

Kémiaailag módosított, emberi növekedési hormon konjugátumok

K I V O N A T

5

A találmány tárgya kémiaailag módosított, emberi növekedési hormon (hGH), amelyet úgy állítottak elő, hogy a fehérjéhez vízoldékony polimert kötöttek. A találmány szerint, kémiaailag módosított fehérje hGH aktivitása sokkal tovább tarthat, mint a nem módosított hGH-é, ezzel a dózis csökkentése és más beadási rendek válnak lehetővé.

A találmány tárgyát képezik továbbá a kémiaailag módosított hGH és annak agonista változatai, az előállításukra szolgáló eljárások, valamint a kémiaailag módosított hGH-t és annak agonista változatait tartalmazó készítmények is.

A találmány szerinti módosított hGH és annak agonista változatai alkalmazhatók számos betegség vagy fejlődési rendellenesség kezelésére.

5

15

30

a klónozott szomatogén [Leung és mtsai., Nature 330, 537 (1987)] vagy prolaktin receptorhoz [Boutin és mtsai., Cell 53, 69 (1988)]. A hGH-t kódoló klónozott gént szekretálódó formában már expresszálták *Escherichia coli*-ban [Chang és mtsai., Gene 55, 189 (1987)] és a hGH DNS- és aminosav-szekvenciája is ismert [Goeddel és mtsai., Nature 281, 544 (1979); Gray és mtsai., Gene 39, 247 (1985)].

Az emberi növekedési hormon (hGH) a normális emberi növekedés és fejlődés szabályozásában fontos szerepet tölt be. Az agyalapi mirigy e hormonja különféle biológiai hatásokat képes kifejteni (például, lineáris növekedés (somatogenesis), laktáció, makrofágok aktiválása, inzulinszerű és diabetogén hatások, stb.) [Chawla, Ann. Rev. Med. 34, 519 (1983); Edwards és mtsai., Science 239, 769 (1988); Thomer és mtsai., J. Clin. Invest. 81, 745 (1988)]. Gyermekekben a növekedési hormon hiánya törpeséghez vezet, ezt azonban már több mint tíz éve sikeresen kezelik a hGH exogén beadásával.

Az emberi növekedési hormon (hGH) 191 aminosavból álló, egyláncú polipeptid (molekulatömege: 21.500), amelynek 53. és 165. illetve a 182. és 189. helyeit diszulfidhidak kötik össze [Niall, Nature, New Biology, 230, 90 (1971)]. A hGH hatékony anabolikus ágens, különösen azért, mert a nitrogén, foszfor, kálium, és kalcium visszatartását váltja ki. Agyalapimirigy-irtott (*hypophysectomia*) patkányokban a GH a patkányok növekedési arányát legalább részben helyreállítja [Moore és mtsai., Endocrinol. 122, 2920-2926 (1988)]. Az agyalapi mirigy alacsony működése (GH hiány) esetén, a GH leginkább feltűnő hatásai közé tartozik az, hogy az alanyokban a csont-üvegporclemmez lineáris növekedésének gyorsulása testméret-növekedést eredményez [Kaplan, Growth disorders in childrens and adolescents, Charles C. Thomas, Springfield, IL (1964)].

Különböző állatmodellekben, a hGH különféle fiziológiai és metabolikus hatásokat – például lineáris csontnövekedést, laktációt, makrofágok aktiválását, inzulinszerű és diabetogén hatások, stb. - vált ki [Chawla, Ann. Rev. Med. 34, 519 (1983); Isaksson és mtsai., Ann. Rev. Physiol. 47, 483 (1985); Edwards és mtsai., Science 239, 769 (1988); Thomer és Vance, J. Clin. Invest. 81, 745 (1988); Hughes és Friesen, Ann. Rev. Physiol. 47, 469 (1985)]. Az irodalomból ismert, hogy – különösen nőkben a menopauza után – a kor előrehaladtával a GH szekréciója csökken [Millard és mtsai., Neurobiol. Aging. 11, 229-235 (1990); Takahashi és mtsai., Neuroendocrinol. M, L6-, 137-142 (1982); Rudman és mtsai., J. Clin. Invest. 67, 1361-1369 (1981); Blackman, Endocrinol. Aging 16, 981 (1987)]. Ezenfelül, létezik olyan közlemény, amely szerint az idősödés bizonyos megnyilvánulásai, így a test csökkent hústömege, a zsírszövet tömegének növekedése, és a bőr vékonyodása, csökkenthető heti háromszori GH-kezeléssel [Rudman és mtsai., N. Engl. J.

Med. 323, 1-6 (1990); Vance, N. Engl. J. Med. 323, 52-54 (1990)]. E biológiai hatások a hGH és specifikus celluláris receptorok kölcsönhatásának eredményei. Két különböző emberi receptort klónoztak eddig: a májból származó hGH-receptort [Leung és mtsai., Nature 330, 537 (1987)] és az emberi prolaktin receptorát [Boutin és mtsai., Mol. Endocrinol. 3, 1455 (1989)]. Azonban, valószínű, hogy más hGH-receptorok is vannak, így például az emberi placentában található laktogénreceptor [Freemark és mtsai., Endocrinol. 120, 1865 (1987)]. E homológ receptorok egyetlen, glikozilált, extracelluláris hormonkötő-domént, transzmembrán-domént és citoplazma-domént tartalmaznak, amelyek egymástól szekven-
5 cia és méret tekintetében jelentősen mértékben különböznek. Egy vagy több receptorról
10 vélik azt, hogy meghatározó szerepet játszanak a hGH-ra adott fiziológiai válasz szabályo-
zásában.

Általános az a megfigyelés, hogy ha fiziológiailag aktív fehérjét adunk be egy adott testbe, akkor az aktív fehérje, a testből történő magas kitisztulási ráta miatt, csak rö-
vid ideig mutat farmakológiai aktivitást. Továbbá, a relatív hidrofobicitás korlátozhatja e
15 fehérjék stabilitását és/vagy oldékonyságát.

A terápiás fehérje kitisztulási arányának csökkentése, stabilitásának javítása vagy antigenitásának megszüntetése céljából számos olyan eljárás ismert, amely során vízben oldható polimerekkel fehérjéket kémiai módon módosítanak. Az ilyen típusú kémiai módosítás hatékony gátolhatja azt, hogy proteolitikus enzimek fizikailag érintkezhessenek a fehérje
20 vázával, és így megakadályozható a fehérje lebontása. Bizonyos, vízben oldható polimerek kémiai kapcsolása, a molekula megnövekedett hidrodinamikus térfogata miatt, hatékonyan csökkentheti a vesén át történő kiválasztást. További előnyök közé tartozik – bizonyos körülmények esetén – a terápiás fehérje stabilitásának és keringési idejének fokozása, az oldékonyság fokozása, és az immunogenitás csökkentése. A poli(alkilénoxid), nevezetesen
25 a poli(etilénglikol) (PEG) egy olyan kémiai csoport, amelyet már alkalmaztak terápiás fe-
hérjekészítmények előállításában (a „PEG-ezés” ige legalább egy PEG-molekula kapcsolá-
sát jelenti). A poli(etilénglikol) kapcsolásáról már kimutatták, hogy védelmet nyújt a proteolízis ellen [Sada és mtsai., J. Ferment. Bioeng. 71, 137-139 (1991)], és eljárások is ismertek számos poli(etilénglikol)-csoport kapcsolására [US 4.179.337 sz. amerikai egye-
30 sült államokbeli szabadalmi irat (Davis és mtsai., 1979. december 18.); US 4.00.531 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat (Royer, 1977. január 11.); Abuchowski és mtsai, Enzymes as drugs, 367-383, szerk: Holcerberg és Roberts (1981)].

Más vízdéköny polimereket – így az etilén-glikol/propilén-glikol kopolimerjeit, karboximetil-cellulózt, dextránt, poli(vinilalkohol)-t, poli(vinilpirrolidon)-t, poli(-1,3-dioxolán)-t, poli(-1,3,6-trioxán)-t, etilén/maleinsav-anhidrid kopolimert, poli-aminosavakat (homopolimerként vagy random kopolimerként) - is alkalmaztak már eddig.

5 A PEG-ezett terápiás fehérjékre számos példa ismert. Az adenzin-deamináz PEG-ezett formáját, az ADAGEN®-t, már engedélyezték súlyos kombinált immunhiányos betegség kezelésére. PEG-ezett L-aszparagináz, ONCASPAR®-t, engedélyeztek hiperszenzitív ALL páciensek kezelésére. A fejsérülések kezelésére, PEG-ezett szuper-oxid-dizmutáz van jelenleg klinikai kipróbálás alatt. PEG-ezett α -interferont [US 10 5.738.846 sz. és US 5.382.657 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok] engedélyeztek hepatitis kezelésére, PEG-ezett glükocerebrozidázal és PEG-ezett hemoglobinnal pedig már végeztek előzetes klinikai teszteket. További példaként a PEG-ezett IL-6-ot [EP 0 442 724 sz. európai közzétételi irat] hoznánk fel, amelyben poli(etilén-glikol) molekulákat adtak IL-6-hoz.

15 Egy másik, kémiaiailag módosított, specifikus terápiás fehérje a granulocita-kollóniákat serkentő faktor (G-CSF). A G-CSF a neutrofil granulociták gyors proliferációját és a véráramba történő felszabadulását indukálja, ezáltal terápiás hatást szolgáltat a fertőzések elleni küzdelemben. Az EP 0 401 384 sz. európai közzétételi irat (1990. december 12.) anyagokat és eljárásokat ismertet olyan G-CSF előállítására, amelyhez 20 poli(etilén-glikol) molekulákat kapcsolnak. Módosított G-CSF-et és annak analógjait ír le az EP 0 473 268 sz. európai közzétételi irat (1992. március 4.), és vízdéköny polimer partikulumhoz (például poli(etilén-glikol) molekulához) kovalensen konjugált különféle G-CSF-ek és származékok alkalmazását is ismerteti. Módosított, emberi granulocita-kollóniákat serkentő faktor aktivitású polipeptidet írtak le az EP 0 335 423 sz. európai közzétételi iratban (1989. október 4.). Az US 5.824.784 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban, fehérjék vagy azok analógjainak N-terminális módosítására szolgáló eljárás leírás mellett, az eredményül kapott készítményeket – így új, N-terminálisan, kémiaiailag 25 módosított G-CSF-készítményeket – ismertetnek. Az US 5.823.778 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat kémiaiailag módosított G-CSF-et ír le.

30 Poli(etilén-glikol) esetében, különféle eljárásokat alkalmaznak a poli(etilén-glikol)-nak a fehérjékhez történő kapcsolására. Általában, poli(etilén-glikol)-molekulákat a fehérjéken lévő reaktív csoportok segítségével kapcsolnak a fehérjékhez.

Aminocsoportokat, mint amilyenek a lizin aminosavon vagy az N-terminálison vannak, kényelmesen alkalmazhatók az ilyen kapcsoláshoz. Például, Royer [US 4.002.531 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat, mint fenn] leírja, hogy redukív alkilációt alkalmazott poli(etilén-glikol)-molekuláknak egy adott enzimhez való kötésére.

5 Az EP 0 539 167 sz. európai közzétételi irat (1993. április 28., Wright) leírja, hogy szabad aminocsoport(ka)t tartalmazó peptideket és szerves vegyületeket módosítottak a PEG vagy más, vízdékony szerves polimerek imidát származékával. Az US 5.298.643 sz. és US 5.637.749 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat PEG-arilimidátokat ismert-

10 Chamow és munkatársai [Chamow és mtsai., Bioconjugate Chem. 5, 133-140 (1994)] a CD4 immunadhezin monometoxi(etilén-glikol)-aldehiddel, redukív alkilálással végzett módosítását írják le. A szerzők szerint a CD4-Ig-k 50%-át sikerült MePEG-gel módosítani a PEG-ezés során alkalmazott körülmények között [Id. 137. old.]. A szerzők leírták azt is, hogy a módosított CD4-Ig *in vitro* kötési kapacitása (a gp120 fehérjére néz-

15 ve) lecsökkent az MePEG-ezés mértékével arányosan [mint fenn, US 4.904.584 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat, Shaw (1990. február 27.)], a MePEG-ezés mértéke viszont a poli(etilén-glikol)-molekulák reaktív aminocsoportokon át történő megkötésére szolgáló lizin aminosavak számának módosításával volt kapcsolatban.

Egy adott polimer valamilyen fehérjéhez való kötésére szolgáló eljárások egy részében egy adott csoportot alkalmaznak kötőcsoportként. Ilyen csoportok, azonban, anti-

20 gén hatásúak lehetnek. Trezilkloridon alapuló eljárásban ugyan nincs elérhető kapcsolócsoport, de ezen eljárást nehezen lehet alkalmazni terápiás termékek előállítására, mivel a trezilklorid alkalmazásával toxikus melléktermékek képződhetnek [Francis és mtsai., Stability of protein pharmaceuticals: in vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization, szerk.: Ahern és Manning, kiad.: Plenum, New York (1991); Delgado és mtsai., „Coupling of PEG to protein by activation with tresyl chloride, applications in immunoaffinity cell preparation”, Separations using aqueous phase systems, applications in cell biology and biotechnology, 211-213, szerk.: Fisher és mtsai., kiad.: Plenum Press,

25 New York (1989)].

30 Rose és munkatársai karbohidrazid linker csoportot kapcsoltak szelektíven egy adott fehérjeszubsztrátum (inzulin) C-terminális karboxilcsoportjához [Rose és mtsai., Bioconjugate Chem. 2, 154-159 (1991)].

A WO 93/00109 sz. nemzetközi közzétételi irat eljárást ismertet emlőseredetű vagy madáreredetű GH-ra érzékeny szövet serkentésére, amely eljárásban folyamatos, hatékony GH koncentrációt tartottak fenn a plazmában 3 vagy ennél több napon át. A plazmában ilyen koncentrációt például úgy lehet elérni, hogy makromolekuláris anyaghoz, például PEG-hez (poli(etilén)glikol) kapcsolt GH-t alkalmazunk. A makromolekuláris anyaghoz történő kapcsolásról kijelentik, hogy megnövekedett fél-életidőt eredményez. MPEG aldehyd-5000 és mPEG N-hidroxiszukcimid-észter (mPEG-NHS-5000) alkalmazásával PEG-gezett emberi növekedési hormont ismertetnek a WO 93/00109 sz. nemzetközi közzétételi iratban. Az mPEG-NHS alkalmazása többszörösen PEG-ezett hGH formák heterogén keverékét eredményezte. A WO 93/00109 sz. nemzetközi közzétételi iratban ismertetik az mPEG-maleimid alkalmazását is cisztein-hGH változatok PEG-ezésére.

A WO 99/03887 sz. nemzetközi közzétételi irat PEG-ezett cisztein-hGH változatot (BT-005) ismertet. E konjugátumról azt állítják, hogy növekedési hormonra hiányos patkányokban a hGH-nál hatékonyabban serkenti a tömegnövekedést és hosszabb a fél-életideje is.

PEG-ezett emberi növekedési hormont írt le Clark és munkatársai [Clark és mtsai., J. Biol. Chem. 271, 21969-21977 (1996)], amelynek előállítására karboximetált PEG szukcimidil-észterét alkalmazták. A Clark és munkatársai által ismertetett hGH-származék méretét az elsődleges aminosavakhoz konjugált mPEG-NHS-5000-rel növelték. A PEG-gel történő módosítás növekvő szintjei csökkentették a hGH affinitását a hGH-receptorhoz és sejteken alapuló vizsgálatban legalább 1500-szorosra növelték a hGH EC₅₀-értékét. Olson és munkatársai [Olson és mtsai., Polymer Reprints 38, 568-569 (1997)] ismertetik az N-hidroxiszukcinimid (NHS)PEG és a szukszinimidil-propionát (SPA)PEG alkalmazását többszörösen PEG-ezett hGH-származékok előállítására.

A WO 94/20069 sz. nemzetközi közzétételi irat olyan PEG-ezett hGH-t ismertet, amely tüdön át történő bevitelre szolgáló készítmény egyik komponense.

Az US 4.179.337 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat olyan, enzimek és hormonok PEG-ezésére szolgáló eljárást ismertet, amellyel fiziológiailag aktív, nem immunogén, vízdékes polipeptid-konjugátumokat lehet előállítani. A PEG-ezhető hormonok között megemlíti a GH-t is.

Az EP 458064 A2 sz. európai közzétételi irat szomatotropinba bevitt vagy abban természetes körülmények között megtalálható ciszteinek PEG-ezését ismerteti. Az EP 458064 A2 sz. európai közzétételi iratban megemlíti továbbá azt is, hogy két ciszteint építettek be a vad típusú, borjúeredetű szomatotropin 102-112. aminosavai által alkotott ω-

huroknak elnevezett hurokba, előnyösebben az EP 458064 A2 sz. európai közzétételi irat ismerteti a borjúeredetű szomatotropin 102. (szerinről ciszteinre történő) és 112. aminosavának (tirozinról ciszteinre történő) szubsztitúcióját.

5 A WO 95/11987 sz. nemzetközi közzétételi irat PEG kapcsolását javasolja a kiindulási molekulában jelenlévő vagy abba, irányított mutagenézissel bevitt cisztein tiolcsoportjához. A WO 95/11987 sz. nemzetközi közzétételi irat tárgyát képezi a nexin-1 proteáz PEG-ezése, bár emellett általában javasolják a hGH és más fehérjék PEG-ezését is.

10 A WO 99/03887 sz. nemzetközi közzétételi irat ismerteti, például, olyan növekedési hormont, amelyet szerin aminosavakra további cisztein beillesztésével és a bevitt ciszteinekhez PEG kapcsolásával módosítottak.

WO 00/42175 sz. nemzetközi közzétételi irat tárgya PEG kapcsolására szolgáló, szabad ciszteineket tartalmazó fehérjék előállítására szolgáló eljárások képezik. A WO 00/42175 sz. nemzetközi közzétételi irat az alábbi hGH-mutációkat ismerteti: T3C, S144C és T148C és azok ciszteinen keresztül PEG-ezett változatai.

