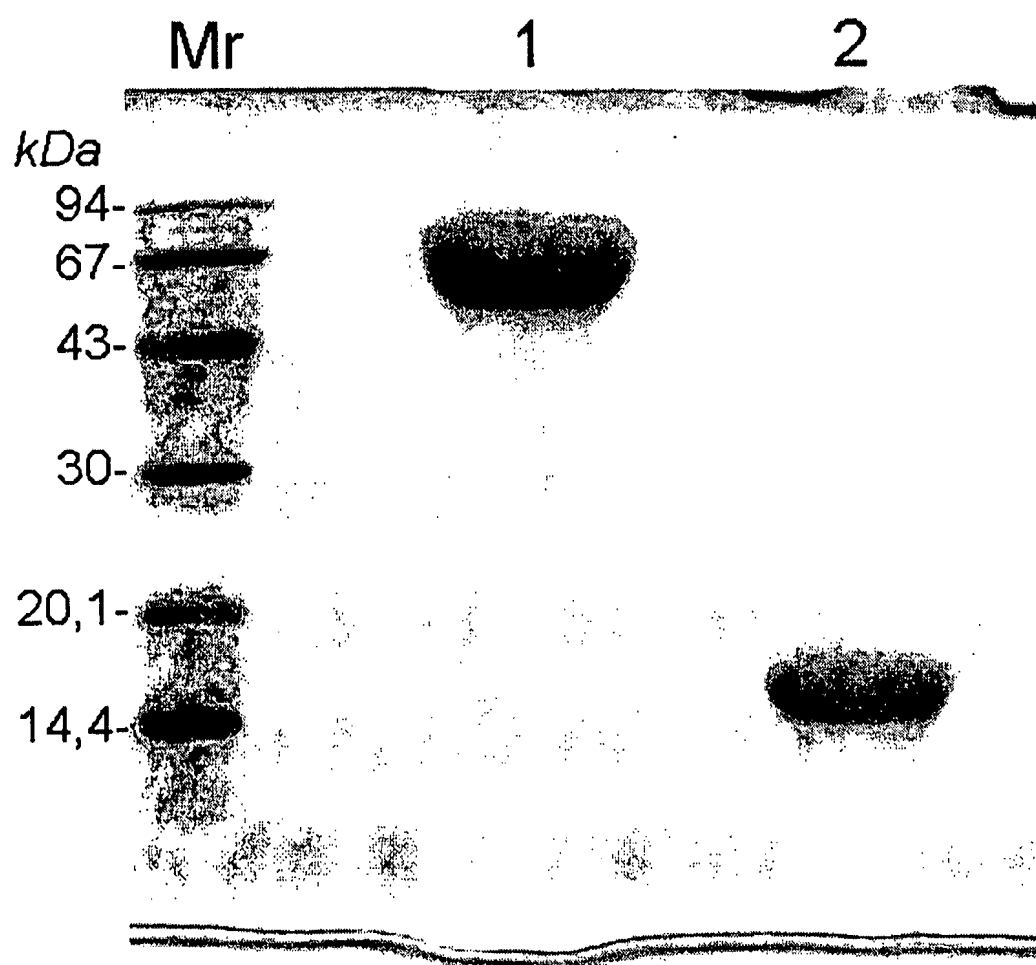
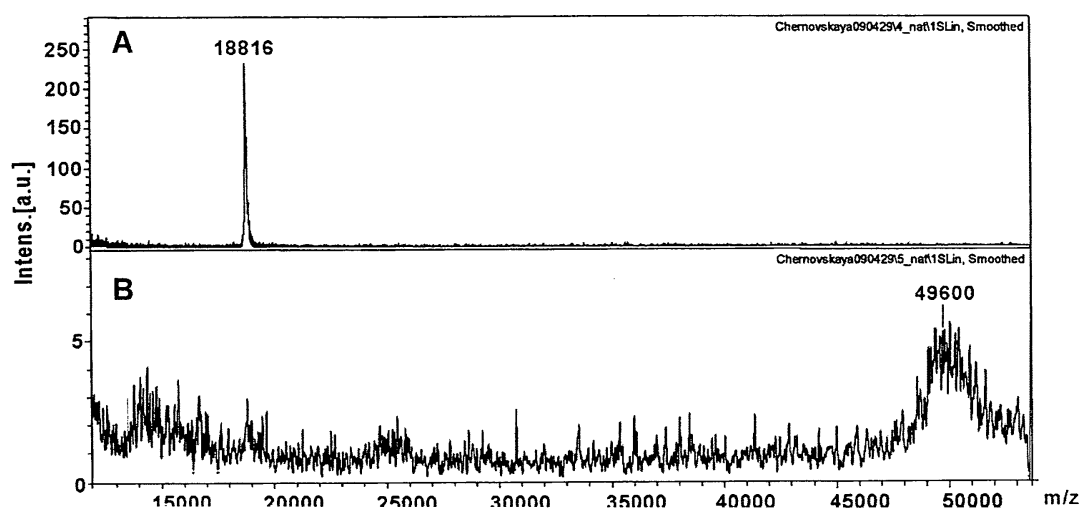


