

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/61

A61K 47/48

A61K 38/27



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02825928.9

[43] 公开日 2005 年 4 月 20 日

[11] 公开号 CN 1608079A

[22] 申请日 2002.11.20 [21] 申请号 02825928.9

[30] 优先权

[32] 2001.11.20 [33] US [31] 60/331,907

[86] 国际申请 PCT/US2002/037270 2002.11.20

[87] 国际公布 WO2003/044056 英 2003.5.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.22

[71] 申请人 法玛西雅公司

地址 美国密苏里州

[72] 发明人 R·F·菲恩 W·劳

N·R·斯格尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 13 页 说明书 33 页 序列表 2 页
附图 8 页

[54] 发明名称 化学修饰的人生长激素缀合物

[57] 摘要

本发明提供化学修饰的人生长激素(hGH)，它是通过水溶性聚合物与所述蛋白质结合制备的。与未修饰的 hGH 相比，本发明化学修饰的蛋白质具有更持久的 hGH 活性，可降低了剂量和安排给药时间。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 包括至少一种水溶性聚合物分子的缀合物，所述聚合物与生物活性人生长激素(hGH)多肽或其激动剂变异体的至少一个氨基酸残基共价连接。

2. 根据权利要求1的缀合物，其中所述人生长激素多肽包括 SEQ ID NO: 1 氨基酸顺序。

3. 根据权利要求1或2的缀合物，其中所述聚合物是聚氧乙烯分子。

4. 根据权利要求3的缀合物，其中所述聚氧乙烯分子是聚乙二醇分子。

5. 根据权利要求4的缀合物。其中聚乙二醇与具有游离氨基、羧基或巯基的氨基酸残基连接。

6. 根据权利要求5的缀合物，采用活化的聚乙二醇形成。

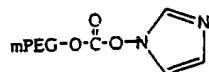
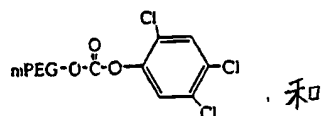
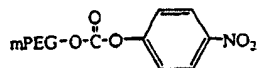
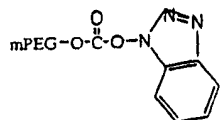
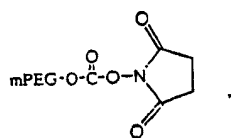
7. 根据权利要求6的缀合物，其中所述活化的聚乙二醇包括官能团。

8. 根据权利要求7的缀合物，其中所述连接在具有游离氨基的氨基酸上。

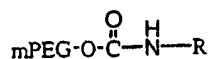
9. 根据权利要求8的缀合物，其中所述官能团选自：碳酸酯、羰咪唑、羧酸的活性酯、二氢唑酮、环二酰亚胺硫酮、异氰酸酯或异硫氰酸酯、亚氨酸酯和醛。

10. 根据权利要求9的缀合物，其中所述官能团碳酸酯或羰咪唑。

11. 根据权利要求10的缀合物，其中所述活化的聚乙二醇选自：



12. 根据权利要求 11 的缀合物, 具有以下结构:

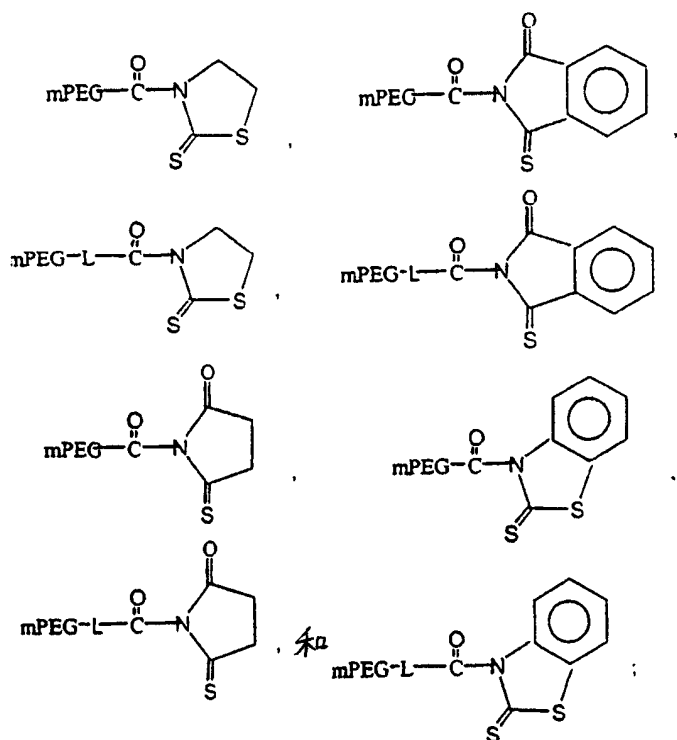


其中 R 是人生长激素多肽。

13. 根据权利要求 12 的缀合物, 其中所述人生长激素多肽包括 SEQ ID NO: 1 氨基酸顺序。

14. 根据权利要求9求的缀合物,其中所述官能团是环二酰亚胺硫酮。

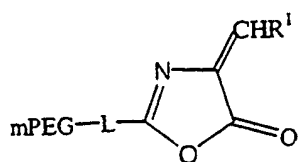
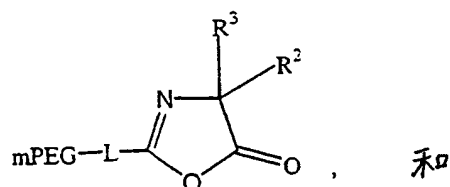
15. 根据权利要求 14 的缀合物, 其中所述活化的聚乙二醇选自:



其中 L 选自: $-O-$, $-NH-$, $-OCH_2-$, $-NH-CO(CH_2)_n-$, $-NH-CO(CH_2)_nO-$, $-CO-NH(CH_2)_n-$, $-S-$, $-CO-NH(CH_2)_nO-$, $-O(CH_2)_nO-$, $-O(CH_2)_n-$, $-SCH_2CH_2-$, 和 $-NH(CH_2)_n-$ 。

16. 根据权利要求 9 的缀合物, 其中所述官能团是二氢唑酮。

17. 根据权利要求 16 的缀合物, 其中所述活化的聚乙二醇选自:



其中

R_1 选自氢, 烷基, 环烷基, 碳环和杂环芳环, α , β -不饱和烷基;

和

R_2 和 R_3 独立地选自氢, 烷基, 芳基和烷基芳基。

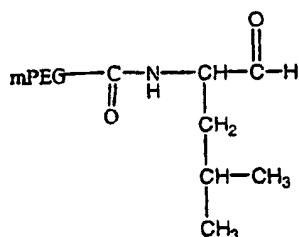
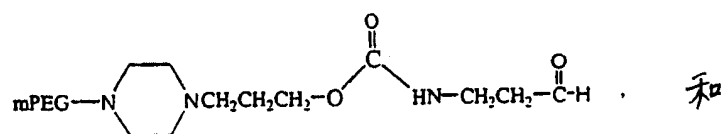
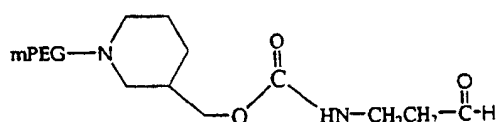
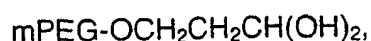
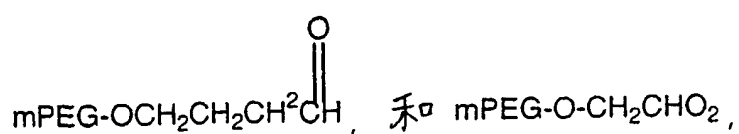
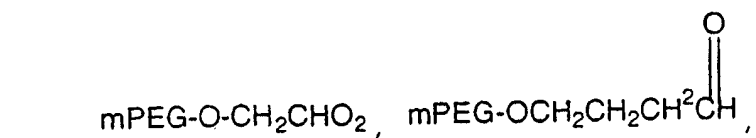
18. 根据权利要求 9 的缀合物, 其中所述官能团是异氰酸酯或异硫

氰酸酯。

19. 根据权利要求 18 的缀合物, 其中所述活化的聚乙二醇选自:
mPEG-N=C=O, 和 mPEG-N=C=S。

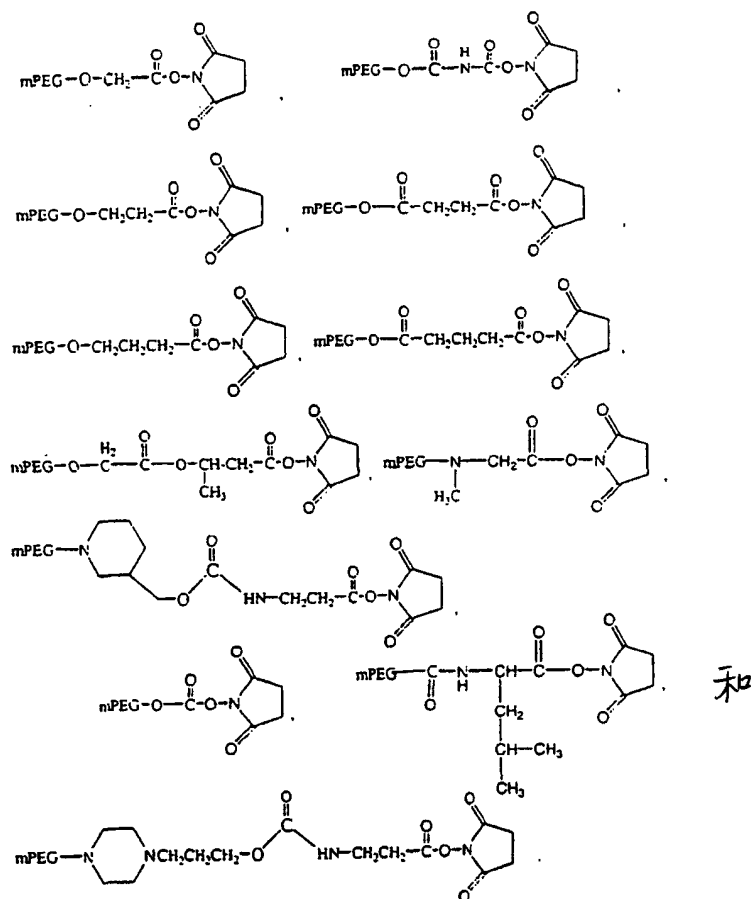
20. 根据权利要求 9 的缀合物, 其中所述官能团是醛或水合醛。

21. 根据权利要求 20 的缀合物, 其中所述活化的聚乙二醇选自:

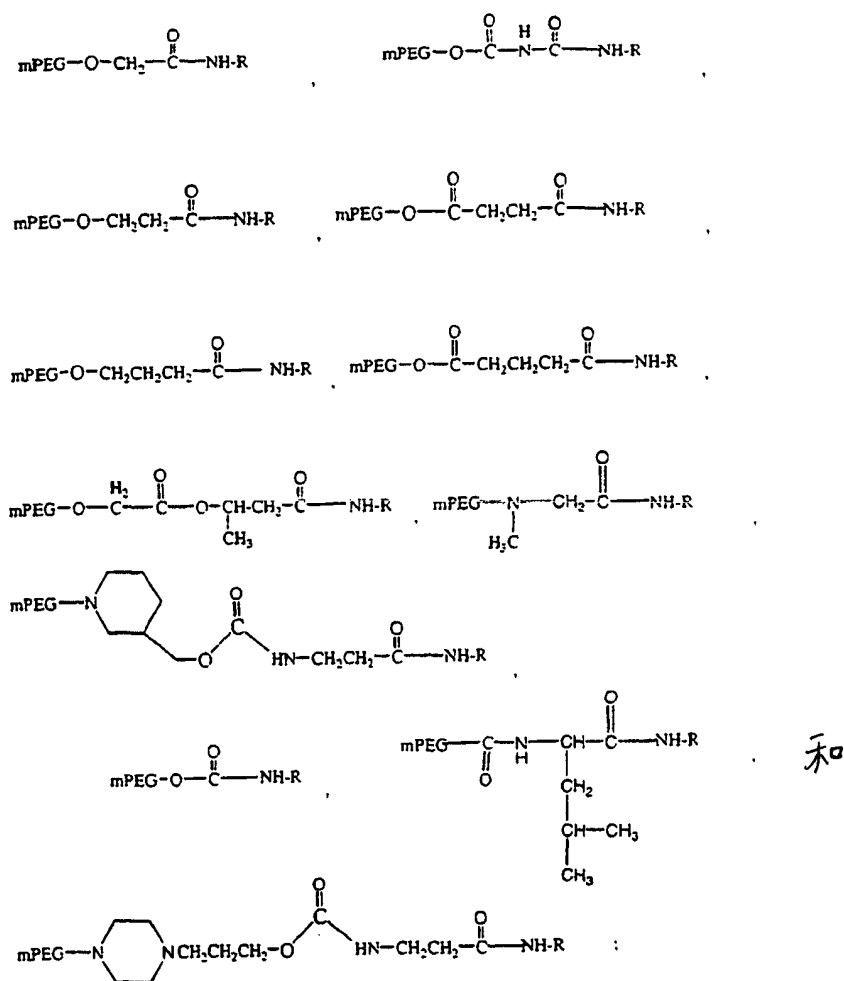


22. 根据权利要求 9 的缀合物, 其中所述官能团是羧酸的活性酯。

23. 根据权利要求 22 的缀合物, 其中所述活化的聚乙二醇选自:



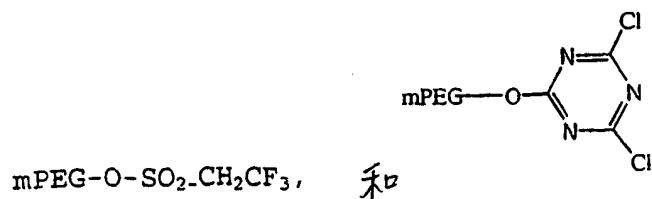
24. 根据权利要求 23 的缀合物, 具有选自以下的结构:



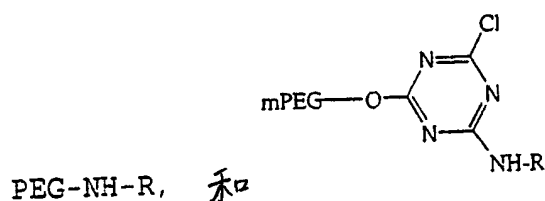
其中 R 是人生长激素多肽。

25. 根据权利要求 24 的缀合物, 其中所述人生长激素多肽包括 SEQ ID NO: 1 氨基酸顺序。

26. 根据权利要求 9 的缀合物, 其中所述活化的聚乙二醇选自:



27. 根据权利要求 26 的缀合物, 具有选自以下的结构:



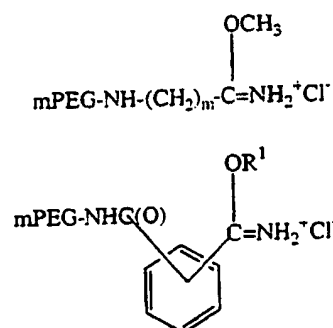
其中 R 是人生长激素多肽。

28. 根据权利要求 27 的缀合物, 其中所述人生长激素多肽包括 SEQ

ID NO: 1 氨基酸顺序。

29. 根据权利要求 28 的缀合物，其中所述官能团是亚氨酸酯。

30. 根据权利要求 9 的缀合物，其中所述活化的聚乙二醇选自：



其中 m 是 0-20，和，

其中 R¹ 是烷基，苯基，苯基烷基，和环烷基。

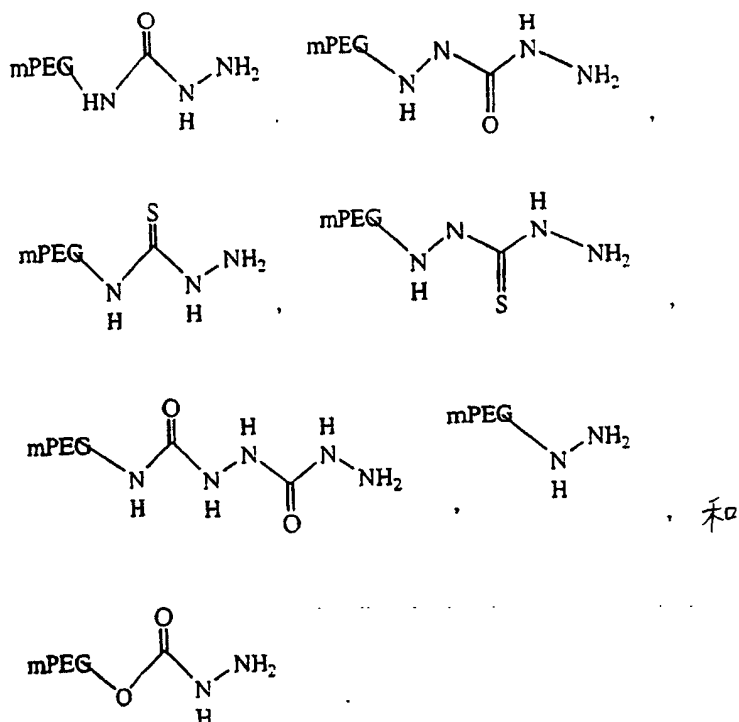
31. 根据权利要求 9 的缀合物，其中所述游离氨基是氨基端 α-氨基。

32. 根据权利要求 31 的缀合物，其中所述氨基端 α-氨基位于苯丙氨酸上。

33. 根据权利要求 8 的缀合物，其中所述连接在具有游离羧基的氨基酸上。

34. 根据权利要求 33 的缀合物，其中所述官能团选自：伯胺；胍；和酰胍官能团。

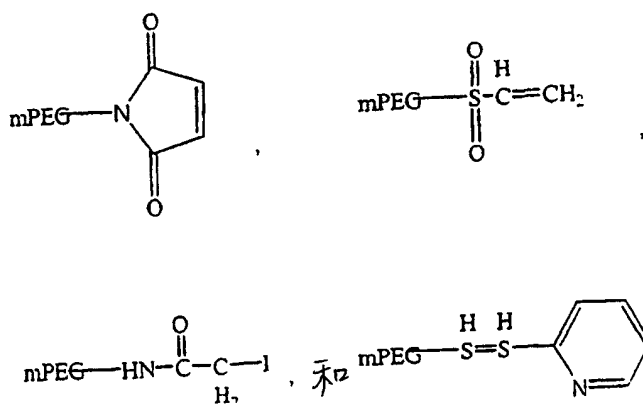
35. 根据权利要求 34 的缀合物，其中所述官能团选自：
mPEG-CH₂CH₂-NH₂， mPEG-O-CH₂-CO-NH-NH₂，



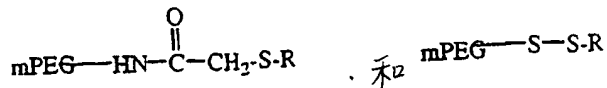
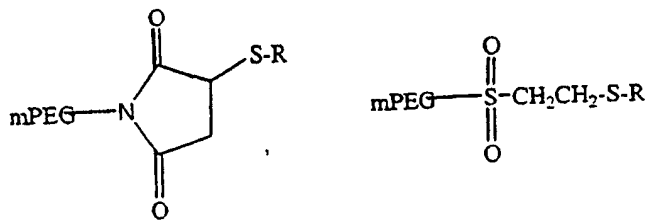
36. 根据权利要求 8 的缀合物, 其中所述连接在具有游离巯基的氨基酸上。

37. 根据权利要求 36 的缀合物, 其中所述官能团选自: 巯基; 马来酰亚胺; 乙烯基砷; 和苯乙二醛。

38. 根据权利要求 37 的缀合物, 其中所述官能团选自:



39. 根据权利要求 38 的缀合物, 具有选自以下的结构:



其中 R 是人生长激素多肽。

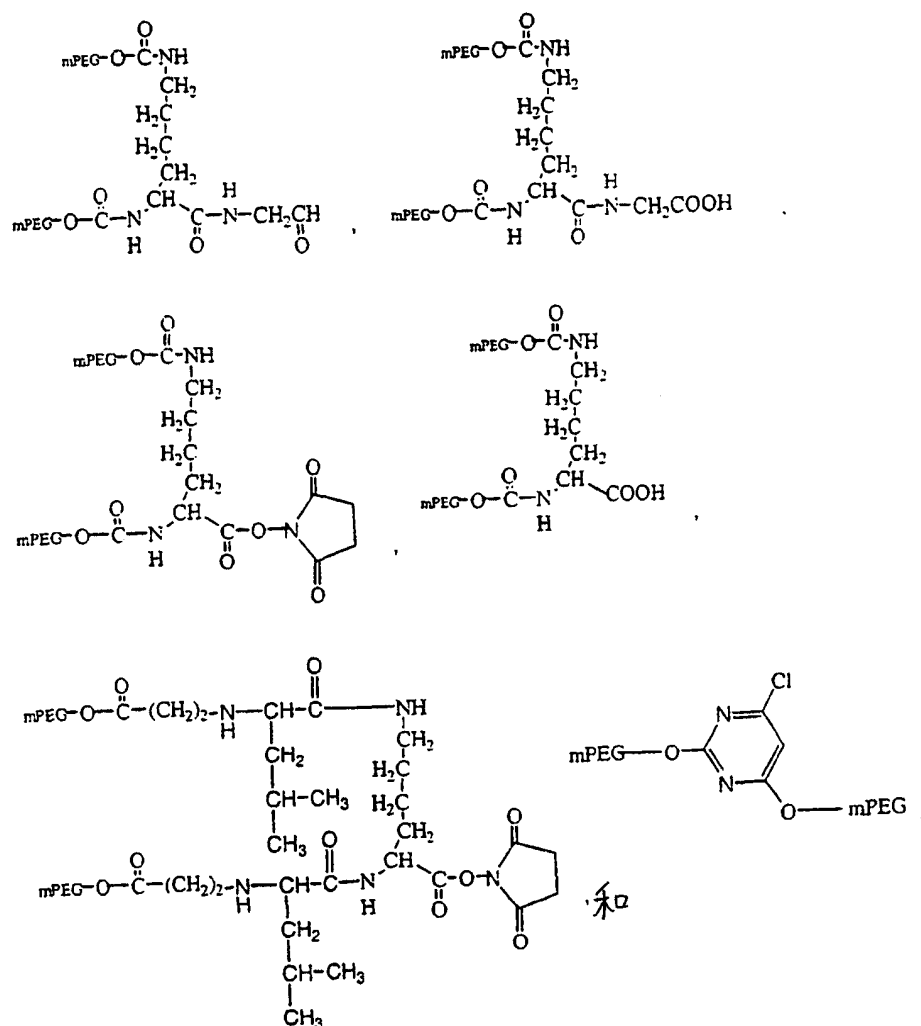
40. 根据权利要求 39 的缀合物, 其中所述人生长激素多肽包括 SEQ ID NO: 1 氨基酸顺序。

41. 根据权利要求 8 的缀合物, 其中所述聚乙二醇的分子量约为 0.5kD-100kDa。

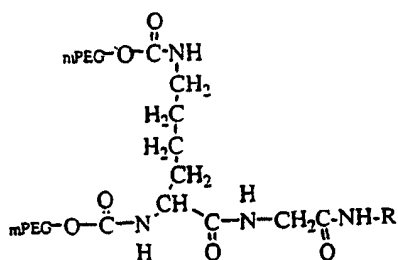
42. 根据权利要求 41 的缀合物, 其中所述聚乙二醇分子量约为 5kD-40kDa。

43. 根据权利要求 8 的缀合物, 其中所述聚乙二醇是分枝聚合物。

44. 根据权利要求 43 的缀合物, 其中所述分枝聚合物选自:



45. 具有以下结构的人生长激素-PEG 缀合物:



其中 R 是人生长激素多肽。

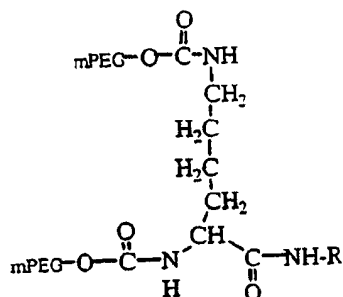
46. 根据权利要求 45 的缀合物, 其中所述人生长激素多肽包括 SEQ ID NO: 1 氨基酸顺序。

47. 根据权利要求 46 的缀合物, 其中至少 80% 的所述聚乙二醇与氨基端苯丙氨酸缀合。

48 根据权利要求 46 的缀合物, 其中至少 90% 的所述聚乙二醇与氨基端苯丙氨酸缀合。

49. 根据权利要求 47 或 48 的缀合物, 其中各 mPEG 的分子量约为 20kDa。

50. 具有以下结构的人生长激素-PEG 缀合物



其中 R 是人生长激素多肽。

51. 根据权利要求 50 的缀合物, 其中所述人生长激素多肽包括 SEQ ID NO: 1 氨基酸顺序。

52. 根据权利要求 51 的缀合物, 其中至少 80% 的所述聚乙二醇与氨基端苯丙氨酸缀合。

53. 根据权利要求 51 的缀合物, 其中至少 90% 的所述聚乙二醇与氨基端苯丙氨酸缀合。

54. 根据权利要求 52 或 53 的缀合物, 其中各 mPEG 的分子量约为 20kDa。

55. 具有 $\text{mPEG-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-R}$ 结构的人生长激素-PEG 缀合物, R 是人生长激素多肽。

56. 根据权利要求 55 的缀合物, 其中所述人生长激素多肽包括 SEQ ID NO: 1 氨基酸顺序。

57. 根据权利要求 56 的缀合物, 其中至少 80% 的所述聚乙二醇与氨基端苯丙氨酸缀合。

58. 根据权利要求 56 的缀合物, 其中至少 90% 的所述聚乙二醇与氨基端苯丙氨酸缀合。

59. 根据权利要求 57 或 58 的缀合物, 其中各 mPEG 的分子量约为 20kDa。

60. 根据权利要求 8 的缀合物, 其中所述聚乙二醇是双官能聚合物。

61. 根据权利要求 8 的缀合物, 其中所述聚乙二醇是前体药物。

62. 组合物, 包括如权利要求 1 的人生长激素和至少一种可药用载体。

63. 治疗生长或发育障碍患者的方法, 包括将治疗有效量的如权利要求 1 的 hGH 缀合物给予所述患者。

64. 根据权利要求 63 的方法, 其中所述生长或发育障碍是生长激素缺乏 (GHD)。

65. 根据权利要求 63 的方法, 其中所述生长或发育障碍是 Turner 综合症。

66. 根据权利要求 63 的方法, 其中所述生长或发育障碍是慢性肾功能不全。

67. 根据权利要求 63 的方法, 其中所述生长或发育障碍是小于胎龄 (SGA)。

68. 组合物, 包括如权利要求 48 的人生长激素和至少一种可药用载体。

69. 治疗生长或发育障碍患者的方法, 包括将治疗有效量的如权利要求 48 的 hGH 缀合物给予所述患者。

70. 根据权利要求 69 的方法, 其中所述生长或发育障碍是生长激素缺乏 (GHD)。

71. 根据权利要求 69 的方法, 其中所述生长或发育障碍是 Turner 综合症。

72. 根据权利要求 69 的方法, 其中所述生长或发育障碍是慢性肾功能不全。

73. 根据权利要求 69 的方法, 其中所述生长或发育障碍是小于胎龄 (SGA)。

74. 组合物, 包括如权利要求 50 或 55 的 hGH 和至少一种可药用载体。

75. 治疗生长或发育障碍患者的方法, 包括将治疗有效量的如权利要求 74 的 hGH 缀合物给予所述患者。

76. 根据权利要求 75 的方法, 其中所述生长或发育障碍是生长激

素缺乏 (GHD)。

77. 根据权利要求 75 的方法, 其中所述生长或发育障碍是 Turner 综合症。

78. 根据权利要求 75 的方法, 其中所述生长或发育障碍是慢性肾功能不全。

79. 根据权利要求 75 的方法, 其中所述生长或发育障碍是小于胎龄 (SGA)。

化学修饰的人生长激素缀合物

根据 35U.S.C. § 119(e) 的规定, 本申请要求 2001 年 11 月 20 日提交的美国临时申请 60/331,907 的优先权, 该在先申请的全部公开内容在此引入作为参考。

发明领域

本发明涉及化学修饰的人生长激素 (hGH) 及其激动剂变异性, 其中 hGH 的化学和/或生理特性已发生改变。PEG 化的 hGH 可能增加血浆驻留时间、降低清除率、改善稳定性、减少抗原性或上述优点的组合。本发明也涉及修饰 hGH 的方法。另外, 本发明涉及含有所述经修饰的 hGH 的药用组合物。另一实施方案涉及所述修饰的 hGH 在治疗生长发育病症中的应用。

发明背景

人生长激素 (hGH) 是包括经两个二硫桥交联的 191 个氨基酸单链的蛋白质, 其单体形式的分子量为 22kDa。人生长激素由脑下垂体分泌, 也能由重组遗传工程获得。hGH 能促使所有能生长身体组织的生长。重组 hGH 已经市售多年。目前市售的两类治疗用重组 hGH 制剂为: 经认证的例如 Genotropin™, 或 Nutropin™, 和在氮端带有额外的甲硫氨酸残基的类似物, 例如 Somatonorm™。hGH 用于刺激具有垂体机能不足的侏儒症 (也称生长激素缺乏 (GHD)) 或 Turner 综合症患者的线性生长 (linear growth), 但也适于其他适应症, 包括: 长期治疗出生时胎龄 (SGA) 不足的儿童生长不足, 治疗普-拉-威综合症 (PWS) 患者, 慢性肾功能不全, 艾滋病衰竭, 和衰老。

生长激素 (GH) 的主要生物效应是促进幼小哺乳动物生长和维持老年哺乳动物的组织。受其影响的器官系统包括骨骼, 结缔组织, 肌肉,

和内脏例如肝、肠，和肾。生长激素通过与靶细胞膜上的特殊受体相互作用而发挥其作用。hGH 是同源激素家族一员中的，该家族包括胎盘催乳素、促乳激素，和其它遗传和物种的变异体或生长激素(Nicoll, C. S. 等, (1986) *Endocrine Reviews* 7: 169)。hGH 是其中的独特激素，它具有广谱的物种特异性，并能与克隆的体细胞(somatogenic)(Leung, D. W. 等, [1987] *Nature* 330: 537)、或促乳激素受体(Boutin 等, *J. M. Cell*[1988]53: 69)结合。已在大肠杆菌中以分泌形式表达了 hGH 的克隆基因(Chang, C. N 等, [1987] *Gene* 55: 189)，并且其 DNA 和氨基酸序列也有报道(Goeddel 等, [1979] *Nature* 281: 544; Gray 等, [1985] *Gene* 39: 247]。