15 A WO 97/11178 sz. nemzetközi közzétételi irat (emellett az US 5.849.535 sz., US 6.004.931 sz. és US 6.022.711 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok) tárgya GH-változatok alkalmazása hGH agonistákként vagy antagonistákként. A WO 97/11178 sz. nemzetközi közzétételi irat ismerteti még a hGH PEG-ezését, ideértve a lizin PEG-ezését és a lizin bevételét vagy helyettesítését (például, K168A és K172R). A WO
20 97/11178 sz. nemzetközi közzétételi irat ismerteti a G120K szubsztitúciót is.

A PEG-ezett hGH-val kapcsolatos korábbi közlemények szerint, a hGH PEG-ezésekor több PEG kapcsolása szükséges, melynek eredményeként kapott termék nem kívánatos heterogenitású ahhoz, hogy a vesén át történő kiszűrődés 70 K molekulatömeghatárát [Knauf és mtsai., J. Biol. Chem. 263, 15064-15070 (1988)] meghaladó térfogatú
25 legyen.

Hosszabb keringési fél-életidejű GH-molekula csökkentené a szükséges beadások számát, optimálisabb terápiás hGH-szinteket és emellett fokozott terápiás hatást biztosítana.

30 A találmány tárgyát csökkent heterogenitású, alacsonyabb kiürülési rátájú, a plazmában való megmaradásra vonatkozóan megnövekedett időtartamú, javult oldékonyságú, fokozott stabilitású, csökkent antigenitású vagy ilyen hatások kombinációit mutató, kémiaiilag módosított hGH-konjugátumok képezik.

A bejelentésben a 60/331.907 sz., 2001. november 20-án benyújtott, előzetes USA-beli szabadalmi bejelentés elsőbbségét igényeljük, amely teljes egészében a kitanítás részét képezi.

Az alábbiakban összefoglaljuk a találmány szerinti megoldást.

5 A találmány tárgyát - minden korlátozás nélkül - az alábbi javított kémiai vagy fiziológiai tulajdonságok közül legalább egyet mutató, kémiaileg módosított hGH és annak agonista változatai képezik: alacsonyabb kiürülési ráta, megnövekedett idejű jelenlét a plazmában, javult oldékonyság, és csökkent antigenitás. Így – ahogyan az alábbiakban részletebben leírjuk – a találmány számos szempontja kapcsolatos a hGH és annak
10 agonista változatai kémiai módosításával és különféle, poli(etilén-glikol)-csoportok alkalmazásával végzett specifikus módosításaival.

A találmány tárgyát a kémiaileg módosított hGH és annak agonista változatai előállítására szolgáló eljárások is képezik.

15 A találmány tárgyát a kémiaileg módosított hGH-t és annak agonista változatait tartalmazó készítmények is képezik.

A találmány szerinti módosított hGH és annak agonista változatai - minden korlátozás nélkül - alkalmazhatók az alábbiak kezelésére: törpeség (GHD), felnőttkori GHD, Turner-féle szindróma, a terhességi korhoz képest kisebbre született gyermekek (SGA) növekedési hiányosságának hosszú időtartamú kezelésére, Prader-Willi féle szindrómás
20 (PWS) páciensek kezelésére, krónikus veseelégtelenség (CRI), AIDS-al kapcsolatos sorvadás, öregedés, végstádiumú vesebaj, és cisztikus fibrózis.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a találmányhoz tartozó ábrákat.

1. ábra: hGH és 20 K PEG-ALD reakciójakor keletkezett termékek redukáló és nem redukáló SDS-PAGE-vel és a tisztított 20 K PEG-ALD hGH anioncserélő kromatográfiával végzett analízise. 1. sáv: MW fehérjestandardok; 2. sáv: redukált hGH (10 µg); 3. sáv: redukált, 20 K lineáris PEG-ALD – hGH reakciókeverék (10 µg); 4. sáv: redukált, anioncserével tisztított, 20 K lineáris PEG-ALD – hGH (10 µg); 5. sáv: üres; 6. sáv: nem redukált hGH (10 µg); 7. sáv: nem redukált, 20 K lineáris PEG-ALD – hGH reakciókeverék (10 µg); 8. sáv: nem redukált, anioncserével tisztított, 20 K lineáris PEG-ALD – hGH
25 (10 µg); 9. sáv: üres; 10. sáv: MW fehérjestandardok.

2. ábra: Különbféle, anioncserével tisztított, PEG-ezett hGH-molekulák nem redukáló SDS-PAGE-vel végzett analízise. 1. sáv: MW fehérjestandardok; 2. sáv: hGH (10 µg); 3. sáv: 4-6 x 5 K PEG-SPA – hGH (10 µg); 4. sáv: 20 K lineáris PEG-ALD – hGH

(10 µg); 5. sáv: 20 K elágazó PEG-ALD – hGH (10 µg); 6. sáv: 40 K elágazó PEG – hGH (10 µg).

3. ábra: Tripszinnel emésztett hGH, 40 K elágazó PEG-ALD – hGH és 40 K elágazó PEG-NHS – hGH, RP-HPLC-en kapott elúciós profiljai. A PEG-et elsősorban a hGH N-terminálisához kapcsoltuk (ahogyan a 40 K elágazó ALD – hGH-nál mutattuk), és ennek eredményeként az N-terminális (T1) fragmentumnak megfelelő csúcs magassága lecsökkent, ezzel párhuzamosan egy új, PEG-ezett T1 csúcs keletkezett.

4. ábra: Naponta beadott, nem PEG-ezett hGH (0,3 mg/kg/nap) *in vivo* bioaktivitásának összehasonlítása a szubkután (s.c.), hatnaponta egyszer beadott, egyszeresen PEG-ezett hGH (1,8 mg/kg) *in vivo* bioaktivitásával, amely illusztrálja, hogy az agyalapimirigy-irtott patkányok tömege növekedett a 11 napos vizsgálat során.

5. ábra: Naponta s.c. beadott, nem PEG-ezett hGH (0,3 mg/kg/nap) *in vivo* bioaktivitásának összehasonlítása a szubkután (s.c.), hatnaponta egyszer beadott, 4-5 x 5 K PEG-SPA-hGH, egyszeresen PEG-ezett 20 K elágazó PEG-ALD-hGH, és egyszeresen PEG-ezett 40 K elágazó PEG-ALD-hGH bioaktivitásával, amely illusztrálja, hogy az agyalapimirigy-irtott patkányok tömege növekedett a 11 napos vizsgálat során.

6. ábra: Naponta s.c. beadott, nem PEG-ezett hGH (0,3 mg/kg/nap) *in vivo* bioaktivitásának összehasonlítása a szubkután (s.c.), hatnaponta egyszer beadott, 4-5 x 5 K PEG-CMHBA-hGH, egyszeresen PEG-ezett 20 K lineáris ALD, egyszeresen PEG-ezett 30 K lineáris ALD, egyszeresen PEG-ezett 20 K elágazó PEG-ALD-hGH, és egyszeresen PEG-ezett 40 K elágazó PEG-ALD-hGH bioaktivitásával, amely illusztrálja, hogy agyalapimirigy-irtott patkányok combcsontja növekedett a 11 napos vizsgálat során.

7. ábra: Egyetlen dózisban s.c. beadott, nem PEG-ezett hGH (1,8 mg/kg), egyszeresen PEG-ezett 5 K lineáris PEG-ALD-hGH, egyszeresen PEG-ezett 20 K elágazó PEG-ALD-hGH, egyszeresen PEG-ezett 20 K elágazó PEG-ALD-hGH, egyszeresen PEG-ezett 20 K elágazó PEG-hidrazid-hGH, egyszeresen PEG-ezett 30 K lineáris PEG-ALD-hGH, 4-6 x 5 K PEG-SPA-hGH, és 4-5 x 5 K PEG-CMHBA-hGH *in vivo* bioaktivitásának összehasonlítása, amely illusztrálja, hogy agyalapimirigy-irtott patkányokban a plazma IGF-1 szintjei növekedtek a 9 napos vizsgálat során.

Az alábbiakban részletesen leírjuk a találmány szerinti megoldást.

A hGH és annak agonista változatai az US 4.658.021 sz. és US 5.633.352 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban leírt rekombináns fehérjék családjába tartoznak. Ezek rekombináns úton történő előállítását és alkalmazási módjukat részletesen az US

4.342.832 sz., US 4.601.980 sz., US 4.898.830 sz. és US 5.759.745 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok ismertetik.

Bármilyen, gazdasejt – például rekombináns genetikai eljárások alkalmazásával transzformált vagy transzfektált *E. coli* és állati sejtek - által előállított, tisztított és izolált hGH vagy annak agonista változata alkalmazható a találmány szerinti megoldásban. To-
 5 vábbi hGH változatokat ismertet az US 07/715.300 sz. amerikai egyesült államokbeli sza-
 badalmi irat (1991. június 14.), US 07/743.614 sz. amerikai egyesült államokbeli szaba-
 dalmi irat (1991. augusztus 9.) és WO 92/09690 sz. nemzetközi közzétételi irat
 (1992.június 11.). Ezek közül különösen előnyös a transzformált *E. coli* által termelt hGH
 10 vagy annak agonista változata. Ilyen hGH vagy annak agonista változata nagy mennyisé-
 gekben előállítható igen tisztán és homogénen. Például, a fenti hGH vagy annak agonista
 változata előállítható az US 4.342. 832 sz., US 4.601.980 sz., US 4.898.830 sz. US
 5.424.199 és US 5.795.745 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban ismer-
 tetett eljárással. A leírás szerinti értelemben, az „aminosav-szekvenciája lényegében az
 15 alábbi” kifejezés azt jelenti, hogy a fenti aminosav-szekvencia tartalmazhat egy vagy több
 változtatást (delécio, addíció, inzercio vagy helyettesítés) az aminosavak között, ha a hGH
 vagy annak agonista változatával összehasonlítva, a működésbeli hasonlóság tekintetében a
 változás nem okoz bármilyen előnytelen különbséget. Előnyösebb, ha olyan hGH-t vagy
 annak agonista változatát alkalmazunk, amelynek aminosav-szekvenciája legalább egy
 20 további lizint, aszparaginsavat, glutaminsavat, páratlan ciszteint, illetve szabad N-
 terminális ω -aminocsoportot vagy szabad C-terminális karboxilcsoportot tartalmaz.

A találmány szerint, poli(etilén-glikol)-t kötöttünk hGH-hoz vagy annak agonista
 változatához, az azt alkotó bizonyos aminosavakon át történő kovalens kapcsolással. A
 szakember által ismert, különböző funkciós csoportokat, linkereket tartalmazó, vagy kü-
 25 lönböző konfigurációjú és molekulatömegű aktivált poli(etilén-glikol)-ok alkalmazhatók a
 PEG-hGH konjugátumok vagy PEG-hGH agonista változatok előállítására [lásd például,
 Roberts és mtsai., Adv. Drug Del. Rev. 54, 459-476 (2002); Harris és mtsai., Drug Deliv.
 Syst. 40, 538-551 (2001)]. Az aminosav lehet bármilyen, például, szabad amino-, karboxil-
 , szulfhidril- (tiol-), hidroxil-, guanidil-, vagy imidazolil-csoportot tartalmazó reaktív ami-
 30 nosav, amelyhez aktivált poli(etilén-glikol) terminális reaktív csoportja kapcsolható. A sza-
 bad aminocsoportot tartalmazó aminosavak közé tartozhat lizin és/vagy N-terminális ami-
 nosav, szabad karboxilcsoportot tartalmazó aminosav, például aszparaginsav, glutaminsav,
 és/vagy szabad szulfhidril-csoportot (tiolt) tartalmazó aminosavak – például szerin vagy

tirozin -, szabad guanidinilcsoportot tartalmazó aminosav – például arginin -, és szabad imidizoil-csoportot tartalmazó aminosav – például hisztidin.

A találmány egy másik megvalósítási módjában, oxim-kémiai módszereket [Lemieux és Bertozzi, TIB Tech. 16, 506-513 (1998)] alkalmazunk N-terminális szerin aminosavak célbavételére.

A találmányban alkalmazott poli(etilén-glikol) nem korlátozódik egyetlen konkrét formára vagy molekulatömeg-tartományra. A poli(etilén-glikol) molekulatömege 500-tól 100.000-ig terjedhet. Normális esetben, 500-60.000, előnyösen 1.000-40.000 molekulatömegűt alkalmazunk. Előnyösebb, ha a molekulatömeg nagyobb, mint 5.000-tól körülbelül 40.000-ig terjed.

A találmány egy másik megvalósítási módjában, a poli(etilén-glikol) elágazó PEG, amelyhez egynél több PEG-csoport kapcsolódik. Elágazó PEG-eket előnyösen az alábbi dokumentációk hoznak fel példaként: US 5.932.462 sz., US 5.342.940 sz., US 5.643.575 sz., US 5.919.455 sz., US 6.113.906 sz., és US 5.183.660 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok; WO 02/09766 sz. nemzetközi közzétételi irat; Kodera, Bioconj. Chem. 5, 283-288 (1994); és Yamasaki és mtsai., Agric. Biol. Chem. 52, 2125-2127 (1998). A találmány előnyös megvalósítási módjában, az elágazó PEG-et alkotó egyes poli(etilén-glikol)-ok molekulatömege 5.000-20.000.

Poli(alkilén-oxid)-okat, nevezetesen poli(etilén-glikol)-okat, terminális reaktív csoporton keresztül kötünk a hGH-hoz vagy annak agonista változatához. A terminális reaktív csoport a PEG és a fehérje között hagyhat vagy nem hagyhat kapcsolócsoportot (*spacer*-t). A találmány szerinti hGH-konjugátum vagy annak agonista változata kialakítása céljából, polimereket, mint például poli(alkilén-oxid)-ot, aktivált formává alakítjuk (az aktivált forma kifejezést a szakember ismeri). A reaktív csoport, például, lehet a fehérje kémiai csoportjai, mint például amino-, karboxil- vagy tiolcsoportok, és a poli(etilén-glikol) közötti kötést közvetítő terminális reaktív csoport. Jellemző, hogy a terminális polimer hidroxil végcsoportjainak egyikét vagy mindkettőt (azaz az α és ω terminális hidroxilcsoportok), a kovalens konjugációt lehetővé tévő, reaktív funkciós csoportokká alakítjuk. E folyamatot gyakran nevezik „aktiválásnak” és a reaktív csoportot hordozó poli(etilén-glikol)-t - a továbbiakban – „aktivált poli(etilén-glikol)”-nak nevezzük. Az α és ϵ kötőcsoportot egyaránt tartalmazó polimereket „bisz-aktivált poli(alkilén-oxid)”-oknak nevezzük és „bifunkcionális”-nak tekintjük. Az α és ϵ terminális hidroxilcsoportjain ugyanolyan reaktív csoportot tartalmazó polimereket néha „homobifunkcionális”-nak vagy „homobisz-aktivált”-nak nevez-

zük. Az α és ϵ terminális hidroxilcsoportjain eltérő reaktív csoportot tartalmazó polimereket néha „heterobifunkcionális”-nak [lásd például, WO 01/26692 sz. nemzetközi közzétételi irat] vagy „heterobisz-aktivált”-nak nevezzük. Az egyetlen reaktív csoportot tartalmazó polimereket „mono-aktivált” poli(alkilénoxid)-oknak vagy „mono-funkcionális”-nak nevezzük. Más, lényegében nem antigénikus polimereket hasonlóképpen lehet „aktiválni” vagy „funkcionalizálni”.

Az aktivált polimerek így alkalmasak a fehérjén lévő kémiai csoportok - α - és ϵ -amino-, karboxil- vagy tiolcsoportok - és poli(etilén-glikol) között kapcsolódást közvetíteni. A találmány egyik megvalósítási módjában, bisz-aktivált polimereket akár két fehérjével vagy egy fehérjemolekulával és egy adott reaktív kismolekulával is reagáltathatunk fehérjepolimerek vagy fehérje-kismolekula konjugátumok keresztkötések útján történő hatékony kialakítása céljából.

A hGH vagy annak agonista változata lizinjeinek aminoterminális α -aminocsoportjával vagy ϵ -aminocsoportjával reagálni képes funkciós csoportok az alábbiak: N-hidroxiszukcinimidil-észterek, karbonátok – például, a p-nitrofenil, vagy szukcinimidil [US 5.808.096 sz., US 5.612.460 sz., US 5.324.844 sz. és US 5.122.614 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok] -, karbonil-imidazol, azlaktonok [US 5.321.095 sz. és US 5.567.422 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok], ciklikus imidtionok [US 5.405.877 sz. és US 5.349.001 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok], izocianátok vagy izotiocianátok [Greenwald, J. Org. Chem. 60, 331-336 (1995)], trezil-klorid [EP 714 402 sz. és EP 439 508 sz. európai közzétételi iratok], halogénformiátok [WO 96/40792 sz. nemzetközi közzétételi irat], és aldehidek.

A hGH-n vagy annak agonista változatán lévő karbonsav-csoportokkal, reaktív karbonilcsoportokkal és oxidált szénhidrát-csoportokkal reagálni képes funkciós csoportok közé az alábbiak tartoznak: primer aminok, és hidrazin és hidrazid funkciós csoportok – mint például, az acilhidrazidok, karbazátok, szemikarbamátok, tiokarbamátok, stb. [WO 01/70685 sz. nemzetközi közzétételi irat].

Merkaptocsoportok – ha jelen vannak a hGH-n vagy annak agonista változatán – szintén alkalmazhatók kötőhelyként például az alábbi reaktív csoportokat tartalmazó, megfelelően aktivált polimerek számára: tiolok, maleimidek, szulfonok, és fenilglioxálok [például, US 5.093.531 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat, amely publikáció a kitanítás részét képezi]. Elektrofil központtal reagálni képes, más nukleofilek közé - min-

den korlátozás nélkül – tartozik, például, a hidroxil, amino, karboxil, tiol, aktív metilén és hasonló.