Fig. 4.

Fig. 5



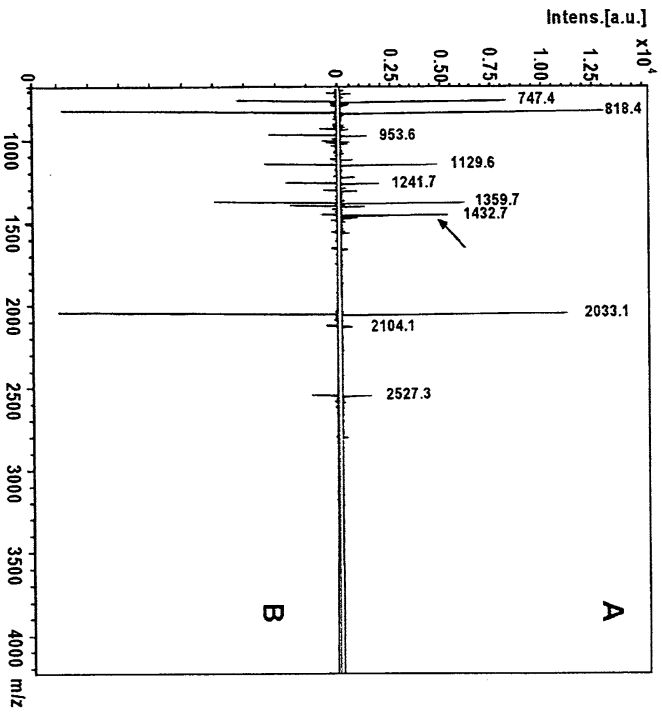


Fig. 6.

