

В отношении настоящей заявки в соответствии с разделом 35 кодекса США, § 119, заявлен приоритет от 20 ноября 2001 года согласно временной заявке США серийный № 60/331,907, которая во всей своей полноте, как если бы она была написана здесь, включена путем ссылки.

### **Область изобретения**

Настоящее изобретение относится к химической модификации гормона роста человека (hGH) и его вариантов-агонистов, в результате которой химические и/или физиологические свойства hGH могут быть изменены. Пэгилированный hGH может иметь увеличенную продолжительность пребывания в плазме, пониженную скорость клиренса, повышенную стабильность, пониженную антигенность или их комбинацию. Настоящее изобретение также относится к способам модификации hGH. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим модифицированный hGH. Еще одним воплощением является применение модифицированного hGH для лечения нарушений роста или развития.

### **Предшествующий уровень техники**

Гормон роста человека (hGH) представляет собой белок, содержащий одну цепь из 191 аминокислот, поперечно-связанных двумя дисульфидными мостиками, и мономерная форма имеет молекулярную массу 22 кДа. Гормон роста человека секретируется гипофизом, а также может быть получен рекомбинантной геной инженерией. hGH вызывает рост всех тканей организма, которые способны расти. Рекомбинантный hGH коммерчески доступен в течение нескольких лет. На рынке имеется два типа терапевтически пригодных препаратов рекомбинантного hGH: аутентичный препарат, например Genotropin™ или Nutropin™, и аналог с дополнительным метиониновым остатком на N-концевом конце, например Somatonom™. hGH используют для стимуляции линейного роста у пациентов с гипогипофизарной карликовостью, которую также называют дефицитом гормона роста (GHD), или с синдромом Тернера, но предполагаются также другие показания, в том числе длительное лечение недостаточности роста у детей, которые родились с малым для гестационного возраста размером тела (SGA), для лечения пациентов с синдромом Прадера-Вилли (PWS), хронической почечной недостаточностью (CRI), связанным со СПИДом истощением и старением.

Основной биологический эффект гормона роста (GH) заключается в стимуляции роста молодых млекопитающих и сохранения тканей у более старых млекопитающих. Затрагиваемые системы органов включают скелет, соединительную ткань, мышцы и внутренние органы, такие как печень, кишечник и почки. Гормоны роста оказывают свое воздействие через взаимодействие со специфическими рецепторами на мембране клетки-мишени. hGH является членом семейства гомологичных гормонов, которые включают плацентарные лактогены, пролактин и другие генетические и видовые варианты гормона роста (Nicoll, C.S., et al. (1986) *Endocrine Reviews* 7: 169). Среди них hGH выделяется тем, что он проявляет широкую видоспецифичность и связывается либо с клонированным соматогенным рецептором (Leung, D.W., et al. (1987) *Nature* 330: 537), либо рецептором пролактина (Boutin, J.M., et al. (1988) *Cell*; 53: 69). Клонированный ген для hGH экспрессируется в секретируемой форме в *Escherichia coli* (Chang, C.N., et al. (1987) *Gene* 55: 189), и его ДНК и аминокислотная последовательность известны (Goeddel, et al. (1979) *Nature* 281: 544; Gray, et al. (1985) *Gene* 39: 247).

Гормон роста человека (hGH) участвует в регуляции нормального роста и развития человека. Этот гипогипофизарный гормон проявляет множество биологических эффектов, включая линейный рост (соматогенез), лактацию, активацию макрофагов, инсулиноподобные и диабетогенные эффекты среди прочего (Chawla, R.K. (1983) *Ann. Rev. Med.* 34, 519; Edwards, C.K. et al. (1988) *Science* 239, 769; Thomer, M.O., et al. (1988) *J. Clin. Invest.* 81: 745). Дефицит гормона роста у детей приводит к карликовости, которую успешно лечат в течение более чем десятилетия путем экзогенного введения hGH.

Гормон роста человека (hGH) представляет собой одноцепочечный полипептид, содержащий 191 аминокислоту (молекулярная масса 21500). Дисульфидные связи связывают положения 53 и 165 и положения 182 и 189 (Niall, *Nature, New Biology*, 230: 90 (1971)). hGH является сильнодействующим анаболическим агентом благодаря, в частности, удерживанию азота, фосфора, калия и кальция. Обработка гипогипофизарных крыс гормоном роста может восстанавливать по меньшей мере часть скорости роста крыс (Moore et al., *Endocrinology* 122: 2920-2926 (1988)). Среди его наиболее выдающихся эффектов у гипогипофизарных (GH-дефицитных) субъектов ускоряется линейный рост кости-пластинки-хряща, что приводит к увеличению роста (Kaplan, *Growth Disorders in Children and Adolescents* (Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1964)).