Ide tartoznak még az US 5.359.030 sz., US 5.681.811 sz., és US 5.438.040 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban ismertetett, lipofil és hidrofil csoportokat hordozó polimerek mellett, a WO 98/32466 sz. nemzetközi közzétételi iratban leírt halogénezett PEG-ek, amelyek amino-, tiol- és aromás hidroxicsoporthoz reagálva képesek a PEG-et kovalensen a fehérjéhez kapcsolni.

A találmány egyik előnyös megvalósítási módjában, szekunder amin- vagy amidkötéseket létesítünk a hGH vagy annak agonista változata lizinjeinek aminoterminális α -aminocsoportja vagy ϵ -aminocsoportja és aktivált PEG között. A találmány egy másik előnyös szempontja szerint, a hGH vagy annak agonista változata lizinjeinek aminoterminális α -aminocsoportja vagy ϵ -aminocsoportja és egyetlen vagy elágazó PEG-aldehid között – megfelelő redukáló ágens, például, NaCNBH_3 , NaBH_3 , piridin, borán, stb. alkalmazásával – szekunder aminkötést létesítünk [Chamow és mtsai, Bioconjug. Chem. 5, 133-140 (1994); US 5.824.784 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat].

A találmány előnyös megvalósítási módjában a poli(etilén-glikol) legalább 70%-a, előnyösebben legalább 80%-a, előnyösebben legalább 81%-a, előnyösebben legalább 82%-a, előnyösebben legalább 83%-a, előnyösebben legalább 84%-a, előnyösebben legalább 85%-a, előnyösebben legalább 86%-a, előnyösebben legalább 87%-a, előnyösebben legalább 88%-a, előnyösebben legalább 89%-a, előnyösebben legalább 90%-a, előnyösebben legalább 91%-a, előnyösebben legalább 92%-a, előnyösebben legalább 93%-a, előnyösebben legalább 94%-a, előnyösebben legalább 95%-a, előnyösebben legalább 96%-a, előnyösebben legalább 97%-a, és legelőnyösebben legalább 98%-a az aminoterminális α -aminocsoporton van.

A találmány egy másik előnyös megvalósítási módjában, amidot kialakító linkerrel – például, szukcinimidil-észterekkel, ciklikus imidtionokkal vagy hasonlókkal – aktivált polimert alkalmazunk a hGH vagy annak agonista változata és a polimer közötti kötés befolyásolására [lásd például: US 5.349.001 sz., US 5.405.877 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; Greenwald és mtsai., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 17, 101-161 (2000), amely publikáció a kitanítás részét képezi]. A hGH vagy annak agonista változata szabad aminocsoportjaihoz köthető, előnyös, aktivált poli(etilén-glikol) lehet egyszeres vagy elágazó láncú N-hidroxiszukcinilimid poli(etilén-glikol)-hoz a poli(etilén-glikol) szukcinilsav-észtereinek N-hidroxiszukcinilimiddel végzett aktiválásával juthatunk.

A találmány egy másik előnyös megvalósítási módjában, egyéb aktivált polimert alkalmazunk a polimer és a hGH vagy annak agonista változata ϵ -amino- vagy más csoportja közötti kovalens kötés létesítéséhez. Például terminálisan aktivált polimerek izocianát vagy izotiocianát formáit alkalmazhatjuk a lizin aminocsoportjával létesített, ureán vagy tioureán alapuló kötések kialakítására [Greenwald, J. Org. Chem. 60, 331-336 (1995)].

A találmány egy másik előnyös szempontja szerint, karbamát (uretán) kötések alakítunk ki a fehérjék aminocsoportjával a kitanítás részét képező US 5.122.614 sz., US 5.324.844 sz. és US 5.612.640 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban ismertetettek szerint (például, N-szukcinimidil-karbonáttal, p-nitrofenil-karbonáttal és karbonilimidazollal aktivált polimerek). A találmány másik előnyös megvalósítási módjában, benzotriazol-karbonát PEG-származékot kapcsolunk a hGH vagy annak agonista változata aminocsoportjaihoz.

A találmány egy másik szempontja szerint, a találmány tárgyát a hGH vagy annak agonista változata prodrog- vagy késleltetett felszabadulású formája képezi, amelyben vízben oldható polimert, például poli(etilén-glikol)-t, kapcsolunk hGH-molekulához vagy annak agonista változatához olyan funkcionális linkeren keresztül, amely enzimatis vagy pH-val irányított hidrolízissel előre meghatározható módon történő lebomlásával szabad hGH vagy annak agonista változata, vagy más hGH vagy annak agonista változatának származéka szabadul fel. A prodrog lehet „dupla prodrog” [Bundgaard, Adv. Drug Deliv. Rev. 3, 39-65 (1989)] is, amely a kaszkád-késleltetés alkalmazásán alapul. Az ilyen rendszerekben, a hidrolízis reakcióban kezdeti sebesség-meghatározó (lassú) enzimatis vagy pH-val irányított lépés szerepel, majd az ezt követő második lépésben a gyors, nem enzimatis hidrolízis csak akkor megy végbe, ha az első lépés már megtörtént. Ilyen felszabadítható polimerrel olyan fehérje konjugátumot állíthatunk elő, amely nem állandó és amelyből hGH vagy annak agonista változata folyamatosan felszabadul. Ilyen funkcionális linkerek az irodalomban ismertek [US 5.614.549 sz., US 5.840.900 sz., US 5.880.131 sz., US 5.965.119 sz., US 5.965.565 sz., US 6.011.042 sz., US 6.153.655 sz., US 6.180.095 B1 sz., és US 6.413.507 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok; Greenwald és mtsai., J. Med. Chem. 42, 3657-3667 (1999); Lee, S. és mtsai., Bioconjugate Chem. 12, 163-169 (2001); Garman és mtsai., FEBS Lett. 223, 361-365 (1987); Woghiren és mtsai., Bioconjugate Chem. 4, 314-318 (1993); Roberts és mtsai., J. Pharm. Sci. 87, 1440-1445 (1998); Zhao, Ninth Int. Symp. Recent Adv. Drug Delivery Syst. 199; Greenwald és mtsai., J. Med. Chem. 43, 475-487 (2000); Greenwald, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.

17, 101-161 (2000); Zalipsky és mtsai., 28th Int. Symp. On Controlled Release of Bioactive Materials 1, 73-74 (2001)].

A konjugációs reakciók – a továbbiakban PEG-ezési reakciók – oldatban történnek a polimer moláris feleslegében és függetlenül attól, hogy a polimer hová fog kapcsolódni a fehérjében. Ilyen, általános eljárásokra – azonban – jellemző volt, hogy a megfelelő bioaktivitás megtartása szempontjából nem bizonyultak megfelelőnek bioaktív fehérjék nem antigénikus polimerekhez való konjugálásához. A hGH vagy annak agonista változata bioaktivitása megtartásának egyik módja az, ha a polimerkapcsolási folyamatban nagyrészt elkerüljük azt, hogy a receptor kötőhelyével (-helyeivel) kapcsolatos reaktív csoportok a konjugációban részt vegyenek. A találmány egy másik szempontja szerint, a találmány tárgya eljárás poli(etilén-glikol) hGH-val vagy annak agonista változatával történő konjugáltatására, a bioaktivitás magas szintű megtartása mellett.

A kovalens kötéssel történő kémiai módosításokat bármely, biológiailag aktív anyagnak az aktivált poli(etilén-glikol)-al történő reakciójára általában alkalmas körülmény mellett végezhetünk. A hGH vagy annak agonista változata inaktiválásának elkerülése végett, a konjugációs reakciót viszonylag enyhe körülmények között végezzük. Az enyhe körülmények a reakcióoldat pH-jának 3-10 között, a reakció hőmérsékletének pedig a 0-37°C között tartását jelentik. Olyan esetekben, ahol a hGH vagy annak agonista változatában található reaktív aminosavak szabad aminocsoportokat hordoznak, előnyös, ha a fenti módosításokat alkalmas pufferben (pH 3-10), így - minden korlátozás nélkül – foszfát, MES, citrát, acetát, szukcinát vagy HEPES pufferben, 1-48 órán át, 4-37°C között végezzük. Ha N-terminális aminocsoportokat veszünk célba olyan reagensekkel, mint amilyenek a PEG-aldehidek, előnyös, ha a pH-t 4-8 közötti értéken tartjuk. Az aktivált poli(etilén-glikol)-t a hGH-ban vagy annak agonista változatában lévő szabad aminocsoportok számának moláris mennyiségét 0,05-100-szor, előnyösen körülbelül 0,01-2,5-szor meghaladó mennyiségben alkalmazhatjuk. Másfelől, ha a hGH-ban vagy annak agonista változatában lévő reaktív aminosavak szabad karboxilcsoportokat tartalmaznak, a fenti módosításokat, például, 3,5-5,5 közötti pH-nál végezzük, a poli(oxietiléndiamin)-nal végzett módosítást karbodiimid jelenlétében (pH 3,5-5), 1-24 órán át, 4-37°C között végezzük. Az aktivált poli(etilén-glikol)-t a hGH-ban vagy annak agonista változatában lévő szabad karboxilcsoportok számának moláris mennyiségét 0,05-300-szor meghaladó mennyiségben alkalmazhatjuk.

A találmány különálló megvalósítási módjában, a konjugációs reakciókhoz adott polimer mennyiségének felső határa a körülbelül 1:1 értéket meghaladva olyan mennyiség lehet, amelynél az aktivált polimer és a hGH vagy annak agonista változata lényeges mennyiségű magas molekulatömegű (azaz a konjugátumok több mint körülbelül 20%-a tartalmaz hGH-t vagy annak agonista változatát alkotó molekulánként egy polimerszálnál többet) kialakulása nélkül képes reakcióba lépni. Például, a találmány e szempontja szerint, úgy véljük, hogy egészen 6:1 arány alkalmazható a kívánt konjugátumok jelentős mennyiségekben történő előállításához, és e konjugátumokat ezután elkülöníthetjük a magas molekulatömegű konjugátumoktól.

A találmány egy másik szempontja szerint, bifunkcionálisan aktivált PEG-származékokat alkalmazhatunk polimer hGH vagy annak agonista változata molekulájának előállítására, amely molekulában több hGH-t vagy annak agonista változatát PEG segítségével keresztkötjük. Bár az itt leírt reakciókörülmények jelentős mennyiségű hGH-t vagy annak agonista változatát eredményezhetik, a nem módosított hGH vagy annak agonista változata könnyen visszavezethető a további konjugációs reakciók előállításának kiindulási pontjába. A találmány szerinti eljárások meglepően kevés mennyiségű – azaz kevesebb, mint körülbelül 30% és még előnyösebben kevesebb, mint 10% - nagy molekulatömegű molekulákat és hGH-t vagy annak agonista változatát alkotó molekulánként egynél több polimerszálat tartalmazó molekulákat generálnak. E reakciókörülmények szöges ellentétben állnak azokkal, amelyeket a polimerek konjugációs reakcióiban jellemzően alkalmaznak (ahol az aktivált polimer a célmolekulához képest többszörös moláris feleslegben van jelen). A találmány egy másik szempontja szerint, a polimer aminocsoportonként 0,1 ekvivalenstől a hGH vagy annak agonista változata mennyiségére nézve körülbelül 50 ekvivalens mennyiségig van jelen. A találmány egy másik szempontja szerint, a polimer, a hGH vagy annak agonista változata ekvivalens mennyiségére vonatkozóan, körülbelül 1-10 ekvivalens mennyiségben van jelen.

A találmány szerinti konjugációs reakciók kiindulásként olyan reakciókeveréket szolgáltatnak, amely mono- és di-PEG-hGH konjugátumokat, el nem reagált hGH-t, el nem reagált polimert, és általában kevesebb, mint 20% nagy molekulatömegű konjugátumokat tartalmaz. A nagy molekulatömegű konjugátumok egynél több polimerszálat és/vagy a hGH vagy annak agonista PEG-gel polimerizált származékait tartalmazzák. Miután a nem reagált molekulákat és a nagy molekulatömegű konjugátumokat eltávolítottuk, a hGH-val vagy annak agonista változatával képzett, főként mono- és di-polimert tartalmazó konjugátumokat kinyerjük. Mivel tény, hogy a konjugátumok legnagyobb része egyetlen

polimerszálat tartalmaz, így a konjugátumok lényegében homogének. E módosított hGH vagy annak agonista változata a natív vagy nem módosított hGH vagy annak agonista változata *in vitro* biológiai aktivitásának - standard FDC-1 sejtproliferációs vizsgálattal [Clark és mtsai., J. Biol. Chem. 271, 21969-21977 (1996)], vagy agyalapimirigy –irtott patkányok növekedésével mérve [Clark és mtsai., J. Biol. Chem. 271, 21969-21977 (1996)] - legalább 0,1%-át mutatja. A találmány előnyös szempontjai szerint azonban, a módosított hGH vagy annak agonista változata a natív vagy nem módosított hGH vagy annak agonista változata *in vitro* biológiai aktivitásának körülbelül 25%-át, előnyösebben körülbelül 50%-át, még előnyösebben körülbelül 75%-át mutatja, és legelőnyösebb, ha a módosított hGH vagy annak agonista változata *in vitro* biológiai aktivitása megegyezik a natív vagy nem módosított hGH vagy annak agonista változata *in vitro* biológiai aktivitásával, vagy azt felülmúlja.

A találmány szerinti eljárásban előnyös, ha a polimer hGH-hoz vagy annak agonista változatához vonatkoztatott arányai eléggé korlátozottak. Így, a hGH-val vagy annak agonista változatával alkotott konjugátumok főként csak egyetlen polimerszálat tartalmaznak. Továbbá, a polimer kapcsolódása a hGH-hoz vagy annak agonista változatához kevésbé véletlenszerű, mintha nagyobb moláris feleslegben alkalmaznánk a polimer linkert. A konjugációs reakciót követően a reakciókeverékben jelen lévő nem módosított hGH vagy annak agonista változata ioncsere vagy méretkizárásos kromatográfia vagy hasonló elválasztási eljárások alkalmazásával elkülöníthető és későbbi reakciókba visszaforgatható.

Poli(etilén-glikol)-al módosított hGH vagy annak agonista változata – nevezetesen a találmány szerinti kémiaiilag módosított fehérje – a reakciókeverékből a fehérjék tisztítására alkalmazott hagyományos eljárásokkal, így dialízissel, kisózással, ultraszűréssel, ioncserélő kromatográfiával, hidrofób kölcsönhatásos kromatográfiával (HIC), gélkromatográfiával és elektroforézissel, tisztítható. Az ioncserélő kromatográfia különösen hatékony az el nem reagált poli(etilén-glikol) és a hGH vagy annak agonista változata eltávolítására. A találmány további megvalósítási módjában, a hGH-nak vagy annak agonista változatának mono- és dipolimer-konjugátumát, a nagy molekulatömegű konjugátumok és a nem módosított hGH-nak vagy annak agonista változatának eltávolítása végett, izoláljuk a reakciókeverékből. Az elválasztást befolyásolja, ha a konjugátumkeverékből milliliterenként 0,5-10 mg hGH-nak vagy annak agonista változatának mono- és dipolimer-konjugátumát tartalmazó, puffereelt oldatot készítünk. Az alkalmas oldatok pH-ja 4-8 körüli. Előnyös, ha az oldatok az alábbi pufferek közül egyet vagy többet tartalmaznak: KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄, CH₃CO₂H és NaOH.

A reakciókeverékben lévő puffertől függően, a hGH-val vagy annak agonista változatával képzett polimerkonjugátumot tartalmazó oldattal először puffercserét/ultraszűrést végezhetünk az el nem reagált polimer eltávolítására. Például, a hGH-val vagy annak agonista változatával képzett polimerkonjugátumot tartalmazó oldatból alacsony molekulatömegű (10.000-30.000 Dalton) kizárási határú membránon végzett ultraszűréssel eltávolíthatjuk a legkevesbé kívánatos anyagokat, például az el nem reagált polimert, felületaktív-anyagokat (már ha jelen vannak), vagy hasonlókat.

Előnyös, ha a konjugátumokat inoncsereelő kromatográfiás közegben frakcionáljuk a kívánt anyagokat tartalmazó frakcióba. Ilyen közeg képes szelektíven felkötni a hGH vagy annak agonista változatának PEG-gel képzett konjugátumait a töltésekben fennálló, és valamennyire előrejelezhető módon változó, különbségek alapján. Például, a hGH-nak vagy annak agonista változatának felszíni töltése meghatározható a fehérje felszínén elérhető töltött csoportok számának meghatározásával. E töltött csoportok a poli(alkilénoxid) polimerek potenciális kötőhelyeül szolgálnak. Ezért, a hGH-val vagy annak agonista változatával képzett konjugátumok más anyagoktól eltérő töltése lehetővé teszik a szelektív izolációt.

Erősen poláros anion- (például, kvaterner amin) vagy kationcsereelő (például szulfopropil) gyantákat alkalmazunk a találmány szerinti eljárásban. Különösen előnyösek az ioncsereelő-gyanták. A találmány szerinti megoldásban alkalmazható, kereskedelmi forgalomban beszerezhető kationcsereelő gyanták közé - minden korlátozás nélkül - az alábbiak tartoznak: SP-hitrap®, SP-Sepharose HP® és SP Sepharose® fast flow. Más alkalmas kationcsereelő gyanták, például S és CM gyanták, is alkalmazhatók. A találmány szerinti megoldásban alkalmazható, kereskedelmi forgalomban beszerezhető anioncsereelő gyanták közé - minden korlátozás nélkül - az alábbiak tartoznak: Q-hitrap®, Q-Sepharose HP® és Q Sepharose® fast flow. Más alkalmas anioncsereelő gyanták, például DEAE gyanták, is alkalmazhatók.