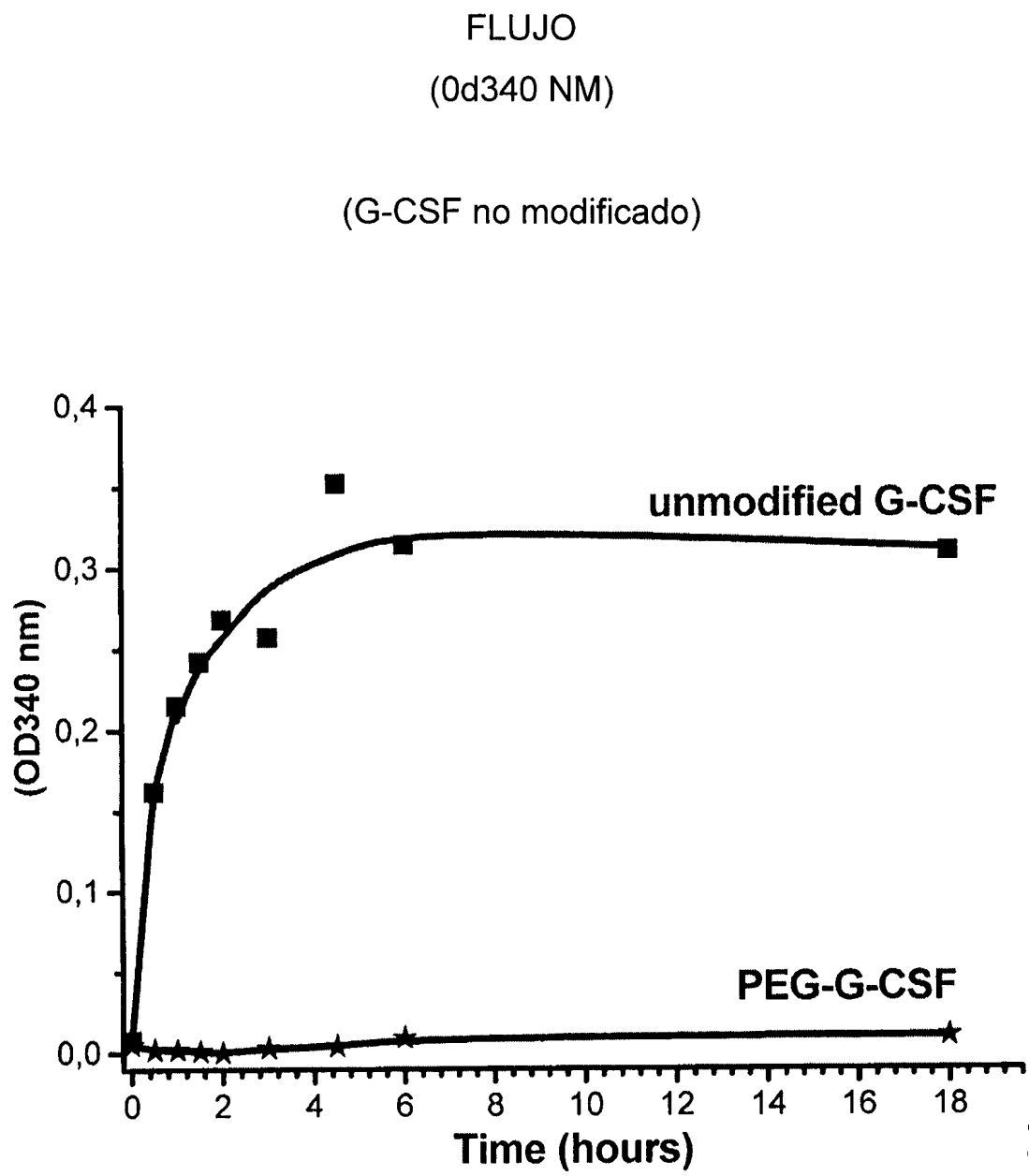


Fig. 7.

TIEMPO (horas)