hGH вызывает множество физиологических и метаболических эффектов в различных животных моделях, включая линейный рост кости, лактацию, активацию макрофагов, инсулиноподобные и диабетогенные эффекты и другое (R.K. Ghawla et al., *Annu. Rev. Med.* 34: 519 (1983); O.G.P. Isaksson et al., *Annu. Rev. Physiol.* 47, 483 (1985); C.K. Edwards et al., *Science* 239, 769 (1988); M.O. Thomer and M.L. Vance, *J. Clin. Invest.* 82: 745 (1988); J.P. Hughes and H.G. Friesen, *Annu. Rev. Physiol.* 47: 469 (1985)). Известно, что особенно у женщин после менопаузы секреция GH снижается с возрастом (Millard et al., *Neurobiol. Aging*, 11: 229-235 (1990); Takahashi et al., *Neuroendocrinology M*, L6-137-142 (1987); см. также Rudman et al., *J. Clin. Invest.*, 67: 1361-1369 (1981) и Blackman, *Endocrinology and Aging*, 16: 981 (1987)). Известно также, что некоторые проявления старения, в том числе уменьшение массы постной

части тела, увеличение массы жировой ткани и истончение кожи, можно снижать путем обработки гормоном роста 3 раза в неделю (смотри, например, Rudman et al., N. Eng. J. Med, 323: 1-6 (1990) и сопроводительную статью Dr. Vance в том же самом выпуске журнала (стр. 52-54)). Эти биологические эффекты являются результатом взаимодействия между hGH и специфическими клеточными рецепторами. Были клонированы два разных человеческих рецептора - hGH рецептор печени (D.W. Leung et al., Nature 330: 537 (1987)) и рецептор пролактина человека (J.M. Boutin et al., Mol. Endocrinology. 3: 1455 (1989)). Однако, вероятно, существуют другие, в том числе плацентарный рецептор лактогена человека (M. Freemark, M. Comer, G. Komer, and S. Handwerger, Endocrinol. 120: 1865 (1987)). Эти гомологичные рецепторы содержат гликозилированный внеклеточный гормонсвязывающий домен, единичный трансмембранный домен и цитоплазматический домен, которые значительно различаются по последовательности и размеру. Предполагается, что один или более чем один рецептор играют определяющую роль в физиологической реакции на hGH.

Как правило, физиологически активные белки, введенные в организм, могут проявлять свою фармакологическую активность только в течение короткого периода времени из-за высокой скорости их клиренса в организме. К тому же относительная гидрофобность этих белков может ограничивать их стабильность и/или растворимость.

В целях снижения скорости клиренса, увеличения стабильности или аннулирования антигенности терапевтических белков были предложены способы, при которых белки химически модифицируют водорастворимыми полимерами. Химическая модификация этого типа может эффективно блокировать протеолитический фермент от физического контакта с главной цепью белка, тем самым предотвращая расщепление.

Химическое присоединение некоторых водорастворимых полимеров может эффективно снижать почечный клиренс благодаря увеличению гидродинамического объема молекулы. Дополнительные преимущества включают при определенных обстоятельствах увеличение стабильности и периода циркуляции терапевтического белка, увеличение растворимости и уменьшение иммуногенности. Полиалкиленоксид, в частности полиэтиленгликоль (PEG), представляет собой одну такую химическую группировку, которая была использована в получении терапевтических белковых продуктов (глагол "пэгилировать" означает "присоединять по меньшей мере одну молекулу PEG"). Было показано, что присоединение полиэтиленгликоля защищает от протеолиза (Sada, et al., J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139 (1991)), и способы присоединения некоторых полиэтиленгликолевых группировок доступны (смотри патент США № 4179337, Davis et al., "Non-Immunogenic Polypeptides", выданный 18 декабря 1979, и патент US 4002531, Royer, "Modifying enzymes with Polyethylene Glycol and Product Produced Thereby", выданный 11 января 1977; обзор смотри в Abuchowski et al., in Enzymes as Drugs. J.S. Holcberg and J. Roberts, eds. pp. 367-383 (1981)).

Были использованы другие водорастворимые полимеры, такие как сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо случайные сополимеры).