Például, előnyös, ha az anion- vagy kationcsereelő gyantával oszlopot töltünk meg és hagyományos módon ekvilibrálnak. A polimerrel konjugált hGH-t vagy annak agonista változatát tartalmazó oldattal megegyező pH-jú és ozmolalitású puffert alkalmazunk. Előnyös, ha az elúciós puffer az alábbi sókból egyet vagy többet tartalmaz: KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄, és (NH₄)₂CO₃. A konjugátumot tartalmazó oldatot az oszlopra adszorbeáljuk, miközben az el nem reagált polimer és némely nagy molekulatömegű komponens átesik. A felvitelt követően, növekvő sókoncentrációjú elúciós pufferből álló gradienst áramoltatunk át az oszlopon a kívánt, poli(alkilén-

oxid)-dal konjugált hGH-t vagy annak agonista változatát tartalmazó frakció eluálására. Előnyös, ha a kation- vagy anioncserélő lépést követően, az eluált, összeöntött frakciók egységes polimerkonjugátumot tartalmaznak. A nem konjugált hGH vagy annak agonista változata hagyományos eljárásokkal visszamosható az oszlopról. Ha szükséges, a hGH-nak

5 vagy annak agonista változatának egyszeresen vagy többszörösen PEG-ezett változatai a továbbiakban alkalmazott ioncserélő kromatográfiával vagy méretkizárásos kromatográfiával egymástól is elválaszthatók.

Többszörös, növekvő sókoncentrációjú vagy növekvő pH-jú, izokratikus oldatokat hasznosító eljárások is alkalmazhatók. Többszörös, növekvő koncentrációjú, izo-

10 kratikus lépések a hGH-nak vagy annak agonista változatának di- majd mono-polimerkonjugátumai egymás utáni elúcióját eredményezik.

Az elúció során alkalmazott hőmérséklet 4-25°C körüli. Előnyös, ha az elúciót 4-22°C körüli hőmérsékleten végezzük. Például, a hGH-val vagy annak agonista változata PEG-gel képzett konjugátumát tartalmazó frakciót 280 nm-en történő UV abszorbanciával

15 mutatjuk ki. Frakciószedést végezhetünk egyszerű időbeli elúciós profilok követésével.

A hGH vagy annak agonista változata és a poli(etilén-glikol) polimer közötti konjugációs folyamatokban alkalmazhatunk felületaktív anyagokat. Alkalmas felületaktív anyagok közé ionos típusú ágensek – mint például, nátrium-dodecilszulfát (SDS) – tartoznak. Más ionos felületaktív anyagok - mint például, litium-dodecilszulfát, kvaterner

20 ammóniumvegyületek, taurokólsav, kaprilsav, dekánszulfonsav, stb. – is alkalmazhatók. Nem ionos felületaktív anyagok is alkalmazhatók. Például olyan anyagok, mint amilyenek a poli(oxietilén)-szorbitánsok („Tween”-ek), poli(oxietilén)-éterek („Triton”-ok), szintén alkalmazhatók [Neugebauer, A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry, kiad.: Calbiochem Corp. (1992)]. A találmány szerinti eljárásokban al-

25 kalmazható felületaktív anyagok alkalmazását csak az korlátozza, hogy ezeket csak olyan körülmények között és koncentrációban alkalmazzuk, amely nem okozza a hGH vagy annak agonista változata lényeges mértékű, irreverzibilis denaturációját és nem gátolja teljesen a polimerkonjugációt. A reakciókeverékekben a felületaktív anyagok körülbelül 0,01-0,5% mennyiségben, előnyösen körülbelül 0,05-0,5% mennyiségben, és legelőnyösebben

30 körülbelül 0,075-0,25% mennyiségben vannak jelen. A találmány szerinti megoldásban a felületaktív anyagok keverékei is alkalmazhatók.

Úgy véljük, hogy a felületaktív anyagok átmeneti, reverzibilis védelmi rendszert biztosítanak a polimerkonjugációs folyamat során. A felületaktív anyagokról kimutatták, hogy hatékonyan akadályozzák bizonyos polimerek aggregációját, de lehetővé teszik a lizinen vagy N-terminális aminosavon alapuló konjugáció lezajlását.

5 A találmány szerinti, poli(etilén-glikol)-lal módosított hGH vagy annak agonista változata farmakológiai hatása jobban megmarad, ami jelentkezhethet annak megnövekedett *in vivo* fél-életidejében is.

Továbbá, a találmány szerinti, poli(etilén-glikol)-lal módosított hGH vagy annak agonista változata alkalmas lehet az agyalapi mirigy alulműködésére visszavezethető törpe-
10 peség (GHD), felnőttkori növekedési hormon hiánya, Turner-féle szindróma, a terhességi korhoz képest kisebbre született gyermekek (SGA) növekedési hiányosságának hosszú időtartamú kezelésére, Prader-Willi-féle szindrómás (PWS) páciensek kezelésére, krónikus veseelégtelenség (CRI), AIDS-el kapcsolatos sorvadás, és öregedés kezelésére.

A találmány szerinti, poli(etilén-glikol)-lal módosított hGH vagy annak agonista
15 változata formulázható gyógyászati szempontból elfogadható diluens, izotónikus oldat készítésére szolgáló ágenst, pH beállítására szolgáló anyagot, és hasonlókat is tartalmazó, egy adott páciensnek beadható gyógyszerekké.

A kezelés céljától függően a fenti gyógyszereket beadhatjuk szubkután, intra-
muszkulárisan, intravénásan, tüdőn át, intradermálisan, vagy orálisan. A dózis függhet a
20 kezelni kívánt páciens elváltozásának típusától és állapotától, és mennyisége felnőtteknél injekció esetén 0,1-5 mg, orális beadás esetén pedig 0,1-50 mg lehet.

Előnyös, ha találmány szerinti polimervegyületek szobahőmérsékleten oldódnak vízben. Ilyen polimerek közé - minden korlátozás nélkül – tartoznak a poli(alkilénoxid) homopolimerjei, például, poli(etilén-glikol) vagy poli(propilén-glikol)-ok, poli(oxietilézett
25 poliolok), ezek kopolimerjei és blokkpolimerjei amennyiben biztosítják, hogy a blokk kopolimerek vízben való oldhatósága megmarad.

PEG-en alapuló polimerek mellett ténylegesen nem antigénikus anyagok – például dextrán, poli(vinilpirrolidonok), poli(akrilamidok), poli(vinilalkoholok), szénhidrát ala-
pú polimerek és hasonlóak – is alkalmazhatók. E polimervegyületek α - és ω -terminális cso-
30 portjainak aktiválása befolyásolható a poli(alkilénoxidok) konvertálásánál alkalmazottak-
hoz hasonló módon, és így az aktiválást a szakember ismeri. A szakember számára egyér-
telmű, hogy az alábbi lista tisztán illusztrációs célokat szolgál és az itt ismertetett tulajdon-
ságokkal bíró összes polimeranyag a találmány tárgykörébe tartozik. A leírás szerinti érte-
lemben, a „ténylegesen nem antigénikus” kifejezés azt jelenti, hogy a technikában ismertek

szerint az ilyen anyag nem toxikus és emlősökben nem vált ki észrevehető immunogén választ.

Meghatározások

5 Az alábbiakban megadjuk a leírásban alkalmazott rövidítések listáját és azok, felcserélhetően alkalmazott, megfelelő jelentését:

g gramm(ok)

mg milligramm(ok)

ml vagy mL milliliter(ek)

RT szobahőmérséklet

10 PEG poli(etilén)glikol

A leírásban idézett minden publikáció, szabadalom és szabadalmi bejelentés a kitanítás részét képezi, mintha jeleztük volna, hogy az egyes publikációk, szabadalmak, vagy szabadalmi iratok specifikusan és egyedileg a kitanítás részét képeznék.

15 Bár a találmányt illusztrációk és példák útján, a jobb megértés végett bizonyos részletességgel ismertettük, a kitanítás fényében a szakember számára egyértelmű, hogy a találmányban bizonyos változtatások és módosítások végezhetők anélkül, hogy a találmány oltalmi körétől eltérnének. Az alábbi példák csak illusztrációs célt szolgálnak és a találmány, szélesebb értelemben ismertetett oltalmi körét semmiben sem korlátozzák.

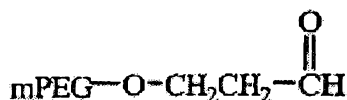
20 Az alábbi példákban a hGH szekvenciája a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia. Egyértelmű, hogy a hGH vagy annak agonista változatait is magában foglaló polipeptid-család többi tagja is PEG-ezhető az alábbi példákban ismertettekhez hasonló módon.

A leírásban idézett minden hivatkozás, szabadalom vagy szabadalmi irat teljes egészében a kitanítás részét képezi.

25 A találmány szerinti megoldást az alábbi példákkal tovább illusztráljuk, amelyek azonban a találmány oltalmi körét semmiben sem korlátozzák.

1. példa

Egyenes láncú, 20.000 MW PEG-ALD-hGH



E példa eljárást mutat be N-terminálisán egyszeresen PEG-ezett, lényegében homológ hGH készítmények redukzív alkilálással történő előállítására. Metoxi-lineáris PEG-propionaldehid reagenst (körülbelül 20.000 MW, Shearwater Corp.), redukatív aminálással, szelektíven kapcsoltunk a hGH N-terminálisához kihasználva azt az előnyt, amit az N-terminális lizin primer aminjának pK_a értéke és az ϵ -amino helyen lévő primer aminok pK_a értéke közötti relatív különbség nyújt. Huszonöt mM MES-ben (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 6,0, 25 mM HEPES-ben (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 7,0 vagy 10 mM nátriumacetátban (Sigma Chemical, St. Louis, MO), pH 4,5, oldott hGH fehérjét metoxi-PEG-propionaldehiddel (Shearwater Corp., Huntsville, AL) reagáltattunk úgy, hogy a fehérjét tartalmazó oldathoz annyi M-PEG-ALD-t adtunk, hogy a PEG:hGH relatív moláris aránya aminonként 0,1:0,7 legyen (az oldathoz igény szerint 8% acetonitrilt is adhatunk). A reakciót vízzel készült 1 M NaCNBH₄ (Sigma Chemical, St. Louis, MO) törzsoldat hozzáadásával (10-50 mM végkoncentrációban) katalizáltuk. A reakciókat sötétben 4°C-on, RT, 18-24 órán át végeztük. A reakciókat 1 M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO), $\approx$ pH 7,6 hozzáadásával (50 mM végkoncentrációban) vagy a reakciót követő tisztításban alkalmazott megfelelő pufferbe hígítva állítottuk le.

2. példa

Egyenes láncú, 30.000 MW PEG-ALD-hGH

Metoxi-lineáris PEG-propionaldehid reagenst (körülbelül 30.000 MW, Shearwater Corp.) hGH N-terminálisához kapcsoltunk az 1. példában leírt eljárás alkalmazásával.

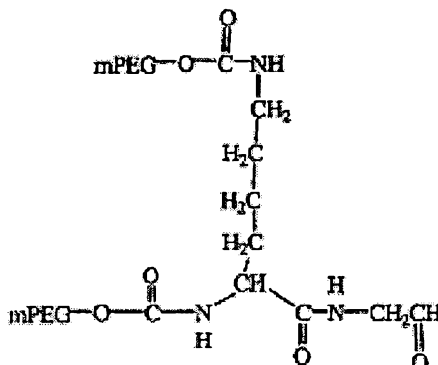
3. példa

Egyenes láncú, 5.000 MW PEG-ALD-hGH

Metoxi-lineáris PEG-propionaldehid reagenst (körülbelül 5.000 MW, Shearwater Corp.) hGH N-terminálisához kapcsoltunk az 1. példában leírt eljárás alkalmazásával.

4. példa

Elágazó láncú, 40.000 MW PEG-ALD-hGH



Metoxi-elágazó PEG-propionaldehid reagenst (PEG2-ALD reagens, Shearwater Corp.) hGH N-terminálisához kapcsoltunk az 1. példában leírt eljárás alkalmazásával.

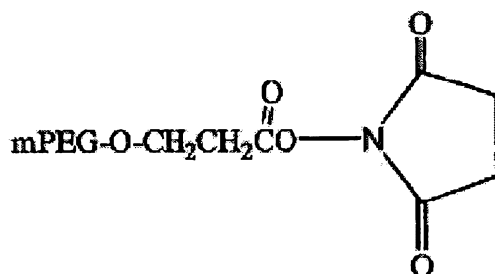
5. példa

Elágazó láncú, 20.000 MW PEG-ALD-hGH

- 5 Metoxi-elágazó PEG-propionaldehid reagenst (20.000 MW, PEG2-ALD reagens, Shearwater Corp.) hGH N-terminálisához kapcsoltunk az 1. példában leírt eljárás alkalmazásával. A PEG:hGH moláris aránya aminonként 0,1-0,5 volt.

6. példa

Egyenes láncú, 30.000 MW SPA-PEG-hGH



10

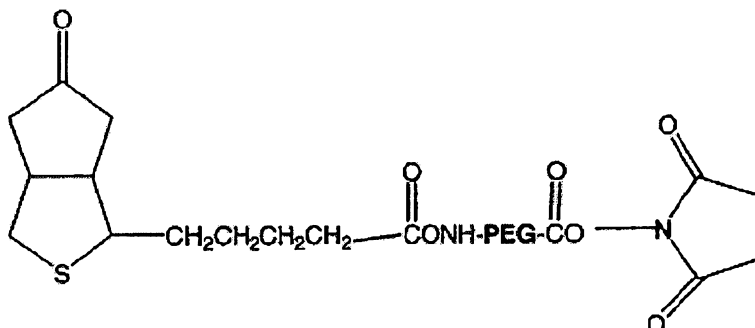
E példa eljárást mutat be egyszerűen PEG-ezett, lényegében homológ hGH készítmények N-hidroxisukcinimidillel (NHS) aktivált észterek alkalmazásával történő előállítására. Kétszázötven millimól HEPES pufferben (pH 7,2), hGH fehérje-törzsoldatból 10 mg/ml koncentrációjú oldatot készítettünk (az oldathoz igény szerint 8% acetonitrilt is adhatunk). Az oldathoz annyi metoxi-PEG-sukcinimidil-propionátot (SPA-PEG) adtunk, hogy a PEG:hGH relatív moláris aránya aminonként 0,1:0,65 legyen. A reakciókat 4°C-on, RT, 5 perc és 1 óra közötti időtartamon át végeztük. A reakciókat úgy állítottuk le, hogy az elegyhez 0,1 N ecetsavat vagy 5-szörös moláris feleslegben lévő Tris-HCl-t adva a pH 4,0-ra csökkentettük le.

20

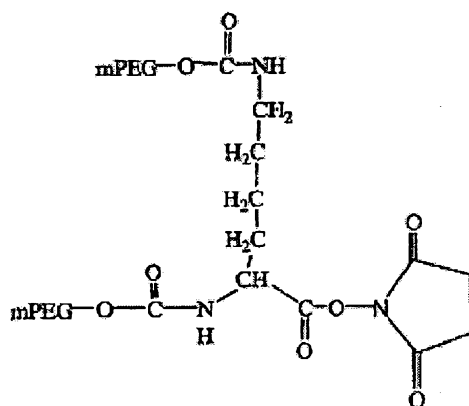
7. példa

Egyenes láncú, 20.000 MW SPA-PEG-hGH

Egyenes láncú SPA-PEG reagenst (20.000 MW, Shearwater Corp.) hGH N-terminálisához kapcsoltunk a 6. példában leírt eljárás alkalmazásával.

8. példaEgyenes láncú, 3.400 MW Biotin-SPA-PEG-hGH

5 Egyenes láncú Biotin-PEG-CO₂-NHS reagenst (Shearwater Corp.) hGH-hoz kapcsolunk a 6. példában leírt eljárás alkalmazásával.

9. példaElágazó láncú, 10.000 MW NHS-PEG-hGH

10 Elágazó láncú PEG2-NHS reagenst (10.000 MW, Shearwater Corp.) hGH-hoz kapcsolunk a 6. példában leírt eljárás alkalmazásával.

10. példaElágazó láncú, 20.000 MW NHS-PEG-hGH

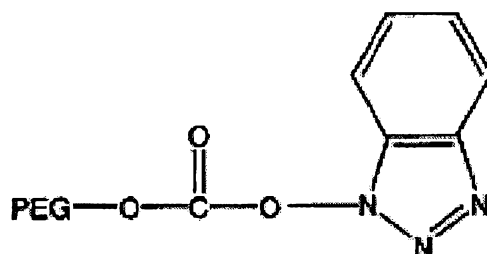
Elágazó láncú PEG2-NHS reagenst (20.000 MW, Shearwater Corp.) hGH-hoz kapcsolunk a 6. példában leírt eljárás alkalmazásával.

11. példaElágazó láncú, 40.000 MW NHS-PEG-hGH

Elágazó láncú PEG2-NHS reagenst (40.000 MW, Shearwater Corp.) hGH-hoz kapcsolunk a 6. példában leírt eljárás alkalmazásával.

12. példa

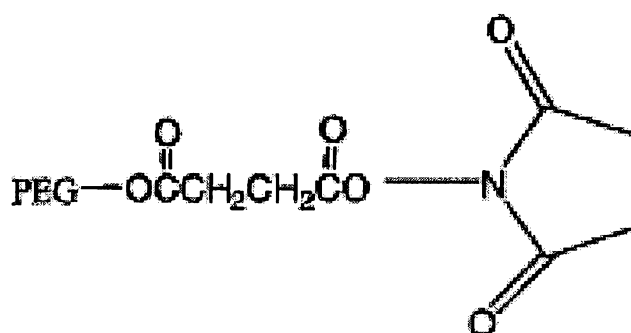
Egyenes láncú, 20.000 MW PEG-BTC-hGH



5 PEG-BTC reagenst (40.000 MW, Shearwater Corp.) hGH-hoz kapcsoltunk a 6. példában leírt eljárás alkalmazásával. E példa eljárást mutat be PEG-ezett, lényegében homológ hGH készítményeknek a PEG benzotriazol-karbonát származékainak alkalmazásával történő előállítására.