44

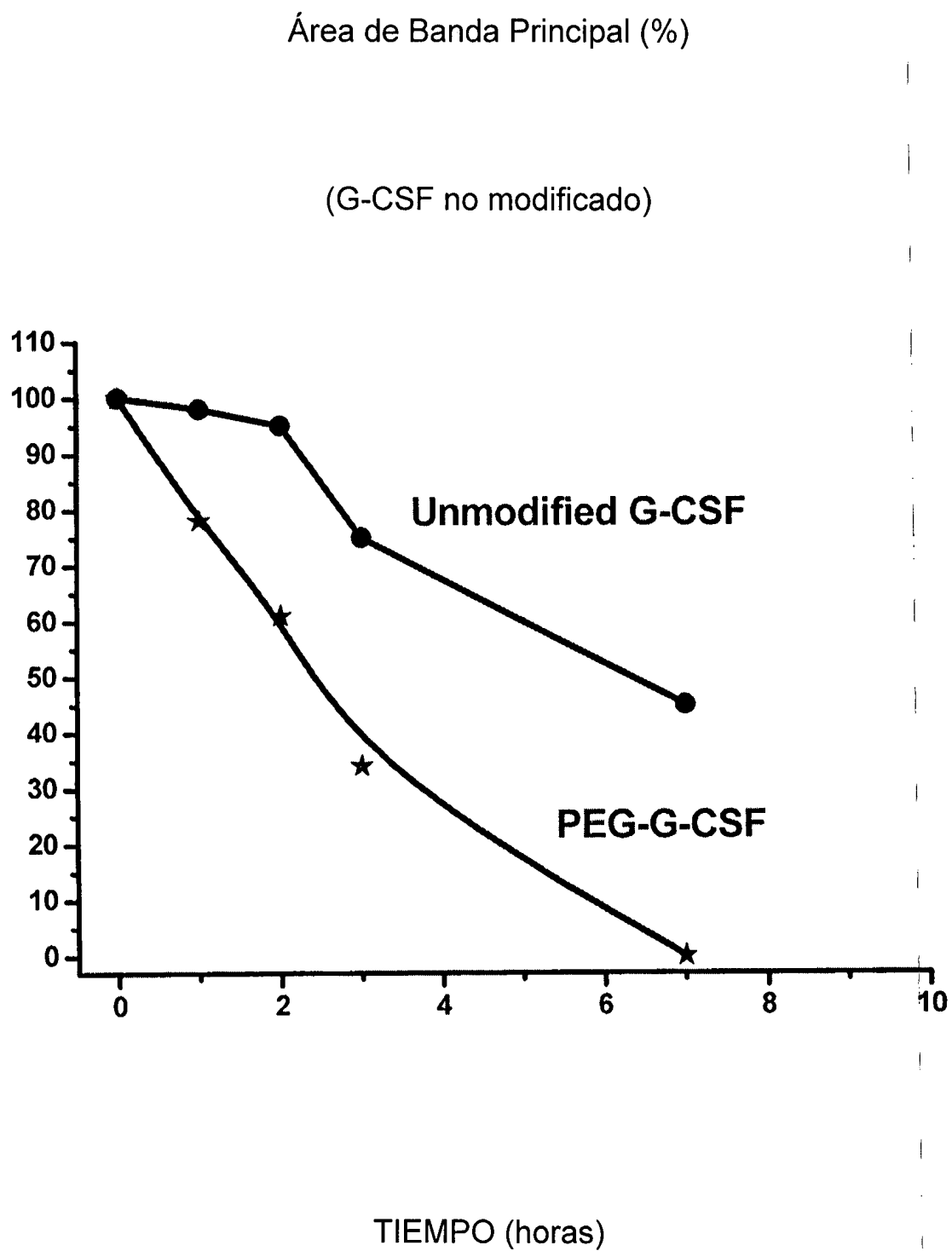


Fig. 8.