人生长激素(hGH)参与正常人生长发育的许多调节。垂体激素表现出许多生物效应，包括线性生长即体质形成、泌乳、巨噬细胞的激活、胰岛素样和致糖尿病作用等(Chawla, R, K. (1983) *Ann. Rev. Med.* 34, 519; Edwards, C. K. 等, (1988) *Science* 239, 769; Thomer, M. O, 等, (1988) *J. Clin. Invest.* 81: 745)。儿童生长激素缺乏可导致侏儒症，过去十年来已通过外源性施用 hGH 成功治疗了侏儒症。

人生长激素(hGH)是由 191 个氨基酸构成的单链多肽(分子量 21,500)。二硫键连结位置 53 和 165 及位置 182 和 189(Niall, *Nature, New Biology*, 230: 90(1971))。hGH 是有效的同化激素类药，尤其是由于对氮、磷、钾和钙的驻留能力。经 GH 治疗的垂体切除的大鼠能至少部分地恢复其生长速度(Moore 等, *Endocrinology* 122: 2920-2926(1988))。它对垂体机能不足的 (GH-缺陷)受试者的最显著作用是加速了骨-生长-板(plate)-软骨的线性生长，从而使身高增长(Kaplan, *Growth Disorders in Children and Adolescents*(Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1964))。

hGH 可在各种动物模型中产生多种生理性和代谢作用，包括线性骨生长、泌乳、巨噬细胞的激活、胰岛素样和致糖尿病作用等(R. K. Chawla 等, *Annu. Rev. Med.* 34: 519(1983); O. G. P. Isaksson 等, *Annu. Rev. Physio.* 47, 483(1985) ; C. K. Edwards 等, *Science*

239,769(1988); M. O. Thomer 和 M. L. Vance, *J. Clin. Invest.* 82: 745(1988); J. P. Hughes 和 H. G. Friesen, *Ann. Rev. Physiol.* 47: 469(1985)。据报道,特别是经绝后女性的生长激素分泌随着年龄而下降。Millard 等, *Neurobiol. Aging*, 11: 229-235(1990); Takahashi 等, *Neuroendocrinology M*, L6-137-142(1987)。参见 Rudman 等, *J. Clin. Invest.*, 67: 1361-1369(1981) 和 Blackman, *Endocrinology and Aging*, 16: 981(1987)。此外,据报道,每周用 GH 治疗 3 次,可减少衰老表现(包括瘦体重下降、脂肪组织体重增加、和皮肤变薄)。参见例如 Rudman 等, *N. Eng. J. Med.*, 323: 1-6(1990), 和 Dr. Vance 在该杂志中的文章(52-54 页)。这些生物效应来源于 hGH 与特定细胞受体之间的相互作用。已克隆出两种不同的人受体,即 hGH 肝受体(D. W. Leung 等, *Nature* 330: 537(1987)) 和人催乳素受体(J. M. Boutin 等, *Mol. Endocrinology*. 3: 1455(1989))。然而,还可能存在其它受体,包括人胎盘催乳素受体(M. Freemark, M. Comer, G. Komer 和 S. Handwerger, *Endocrinol.* 120: 1865(1987))。这些同源受体含有序列和尺寸相差较大的糖基化的胞外激素结合域、单一跨膜结构域和胞浆区。据信一种或更多受体在对 hGH 的生理反应起着决定性作用。

通常可以观察到,施用到身体中的生理学活性蛋白质的药理学活性作用时间较短,这是由于它们在体内的高清除率。此外,这些蛋白质相对的疏水性可能限制了它们的稳定性和/或溶解性。

已有一些方法用来降低治疗性蛋白质的清除率、改善其稳定性或消除其抗原性,这包括用水溶性聚合物化学修饰所述蛋白质。这种类型的化学修饰能有效地阻滞蛋白水解酶与蛋白质主链直接接触,这样就防止了降解。与某些水溶性聚合物化学性连接,使分子的流体动力学体积(hydrodynamic volume)增加,从而可有效降低肾清除率。额外的优点包括,在某些情况下还可增加治疗性蛋白质的稳定性和循环时间、增加其溶解性和降低免疫原性。

聚(环氧烷烃)、特别是聚乙二醇(PEG),就是一种用于制备治疗性蛋白质产品的化学部分(动词“PEG 化”是指连接至少一种 PEG 分子)。

连接聚乙二醇能防止蛋白水解 (Sada 等, *J. Fermentation Bioengineering* 71: 137-139 (1991)), 并且连接某些聚乙二醇部分的方法是已知的。参见专利 US4,179,337, Davis 等, “Non-Immunogenic Polypeptides”, 1979 年 12 月 18 日公开; 和 US4,002,531, Royer, “Modifying enzymes with Polyethylene Glycol and Product Produced Thereby”, 1977 年 1 月 11 日公开。和 Abuchowski 等在 Enzymes as Drugs 中的综述 (J. S. Holcerberg 和 J. Roberts, 编辑, 367-383 页 (1981))。

其它水溶性聚合物也已经使用, 例如乙二醇/丙二醇的共聚物, 羧甲基纤维素, 葡聚糖, 聚乙烯醇, 聚乙烯基吡咯烷酮, 聚(-1,3-二氧戊环), 聚(-1,3,6-三噁烷), 乙烯基/马来酐共聚物, 聚-氨基酸(均聚物或无规共聚物)。

许多文献描述了 PEG 化治疗性蛋白质的示例。ADAGEN[®], 是腺苷脱氨酶的 PEG 化制剂, 已被批准用于治疗严重联合免疫缺陷病。ONCASPAR[®], PEG 化的 L-天冬酰胺酶已被批准用于治疗所有患者的过敏。PEG 化的超氧化物歧化酶也已处于治疗颅脑损伤的临床试验中。PEG 化的 α -干扰素 (US5,738,846、US5,382,657) 已被批准用于治疗肝炎; 报道据 PEG 化的葡糖脑苷脂酶和 PEG 化的血色素也处于临床前试验阶段。另一个示例是 PEG 化的 IL-6, EF0442724 (名称为“改性的 hIL-6”), 其中公开了连接有聚乙二醇分子的 IL-6。

另一经化学修饰的特定的治疗性蛋白质是粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)。G-CSF 诱导嗜中性粒细胞快速增殖并释放到血流中, 从而在抗感染中提供治疗作用。1990 年 12 月 12 日公开的欧洲专利文本 EP0401384 (名称为 “Chemically Modified Granulocyte Colony Stimulating Factor”), 描述了用于制备连接有聚乙二醇的 G-CSF 的材料和方法。EP0473268 (1992 年 3 月 4 日公开, 名称为 “Continuous Release Pharmaceutical Compositions Comprising a Polypeptide Covalently Conjugated To A Water Soluble Polymer”), 描述了经修饰的 G-CSF 及其类似物, 其中衍生物与水溶性颗粒聚合物例如聚乙二

醇的共价缀合。1989年10月4日公开的EP0335423报道了具有粒细胞集落刺激因子活性的修饰多肽。US5,824,784描述了N-端修饰蛋白质或其类似物的方法和所得到的组合物,包括新颖的N-端化学修饰的G-CSF组合物。US5,824,778公开了化学修饰的G-CSF。

已有许多方法可将聚乙二醇分子连接到蛋白质上。通常,聚乙二醇经蛋白质上的反应基与蛋白质连接。

氨基(例如赖氨酸残基上的氨基或N-端的氨基)适于这种连接。例如,Royer(US4,002,531,同上)描述了用于连接聚乙二醇分子和酶的还原性烷基化反应。EP0539167(Wright, 1993年4月28日公开,“PEG Imidates and Protein Derivatives Thereof”)指出,具有游离氨基的肽和有机化合物可用PEG的亚氨酸酯(imidate)衍化物或相关的水溶性有机聚合物修饰。US5,298,643和US5,637,749公开了PEG芳基亚氨酸酯。

Chamow等, *Bioconjugate Chem.* 5: 133-140(1994)报道了用单甲氧基聚乙二醇醛通过还原性烷基化作用修饰CD4免疫粘和素。该作者报道,在控制PEG化程度的条件下,有50%的CD4-Ig被MePEG修饰(同前,137页)。作者还报道经修饰的CD4-Ig的体外结合(与蛋白gp120)能力降低,其降低速度与MePEG化程度相关(出处同前)。US4,904,584(Shaw, 1990年2月27日公布)涉及对蛋白质上的许多赖氨酸残基进行修饰,使之通过活性胺基与聚乙二醇连接。

许多用于连接聚合物和蛋白质的方法均涉及采用起连接基作用的部分(moiety)。然而,这种连接基部分可能是抗原性的。有一种氯化三氟乙烷磺酰(tresyl chloride)方法不采用连接基,但是这种方法难以用来生产治疗性产品,因为氯化三氟乙烷磺酰可能产生毒性副产物。参见Francis等在 Stability of protein pharmaceuticals: in vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization(Ahern, T. 和 Manning, M.C. 编辑, Plenum出版社, 纽约, 1991), 及 Delgado 等, “Coupling of PEG to Protein By Activation With Tresyl Chloride, Applications In Immunoaffinity Cell

Preparation”，在 Separations Using Aqueous Phase Systems, Applications In Cell Biology and Biotechnology, Fisher 等编辑, Plenum 出版社, 纽约, N. Y., 1989, 211-213 页)。

同时参见 Rose 等 (*Bioconjugate Chemistry* 2: 154-159 (1991)), 报道了连接基碳酰肼(carbohydrazide)与蛋白质底物(胰岛素)上 C 端羧基的选择性结合。

W093/00109 涉及刺激哺乳动物或鸟类 GH 应答组织的方法, 包括在 3 天或更长时间内维持连续的有效血浆 GH 浓度。据称, 使用 GH 与大分子物质例如 PEG (聚乙二醇) 结合, 可达到这种血浆浓度。据称与大分子物质的结合能提高半衰期。W093/00109 报道了 PEG 化的人生长激素, 其中采用了 mPEG 醛-5000 和 mPEG N-羟基琥珀酰亚胺酯 (mPEG-NHS-5000)。使用 mPEG-NHS, 可形成多 PEG 化形式的 hGH 的非均匀混合物。W093/00109 也公开了用 mPEG-马来酰亚胺对半胱氨酸 hGH 变体进行 PEG 化。

W099/03887 公开 PEG 化的半胱氨酸变体生长激素。命名为 BT-005, 据称这种缀合物在刺激生长激素缺乏的大鼠的体重增加方面比 hGH 更有效, 且具有更长的半衰期。

Clark 等也报道了采用羧甲基化 PEG 的琥珀酰亚胺酯进行人生长激素的 PEG 化 (*Journal of Biological Chemistry* 271: 21969-21977, 1996)。Clark 等描述, 使用能选择性结合伯胺的 mPEG-NHS-5000, 可增加 hGH 衍生物的尺寸。增加 PEG 修饰水平, 可降低其对受体的亲和力, 并使 EC_{50} 增加 1500 倍 (细胞水平分析)。Olson 等 (*Polymer Preprints* 38: 568-569, 1997) 公开了采用 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) PEG 和琥珀酰亚胺丙酸酯 (SPA) PEG 得到 hGH 的多 PEG 化种类。

W094/20069 预言性地公开了作为肺部给药制剂一部分的 PEG 化的 hGH。

US4, 179, 337 公开 PEG 化酶和激素的方法, 其中得到了生物活性的非免疫原性水溶性多肽缀合物。其中 GH 是被 PEG 化的激素的一个示例。

EP458064A2 公开对生长激素中引入或天然存在的半胱氨酸残基进行 PEG 化的方法。EP458064A2 还提到环(术语为位于野型牛生长激素中残基 102-112 上的 ω 环)中的两个半胱氨酸残基的插入(incorporation), 更具体地说, EP458064A2 公开牛生长激素上编号 102 和 112 残基分别由 Cys 取代 Ser 和由 Cys 取代 Tyr。

W095/11987 认为 PEG 可与母体分子中存在或者经定向诱变引入的半胱氨酸残基上的巯基结合。W095/11987 涉及 PEG 化蛋白酶连结素-1, 同时也提出 hGH 和其它蛋白质通常可以被 PEG 化。

例如, W099/03887 公开了修饰的生长激素, 其中经丝氨酸残基插入额外的半胱氨酸, 使 PEG 与引入的半胱氨酸残基结合。

W000/42175 涉及制备含有供 PEG 结合的游离半胱氨酸残基的蛋白质的方法。W000/42175 公开了 hGH 的下列突变蛋白质: T3C, S144C 和 T148C, 及其半胱氨酸 PEG 化。

wo9711178 (以及 US5849535, US6004931 和 US6022711) 涉及以生长激素变异体作为 hGH 的激动剂或拮抗物。W09711178 也公开人生长激素的 PEG 化, 包括赖氨酸的 PEG 化和引入或取代赖氨酸(例如 K168A 和 K172R)。W09711178 也公开了取代 G120K。

前述 PEG 化的 hGH 需要与多个 PEG 结合以形成大于 70K 分子量的流体动力学体积而被肾过滤截留(Knauf M. J. 等, *J. Biol. Chem.* 263: 15064-15070, 1988), 这可能产生不利的产品异质性(heterogeneity)。

具有较长循环半衰期的 GH 分子将降低必要的给药次数, 并可能在提供更优化的治疗 hGH 水平的同时增加治疗作用。

本发明提供化学修饰的 hGH 缀合物, 其具有降低了的不均匀性、降低了的清除率、增加的血浆驻留持续时间、改善的溶解性、提高的稳定性、降低了的抗原性或上述优点的组合。

发明概述

本发明涉及化学修饰的 hGH 及其激动剂变异体, 其具有至少一种但并不限于以下改善的化学或生理特性: 降低的清除率、提高的血浆驻留

持续时间、提高稳定性、改善的溶解性和降低的抗原性。这样，如下面更为详细的描述所述，本发明涉及与化学修饰的 hGH 及其激动剂变异性、以及采用多种聚乙二醇部分进行的特定修饰等有关的方面。

本发明还涉及生产化学修饰的 hGH 及其激动剂变异体的方法。

本发明还涉及包括化学修饰的 hGH 及其激动剂变异体的组合物。

本发明经修饰的 hGH 及其激动剂变异性可用于治疗以下疾病，包括但不限于侏儒症 (HD)、成年人 GHD、Turner 综合症、出生时小于胎龄 (SGA) 的儿童生长疾病的长期治疗、治疗普-拉-威综合症 (PWS) 患者、慢性肾功能不全 (CRI)、Aids 衰竭、衰老、终末期肾衰竭和囊性纤维化。