13. példa

Egyenes láncú, 5.000 MW PEG-SS-hGH



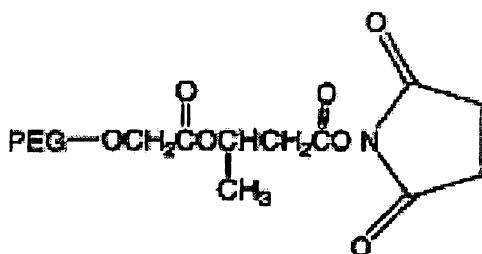
10

Szukcinimidil szukcinát-PEG-et (5.000 MW, Shearwater Corp.) hGH-hoz kapcsoltunk a 6. példában leírt eljárás alkalmazásával. E példa eljárást mutat be PEG-ezett, lényegében homológ hGH készítményeknek a hidrolizálható kötés alkalmazásával történő előállítására.

15

14. példa

Egyenes láncú, 20.000 MW PEG-CM-HBA-hGH



5 Karboximetil hidrovajsav-PEG-et (CM-HBA-PEG, 20.000 MW, Shearwater Corp.) hGH-hoz kapcsoltunk a 6. példában leírt eljárás alkalmazásával. E példa eljárást mutat be PEG-ezett, lényegében homológ hGH készítményeknek a hidrolizálható kötés alkalmazásával történő előállítására.

15. példa

Egyenes láncú, 2-4x 5.000 MW PEG-CM-HBA-hGH

10 PEG-CM-HBA-t (5.000 MW, Shearwater Corp.) hGH-hoz kapcsoltunk a 13. példában leírt eljárás alkalmazásával.

16. példa

Egyenes láncú, 20.000 MW HZ-PEG-hGH

PEG-OCH₂CONHNH₂

15 E példa eljárást mutat be egyszerűen PEG-ezett, lényegében homológ hGH készítmények 20.000 MW metoxi-PEG-hidrazid (HZ-PEG, Shearwater Corp.) alkalmazásával történő előállítására. HGH-fehérjetörzsoldatot feloldottunk 10 mM MES pufferben (pH 4,0) (10 mg/ml koncentrációban). Az oldathoz szilárd HZ-PEG-et adtunk (PEG:hGH relatív moláris aránya 0,1-5,0/karboxilcsoport). A reakciókat 2-4 mM végkoncentrációban hozzáadott karbodiimiddel (EDC, EOAC, EDEC) katalizáltuk. A reakciókat 4°C-on, 2-12
20 órán át, vagy szobahőmérsékleten 10 perc és 12 óra közötti időtartamig végeztük, majd a nem konjugált PEG és a karbodiimid kationcserével történt eltávolításával leállítottuk.

17. példa

Többszörösen PEG-ezett konjugátumok

25 Az 1. és 4. példában előállított, két vagy több kapcsolt PEG-et tartalmazó (többszörösen PEG-ezett), módosított hGH-kat anioncserélő kromatográfiával választottuk el az egyszerűen PEG-ezett konjugátumoktól. Két vagy több kapcsolt PEG-et tartalmazó (többszörösen PEG-ezett), módosított hGH-kat anioncserélő kromatográfiával választottuk el az egyszerűen PEG-ezett konjugátumoktól. Két vagy több kapcsolt PEG-et tartalmazó (többszörösen PEG-ezett), módosított hGH-kat anioncserélő kromatográfiával választottuk el az egyszerűen PEG-ezett konjugátumoktól.

szőrösen PEG-ezett), módosított hGH-kat kationcserélő kromatográfiával is elválasztottuk az egyszeresen PEG-ezett konjugátumoktól.

A 2., 3., 5-13. példában előállított, két vagy több kapcsolt PEG-et tartalmazó (többszőrösen PEG-ezett), módosított hGH-kat az 1. és 4. példában leírtakhoz hasonlóan tisztítottuk.

18. példa

PEG-ezett hGH tisztítása

Egyetlen ioncserélő kromatográfiás lépés elég volt ahhoz, hogy a PEG-ezett hGH konjugátumokat 95%-osnál nagyobb tisztaságban (SEC-analízis) válasszunk el a reakciókeverékből.

Anioncserélő kromatográfia

A PEG-ezett hGH konjugátumoknak a reakciókeverékből, 95%-osnál nagyobb tisztaságban (SEC-analízis) történő elválasztására egyetlen anioncserélő kromatográfiás lépést alkalmaztunk. Egyszeresen PEG-ezett hGH-t a nem módosított hGH-tól és a többszőrösen PEG-ezett hGH-tól anioncserélő kromatográfia alkalmazásával választottuk el. Jellemzően 20K aldehyd-hGH reakciókeveréket (5-100 mg fehérje) a fentiekben leírtak szerint, 25 mM HEPES (pH 7,3, „A” puffer) pufferrel ekvibrált Q-Spharose Hitrap oszlopon (1 vagy 5 ml, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) vagy Q-Sepharose fast flow oszlopon (26/20, 70 ml-es oszloptérfogat, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) tisztítottunk. A reakciókeveréket 5-10-szeresére hígítottuk „A” pufferrel és 2,5 ml/min áramlási sebességgel felvittük az oszlopra. Az oszlopot 8 oszloptérfogat „A” pufferrel mostuk, majd a különféle hGH-konjugátumokat 80-100 oszloptérfogat „A” pufferrel és lineáris 0-100 mM NaCl gradienssel eluáltuk. Az eluent abszorbancia 280 nm-en (A_{280}) történt mérésével vizsgáltuk és 5 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. Az azonos mértékben PEG-eződött (például, mono-, di-, tri-, stb., lásd 15. példa) konjugátumokat tartalmazó frakciókat összeöntöttük, majd az összeöntött mintákat 0,5-5 mg/ml-re töményítettük Centriprep YM10 koncentrátor (Amicon Technology Corporation, Northborough, MA) alkalmazásával. Az összeöntött minták fehérjekoncentrációját A_{280} történt méréssel határoztuk meg (extinkciós koefficiens: 0,78). E folyamatban a mono 20K PEG-aldehyd-hGH teljes kitermelése 25-30%-os volt.

Kationcserélő kromatográfia

Kationcserélő kromatográfiát 10 mM nátriumacetáttal (pH 4,0, „B” puffer) ekvibrált SP-Sepharose high performance (nagyteljesítményű) oszlopon (Pharmacia XK 26/20, 70 ml oszloptérfogat) végeztünk. A reakciókeveréket „B” pufferrel a tízszeresére

hígítottuk és 5 ml/min áramlási sebességgel felvittük az oszlopra. Az oszlopot 5 oszloptér-
fogat „B” pufferrel, majd 5 oszloptérfogat 12%-os „C” pufferrel (10 mM acetát, pH 4,5, 1
M NaCl) mostuk. A PEG-hGH konjugátumokat 20 lineáris 12-27%-os „C” pufferrel
eluáltuk az oszlopról. Az eluenst abszorbancia 280 nm-en történt mérésével vizsgáltuk és
5 10 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. Az azonos mértékben PEG-eződött (például, mono-, di-,
tri-, stb., lásd 15. példa) konjugátumokat tartalmazó frakciókat összeöntöttük, és a puffert
10 mM acetátra (pH 4,5) cseréltük, majd az összeöntött mintákat 1-5 mg/ml-re töményítet-
tük kevert cellában, Amicon YM10 membrán alkalmazásával. Az összeöntött minták
fehérjekoncentrációját A_{280} történt méréssel határoztuk meg (extinkciós koefficiens: 0,78). E
10 folyamatban az egyszeresen PEG-ezett hGH teljes kitermelése 10-50%-os volt.

19. példa

Biokémiai jellemzés

A tisztított, PEG-ezett hGH-t tartalmazó mintákat redukáló és nem redukáló SDS-
PAGE-vel, nem denaturáló és denaturáló méretkizárásos kromatográfiával, analitikai
15 anioncserélő kromatográfiával, N-terminális szekvenálással, hidrofób kölcsönhatásos kro-
matográfiával, és fordított fázisú HPLC-vel jellemeztük.

Méretkizárásos nagyteljesítményű folyadékkromatográfia (SEC-HPLC)

Metoxi-PEG és hGH különféle kapcsolási kémiákkal, méretekkel, linkerekkel és
geometriákkal történt reakcióit, anioncserével tisztított mintáit és a kapcsolat végső, tisztí-
20 tott termékeit nem denaturáló SEC-HPLC-vel vizsgáltuk. Analitikai, nem denaturáló SEC-
HPLC-t Tosohaas G4000PWXL oszlopon (7,8 * 30 cm, Tosohaas Amersham Bioscience,
Piscataway, NJ) vagy Superdex 200 oszlopon (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)
végeztünk, 20 mM foszfát pufferben (pH 7,2, 150 mM NaCl), 0,5 ml/min áramlási sebes-
séggel. A PEG-ezés nagymértékben megnöveli a fehérje hidrodinamikai térfogatát, amely
25 a retenciós idő lerövidülését eredményezi. A PEG-aldehyd-hGH reakciókeverékekben a
nem módosított hGH mellett konjugátumokat mutattunk ki. E PEG-ezett és nem PEG-ezett
konjugátumokat Q-Sepharose kromatográfiával választottuk el, és ezt követően a tisztítás
során kapott mono-PEG-ALD-hGH konjugátumok egyetlen csúcsként eluálódtak a nem
denaturáló SEC során (>95% tisztaság). A Q-Sepharose kromatográfiás lépés hatékonyan
30 távolította el a szabad PEG-et, hGH-t, és a többszörösen PEG-ezett hGH-konjugátumokat
az egyszeresen PEG-ezett hGH-tól. A nem denaturáló SEC-HPLC alkalmazásával kimutat-
tuk, hogy a különféle PEG-ezett hGH-k tényleges mérete jóval nagyobb, mint ami az elmé-
leti molekulatömegeből következne (1. táblázat)

1. táblázat

Méretkizárásos kromatográfia (SEC)

	Méret (Elméleti)	(SEC)
hGH	22.000	21. 000
4-6x5K PEG-SPA GH	47.000	128.000
2-4x5K PEG-CMHBA (NHS) GH	37.000	71.000
20K PEG-ALD GH	42.000	120.000
20K elágazó PEG-ALD GH	42.000	114.000
20K PEG-CMHBA (NHS) GH	42.000	115.000
20k PEG-hidrazid GH	42.000	125.000
2x20K PEG-ALD GH	62.000	250.000
30K PEG-ALD GH	52.000	231.000
30K PEG-SPA GH	52.000	183.000
2x30K PEG-SPA GH	82.000	569.000
40K elágazó PEG-ALD GH	62.000	330.000
40K elágazó PEG-NHS GH	62.000	253.000

Denaturáló SEC-HPLC

- 5 Metoxi-PEG és hGH különféle kapcsolási kémiákkal, méretekkel, linkerekkel és geometriákkal történt reakcióit, anioncserével tisztított mintáit és a kapcsolás végső, tisztított termékeit denaturáló SEC-HPLC-vel vizsgáltuk. Analitikai, denaturáló SEC-HPLC-t Tosohaas 3000SWXL oszlopon (7,8 * 30 cm, Tosohaas Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) végeztünk, 100 mM foszfát pufferben (pH 6,8, 0,1% SDS), 0,8 ml/min
- 10 áramlási sebességgel. A PEG-ezés nagymértékben megnöveli a fehérje hidrodinamikai térfogatát, amely a retenció idő lerövidülését eredményezi. A 20K PEG-aldehid-hGH reakciókeverékekben a nem módosított hGH mellett konjugátumokat mutattunk ki. E PEG-ezett és nem PEG-ezett konjugátumokat Q-Sepharose kromatográfiával választottuk el, és ezt követően a tisztítás során kapott mono 20K PEG-ALD-hGH konjugátumok egyetlen
- 15 csúcsként eluálódtak a denaturáló SEC során (>95% tisztaság). A Q-Sepharose kromatográfiás lépés hatékonyan távolította el a szabad PEG-et, hGH-t, és a többszörösen PEG-ezett hGH-konjugátumokat az egyszeresen PEG-ezett hGH-tól.

SDS PAGE / PVDF transzfer

SDS-PAGE-t alkalmaztunk a különféle PEG reagensek hGH-val történő reakciójának és a tisztított végtermékek vizsgálatára. Ezen eljárásra példákat a mono 20K lineáris és elágazó 20K és 40K PEG-aldehiddel, és 4*6 5K SPA-PEG-gel végzett reakciók kapcsán, az 1. és 2. ábrán mutatunk be. SDS-PAGE-t 1 mm vastag, 10-20% Tris-glicin géleken (Invitrogen, Carlsbad, CA) végeztünk redukáló és nem redukáló körülmények között, és a géleket Novex Colloidal Coomassie™ G-250 gélfestő készlettel (Invitrogen, Carlsbad, CA) festettük meg. A tisztított mono-PEG-aldehyd-hGH konjugátumok egyetlen fő sávként vándoroltak az SDS-PAGE-n. A sávokat N-terminális szekvenálás céljából PVDF-membránra blottoltuk.

Analitikai anioncserélő HPLC

Analitikai anioncserélő HPLC-t alkalmaztunk a különféle mPEG-ek hGH-val történt reakciójának, az anioncserével tisztított frakciók és a végső tisztított termékek vizsgálatára. Az analitikai anioncserélő HPLC-t Tosohas Q5PW vagy DEAE-PW anioncserélő oszlopon (7,5*75 mm, Tosohas Amersham Bioscience, Piscataway, NJ), 50 mM Tris pufferben (pH 8,6), 1 ml/min áramlási sebességgel végeztük. A mintákat lineáris 5-200 mM NaCl gradienssel eluáltuk.

Fordított fázisú HPLC (RP-HPLC)

PEG-GH reakciókeverékeket és tisztított, PEG-ezett termékeket RP-HPLC-vel analizáltunk hGH-k, egyszeresen és többszörösen PEG-ezett hGH-konjugátumok vizsgálatára és az oxidált hGH formák mellett, az olyan PEG-hGH izoformák nyomkövetésére, amelyekben az egyetlen PEG-csoport más-más helyre kapcsolódott (például, N-terminálishoz vagy valamelyik lizin ε-aminocsoportjához). Az RP-HPLC-t Zorbax SB-CN fordított fázisú oszlopon (150 vagy 250 mm * 4,6 mm (3,5 mm vagy 5 mm) végeztük. Az elválasztás szobahőmérsékleten, mintánként jellemzően 10 mg fehérje felvitelét követően történt. Az „A” puffer trifluorecetsav 0,1%-os vizes oldata volt, a „B” puffer pedig trifluorecetsav 0,1%-os, acetonitrillel készült oldata volt. A gradiens, amelyben a B mennyisége percenként 0,5%-al nőtt, az alábbi volt:

Lépés	Idő	Áramlás	%A	% B	Lépés
0	0	1	60	40	0
1	3	1	60	40	0
2	20	1	50	50	1
3	2	1	60	40	1
4	6	1	60	40	0

N-terminális szekvenálás és peptidtérképezés

Az N-terminális aminosav-szekvenciát automatizált, Edman-féle degradációs kémiával határoztuk meg. A degradációhoz Applied Biosystems Model 494 Procise szekvenáló berendezést (Perkin Elmer, Wellesley, MA) alkalmaztunk. A megfelelő PTH-AA származékokat RP-HPLC-vel, on-line módon, Applied Biosystems Model 140C PTH-analizátorral, Perkin Elmer/Brownlee 2,1 mm i.d. PTH-C18 oszlopon határoztuk meg. Lineáris 20K és elágazó 40K PEG-ALD-hGH sávokat PVDF membránra transzferáltuk vagy pedig a lineáris 20K és elágazó 40K PEG-ALD-hGH-t tartalmazó oldatot szekvenáltuk. A fő jelet (körülbelül 88%-ot) adó, tisztított, lineáris 20K PEG-hGH-ról kiderült, hogy szekvenciája, az N-terminális aminosav kivételével megegyezik a hGH szekvenciájával. Ezt az eredményt vártuk az aldehid kémiával N-terminálisan PEG-ezett fehérje esetében. Az első ciklusban nem nyerhető vissza aminosav, mivel az PEG-csoporttal kapcsolódik. Egy jelentéktelen szignál (körülbelül 12%-os kitermelés) utal a helyes N-terminális aminosav-szekvenciára. Figyelembe véve azt, hogy az RP-HPLC-ről gyűjtött csúcs 100%-ban PEG-ezett, az adatok szerint a PEG-gel történt módosítások körülbelül 88%-a az N-terminálison történt, egyértelmű, hogy a többi az elérhető lizinek egyikéhez kötődik.

Emésztéseket végeztünk tripszinnel (1 mg/ml koncentrációban) és emésztésenként, jellemzően, 50 µg anyagot alkalmaztunk. A tripszint olyan koncentrációban adtuk a reakciókeverékhez, hogy a tripszin:PEG-hGH arány 1:30 (w/w) legyen. A reakciókeverék 30 mM Tris puffert (pH 7,5) tartalmazott. A mintákat szobahőmérsékleten 16±0,5 órán át inkubáltuk. A reakciókat 1 N HCl (50 µl/ml emésztési oldat) hozzáadásával állítottuk le. A mintákat 0,25 mg/ml végkoncentrációra hígítottuk 6,25% acetonitrillel, majd az automata mintavevőbe helyeztük. A reakciókeverékhez először acetonitrilt adtunk (19,8% acetonitril-koncentráció eléréséig), óvatosan összekevertük, majd vízzel feltöltöttük a végleges térfogatra (a kiindulási térfogat négyszerese). A felesleges emésztési oldatot eltávolíthatjuk és -20°C-on akár 1 hétig is tárolhatjuk.