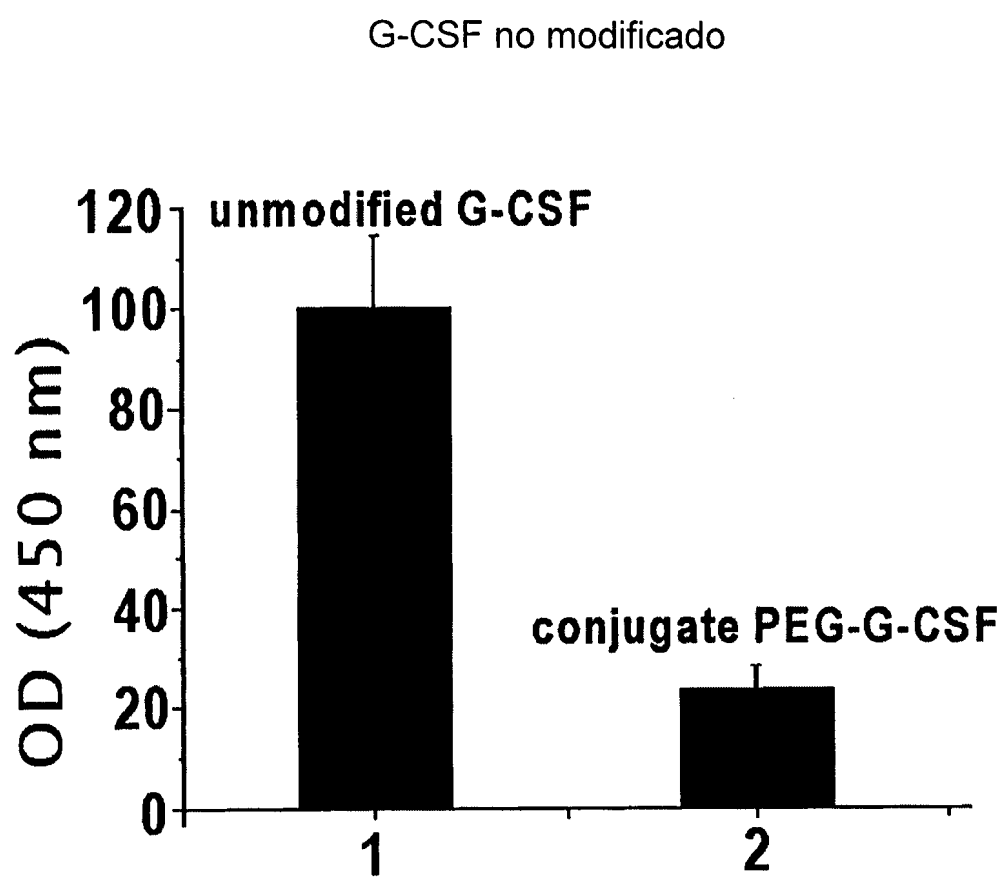


Fig.9

PEG-G-CSF conjugado

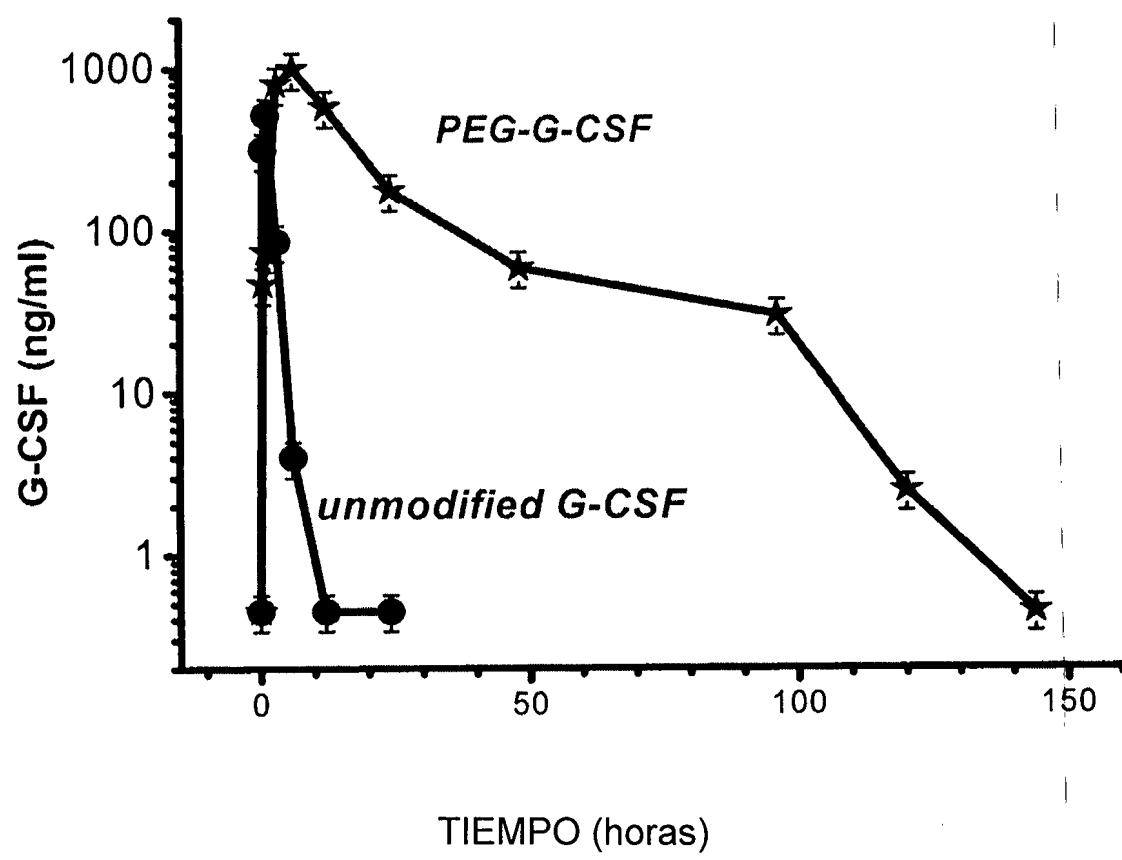


Fig. 10

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 003883
		Bogotá D.C., Enero 15 de 2013 - 13:40:20

RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA					NI 800.020.909
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	532921200	15/01/2013	5.613.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNDITARIO	Vr CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