附图简述

附图 1 是对 hGH 和 20K PEG-ALD 和阴离子交换纯化的 20K PEG-ALD hGH 反应产物进行的还原和非还原性 SDS-PAGE 分析。泳道 1. MW 蛋白质标准；泳道 2. 还原的 hGH-10 μ g；泳道 3. 还原的 20 K 线性 PEG-ALD hGH 反应混合物-10 μ g；泳道 4. 还原的阴离子交换纯化的 20 K 线性 PEG-ALD hGH-10 μ g；泳道 5. 空白；泳道 6. 未还原的 hGH-10 μ g；泳道 7. 未还原的 20 K 线性 PEG-ALD hGH 反应混合物-10 μ g；泳道 8. 未还原的阴离子交换纯化的 20K 线性 PEG-ALD hGH-10 μ g；泳道 9. 空白；泳道 10. MW 蛋白质标准。

附图 2 是对各种阴离子交换纯化的 PEG 化 hGH 分子的非还原性 SDS-PAGE 分析。泳道 1. MW 蛋白质标准；泳道 2. hGH-10 μ g；泳道 3. 4-6 $\times$ 5K PEG-SPA hGH-10 μ g；泳道 4. 20K 线性 PEG-ALD hGH-10 μ g；泳道 5. 20K 支链 PEG-ALD hGH-10 μ g；泳道 6. 40K 支链 PEG hGH-10 μ g。

附图 3 为胰蛋白酶消化 hGH、40K Br PEG-ALD hGH 和 40K Br PEG-NHS hGH 的 RP-HPLC 洗脱图。PEG 主要与 hGH 的 N 端结合 (如 40K Br ALD hGH 所示)，使 N 端 (T1) 碎片峰减少，而产生新 PEG 化的 T1 峰。

附图 4 为未 PEG 化 hGH (日剂量，0.3 mg/Kg/天) 与单 PEG 化 (每 6 天皮下 (SC) 施用一次，1.8mg/Kg) 体内生物活性的比较结果，以垂体切

除的大鼠在 11 天中的体重增加表示。

附图 5 为未 PEG 化 hGH (每日 SC, 0.3 mg/Kg/天) 与 4-6 × 5K PEG-SPA-hGH、单 PEG 化的 20K 支链 PEG-ALD hGH、和单 PEG 化的 40K 支链 PEG-ALD hGH (每 6 天 SC 一次, 1.8 mg/Kg) 体内生物活性的比较结果, 以垂体切除的大鼠在 11 天中的体重增加表示。

附图 6 为未 PEG 化的 hGH (每日 SC, 0.3 mg/Kg/天) 与 4-6 × 5K PEG-CMHBA-hGH、单 PEG 化的 20K 线性 ALD、单 PEG 化的 30K 线性 ALD、单 PEG 化的 20K 支链 PEG-ALD hGH 及单 PEG 化的 40K 支链 PEG-ALD hGH (每 6 天 SC 一次, 1.8 mg/Kg) 的体内生物活性比较结果, 以垂体切除大鼠在 11 天中的体重增加表示。

附图 7 为 1.8 mg/Kg 单 SC 剂量的未 PEG 化 hGH 与单 PEG 化的 5K 线性 PEG-ALD hGH、单 PEG 化的 20K 线性 PEGALD hGH、单 PEG 化 20K 支链 PEG-ALD hGH、单 PEG 化的 20K 线性 PEG-Hydrazide hGH、单 PEG 化的 30K 线性 PEG-ALD hGH、单 PEG 化的 40K 支链 PEG-ALD hGH、4-6 × 5K PEGSPA hGH、4-6 × 5K PEG-CMHBA hGH 的体内生物活性比较结果, 以垂体切除大鼠在 9 天中的血浆 IGF-1 水平增加表示。

发明详述

HGH 及其激动剂变异体属于重组蛋白质家族的成员, 参见 US4658021 和 US5633352 的描述。有关它们的重组生产和使用方法参见 US4342832、4601980; US4898830; US5424199 和 US5795745。

采用由宿主细胞 (例如经重组遗传技术转化或转染的大肠杆菌和动物细胞) 产生的任何纯化和分离的 hGH 或其激动剂变异体, 均可用于本发明。另外的 hGH 变异体见 1991 年 6 月 14 日提交的美国专利申请 07/715、1991 年 8 月 9 日提交的美国序列申请 07/743, 614, 和 1992 年 6 月 11 日公开的 W092/09690 中的描述。其中尤其优选经转化的大肠杆菌产生的 hGH 或其激动剂变异体。可大批量地获得高纯度和同质性 (homogeneity) 的这种 hGH 或其激动剂变异体。例如, 可采用 US4, 342, 832、US4, 601, 980、US4, 898, 830、US5, 424, 199 和 US5, 795, 745

描述的方法，制备上述 hGH 或其激动剂变异体。术语“基本上含有以下氨基酸序列”是指上述氨基酸序列可能包括氨基酸变化(缺失、添加、插入或替换)，条件是这种变化不会对 hGH 或其激动剂变异体的功能产生任何不利的非相似性(non-similarity)。更优选使用基本上具有氨基酸序列的 hGH 或其激动剂变异体，其中包括至少一种赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、未配对的半胱氨酸残基、游离氮端 α -氨基或游离 C 端羧基。

根据本发明，聚乙二醇通过氨基酸残基与 hGH 或其激动剂变异体共价结合。许多具有不同官能团、连接子、构型和分子量的活化聚乙二醇在本领域是已知的，它们可用于生产 PEG-hGH 缀合物或 PEG-hGH 激动剂变异体缀合物(参见综述 Roberts M. J. 等, *Adv Drug Del. Rev.* 54: 459-476, 2002; Harris J.M. 等, *Drug Delivery Systems* 40: 538-551, 2001)。氨基酸残基可以是任何活性的氨基酸残基，其中具有例如游离氨基、羧基、硫氢基(巯基)、羟基、胍基(guanidiny1)或咪唑基(imidizoy1)基可与活化的聚乙二醇的末端反应基结合。

具有游离氨基的氨基酸残基包括赖氨酸残基和/或 N-端氨基酸残基，那些具有自由羧基的残基可包括天冬氨酸、谷氨酸和/或 C 端氨基酸残基，那些具有游离硫氢基(巯基)的残基例如半胱氨酸，那些具有游离羟基的残基例如丝氨酸或酪氨酸，那些具有游离胍基的残基例如精氨酸，和那些具有游离咪唑基的残基例如组氨酸。

在另一个实施方案中，胍类化学物质(Lemieux&Bertozzi *Tib Tech* 16: 506-513, 1998)被用来靶向 N-端丝氨酸残基。

本发明所用的聚乙二醇不局限于任何特殊形式或分子量范围。聚乙二醇分子量为 500-100,000。通常，其分子量为 500-60,000，优选 1,000-40,000。更优选分子量大于 5,000-约 40,000。

在另一个实施方案中，聚乙二醇具有连接着一种以上 PEG 部分的支链 PEG。优选的示例性支链 PEG 参见 US5,932,462; US5,342,940; US5,643,575; US5,919,455; US6,113,906; US5,183,660; WO02/09766; Koder Y., *Bioconjugate Chemistry* 5: 283-288(1994); 和 Yamasaki 等, *Agric. Biol. Chem.*, 52: 2125-2127, 1998。在一个优选实施方案

中，支链 PEG 中每一聚乙二醇的分子量是 5,000-20,000。

聚(环氧烷烃)、特别是聚乙二醇可经末端反应基与 hGH 或其激动剂变异体结合，其中在 PEG 与蛋白质之间可以留下或不留下连接部分(间隔基)。为了形成本发明 hGH 缀合物或其激动剂变异体，可将聚合物例如聚(环氧烷烃)转化成活化形式，这在本领域是已知的。例如，反应基是末端反应基，其在蛋白质的化学部分(例如氨基、羧基或巯基)与聚乙二醇之间形成键合。典型地，将末端聚合物的一个或两个羟基末端基(即 α 和 ω 端羟基)转化为能进行共价缀合的活性官能团。该方法称为“活化作用”，并将具有反应基的聚乙二醇产物在以下简称为“活化聚乙二醇”。含有 α 和 ε 连接基的聚合物称为“双-活化聚(环氧烷烃)和“双官能”。有时将在 α 和 ε 末端羟基上包含相同反应基的聚合物称为“同基双官能”或“同基双活化的”。有时将在 α 和 ε 末端羟基上包含不同反应基的聚合物称为“双异官能团”(参见 W001/26692)或“双异官能活化的”。包含单一反应基的聚合物称为“单活化”聚环氧烷烃或“单官能”。基本上非抗原性的其它聚合物类似于地“活化”或“官能化”。

活化的聚合物适于在蛋白质的化学部分(例如 α 或 ε 氨基、羧基或巯基)与聚乙二醇之间形成键合。在另一个实施方案中，双活化聚合物能以这样的方式与两个蛋白质分子或一个蛋白质分子和一个活性小分子反应，从而通过交联有效地形成蛋白质聚合物或蛋白质-小分子缀合物。

能与 hGH 或其激动剂变异体上赖氨酸的氨基端 α -氨基或 ε -氨基反应的官能团包括：N-羟基琥珀酰亚胺基酯，碳酸酯例如对硝基苯基，或琥珀酰亚胺基 (US5,808,096、US5,612,460、US5,324,844、US5,512,614)；羰咪唑；二氢噁唑酮 (US5,321,095, US5,567,422)；环亚胺硫酮(cyclic imide thione) (US5,405,877、US5,349,001)；异氰酸酯或异硫氰酸酯 (Greenwald R.B., *J. Org. Chem.*, 60: 331-336, 1995)；氯化三氟乙烷磺酰 (EP714402, EP439508)；卤素甲酸酯 (W096/40792)，和醛。

能与 hGH 或其激动剂变异性上羧基、活性羰基及氧化的糖部分反应的官能团包括；伯胺；和胍和酰胍官能团，例如酰胍，卡巴胍(carbazate)，半卡巴胍(semicarbazate)，硫代卡巴胍(thiocarbazate)等(W001/70685)。

如果 hGH 或其激动剂变异性上存在巯基，它也可用作与具有反应基(例如巯基、马业酰亚胺、砒、和苯乙二醛)的活化聚合物连接的中心；参见例如 US5,093,531，其公开内容在此引入作为参考。其它能与亲电中心反应的亲核物质包括但不限于例如，羟基、氨基、羧基、巯基、活性亚甲基等。

也包括含有亲脂和亲水部分的聚合物，参见 US5,359,030 和 US5,681,811；US5,438,040；和 US5,359,030。

以及 W098/32466 公开的能与氨基、巯基和芳族羟基反应的卤化 PEG，它们可将 PEG 直接共价连接到蛋白质上。

在本发明一个优选实施方案中，利用 hGH 或其激动剂变异性上赖氨酸的 N-端 α -氨基或 ϵ -氨基，与活化的 PEG 形成仲胺或酰胺键。在本发明的另一优选方面，通过用适宜的还原剂(例如 NaCNBH_3 、 NaBH_3 、吡啶硼烷等)，在 hGH 或其激动剂变异体的 N-端伯 α -或 ϵ -氨基与单或支链 PEG 醛之间形成仲胺键。参见 Chamow 等(*Bioconjugate Chem.* 5: 133-140(1994))和 US5,824,784 的描述。。

在一个优选的实施方案中，至少 70%，优选至少 80%，优选至少 81%，优选至少 82%，优选至少 83%，优选至少 84%，优选至少 85%，优选至少 86%，优选至少 87%，优选至少 88%，优选至少 89%，优选至少 90%，优选至少 91%，优选至少 92%，优选至少 93%，优选至少 94%，优选至少 95%，优选至少 96%，优选至少 97%，和最优选至少 98%的聚乙二醇在氨基末端的 α -氨基上。

在本发明的另一个优选实施方案中，用形成酰胺的连接基(例如琥珀酰亚胺酯、环亚胺硫酮等)活化所述聚合物，以作用于 hGH 或其激动剂变异性与聚合物之间的连接，例如参见 US5,349,001；US5,405,877；和 Greenwald 等，*Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 17:

101-161, 2000, 其公开内容在此引入作为参考。可与 hGH 或其激动剂变异体的游离氨基结合的活化聚乙二醇优选包括单或支链 N-羟基琥珀酰亚胺聚乙二醇, 可用 N-羟基琥珀酰亚胺活化聚乙二醇的琥珀酸酯而获得。

本发明的其它优选实施方案包括采用其它活化聚合物经 ε -氨基或其它基团在聚合物与 hGH 或其激动剂变异体之间形成共价结合。例如, 异氰酸酯或异硫氰酸酯形式的末端活化聚合物可用于与赖氨酸氨基形成以脲或硫脲为基础的连接 (Greenwald R. B., *J. Org. Chem.*, 60: 331-336, 1995)。

在本发明的另一优选方面中, 与蛋白质形成氨基甲酸酯(尿烷)连接, 参见 US5, 122, 614、5, 324, 844 和 5, 612, 640 的描述, 其公开内容在此引入作为参考。示例包括 N-琥珀酰亚胺基碳酸酯、对-硝基苯基碳酸酯和羧咪唑活化的聚合物。在本发明另一个优选实施方案中, PEG 的苯并三唑碳酸酯衍生物与 hGH 或其激动剂变异体上的氨基连接。

本发明另一方面描述了前体药物或缓释形式的 hGH 或其激动剂变异体, 包括水溶性聚合物例如聚乙二醇经官能连接基与 hGH 或其激动剂变异体分子结合, 该连接基预期能由酶催化或 pH 导致的水解降解而释放出游离的 hGH 或其它 hGH 或其激动剂变异体衍化物。

所述前体药物也可是具有级联(cascade)潜效化作用的“双重前药”(Bundgaard, *Advanced Drug Delivery Drug Delivery Reviews* 3: 39-65, 1989)。在这种系统中, 水解反应包括起初的速限制性(慢)酶催化或 pH 控制的步骤, 和另一个在第一个步骤之后的快速非酶水解步骤。这种可释放性聚合物能提供暂时性的蛋白质缀合物, 该缀合物可用作不断释放 hGH 或其激动剂变异体的贮库。这种官能连接基可参见 US5, 614, 549; US5, 840, 900; US5, 880, 131; US5, 965, 119; US5, 965, 565; US6, 011, 042; US6, 153, 655; US6, 180, 095B1; US6, 413, 507; Greenwald R. B 等, *J. Med. Chem.* 42: 3657-3667, 1999; Lee, S. 等, *Bioconjugate Chem* 12: 163-169, 2001; Garman A. J. 等, *FEBS Lett.* 223: 361-365, 1987; Woghiren C. 等, *Bioconjugate Chem.* 4: 314-318, 1993;

Roberts M. J. 等, *J. Pharm. Sci.* 87: 1440-1445, 1998; Zhao X., in Ninth Int. Symp. Recent Adv. Drug Delivery Syst. 199; Greenwald R. B. 等, *J. Med. Chem.* 43: 475-487, 2000; 和 Greenwald R. B. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 17:101-161, 2000. Zalipsky 等, 28th Int. Symp. On controlled Release of Bioactive Materials 1; 73-74, 2001.