Waters Alliance 2695 HPLC-rendszert alkalmaztunk az analízisben, de más rendszerekkel is kaphatunk hasonló eredményeket. Az alkalmazott oszlop Astec C-4 polimeroszlop (25 cm * 4,6 mm, 5 µm-es töltet) volt. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük, mintánként jellemzően 50 µg fehérjét vittünk fel. Az „A” puffer trifluorecetsav 0,1%-os vizes oldata volt, a „B” puffer pedig trifluorecetsav 0,085%-os, acetonitrillel készült oldata volt. Az alábbi gradienst alkalmaztuk:

Idő	A%	B%	C%	D%	Áramlás	Görbe
0,00	0,0	0,0	100,0	0,0	1,000	1
90,00	0,0	0,0	55,0	45,0	1,000	6
90,10	0,0	0,0	0,0	100,0	1,000	6
91,00	0,0	0,0	0,0	100,0	1,000	6
91,10	0,0	0,0	100,0	0,0	1,000	6
95,00	0,0	0,0	100,0	0,0	1,000	6

Az oszlopot termofeltét alkalmazásával 40°C-ra melegítettük fel. A csúcsokat Waters 996 PDA detektor alkalmazásával, 210-300 nm-en gyűjtött adatok alapján mutattuk ki. A 214 nm hullámhosszra vonatkozó kromatogramot alkalmaztuk az N-terminális PEG-ezés mértékének meghatározására végzett mintaanalízisre (T-1 fragmentum hiánya) (lásd 2. táblázat)

2. táblázat

Minta	% T-1 megvan	%T-1 hiányzik	%T-1 megvan a kontrollhoz képest
Aldehid			
5K ALD	2.0	98.0	7.4
20K	0.0	100.0	0.0
2x20K	0.0	100.0	0.0
30K	1.3	98.7	4.5
40K elágazó	1.9	98.1	6.8
NHS			
4-6x5 SPA	1.3	98.7	4.7
2-4X5 CM	0.0	100.0	0.0
20K CM	23.1	76.9	84.1
30K	18.2	81.8	63.9
2x30K	5.7	94.3	19.9
40K elágazó	20.9	79.1	73.5

20. példa

Farmakodinamikai vizsgálatok

Hatékonysági vizsgálatok agyalapimirigy-irtott patkányokon

Agyalapimirigy-irtott, nőtény Sprague-Dawley patkányokat (Harlan Labs) 7-10 napon át előzetesen szkríneltünk a növekedési rátára nézve. Ezt követően 11 napig tartó növekedési kísérleteket végeztünk. A patkányokat 6-8 állatból álló csoportokra osztottuk. Az 1. csoportba osztott állatok naponta vagy a 0. és a 6. napon vivőanyag-dózis(oka)t adtunk be szubkután. A 2. csoportnak GH-dózisokat (0,3 mg/kg/dózis, s.c.) adtunk be naponta. A 3. csoportnak GH-dózisokat (1,8 mg/kg/dózis) adtunk be s.c. a 0. és a 6. napon. A 4. csoportnak pedig PEG-GH-dózisokat (1,8 mg/kg/dózis) adtunk be s.c. a 0. és a 6. napon. Az agyalapimirigy-irtott patkányok testtömeg-növekedését legalább napi egy tömegmérés-sel követtük nyomon a kísérlet ideje alatt. A hetente egyszer beadott 20K PEG-ALD-hGH-val, 20K és 40K elágazó PEG-ALD-hGH-val, és a 4-6x 5PEG-SPA-hGH-val kezelt állatok tömeggyarapodása (átlag $\pm$ a középérték standard hibája (s.e.m.)) hasonló volt a hGH-val naponta kezelt állatokéhoz (3. és 4. ábra). A 3. táblázatban összefoglaljuk a teljes tömeggyarapodás 11. napon mért értékeit (átlag $\pm$ a középérték standard hibája) a különféle PEG-ezett molekulák heti egyszeri beadása esetén a naponta beadott hGH-hoz viszonyítva.

3. táblázat

Patkányok tömeggyarapodása

Vegyület	Heti egyszeri dózis (mpk)	Napi testtömeggyarapodás (g/nap) (0-11. nap) (átlag $\pm$ SEM)	%-os testtömeggyarapodás a hGH-val naponta kezelt állatokhoz képest (átlag)
hGH (nem PEG-ezett)	1,8	0,97 $\pm$ 0,12	39%
5K Lineáris PEG-ALD GH	1,8	0,96 $\pm$ 0,27	36%
20K Lineáris PEG-ALD GH	1,8	1,99 $\pm$ 0,13,	73%
		1,43 $\pm$ 0,08,	
		1,7 $\pm$ 0,10	
20K Lineáris CM-HBA PEG GH	1,8	2,36 $\pm$ 0,11	99%
20K Lineáris PEG-HYD GH	1,8	2,62 $\pm$ 0,22	99%
20K Elágazó PEG-ALD GH	1,8	2,24 $\pm$ 0,07	87%
30K Lineáris PEG-ALD GH	1,8	2,11 $\pm$ 0,06	94%
		1,85 $\pm$ 0,14	
30K Lineáris PEG-SPA GH	1,8	2,6 $\pm$ 0,1	117%
40K Elágazó PEG-ALD GH	1,8	2,57 $\pm$ 0,08	100%
40K Elágazó PEG-NHS GH	1,8	2,53 $\pm$ 0,09	121%
2x 20K PEG-ALD GH	1,8	2,66 $\pm$ 0,10	128%
4-6x5K SPA-PEG GH	1,8	3,18 $\pm$ 0,10	124%
2-4x5K CM-HBA-PEG GH	1,8	3,54 $\pm$ 0,15	134%
2x 30K Lineáris PEG-SPA GH	1,8	3,1 $\pm$ 0,1	134%

Az egyes tömeggyarapodási kísérletek elvégzése után az állatokat elöltük és analizáltuk a combcsontok hosszát. A 6. ábra bemutatja a combcsont hosszában, a 11 napos vizsgálat során mért változást (átlag $\pm$ SEM) a különféle PEG-ezett molekulák heti egyszeri beadása vagy a naponta beadott hGH esetében.

5 IGF-1 szintek az agyalapimirigy-irtott patkányokban

Kísérleteket végeztünk a fentiekben leírt tömeggyarapodási vizsgálatokhoz hasonlóan, azonban az állatoktól a 0., 1., 2., 3., 4., 5. és az állatok elölésekor a 9. napon vérmin-
tát gyűjtöttünk és azokból ELISA eljárással IGF-1 szinteket határoztunk meg. A 7. ábrán
összehasonlítottuk az agyalapimirigy-irtott állatok szérumában mért IGF-1 szinteket (át-
lag $\pm$ SEM) naponta beadott hGH, vagy egyetlen dózisban beadott hGH vagy a 0. és 6. na-
pon beadott PEG-ezett hGH beadása esetében.

Farmakokinetikai vizsgálatok

Farmakokinetikai vizsgálatokat végeztünk normális, Sprague-Dawley hím patká-
nyokon, egereken és jávai makákón (M. cynomolgus). Csoportonként 6-6 patkányt vagy
15 60-60 egeret egyetlen, 1,8 mg/kg bolus injekcióval vagy egyetlen dózisban, i.v. beadott 1,0
mg/kg GH-val vagy PEG-GH-val kezeltük. A majmokat 0,18 mg/kg GH vagy PEG-GH
dózissal kezeltük egyetlen szubkután bolus és i.v. injekció beadásával (2-4 ma-
jom/csoport). Az 1-5. nap során, a releváns PK-paraméterek megállapítására megfelelő
időben vérmintákat gyűjtöttünk (4. táblázat). ($t_{1/2}$) = terminális fél-életidő, (Cl) = clearance,
20 (T_{max}) = a maximális koncentráció eléréséig eltel idő, Vss = térfogati megoszlás az állan-
dósult állapotban, és (C_{max}) = maximális koncentráció. GH és PEG-GH szintjeit a szérum-
ban az egyes minták immunvizsgálattal történt nyomonkövetésével állapítottuk meg.

HGH immunvizsgálat

A patkányok, egerek és majmok szérumában a hGH és PEG-ezett hGH fehérje
25 koncentrációit a hGH AutoDELFA készlet fluoreszcens immunvizsgálattal (Perkin Elmer
Life Sciences) határoztuk meg. A standard görbe felvételére a megfelelő PEG-hGH-t al-
kalmaztuk.

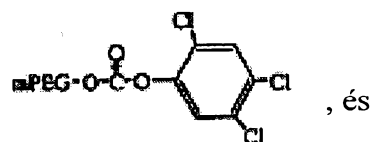
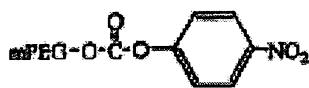
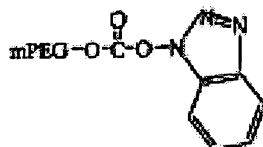
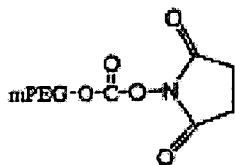
4. táblázat

Faj	Paraméterek	40K Br ALD hGH	40K Br NHS hGH	30K ALD hGH	20K ALD hGH	4-6 x 5K SPA
Egér	Dózis (mg/kg)	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.0	iv 1.0 sc 1.8
	CL (ml/hr/kg)	2.29	2.12	4.43	7.89	4.53
	Vss (ml/kg)	18	16	24	17	51
	T_{1/2, iv} (hr)	4.3	3.8	2.8	1.8	11
	T_{1/2, sc} (hr)	4	6.2	3.7	2.5	9
	Tmax, sc (hr)	11	9	6	3	12
	SC AUC (ug/ml*hr)	682	577	160	31	668
	SC					
	Biológiai elér- hetőség (%)	87	67	39	24	167
Patkány	Dózis (mg/kg)	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.8	iv 1.8 sc 1.8	iv 1.0 sc 1.8
	CL (ml/hr/kg)	1.96	1.75	5.75	9.9	2.9
	Vss (ml/kg)	19	25	44	33	36
	T_{1/2, iv} (hr)	5.4	5.8	3.6	2.2	24
	T_{1/2, sc} (hr)	5.8	7.1	6.7	2.9	29
	Tmax, sc (hr)	24	22	12	9	20
	SC AUC (ug/ml*hr)	398	344	97	70	249
	SC					
	Biológiai elér- hetőség (%)	30	33	31	39	40
Majon	Dózis (mg/kg)	iv 0.18 sc 0.18	iv 0.18 sc 0.18	iv 0.18 sc 0.18	iv 0.18 sc 0.18	iv 0.18 sc 0.18
	CL (ml/hr/kg)	1.83	0.78	1.94	2.19	0.49
	Vss (ml/kg)	57	20	29	44	25
	T_{1/2, iv} (hr)	21	13.6	14.9	7.3	38
	T_{1/2, sc} (hr)	19	21	12	8.3	35
	Tmax, sc (hr)	22	22	10	8	32
	SC AUC (ug/ml*hr)	100	483	125	38	242
	SC					
	Biológiai elér- hetőség (%)	64	77	97	44	66

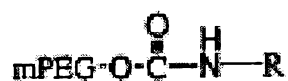
Szabadalmi igénypontok

1. Konjugátum, amely biológiailag aktív emberi növekedési hormon (hGH) polipeptidet vagy annak antagonistá változatát és ezek bármelyikének legalább egyetlen aminosavához kovalensen kapcsoltan legalább egyetlen vízben oldható polimermolekulát tartalmazó.
2. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a hGH-polipeptid a szekvencia-listában 1. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciát tartalmazza.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a polimermolekula poli(etilénoxid).
4. A 3. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilénoxid)-molekula poli(etilén-glikol)-molekula.
5. A 4. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilén-glikol) szabad aminocsoport(ka)t, karboxilcsoport(ka)t, vagy szulfhidril-csoport(ka)t tartalmazó aminosavhoz kapcsolódik.
6. Az 5. igénypont szerinti konjugátum, amely aktivált poli(etilén-glikol) alkalmazásával kialakított.
7. A 6. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az aktivált poli(etilén-glikol) funkciós csoportot tartalmaz.
8. A 7. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az aktivált poli(etilén-glikol) szabad aminocsoportot tartalmazó aminosavhoz kapcsolt.
9. A 8. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a funkciós csoport karbonát, karbonil-imidazol, karbonsav aktív észtere, azlakton, ciklikus imidtion, izocianát vagy izotiocianát, imidát vagy aldehid.
10. A 9. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport karbonát vagy karbonil-imidazol.

11. A 10. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az aktivált poli(etilén-glikol) az alábbiak bármelyike:



5 12. A 11. igénypont szerinti konjugátum, amelynek szerkezete az alábbi:

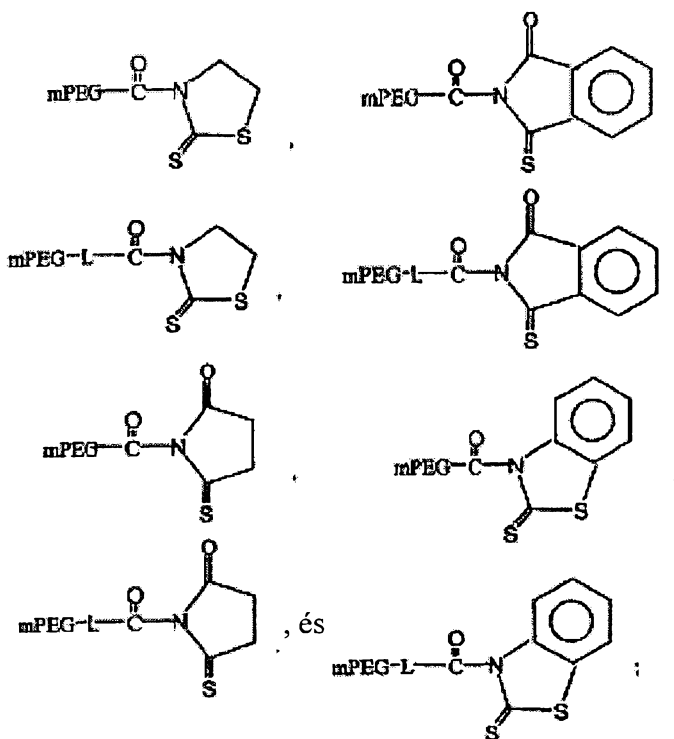


ahol R jelentése emberi növekedési hormon polipeptid.

13. A 12. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az emberi növekedési hormon polipeptid a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciát tartalmazza.

14. A 9. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport ciklikus imidtion.

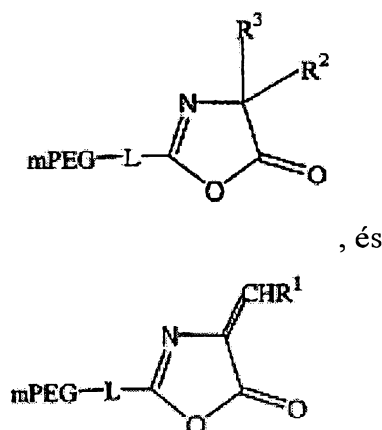
15. A 14. igénypont szerinti konjugátum, ahol az aktivált poli(etilén-glikol) az alábbiak bármelyike:



5 ahol, L jelentése az alábbiak bármelyike: -O-, -NH-, -OCH₂-, -NH-CO(CH₂)_n-, -NH-CO(CH₂)_nO-, -CO-NH(CH₂)_n-, -S-, -CO-NH(CH₂)_nO-, -O(CH₂)_nO-, -O(CH₂)_n-, -SCH₂CH₂-, vagy -NH(CH₂)_n-.

16. A 9. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport azlakton.

17. A 16. igénypont szerinti konjugátum, ahol az aktivált poli(etilén-glikol) az alábbiak bármelyike:



ahol

R^1 jelentése hidrogén, alkil, cikloalkil, karbociklusos vagy heterociklusos aromás gyűrű, α -, β -telítetlen alkil;

és

R^2 és R^3 egymástól függetlenül hidrogén, alkil, aril vagy arilalkil.

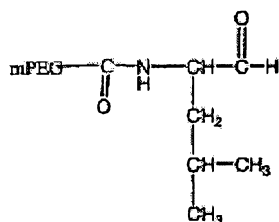
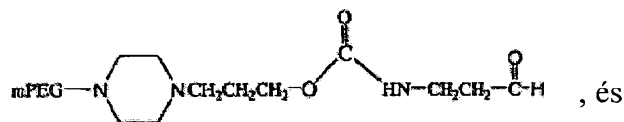
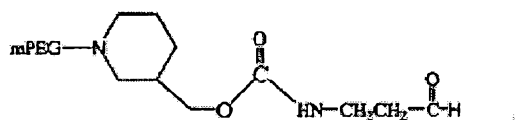
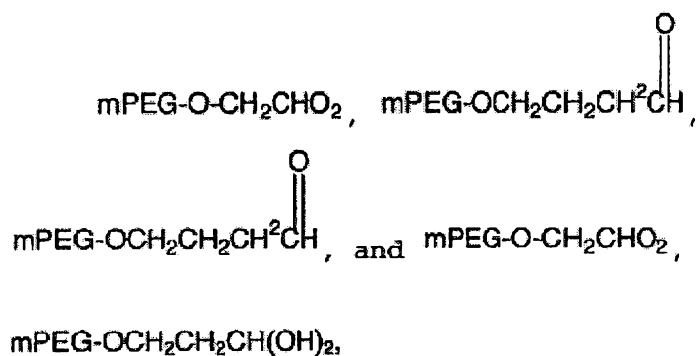
5 18. A 9. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport izocianát vagy izotiocianát.