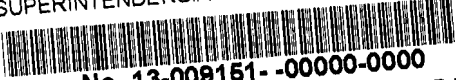
SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-009151- -00000-0000
Fecha: 2013-01-18 15:08:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 51

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 13 - 003891	
				Bogotá D.C., Enero 15 de 2013 - 13:40:20	
RECIBIDO DE : MARIO DELGADO ECHEVERRY E HIJOS LTDA					NI 800.020.909
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	532921200	15/01/2013	5.613.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr UNDITARIO	Vr CONCEPTO	
7 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	210.000.00	
				\$210.000.00	
SON: **DOSCIENTOSDIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: 					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-009151- -00000-0000 Fecha: 2013-01-18 15:08:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 51					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Plsos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Enero 15 de 2013 - 13:40:25					

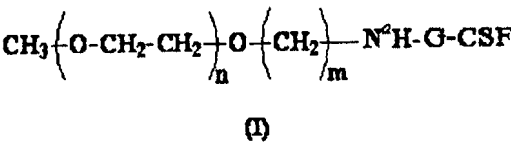
4p

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES					
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS					
PATENTE DE INVENCION ☒ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐					
(21) N° de solicitud:			(22) Fecha de solicitud:		
(51) Clasificación Internacional :					
(71)Solicitante (s) CLOSED JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD"					
(72) Inventor(es) CHERNOVASKAYA, Tatyana Veniaminovna; DENISOV, Lev Alexandrovich; RUDENKO, Elena Georgievna; KLENOVA, Angelina Vsevolodovna; MOROZOV, Dmitriy Valentinovich; MOROZOVA, Elena Leonidovna.					
(74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS					
(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33) País
		2010133875		13-08-2010	RU
(85) Fecha inicio fase nacional: 13/03/2013				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 16/02/2012 Fecha (dd/mm/aa)	
Fecha de presentación de la solicitud: 19/07/2011				N° publicación: WO2012/021088 A1	
No. de solicitud PCT/ RU2011/000532					
(54)Título: UN NUEVO CONJUGADO DE GRANULOCITO COLONIA-ESTIMULANTE FACTOR (G-CSF) CON POLIETILENO GLICOL					

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud:		(51) Int Cl: (71) Solicitante (s) (72) Inventor(es) (74) Apoderado:	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	2010133875	13-08-2010	RU
		CLOSED JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD" CHERNOVASKAYA, Tatyana Veniaminovna; DENISOV, Lev Alexandrovich; RUDENKO, Elena Georgievna; KLENOVA, Angelina Vsevolodovna MOROZOV, Dmitriy Valentinovich; MOROZOVA, Elena Leonidovna; JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS	
(85) Fecha limite inicio fase nacional:		(87) Publicación Internacional	
13/03/2013		Fecha: Fecha (dd/mm/aa)	
		16/02/2012	
Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		N° publicación: WO2012/021088 A1	
Fecha de presentación de la solicitud			
No. de solicitud: PCT/ RU2011/000532			
19/07/2011			
(54) Título: UN NUEVO CONJUGADO DE GRANULOCITO COLONIA-ESTIMULANTE FACTOR (G-CSF) CON POLIETILENO GLICOL			

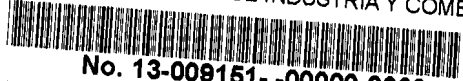
Resumen

Nuevo conjugado fisiológicamente de granulocita colonia estimulante factor (G-CSF) con la fórmula general:



Donde:

n – intergers de 681 a 1 000;
m – interger ≥ 4;
N^aH-G-CSF – Natural o recombinante polipéptido, teniendo actividad de G-CSF
La invención también está relacionada a medicinas conteniendo el conjugado reclamado de fórmula (1), composiciones farmacéuticas, el uso de conjugado de fórmula (1) para drogas y medicinas con granulocita colonia estimulante factor como un ingrediente activo, se aproxima a prevenir y/o tratar la neutropenia, el contenedor que contiene la composición farmacéutica.



No. 13-009151- -00000-0000

Fecha: 2013-01-18 15:08:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 51

PATENTE DE INVENCION

☐

MODELO I

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT

☒

MODELO DE UTILIDAD PCT

☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen).
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL

☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO

☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	