曾经有人在溶液中采用摩尔过量的聚合物(不考虑聚合物与蛋白质的结合部位),进行了缀合反应(称为 PEG 化反应)。然而,已证明这种常规技术不足以将生体活性蛋白质缀合到非抗原性聚合物上并保持足够生物学活性。有一种可保持 hGH 或其激动剂变异体生物学活性的方法,即在聚合物结合过程中基本上避免与 hGH 或其激动剂变异体上受体结合部位相关反应基的缀合。本发明的另一方面是提供聚乙二醇与 hGH 或其激动剂变异体缀合的方法,其中的 hGH 或其激动剂变异体保持了高水平的保留(retained)活性。

在任何适宜条件下,生物活性物质与活化聚乙二醇反应,通过共价键实现所述化学修饰。在相对温和的条件下进行缀合反应,以避免灭活 hGH 或其激动剂变异体。所述温和条件包括使反应的 pH 保持在 3-10 和反应温度约 0-37℃。在 hGH 或其激动剂变异体上的反应性氨基酸残基具有游离氨基的情况下,优选于 4-37℃在适宜缓冲剂(pH3-10)进行上述修饰 1-48 小时,所述缓冲剂包括但不限于磷酸盐、MES、柠檬酸盐、醋酸盐、琥珀酸盐或 HEPES。在用反应物例如 PEG 醛靶向 N-端氨基时,优选保持 pH4-8。可采用约 0.05-100 倍、优选约 0.01-2.5 倍于 hGH 或其激动剂变异体上游离氨基摩尔量的活化聚乙二醇。另一方面,当 hGH 或其激动剂变异体上的反应性氨基酸残基具有自由羧基时,优选在 pH 约 3.5-5.5 下进行上述修饰,例如,于 4-37℃,在碳二酰亚胺(pH3.5-5)的存在下,用聚(氧乙二胺)进行修饰 1-24 小时。可采用 0.05-300 倍于 hGH 或其激动剂变异体上游离羧基摩尔量的活化聚乙二醇。

在独立的实施方案中,缀合反应中聚合物的上限约超过 1:1,这样活化聚合物与 hGH 或其激动剂变异体有可能不形成大量高分子物,即约

20%以上的缀合物中含有约一个以上的聚合物链（每分子 hGH 或其激动剂变异体）。例如，在本发明这方面中，采用高至约 6:1 的比例，可形成大量的并能随后从任何高分子物中分离出来的所需缀合物。

在本发明的另一方面中，可采用双官能活化的 PEG 衍生物产生聚合性的 hGH 或其激动剂变异体-PEG 分子，其中多个 hGH 或其激动剂变异体分子经 PEG 交联。尽管在此描述的反应条件能产生大量未修饰的 hGH 或其激动剂变异体，这些未修饰的 hGH 或其激动剂变异体很容易回收供另一批缀合反应使用。令人惊奇地是，本发明方法产生了非常少的（少于约 30%和更优选少于约 10%）高分子物，及包含一个以上的聚合物链（每 hGH 或其激动剂变异体）的高分子物。这些反应条件不同于典型地用于聚合缀合反应的条件，其中活化的聚合物的量几倍摩尔过量于靶物。在本发明的其它方面中，聚合物的量约为每当量 hGH 或其激动剂变异体 0.1/氨基-50 当量。在本发明的其它方面中，聚合物的量约为每当量 hGH 或其激动剂变异体 1-10 当量。

本发明缀合反应最初提供反应混合物或池(pool)，其中含有单-和二-PEG-hGH 缀合物、未反应的 hGH、未反应的聚合物和通常约少于 20% 高分子物。高分子物包括包含一种以上的聚合物链和/或聚合的 PEG-hGH 或其激动剂变异体的缀合物。待除去未反应的物质和高分子物后，得到主要包含单-和二-聚合物-hGH 或其激动剂变异体缀合物的组合物。当缀合物大部分包括单聚合物链时，所述缀合物是基本上同质的。采用标准化 FDC-P1 细胞增殖分析法(Clark 等, *Journal of Biological Chemistry* 271: 21969-21977, 1996)、受体结合分析法(US5, 057, 417)或测定垂体切除的小鼠的生长(Clark 等, *Journal of Biological Chemistry* 271: 21969-21977, 1996)，测得这些修饰后的 hGH 或其激动剂变异体至少具有天然或未修饰的 hGH 或其激动剂变异体体外生物活性的 0.1%。然而，在本发明的优选方面，更优选修饰后的 hGH 或其激动剂变异体具有约 25%的体外生物活性，更优选修饰后的 hGH 或其激动剂变异体具有约 50%的体外生物活性，更优选修饰后的 hGH 或其激动剂变异体具有约 75%的体外生物活性，和最优选修饰的 hGH 或其激动剂变异体具有相等或改善

的体外生物活性。

本发明方法优选包括使用限定比例的聚合物和 hGH 或其激动剂变异性。这样，hGH 或其激动剂变异性缀合物主要限于含有一个聚合物链的缀合物。此外，与所用的高摩尔过量的聚合物连接基相比，聚合物与 hGH 或其激动剂变异性反应基的结合的随机性基本上更低。淬灭缀合反应后，采用离子交换作用或筛析层析或类似的分离技术，回收反应池中未修饰的 hGH 或其激动剂变异性，供将来反应使用。

可采用用于纯化蛋白质的常规方法，例如透析法、盐析、超滤、离子交换层析、疏水作用层析(HIC)、凝胶层析和电冰法，从反应混合物中纯化出本发明聚乙二醇-修饰的 hGH 或其激动剂变异性（即化学修饰的蛋白质）。在除去未反应的聚乙二醇和 hGH 或其激动剂变异性方面，离子交换层析尤其有效。在本发明的另一实施方案中，从反应混合物中除去高分子物和未修饰的 hGH 或其激动剂变异性，从而分离出单-和二-聚合物-hGH 或其激动剂变异性。将混合物置于包含约 0.5-10mg/mL 的 hGH 或其激动剂变异性-聚合物缀合物的缓冲溶液中，进行分离。适宜溶液的 pH 约为 4-8。所述溶液优选包含一种或更多缓冲盐，选自：KCl、NaCl、K₂HPO₄、KH₂PO₄、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、NaHCO₃、NaBO₃、CH₃CO₂H 和 NaOH。

根据反应缓冲液的不同，可首先将 hGH 或其激动剂变异性聚合物缀合物溶液进行缓冲液交换/超滤，以除去任何未反应的聚合物。例如，PEG-hGH 或其激动剂变异性缀合物溶液经低截流分子量膜(10,000-30,000 道尔顿)超滤，除去可能存在的最不需要的物质例如未反应的聚合物、表面活性剂等。

优选地，采用离子交换层析介质，将缀合物分级收集到含有所需物质的池中。这种介质能通过电荷差异选择性地结合 PEG-hGH 或其激动剂变异性缀合物，所述电荷差异以某种可预测的方式变化。例如，通过测定蛋白质表面上的荷电基团数量，可测定 hGH 或其激动剂变异体的表面电荷。这些荷电基典型地作为聚(环氧烷烃)聚合物的潜在结合点。hGH 或其激动剂变异性缀合物的电荷不同于另一物质，因此可以实施选择性分离。

本发明方法可采用强极性阴离子或阳离子交换树脂（例如季胺或磺丙基树脂）。尤其优选离子交换树脂。适于本发明的市售阳离子交换树脂包括但不限于：SP-hitrap[®]、SP Sepharose HP[®]；和 SP Sepharose[®] 速流。也可使用其它适宜的阳离子交换树脂例如 S 和 CM 树脂。适于本发明的市售阴离子交换树脂包括但不限于：Q-hitrap[®]、Q Sepharose HP[®] 和 Q Sepharose[®] 速流。也可使用其它适宜的阴离子交换树脂例如 DEAE 树脂。

例如，阴离子或阳离子交换树脂优选包装于柱中并经常规方法平衡。可采用与聚合物缀合的 hGH 或其激动剂变异性溶液之 pH 和渗透压相同的缓冲剂。洗脱缓冲剂优选包含一种或更多盐类，其选自：KCl、NaCl、K₂HPO₄、KH₂PO₄、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、NaHCO₃、NaBO₃ 和 (NH₄)₂CO₃。然后，将含缀合物的溶液吸附到不存留未反应聚合物和某些高分子物的柱子上。负载后，对柱子施以梯度流（盐浓度递增）的洗脱缓冲剂，以洗脱所需的聚环氧烷烃-缀合的 hGH 或其激动剂变异性级分。优选地，经阳离子或阴离子交换分离步骤后，洗脱出的级分限于均一的聚合物缀合物。然后，采用常规方法，从柱中洗涤出任何未缀合的 hGH 或其激动剂变异性。如有需要，可采用额外的离子交换层析或筛析层析，进一步对单和多 PEG 化的 hGH 或其激动剂变异性进行分离。

也可使用增加盐浓度或 pH 的多步骤等度洗脱技术。渐增浓度的多步等度洗脱将对二-和一-hGH 或其激动剂变异性-聚合物缀合物进行连续洗脱。

洗脱的温度范围约为 4-25℃。优选地，在约 4-22℃ 的温度下进行洗脱。例如，PEG-hGH 或其激动剂变异性馏份的洗脱物检测于 280nm 处的 UV 吸光度。可通过简单的时间洗脱图收集馏份。

可在聚乙二醇聚合物与 hGH 或其激动剂变异性部分的缀合方法中使用表面活性剂。适宜的表面活性剂包括离子型表面活性剂，例如十二烷基硫酸钠 (SDS)。也可使用其它离子型表面活性剂，例如十二烷基硫酸锂，季胺化合物，牛磺胆酸，辛酸，癸烷磺酸等。也可使用非离子型表面活性剂。例如，可使用聚氧乙烯脱水山梨醇 (Tweens)、聚氧乙烯醚

(Tritons)。参见 Neugebauer, A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry(1992), Calbiochem 公司。本发明方法对表面活性剂的唯一限定是：应在不引起 hGH 或其激动剂变异体实质上的不可逆变性作用和不完全抑制聚合物缀合的的浓度和条件下使用。反应混合物中表面活性剂的用量约为 0.01-0.5%；优选 0.05-0.5%；和最优选约为 0.075-0.25%。也可采用表面活性剂的混合物。

据信，表面活性剂可在聚合物的缀合过程中提供暂时性、可逆性的保护系统。已经证明表面活性剂能有效选择性阻止聚合物聚集，使以赖氨酸为基础的或氨基端为基础的缀合得以进行。

本发明聚乙二醇-修饰的 hGH 或其激动剂变异体具有更持久的药理学作用，这可能归因于其延长的体内半衰期。

此外，本发明聚乙二醇-修饰的 hGH 或其激动剂变异体可用于治疗垂体机能不足性侏儒症(GHD)，成人生长激素缺乏，Turner 综合症，胎龄(SGA)不足的儿童生长不足，普-拉-威综合症(PWS)，慢性肾功能不全(CRI)，艾滋衰竭和衰老。

为了便于患者施用，可将本发明聚乙二醇修饰的 hGH 或其激动剂变异体配制成药剂，其中也可含有药用稀释剂、调节溶液等渗的物质和 pH 调节剂。

可根据治疗目的，经皮下、肌注、静脉注射、肺部、皮内或口服施用上述药剂。也可根据要治疗的患者病症的种类和状况确定剂量，正常地，成人经注射施用 0.1mg-5mg 和口服 0.1mg-50mg。

所用的聚合物也优选为在室温下水溶性的。这种聚合物的非限定性示例包括聚(环氧烷烃)均聚物，例如聚乙二醇或聚(丙二醇)，聚(氧乙烯化多元醇)及其共聚物和嵌段共聚物，条件是嵌段共聚物保持水溶性。

有效的非抗原性物质也可用来替代以 PEG 为基础的聚合物，例如可使用葡聚糖，聚(乙烯吡咯烷酮)，聚(丙烯酰胺)，聚(乙烯醇)，以糖类为基础的聚合物等。实际上，对本领域普通技术人员显而易见的是，可

采用类似于转化聚(环氧烷烃)的方式,对这些聚合物中 α -和 ω -端基进行活化。本领域普通技术人员将领会到上述示例仅仅用于示例说明,可采用所有具有在此描述性质的聚合物。在本发明中,“有效的非抗原性”是指所有材料在本领域中应理解为对哺乳动物无毒且不诱发可观察到的免疫原反应。

以下为缩略语及其可互换使用的相应含义列表:

g	克
mg	毫克
ml 或 mL	毫升
RT	室温
PEG	聚乙二醇

本说明书中提及的所有出版物、专利或专利申请的全部内容均在此引用作为参考,就好象每一出版物、专利、专利申请均特定和独立地被引入作为参考。

尽管出于清楚领会之目的,已通过示例说明和实施例对本发明作了详细描述。对本领域技术人员显而易见的是,在本发明的教导下可实施并不偏离本发明精神和范畴的改进和变化。以下实施例旨在示例说明,对业已通过较宽泛术语描述的本发明范围没有限制作用。

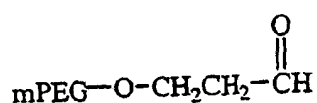
在以下实施例中, hGH 是 SEQ ID NO: 1 的 hGH。可以领会的是,可采用类似于后续实施例中的示例方式,对多肽 hGH 或其激动剂变异体家族的其它成员进行 PEG 化。

在此引用的所有参考、专利或专利申请,其全部内容引入作为参考。

以下实施例将对本发明作进一步说明,所述实施例不应认为是对本发明范围的限制。

实施例 1

直链 20,000 MW PEG-ALD hGH



该实施例说明了经还原性烷基化作用生产基本上同质的N-端单PEG化的hGH制剂的方法。利用N-端上伯胺的相对 pK_a 值与赖氨酸残基上 ϵ -氨基位置 pK_a 值之间的差异,约20,000 MW的甲氧基-线性PEG-丙醛试剂(Shearwater公司)经还原性氨基化反应与hGH的氮端选择性结合。将hGH蛋白溶于25mM的MES pH6.0(Sigma Chemical公司, St. Louis, MO)、25mM Hepes pH7.0(Sigma Chemical公司, St. Louis, MO)、或溶于10mM 醋酸钠 pH4.5(Sigma Chemical公司, St. Louis, MO)中,浓度为10mg/mL,加入甲氧基-PEG-ALD(任选可加入8%乙腈),使hGH蛋白与甲氧基-PEG-丙醛(M-PEG-ALD, Shearwater公司, Huntsville, AL)反应,使PEG:hGH的相对摩尔比为每胺0.1:0.7。通过添加1M的 NaCNBH_3 贮备液(Sigma Chemical公司, St. Louis, MO)催化反应,溶于 H_2O 中,终浓度为10-50mM。反应在黑暗中进行18-24小时(4℃至室温)。加入1M的Tris pH约7.6(Sigma Chemical公司, St. Louis, MO),停止反应。Tris的终浓度为50mM或用供直接纯化的适当缓冲剂稀释。

实施例 2

直链 30,000 MW PEG-ALD hGH

按照实施例 1 描述的方法,甲氧基-线性 30,000 MW PEG 丙醛试剂(Shearwater公司)与hGH的N-端结合。

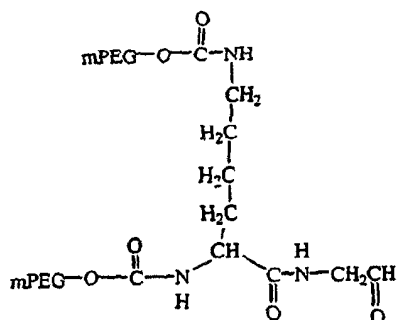
实施例 3

直链 5,000 MW PEG-ALD hGH

按照实施例 1 描述的方法,甲氧基-线性 5,000 MW PEG-丙醛试剂(Fluka)与hGH的N-端结合。

实施例 4

支链 40,000MW PEG-ALD hGH



按照实施例 1 描述的方法, 甲氧基-支链 40,000 MW PEG 醛 (PEG2-ALD) 试剂 (Shearwater 公司) 与 hGH 的 N-端结合。