19. A 18. igénypont szerinti konjugátum, ahol az aktivált poli(etilénlikol) az alábbiak bármelyike:

mPEG-N=C=O, vagy mPEG-N=C=S

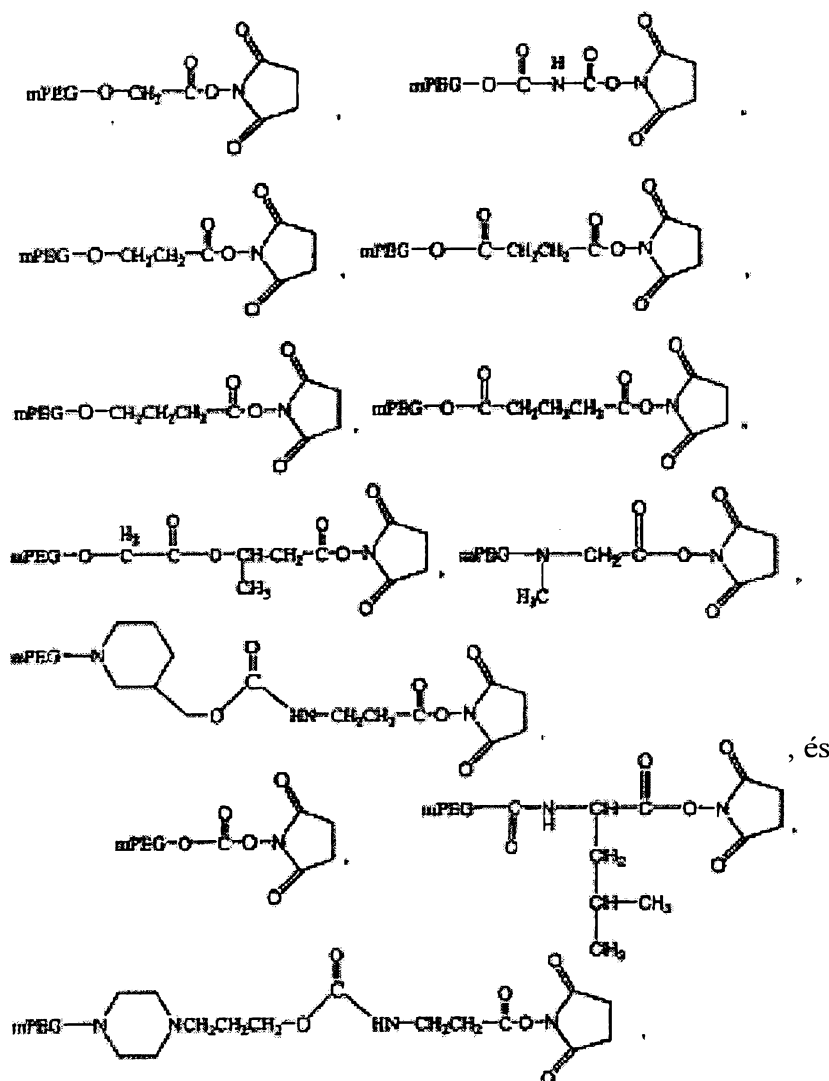
10 20. A 9. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport aldehid vagy aldehidhidrát.

21. A 20. igénypont szerinti konjugátum, ahol az aktivált poli(etilénlikol) az alábbiak bármelyike:

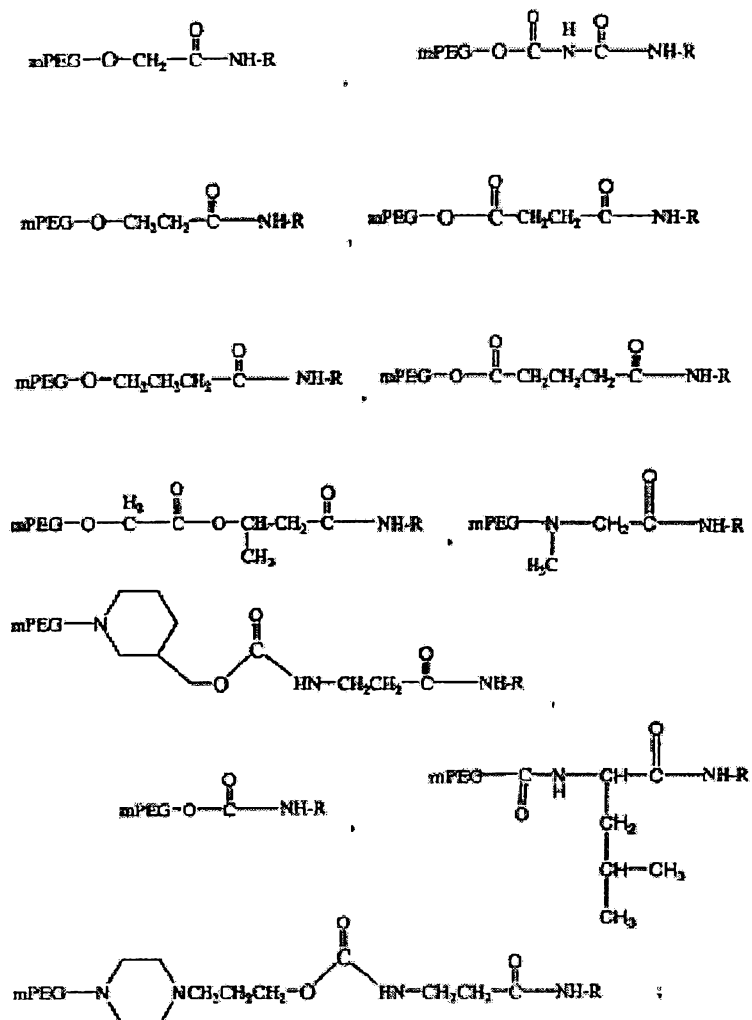


22. A 9. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport valamilyen karbonsav aktív észtere.

23. A 22. igénypont szerinti konjugátum, ahol az aktivált poli(etilén)glikol az alábbiak bármelyike:



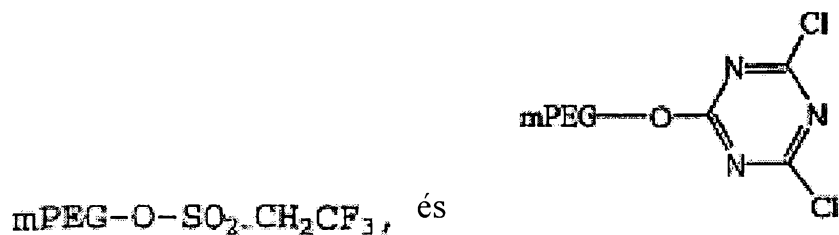
24. A 23. igénypont szerinti konjugátum, amelynek szerkezete az alábbiak bármelyike:



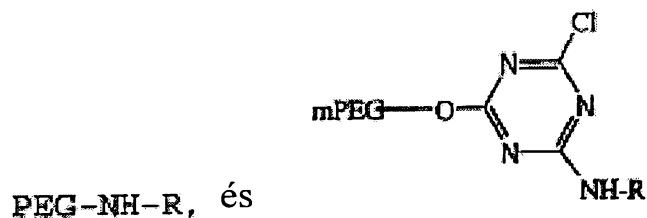
ahol R jelentése: emberi növekedési hormon polipeptidje.

- 5 25. A 24. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az emberi növekedési hormon polipeptid a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciát tartalmazza.

26. A 9. igénypont szerinti konjugátum, ahol az aktivált poli(etilén-glikol) az alábbiak bármelyike:



27. A 26. igénypont szerinti konjugátum, amelynek szerkezete az alábbiak bármelyike:

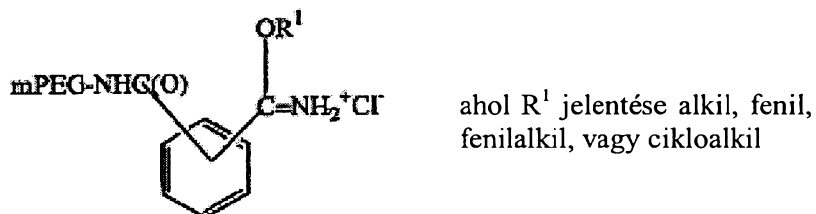
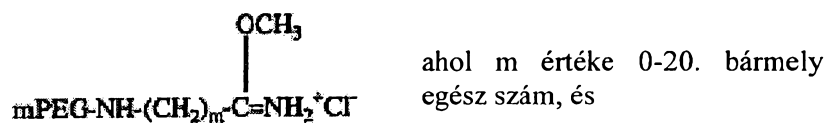


ahol R jelentése: emberi növekedési hormon polipeptidje.

28. A 27. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az emberi növekedési hormon polipeptid a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciát tartalmazza.

29. A 28. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport imidát.

30. A 9. igénypont szerinti konjugátum, ahol az aktivált poli(etilén-glikol) az alábbiak bármelyike:



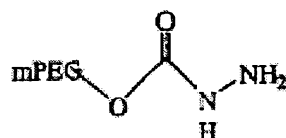
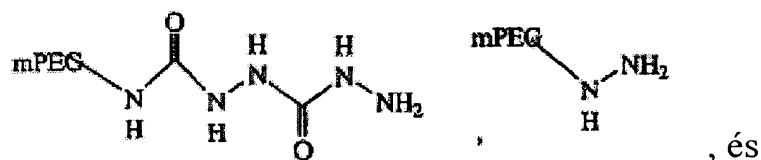
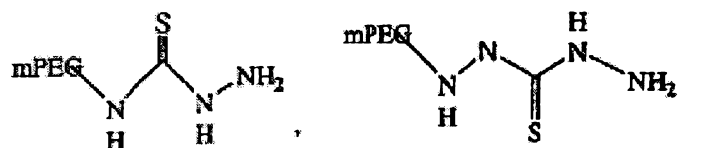
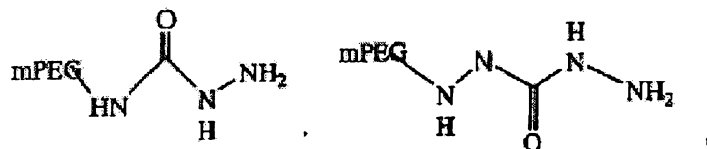
31. A 9. igénypont szerinti konjugátum, ahol a szabad aminos csoport aminoterminális α-aminocsoport.

32. A 31. igénypont szerinti konjugátum, ahol az aminoterminális α-aminocsoport fenilalaninon lévő aminos csoport.

33. A 8. igénypont szerinti konjugátum, ahol a kapcsolódás szabad karboxilcsoportot tartalmazó aminosavnál található.

34. A 33. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport primer amin, hidrazin, és hidrazid funkciós csoportok.

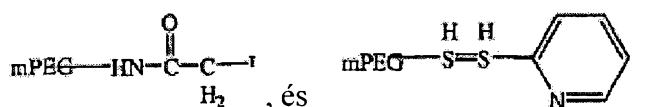
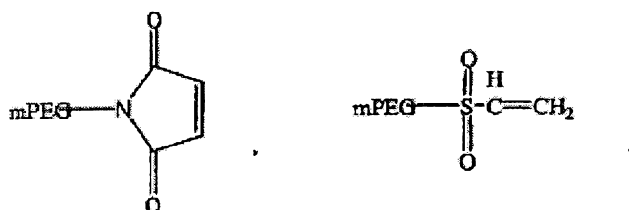
35. A 34. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport az alábbiak bármelyike:



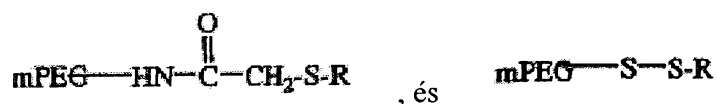
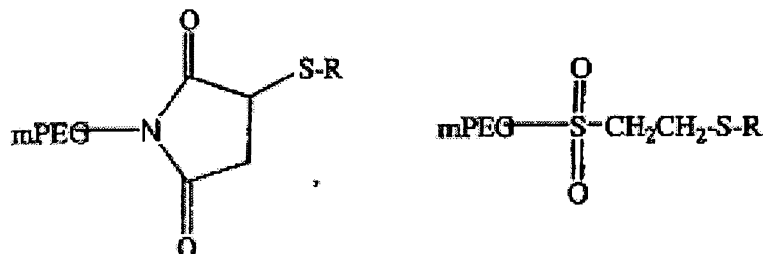
36. A 8. igénypont szerinti konjugátum, ahol a kapcsolódás szabad
5 szulfhidrilcsoportot tartalmazó aminosavnál található.

37. A 36. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport tiol, maleimid, vinilszulfon, vagy fenilglioxál.

38. A 37. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport az alábbiak bármelyike:



39. A 38. igénypont szerinti konjugátum, ahol a funkciós csoport az alábbiak bármelyike:



5 ahol R jelentése: emberi növekedési hormon polipeptidje.

40. A 39. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az emberi növekedési hormon polipeptid a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciát tartalmazza.

10 41. A 8. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilén-glikol) molekula-tömege körülbelül 0,5-100 kDa.

42. A 41. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilén-glikol) molekula-tömege körülbelül 5-40 kDa.

43. A 8. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilén-glikol) elágazó polimer.

15 44. A 43. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az elágazó polimer az alábbiak bármelyike:

ahol R jelentése: emberi növekedési hormon polipeptidje.

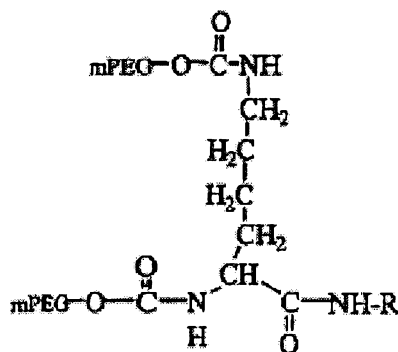
46. A 45. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az emberi növekedési hormon polipeptid a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciát tartalmazza.

47. A 46. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilénglikol) legalább 80%-a az aminosav-szekvenciához kapcsolódik.

48. A 47. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilénglikol) legalább 90%-a az aminosav-szekvenciához kapcsolódik.

49. A 47. vagy 48. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az egyes mPEG-ek molekulatömege körülbelül 20 kDa.

50. Emberi növekedési hormon és PEG konjugátuma, amelynek szerkezete az alábbi:



ahol R az emberi növekedési hormon polipeptidje.

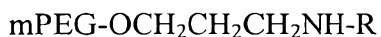
51. Az 50. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az emberi növekedési hormon polipeptid a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciát tartalmazza.

52. Az 51. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilénglikol) legalább 80%-a az aminosav-szekvenciához kapcsolódik.

53. Az 52. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilénglikol) legalább 90%-a az aminosav-szekvenciához kapcsolódik.

54. Az 52. vagy 53. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az egyes mPEG-ek molekulatömege körülbelül 20 kDa.

55. Emberi növekedési hormon és PEG konjugátuma, amelynek szerkezete az alábbi:



ahol R az emberi növekedési hormon polipeptidje.

56. Az 55. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az emberi növekedési hormon polipeptid a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott aminosav-szekvenciát tartalmazza.

57. Az 56. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilén-glikol) legalább 80%-a az aminoterminális fenilalaninhoz kapcsolódik.

58. Az 56. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilén-glikol) legalább 90%-a az aminoterminális fenilalaninhoz kapcsolódik.

59. Az 57. vagy 58. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az egyes mPEG-ek molekulatömege körülbelül 20 kDa.

60. A 8. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilén-glikol) bifunkcionális polimer.

61. Az 56. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a poli(etilén-glikol) prodrog.

62. Az 1. igénypont szerinti hGH-t és legalább egy, gyógyászati szempontból elfogadható hordozót tartalmazó készítmény.

63. Eljárás növekedési vagy fejlődési rendellenességtől szenvedő páciensek kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy a páciensnek az 1. igénypont szerinti hGH terápiásan hatékony mennyiségét adjuk be.

64. A 63. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség a növekedési hormon hiánya (GHD).

65. A 63. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség Turner-féle szindróma.

66. A 63. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség krónikus veseelégtelenség.

67. A 63. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség a terhességi korhoz képesti elmaradás (SGA).

68. A 48. igénypont szerinti hGH-t és legalább egy, gyógyászati szempontból elfogadható hordozót tartalmazó készítmény.

69. Eljárás növekedési vagy fejlődési rendellenességtől szenvedő páciensek kezelésére, vagy az eljárásban a páciensnek a 48. igénypont szerinti hGH-t terápiásan hatékony mennyiségben beadjuk.

70. A 69. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség a növekedési hormon hiánya (GHD).

71. A 69. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség Turner-féle szindróma.

72. A 69. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség krónikus veseelégtelenség.

73. A 69. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség a terhességi korhoz képesti elmaradás (SGA).

5 74. Az 50. vagy 55. igénypont szerinti hGH-t és legalább egy, gyógyászati szempontból elfogadható hordozót tartalmazó készítmény.

75. Eljárás növekedési vagy fejlődési rendelleneségtől szenvedő páciensek kezelésére, *azzal jellemezve*, hogy a páciensnek az 1. igénypont szerinti hGH terápiásan hatékony mennyiségét adjuk be.

10 76. A 75. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség a növekedési hormon hiánya (GHD).

77. A 75. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség Turner-féle szindróma.

15 78. A 75. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség krónikus veseelégtelenség.

79. A 75. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a növekedési vagy fejlődési rendellenesség a terhességi korhoz képesti elmaradás (SGA).