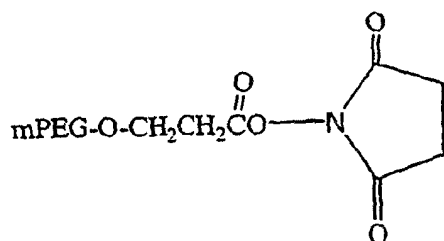
实施例 5

支链 20,000 MW PEG-ALD hGH

甲氧基-支链 20,000 MW PEG-醛 (PEG2-ALD) 试剂 (Shearwater 公司) 按照实施例 1 描述的方法, 与 hGH 的 N-端结合, 其中 PEG 与 hGH 的摩尔比率为 0.1-0.5 每胺。

实施例 6

直链 30,000 MW SPA-PEG hGH



该实施例说明了采用 N-羟基琥珀酰亚胺基 (NHS) 活性酯生产基本上同质的单 PEG 化 hGH 制剂的方法。hGH 蛋白储备溶液溶解于 pH7.20 的 .25M HEPES 缓冲液中 (任选也可加入 8% 乙腈), 浓度为 10mg/mL。然后, 加入 SPA-PEG 产生 PEG: hGH 的相对摩尔比为每胺 0.1-0.65, 使溶液与甲氧基-PEG-琥珀酰亚胺基丙酸酯 (SPA-PEG) 反应。反应于 4℃ 至室温下进行 5 分钟至 1 小时。用 0.1N 醋酸或加入 5X 摩尔过量的 Tris HCl 使 pH 降低到 4.0, 从而停止反应。

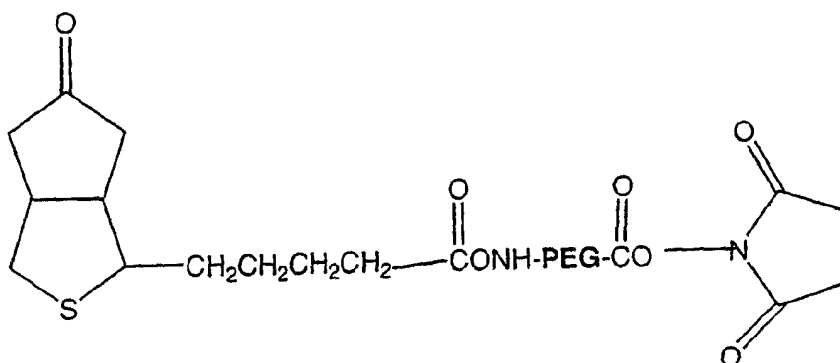
实施例 7

直链 20,000 MW SPA-PEG hGH

按照实施例 6 描述的方法,直链 20,000 MW SPA-PEG 试剂 (Shearwater 公司) 与 hGH 的 N-端结合。

实施例 8

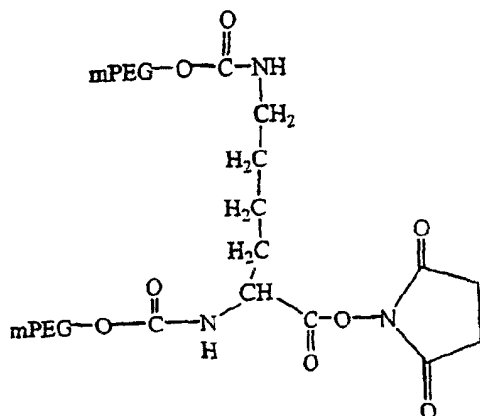
直链 3,400 MW 生物素-SPA-PEG-hGH



按照实施例描述 6 的方法, 3,400 MW 生物素-PEG-CO₂-NHS 反应物 (Shearwater 公司) 与 hGH 结合。

实施例 9

支链 10,000 MW NHS-PEG-hGH



按照实施例 6 描述的方法, 10,000 MW 支链 PEG2-NHS (Shearwater 公司) 与 hGH 结合。

实施例 10

支链 20,000 MW NHS-PEG-hGH

按照实施例 6 描述的方法, 20,000 MW 支链 PEG2-NHS (Shearwater 公司) 与 hGH 结合。

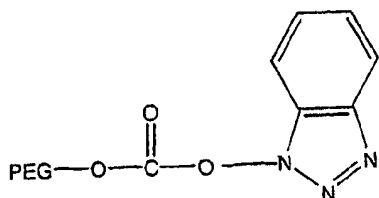
实施例 11

支链 40,000 MW NHS-PEG-hGH

按照实施例 6 描述的方法, 40,000 MW 支链 PEG2-NHS (Shearwater 公司) 与 hGH 结合。

实施例 12

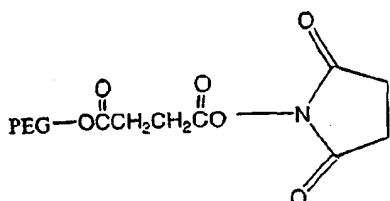
直链 20,000 MW PEG-BTC-hGH



按照实施例 6 描述的方法, 20,000 MW PEG-BTC (Shearwater 公司) 与 hGH 结合。该实施例说明了采用 PEG 的苯并三唑碳酸酯衍生物生产基本上同质的 PEG 化 hGH 制剂的方法。

实施例 13

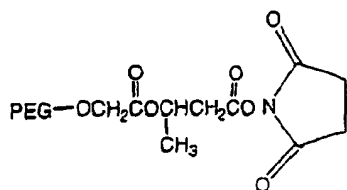
直链 5000 MW PEG-SS-hGH



按照实施例描述 6 的方法, 5,000MW 琥珀酰亚胺基琥珀酸酯-PEG (SSPEG) (Shearwater 公司) 与 hGH 结合。该实施例说明了采用可水解连接生产基本上同质的 PEG 化 hGH 制剂的方法。

实施例 14

直链 20,000 MW PEG-CM-HBA-hGH



按照实施例 6 描述的方法, 20,000 MW 羧甲基羟丁酸-PEG (CMHBA-PEG) (Shearwater 公司) 与 hGH 结合。该实施例说明了采用可水解连接生产基本上同质的 PEG 化 hGH 制剂的方法。

实施例 15

直链 2-4x 5,000MW PEG-CM-HBA-hGH

按照实施例 13 描述的方法, 5,000 MW PEG-CM-HBA (Shearwater 公司) 与 hGH 结合。

实施例 16

直链 20,000 MW HZ-PEG hGH PEG-OCH₂CONHNH₂

该实施例说明了采用 20,000 MW 甲氧基-PEG-酰肼 (HZ-PEG, Shearwater 公司) 生产基本上同质的 PEG 化 hGH 制剂的方法。将 hGH 蛋白储备液溶于 10mM 的 MES (pH4.0) 中, 浓度为 10mg/mL。然后, 加入固体产生 PEG: hGH 的相对摩尔比为每羧基 0.1-5.0, 使该溶液与 HZ-PEG 反应。反应用终浓度为 2mM-4mM 的碳二亚胺 (EDC、EOAC、EDEC) 催化。反应于 4℃ 进行 2 小时至过夜, 或于室温进行 10 分钟至过夜。通过阳离子交换纯化, 除去未结合的 PEG 和碳二亚胺, 使反应停止。

实施例 17

多 PEG 化的种类

由实施例 1 和 4 分别获得连接有两或更多 PEG (多 PEG 化) 的修饰 hGH, 并采用阴离子交换层析将其从单 PEG 化缀合物中分离出来。采用阳离子交换色层分离法, 也可从单 PEG 化缀合物分离出连接有两或更多 PEG (多 PEG 化) 的修饰的 hGHs。

由 2、3、5-13 实施例中获得连接有两或更多 PEG(多 PEG 化)的修饰 hGHs, 并按似于实施例 1 和 4 的方式纯化。

实施例 18

PEG 化 hGH 的纯化

采用单步离子交换层析, 将 PEG 化的 hGH 种类从反应混合物中分离出来 (SEC 分析) 达到 >95%。

阴离子交换层析

采用单步阴离子交换层析, 将 PEG hGH 缀合物从反应混合物中分离出来 (SEC 分析), 达到 >95%。采用阴离子交换层析, 从未修饰的 hGH 和多-PEG 化的 hGH 种类中纯化出单-PEG 化的 hGH。如上所述, 采用 pH7.3 的 25mM HEPES(缓冲剂 A) 平衡的 Q Sepharose Hitrap 柱 (1 或 5mL) (Amersham Pharmacia Biotech 公司, Piscataway, NJ) 或 Q-Sepharose 速流柱 (26/20, 70mL 柱床体积) (Amersham Pharmacia Biotech 公司, Piscataway, NJ), 对典型的 20K 醛 hGH 反应混合物 (5-100mg 蛋白质) 进行纯化。反应混合物用缓冲剂 A 稀释 5-10 倍, 并以 2.5mL/分钟的流速负载到柱上。用 8 倍柱体积的缓冲剂 A 冲洗柱。接着, 以 80-100 倍柱体积的缓冲剂 A 和 0-100mM 的线性 NaCl 梯度将各种 hGH 从柱中洗脱出来。于 280nm 处 (A_{280}) 监测洗脱液, 并收集 5mL 的级分。根据 PEG 化的程度 (例如单、二、三 PEG 化等, 如实施例 15 的评估) 收集级分。然后, 在 Centriprep YM10 浓缩器 (Amicon, Technology Corporation, Northborough, MA) 中, 浓缩收集物至 0.5-5mg/mL。于 280nm 测定富集的蛋白质浓度 (吸光系数 0.78)。该方法纯化的单 20K-醛 hGH 的总收率为 25-30%。

阳离子交换层析

在用 pH4.0 的 10mM 醋酸钠(缓冲剂 B) 平衡的 SP Sepharose 高效柱 (Pharmacia XK 26/20, 70ml 柱床体积) 上, 进行阳离子交换层析。反

应混合物用缓冲剂 B 稀释 10 倍, 并以 5mL/分钟的流速负载到柱上。接着, 用 5 倍柱体积的缓冲剂 B, 然后 5 倍柱体积的 12%缓冲剂 C (10mM 醋酸盐 pH4.5, 1M 的 NaCl) 顺序冲洗柱。接着, PEG-hGH 从柱中洗脱出来 (线性梯度为 12-27%的 20 倍柱体积的缓冲剂 C)。于 280nm 处监测洗脱液, 并收集 10mL 的级分。根据 PEG 化的程度 (单、二、三等) 收集级分, 交换到 10mM 醋酸盐缓冲剂 (pH4.5) 中, 并在装有 Amicon YM 10 膜的搅拌池中浓缩到 1-5mg/mL。于 280nm 测定富集的蛋白质浓度 (吸光系数 0.78)。该方法的单 PEG 化 hGH 的总收率为 10-50%。

实施例 19

生物化学表征

采用还原和非还原性 SDS-PAGE、非变性和变性筛析层析、分析用阴离子交换层析、N 端序列测定、疏水作用层析和反相 HPLC, 对纯化的 PEG 化 hGH 进行了表征。

大小排阻高效液相层析 (SEC-HPLC)

非变性 SEC-HPLC

采用非变性 SEC-HPLC, 对各种结合化合性质 (chemistry)、大小、连接子和几何形状的甲氧基-PEG 与 hGH 的反应、阴离子交换纯化富集物和最终纯化产品进行评价。采用 Tosohaas G4000PWXL 柱, 7.8 mm x 30 cm (Tosohaas Amersham Bioscience 公司, Piscataway, NJ) 或 Superdex 200 (Amersham Bioscience 公司, Piscataway, NJ) 在 20 mM 磷酸盐 pH7.2, 150mM 的 NaCl 中以流速 0.5 mL/分钟, 进行非变性 SEC-HPLC 分析。PEG 化极大地提高了蛋白质的流体动力学体积, 使其移位至较早的保留时间。在 PEG 醛 hGH 反应混合物中观察到了新物种和未修饰的 hGH。采用 Q-Sepharose 层析分离这些 PEG 化和未 PEG 化的物质, 并且所得纯化的单 PEG 醛 hGH 缀合物在非变性 SEC 上以单峰洗脱出 (>95 纯度)。采用 Q-Sepharose 层析步骤, 可有效地从单-PEG 化 hGH 中除去游离的 PEG、hGH 和多 PEG 化的 hGH。非变性 SEC-HPLC 证明各种 PEG 化 hGH 的有效粒

度大于其相应的理论分子量很多(表 1)。

表 1 粒度排阻层析 (SEC)

	MW (理论值)	尺寸 (SEC)
hGH	22000	21000
4-6x5K PEG-SPA GH	47000	128000
2-4x5K PEG-CMHBA (NHS) GH	37000	71000
20K PEG-ALDGH	42000	120000
20K 支链 PEG-ALD GH	42000	114000
20K PEG-CMHBA (NHS) GH	42000	115000
20k PEG-酰肼 GH	42000	125000
2x20K PEG-ALD GH	62000	250000
30K PEG-ALD GH	52000	231000
30K PEG-SPA GH	52000	183000
2x30K PEG-SPA GH	82000	569000
40K 支链 PEG-ALDGH	62000	330000
40K 支链 PEG-NHS GH	62000	253000

变性 SEC-HPLC

采用变性 SEC-HPLC, 对各种甲氧基-PEG 与 hGH 的反应、阴离子交换纯化物和最终纯化产品进行了评价。采用 Tosohaas 3000SWXL 柱, 7.8 mm x 30 cm (Tosohaas Pharmcia Biotech 公司, Piscataway, NJ) 在 pH6.8 的 10 mM 磷酸盐, 0.1% SDS 中, 以流速 0.8 mL/分钟, 进行变性 SEC-HPLC 分析。PEG 化极大地提高了蛋白质的流体动力学体积, 使其移位至较早的保留时间。在 20K PEG 醛 hGH 反应混合物中观察到了新种类和未修饰的 hGH。采用 Q-Sepharose 层析分离这些 PEG 化和未 PEG 化的物质, 接着所得纯化的单 20K PEG 醛 hGH 缀合物在变性 SEC 上以单峰洗脱出(>95 纯度)。采用 Q-Sepharose 层析步骤, 可有效地从单-PEG 化

hGH 中除去游离的 PEG、hGH 和多 PEG 化的 hGH。

SDS PAGE/PVDF 迁移

采用 SDS-PAGE, 对各种 PEG 试剂与 hGH 的反应和纯化的最终产品进行了评价。采用单 20K 线性和支链 20K 和 40K PEG 醛和 4X6 5K SPA PEG, 对这种技术作了示例(图 1 和 2)。在还原和非还原条件下, 用 Novex Colloidal Coomassie™ G-250 染色试剂盒(Invitrogen, Carlsbad CA)染色, 在 1mm 厚的 10-20% Tris N-三(羟甲基)甲基甘氨酸凝胶(Invitrogen, Carlsbad, CA)上进行 SDS-PAGE。纯化的单 PEG-醛 hGH 是 SDS-PAGE 上的主要迁移带。将迁移带点到 PVDF 膜上, 供随后 N-末端序列测定。

分析性阴离子交换 HPLC

采用分析性阴离子交换 HPLC, 评价了各种 mPEG 与 hGH 的反应、阴离子交换纯化级分和最终的纯化产品。采用 Tosohaas Q5PW 或 DEAE-PW 阴离子交换柱, 7.5mm × 75mm(Tosohaas Pharmacia Biotech 公司, Piscataway, NJ)在 50 mM Tris pH8.6, 以流速 1 mL/分钟, 进行分析性阴离子交换 HPLC。用 5-200mM 线性梯度的 NaCl 洗脱试样。

反相 HPLC(RP HPLC)

采用 RP-HPLC 分析 PEG-GH 反应混合物和纯化的 PEG 化产品, 来说明 hGH 种类、单和多 PEG 化的 hGH 种类, 并监测氧化的 hGH 形式以及在不同位点(例如 N-端或赖氨酸 ε-氨基)结合有单 PEG 的 PEG hGH 异形体, 采用 Zorbax SB-CN 150 或 250mm x 4.6mm(3.5mm 或 5mm)反相 HPLC 柱, 进行 RP-HPLC。实验在室温中进行, 典型载样量为 10mg 蛋白质/试样。缓冲剂 A 是在水中的 0.1%三氟乙酸;缓冲剂 B 是在乙腈中的三氟乙酸。以每分钟增加 $1/2\%$ B 的梯度如下:

步骤	时间	流速	% A	% B	步骤
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-端序列和肽图

采用自动 Edman 降解化学法测定 NH_2 -端蛋白序列。采用 Applied Biosystems 494 型 Procise 序列测定仪 (Perkin Elmer 公司, Wellesley MA) 降解。采用配有 Perkin Elmer/Brownlee 2.1mm 的 Applied Biosystems 140 C 型 PTH 分析仪 (PTH-C18 柱, 同上), 通过在线方式 RP-HPLC 分析, 确定各个 PTH-AA 衍生物。对转移至到 PVDF 膜上的 20K 线性和 20 和 40K 支链 PEG-ALD hGH 蛋白质带、或纯化的 20K 线性和支链 20 和 40K PEG-ALD hGH 的溶液进行了测序。纯化的 20K 线性 PEG-hGH 产生了主要信号 (约 88% 收率), 并观察到其具有预期的 hGH 序列, 但是没有氮端氨基酸。该结果与经醛化学法对蛋白质 N-端 PEG 化的预测一致。与 PEG 部分结合的第一个环的残基是不可恢复的。较少的信号 (约 12% 收率) 具有适当的氨基端氨基酸序列。由于 RP-HPLC 采集的峰是 100% PEG 化的, 这些资料表明约 88% 的 PEG 修饰发生在 N-端, 其余的则与几种可能的赖氨酸残基中的一种显然相关。

在 1mg/mL 的浓度下进行胰蛋白酶消化, 每一消化典型地使用 50 μg 材料。加入胰蛋白酶, 使胰蛋白酶与 PEG-hGH 的比例为 1: 30 (w/w)。Tris 缓冲剂的浓度为 30mM 和 pH 为 7.5。试样在室温下保温 16 ± 0.5 小时。加入每 mL 消化溶液 50 μL 的 1N HCl, 淬灭反应。在装入自动取样器之前, 将试样稀释, 终浓度为 0.25mg/mL (在 6.25% 乙腈中)。首先加入乙腈 (至 19.8% 乙腈), 温和地混合, 然后用水加至终体积 (4 倍于起始体积)。除去额外的消化溶液, 并于 -20°C 贮藏 1 周。

采用 Waters Alliance 2695 HPLC 系统进行分析, 但是其它系统的结果也类似。所用的柱子是 Astec C-4 聚合的具有 5 μ m 粒子 25cm x 4.6mm 柱。实验在室温中进行, 典型载样量为 50 μ g 蛋白质/试样。缓冲剂 A 在水中的 0.1% 三氟乙酸; 缓冲剂 B 是在乙腈中的 0.085% 三氟乙酸。梯度如下:

时间	A%	B%	C%	D%	流速	曲线
0.00	0.0	0.0	100.0	0.0	1.000	1
90.0	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

用加热夹套将柱子加热到 40 $^{\circ}$ C。采用 Waters 996 PDA 检测器收集 210-300nm 间的数据, 检测峰。214nm 处的萃取层析图用于试样分析, 以测定 N-端 PEG 化的程度 (T-1 片段损失), 如表 2 所示。

表 2

试样	% T-1 存在	%T-1 损失	% T-1 存在 (相对于对照)
醛			
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 支链	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
30K	23.1	76.9	84.1
2x30K	18.2	81.8	63.9
40K	5.7	94.3	19.9
支链	20.9	79.1	73.5

实施例 20

药效学研究

对垂体切除鼠的效力研究

对在 Harlan 试验室中切除垂体的雌性 Sprague Dawley 大鼠进行 7-10 天生长率的预筛。接着,进行为期 11 天的生长研究。鼠被分成 6-8 个组。第 1 组鼠每日或第 0 天和第 6 天皮下给予载体。第 2 组每日皮下给予 GH(0.3mg/kg/剂量)。第 3 组于第 0 天和第 6 天皮下给予 GH(1.8mg/kg/剂量)。第 4 组于第 0、6 天皮下给予 PEG-GH(1.8mg/kg/剂量)。

研究期间,鼠至少每隔一天称重一次,监测垂体切除鼠的体重增加。每周施用一次的 20K PEG-ALD hGH、20K 和 40K 支链 PEG-ALD hGH、和 4-6x 5PEG-SPA hGH 的体重增加(均值±SEM),与每日施用 hGH 的结果类似(图 3 和 4)。表 3 概述了每周施用各种 PEG 化 hGH 分子的相对于每日施用 hGH 的动物于 11 天时的总体重增加(均值±标准偏差(SEM))。

表 3 鼠体重增加

化合物	单一周剂量 (mpk)	每日增重(0-11 天) g/天 (平均±SEM)	相对于每日 hGH 增 重的%增重(平均)
hGH(未 PEG 化)	1.8	0.97±0.12	39%
5K 线性 PEG-ALD GH	1.8	0.96±0.27	36%
20K 线性 PEG-ALD GH	1.8	1.99±0.13 1.43±0.08 1.7±0.10	73%
20K 线性 CM-HBA PEG GH	1.8	2.36±0.11	99%
20K 线性 PEG-HYDGH	1.8	2.62±0.22	99%
20K 支链 PEG-ALD GH	1.8	2.24±0.07	87%
30K 线性 PEG-ALDGH	1.8	2.11±0.06 1.85±0.14	94%
30K 线性 PEG-SPA GH	1.8	2.6±0.1	117%
40K 支链 PEG-ALD GH	1.8	2.57±0.08	100%
40K 支链 PEG-NHS GH	1.8	2.53±0.09	121%
2x 20K PEG-ALD GH	1.8	2.66±0.10	128%
4-6x5K SPA-PEG GH	1.8	3.18±0.10	124%
2-4x5K CM-HBA-PEG GH	1.8	3.54±0.15	134%
2x 30K 线性 PEG-SPA GH	1.8	3.1±0.1	134%

完成生长研究后，处死动物并分析其骨(胫骨)长度。图 6 为在第 0 天和 6 天施用各种 PEG-GH 缀合物或每日施用 hGH 后的第 11 天时的胫骨长度变化胫骨(均值 $\pm$ 标准偏差)。

垂体切除鼠中的 IGF-1 水平

同上述体重增加研究一样，测定 IGF-1 水平，但于第 0、1、2、3、4、5 天取血液试样，并于第 9 天处死动物。采用 ELISA 测定 IGF-1 水平。图 7 比较在每日给予 hGH 或单剂量 hGH 或于第 0、6 天给予 PEG 化人生长激素后，垂体切除鼠的血清 IGF-1 水平增加(均值 $\pm$ 标准偏差)。

药代动力学研究

在正常 Sprague-Dawley 雄性大鼠、小鼠和短尾猴中，进行药代动力学研究。配制注射剂，单一皮下注射 1.8mg/kg，或单一静脉注射 1.0mg/kg GH 或 PEG-GH，每组 6 只大鼠和多达 60 只小鼠。对于短尾猴，单剂量皮下浓注和静脉注射 0.18mg/kg GH 或 PEG-GH，每组 2-4 只猴。视情况而定，于 1-5 天取血液试样，供有关的 PK 系数分析(表 4)。

($t_{1/2}$) = 终半衰期，(Cl) = 清除率，(T_{max}) = 达最高浓度的时间， V_{ss} = 稳态时的体积分布(表观)，和 (C_{max}) = 采用免疫分析法测定的每一试样最高 GH 和 PEG-GH 浓度血液水平。

HGH 免疫分析

采用 hGH AutoDELFIA 试剂盒荧光免疫测定技术(PerkinElmer Life Sciences)，以适当的 PEG hGH 制备标准曲线，测定大鼠、小鼠和短尾猴血浆中的 hGH 和 PEG 化 hGH 蛋白质浓度水平。

表 4

物种	参数	40K Br ALD hGH	40K Br NHS hGH	30K ALD hGH	20K ALD hGH	4-6 x 5K SPA
小鼠	剂量 (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 生物利用度 (%)	87	67	39	24	167
大鼠	剂量 (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)	1.36	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 生物利用度 (%)	30	33	31	39	40
犬	剂量 (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 生物利用度 (%)	64	77	97	44	66

<110> Pharmacia Corporation

Finn, Rory

Liao, Wei

Siegel, Ned

<120> 化学修饰的人生长激素缀合物

<130> 03582/1/PCT

<150> US 60/331907

<151> 2001-11-20

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 191

<212> PRT

<213> 人 (homo sapiens)

<400> 1

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asp Ala Met Leu Arg
1 5 10 15

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
20 25 30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asp Pro
35 40 45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asp Arg
50 55 60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asp Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
65 70 75 80

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Ser Leu Arg Ser Val
85 90 95

Phe Ala Asp Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asp Val Tyr Asp
100 105 110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
130 135 140

Lys Phe Asp Thr Asp Ser His Asp Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asp Tyr
145 150 155 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
165 170 175