20

A meghatalmazott:

DANUBIA

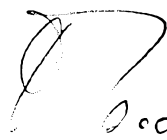
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Dr. Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivő

25

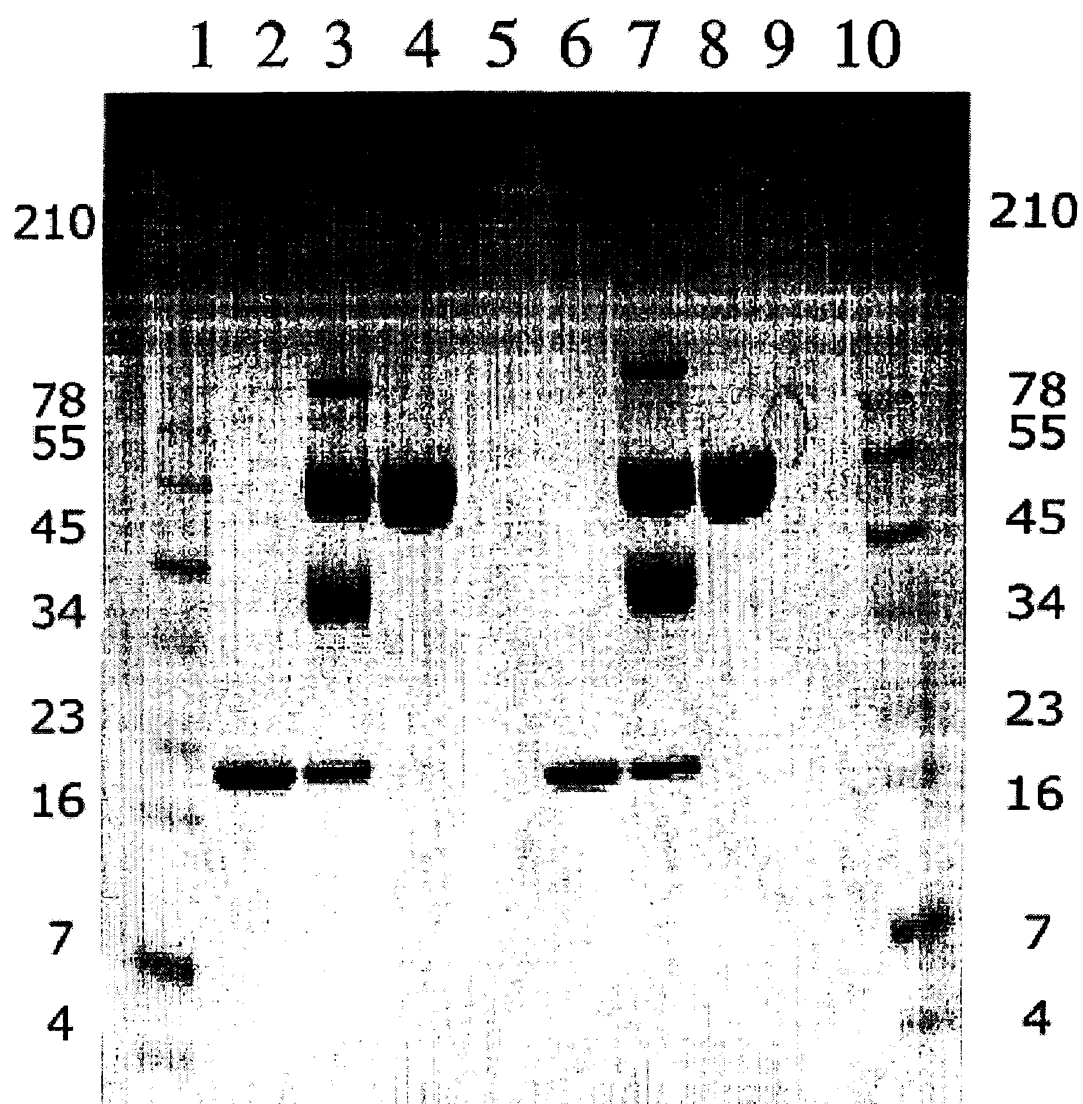

0.07 0.511
1.8 H + 2 (rel) =
1.5 old

30

PCT/US02/37270

1/8

1. ábra



PCT/US02/37270

2/8

2. ábra

1 2 3 4 5 6

210

78

55

45

34

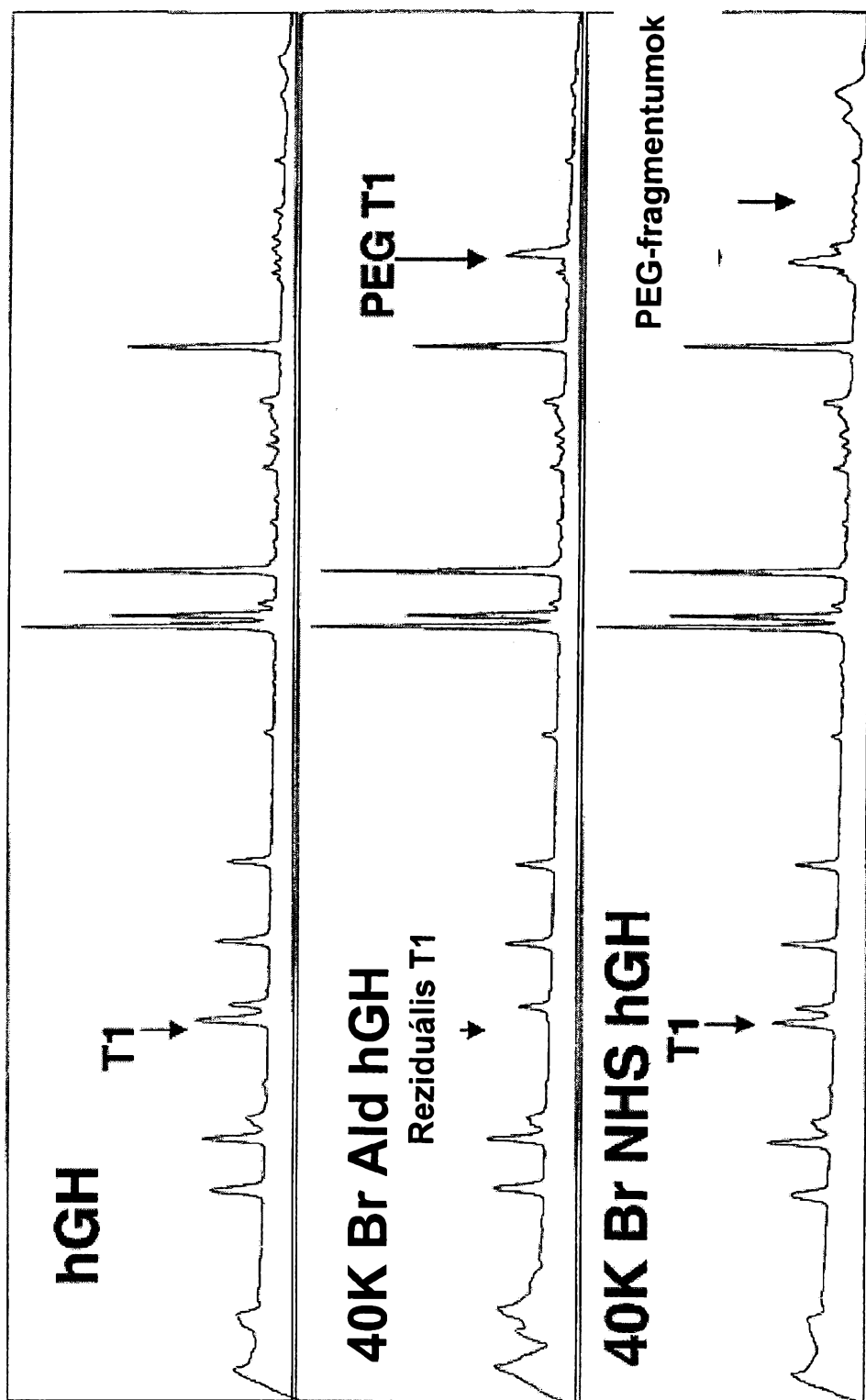
23

16

7



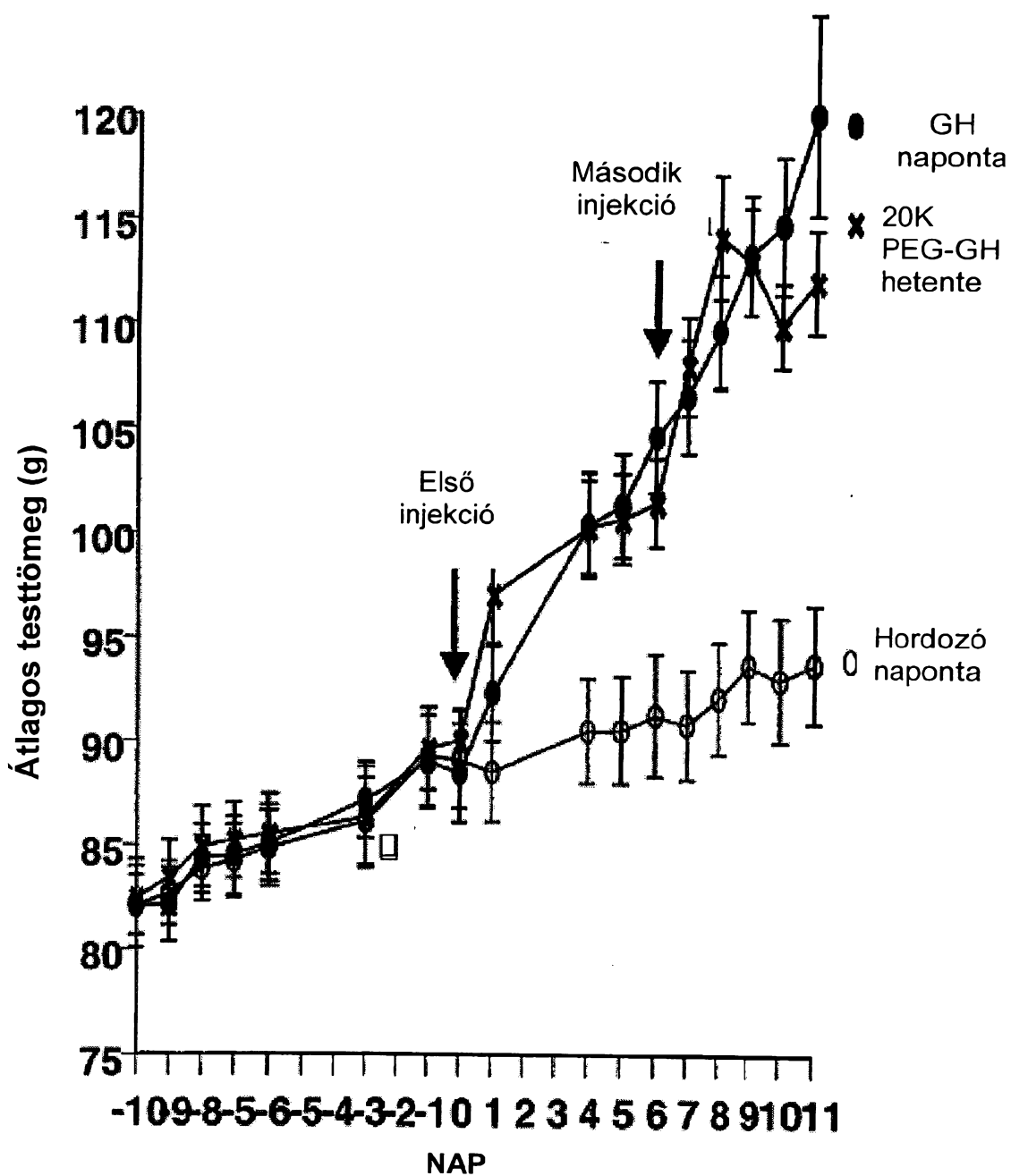
3. ábra



PCT/US02/37270

4/8

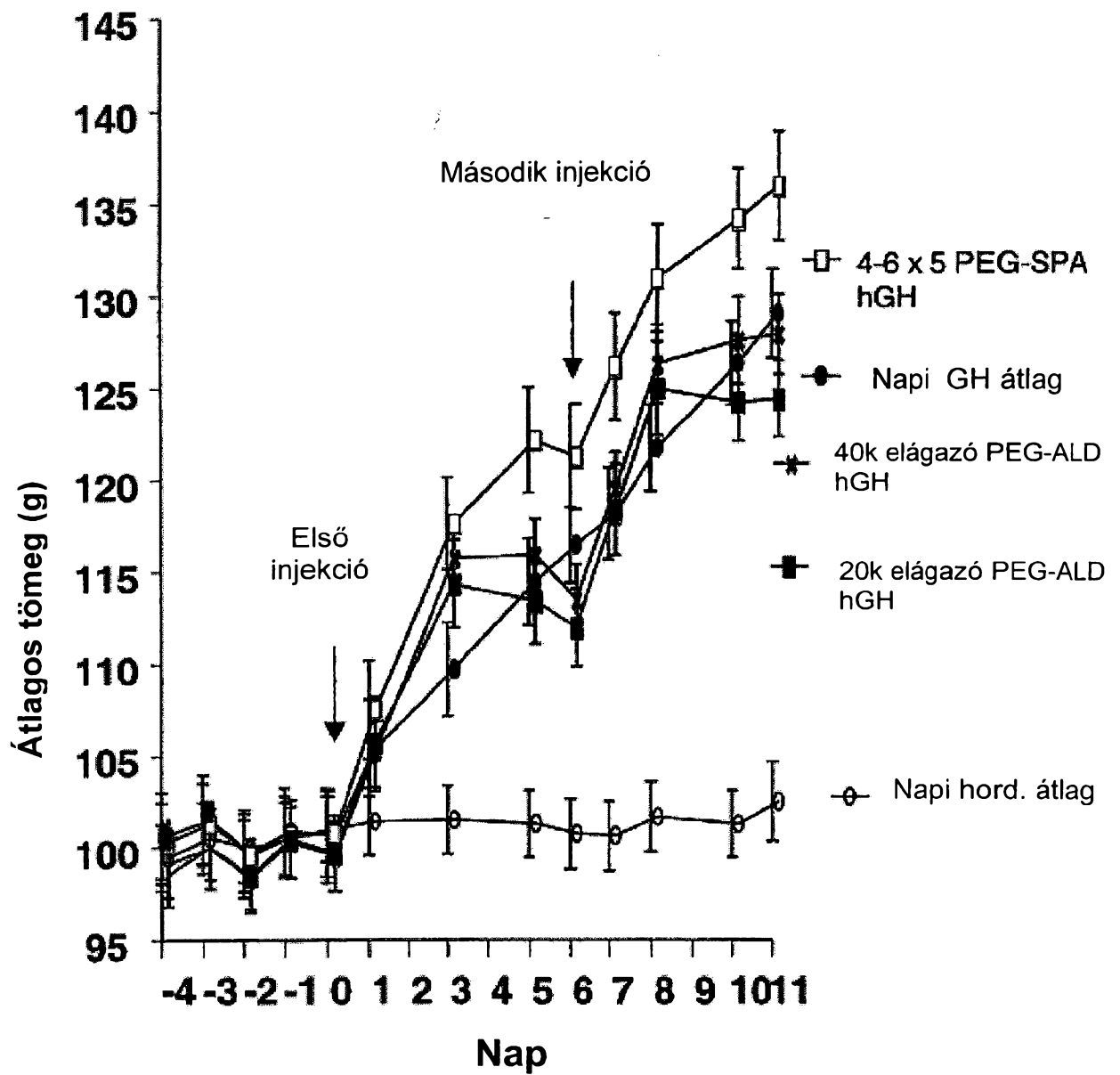
4. ábra



PCT/US02/37270

5/8

5. ábra

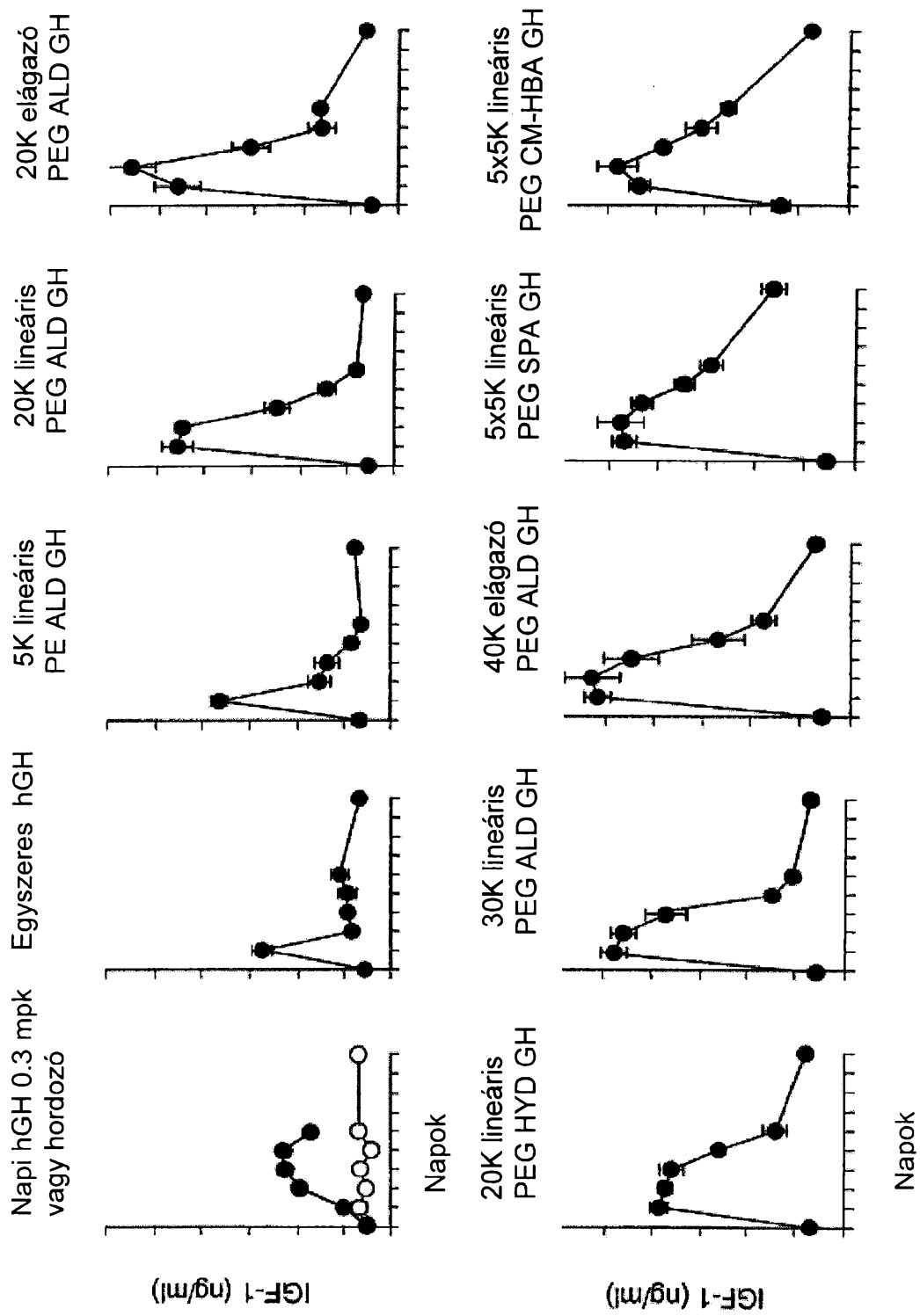


6. ábra

PCT/US02/37270

7/8

7. ábra



PCT/US02/37270

8/8

8. ábra