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
180 185 190

图1

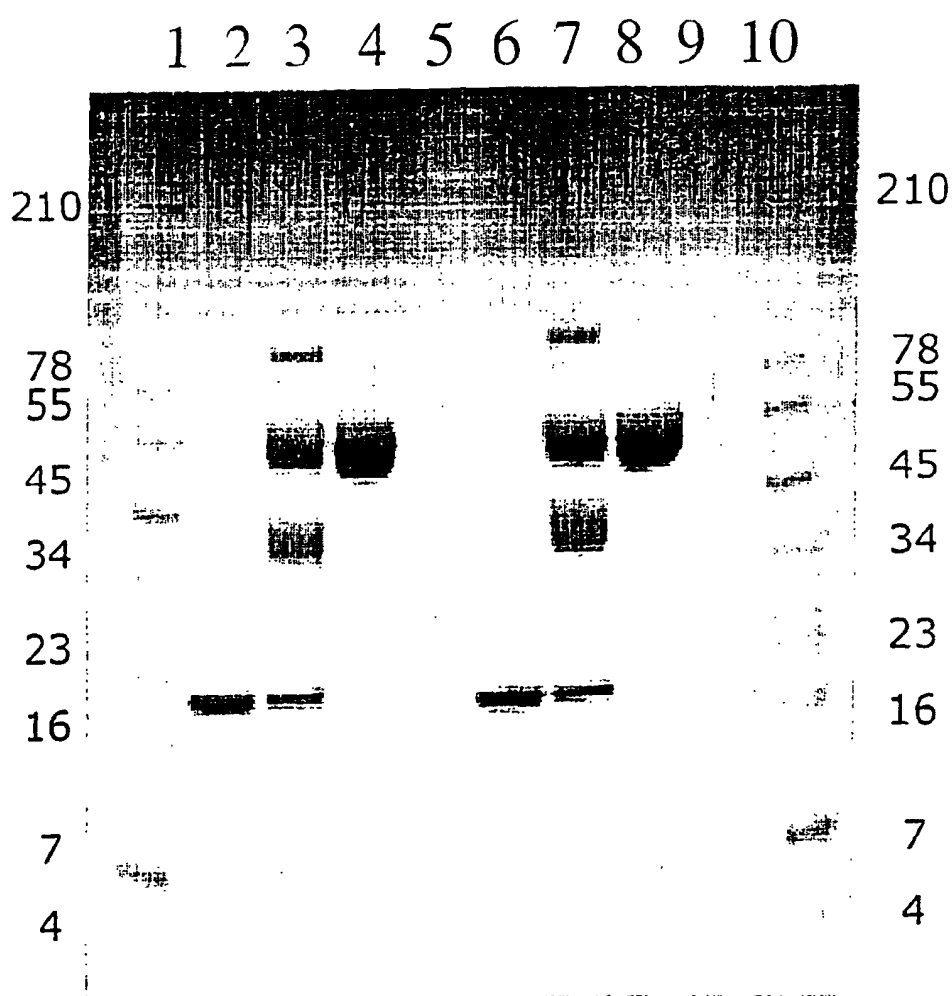


图 2

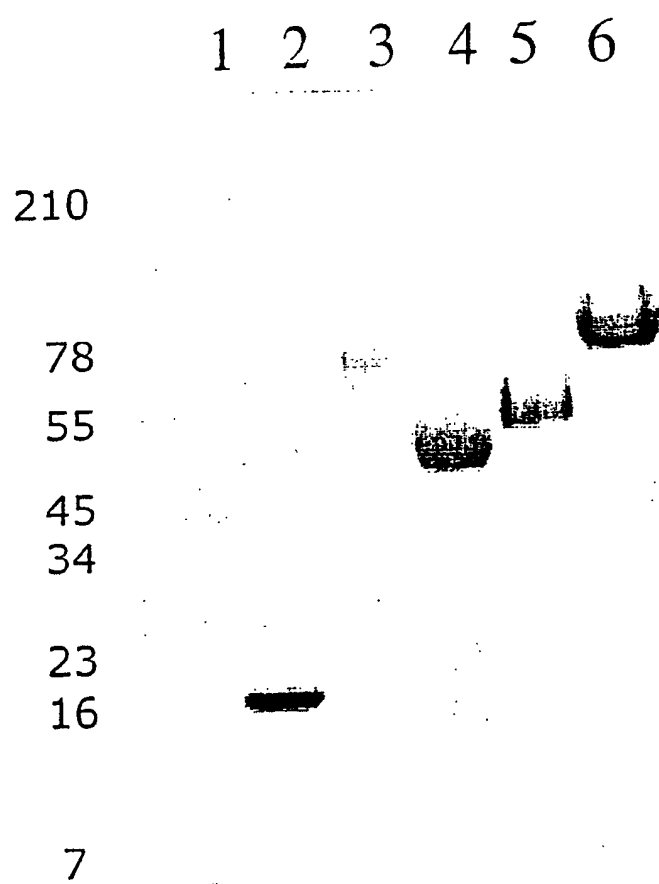


图 3

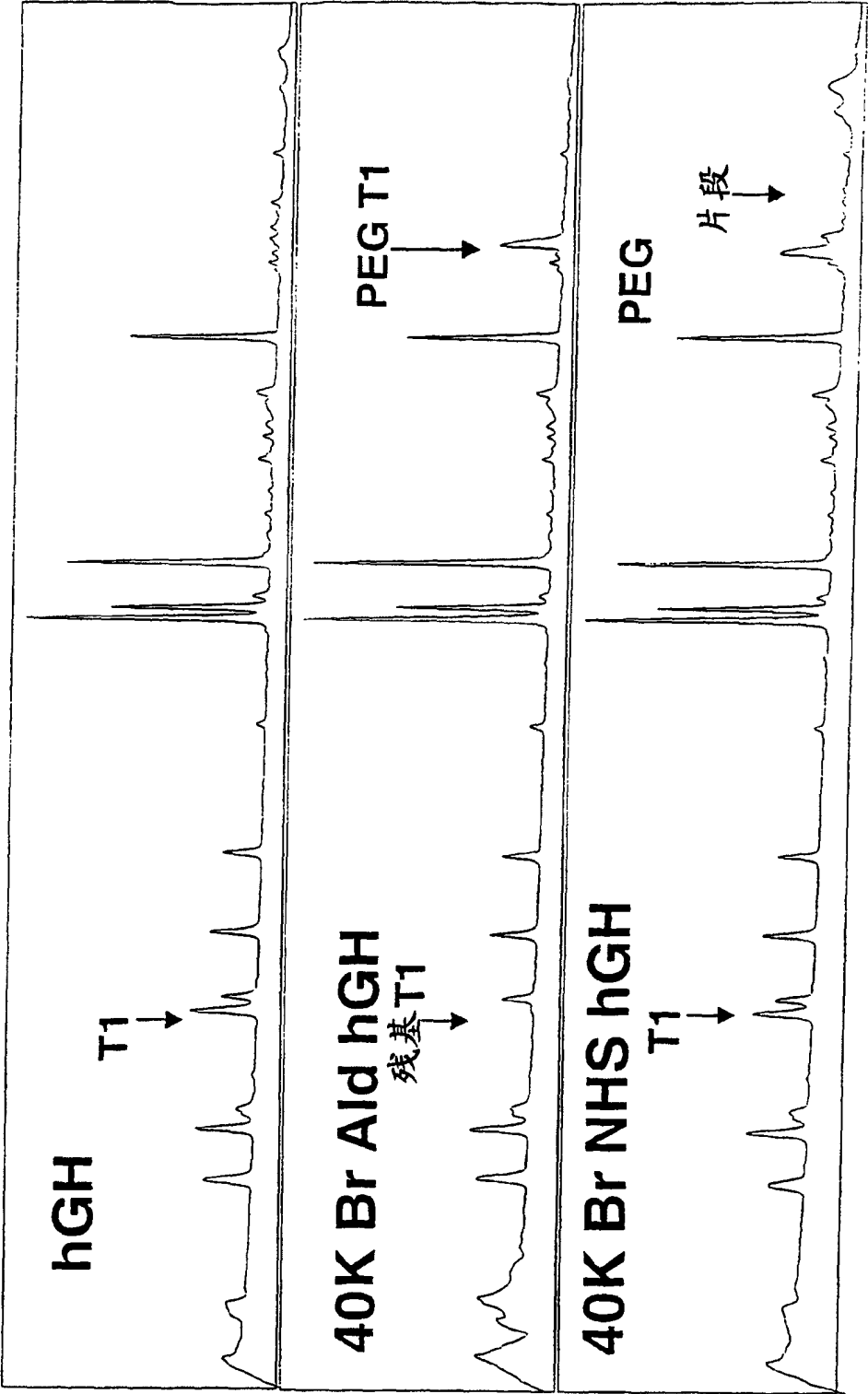


图 4

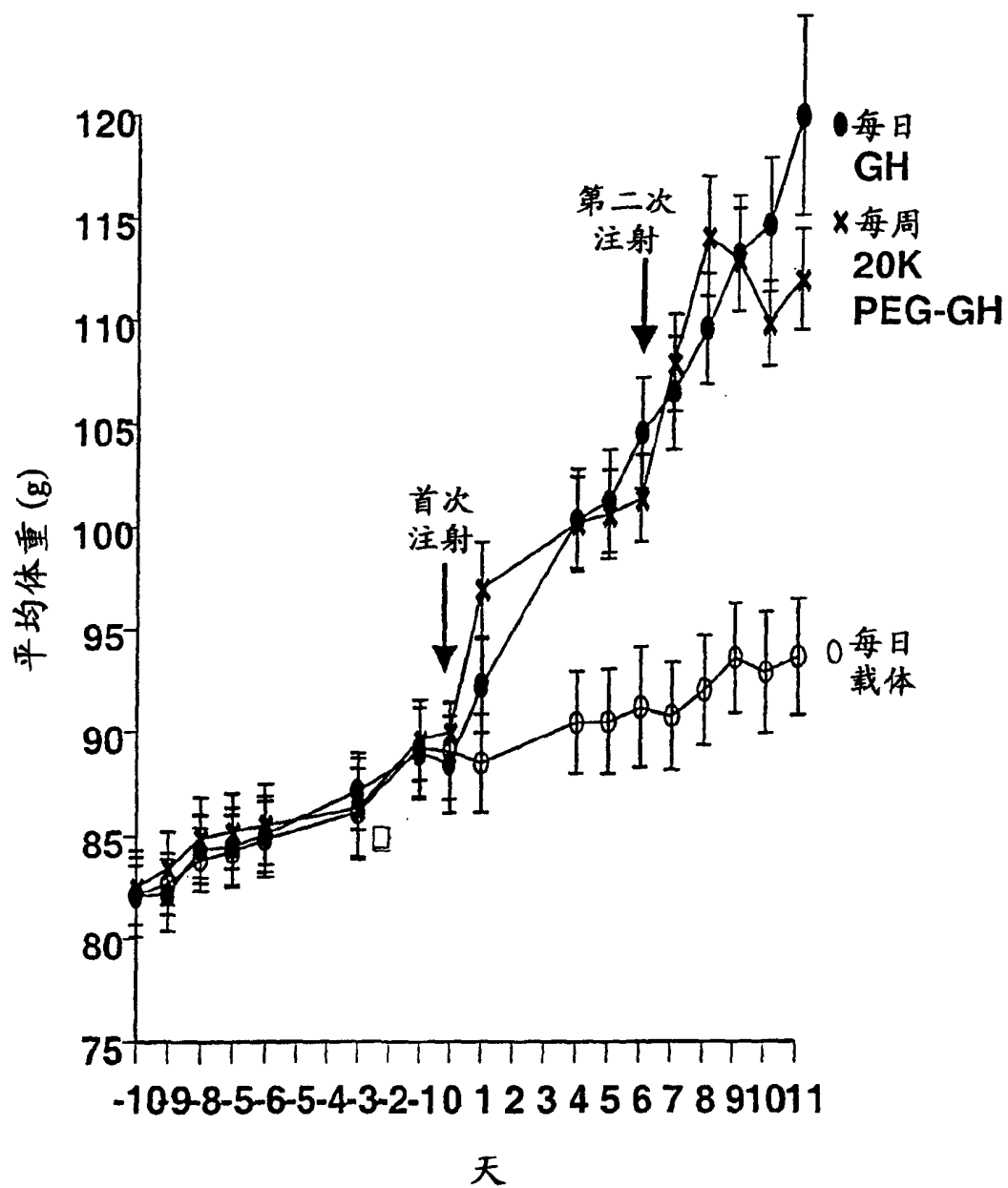


图5

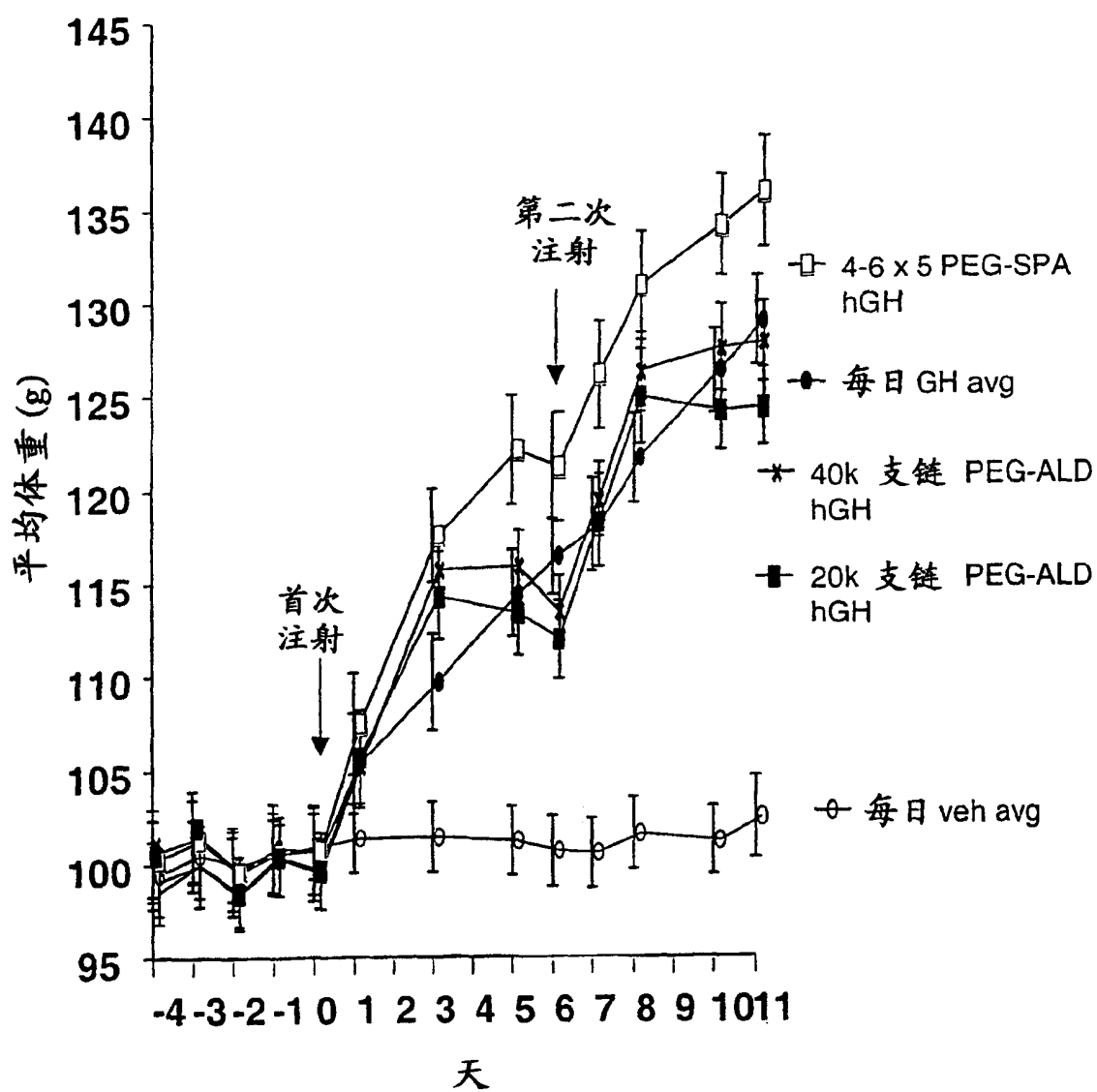


图7

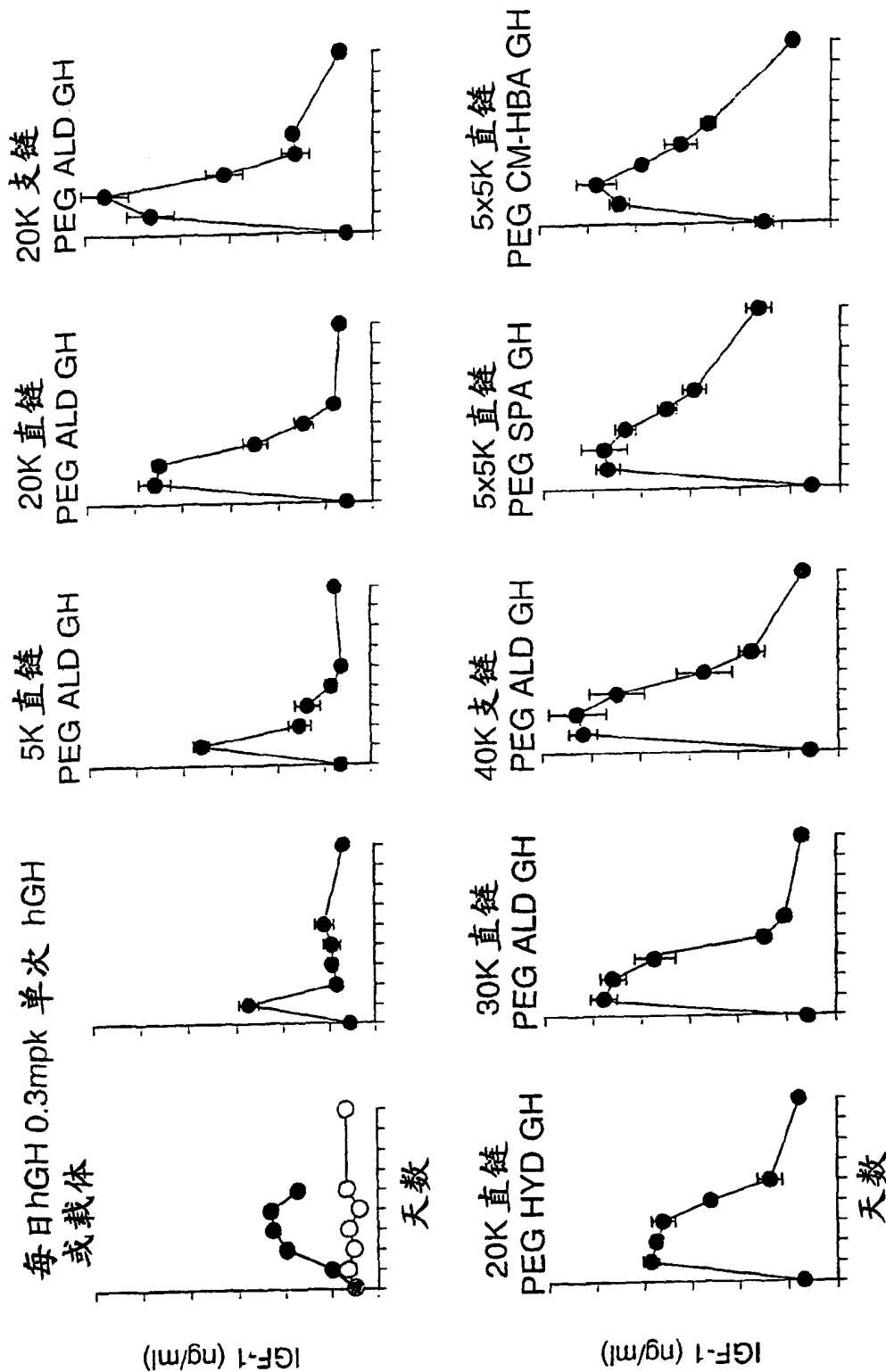


图 8