Описан целый ряд примеров пэгилированных терапевтических белков. ADAGEN<sup>®</sup>, пэгилированный препарат аденозиндеаминазы, одобрен для лечения тяжелого сочетанного иммунодефицитного заболевания. ONCASPAR<sup>®</sup>, пэгилированная L-аспарагиназа, одобрен для лечения гиперчувствительных пациентов с ALL (острый лимфобластный лейкоз). Пэгилированная супероксиддисмутаза прошла клинические испытания для лечения травмы головы. Пэгилированный  $\alpha$ -интерферон (US 5738846, 5382657) одобрен для лечения гепатита; сообщается, что пэгилированная глюкоцереброзидаза и пэгилированный гемоглобин прошли предклинические испытания. Другим примером является пэгилированный IL-6 (EP 0442724 под названием "Modified hIL-6", в котором раскрыты молекулы полиэтиленгликоля, присоединенные к IL-6).

Еще одним специфическим терапевтическим белком, который был химически модифицирован, является гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF). G-CSF индуцирует быструю пролиферацию и высвобождение нейтрофильных гранулоцитов в кровоток, тем самым обеспечивая терапевтический эффект в борьбе с инфекцией. В EP 0401384, опубликованном 12 декабря 1990, под названием "Chemically Modified Granulocyte Colony Stimulating Factor", описаны материалы и способы для получения G-CSF, к которому присоединяют молекулы полиэтиленгликоля. О модифицированном G-CSF и его аналогах сообщается также в EP 0473268, опубликованном 4 марта 1992, под названием "Continuous Release Pharmaceutical Compositions Comprising a Polypeptide Covalently Conjugated To A Water Soluble Polymer", где заявлено применение различных G-CSF и производных, ковалентно конъюгированных с частицами водорастворимого полимера, такого как полиэтиленгликоль. О модифицированном полипептиде, обладающем активностью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека, сообщается в EP 0335423, опубликованном 4 октября 1989. В US 5824784 предложены способы N-концевой модификации белков или их аналогов и полученные композиции, включая новые композиции химически модифицированного по N-концу G-CSF. В US 5824778 раскрыт химически модифицированный G-CSF.

Что касается полиэтиленгликоля, то множество средств было использовано для присоединения мо-

лекул полиэтиленгликоля к белку. Обычно молекулы полиэтиленгликоля связывают с белком через реакционноспособную группу, находящуюся на белке.

Аминогруппы, такие как, например, аминогруппы на лизиновых остатках или на N-конце, удобны для такого присоединения. Например, Royer (патент US 4002531, упомянутый выше) констатирует, что для присоединения молекул полиэтиленгликоля к ферменту было использовано восстановительное алкилирование. В EP 0539167, опубликованном 28 апреля 1993, Wright, "Peg Imidates and Protein Derivatives Thereof", излагается, что пептиды и органические соединения со свободной(ыми) аминогруппой(ами) модифицируют имидатным производным PEG или родственными водорастворимыми органическими полимерами. В US 5298643 и US 5637749 раскрыты PEG-арилимидаты.

Chamow et al. (Bioconjugate Chem. 5: 133-140 (1994)) сообщают о модификации CD4 иммуноадгезина монометоксиполиэтиленгликольальдегидом путем восстановительного алкилирования. Авторы сообщают, что 50% CD4-Ig было MePEG-модифицировано в условиях, позволяющих контролировать степень пэгилирования (с. 137 там же). Авторы также сообщают, что *in vitro* связывающая (с белком gp 120) способность модифицированного CD4-Ig снижается со скоростью, коррелирующей со степенью Me-пэгилирования (там же). Патент US 4904584, Shaw, выданный 27 февраля 1990, относится к модифицированию ряда лизиновых остатков в белках для присоединения молекул полиэтиленгликоля через реакционноспособные аминогруппы.

Многие способы присоединения полимера к белку включают в себя использование группировки, которая действует в качестве связывающей группы. Однако такие группировки могут быть антигенными. Имеется тресилхлоридный способ, при котором не используется никакой связывающей группы, но этот способ может быть трудным для осуществления для получения терапевтических продуктов, поскольку использование тресилхлорида может приводить к образованию токсичных побочных продуктов (смотри Francis et al., в: Stability of protein pharmaceuticals: in vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization (Eds. Ahem, T. and Manning, M.C.) Plenum, New York, 1991. Также Delgado et al., "Coupling of PEG to Protein By Activation With Tresyl Chloride, Applications In Immunoaffinity Cell Preparation", в Separations Using Aqueous Phase Systems, Applications In Cell Biology and Biotechnology, Fisher et al., eds. Plenum Press, New York, N.Y., 1989, pp. 211-213).

Rose et al. (Bioconjugate Chemistry 2: 154-159 (1991)) сообщают о селективном присоединении линкерной группы карбогидразид к C-концевой карбоксильной группе белкового субстрата (инсулин).

WO 93/00109 относится к способу стимуляции чувствительных к GH тканей млекопитающих или птиц, при котором поддерживают постоянную эффективную концентрацию GH в плазме в течение периода времени 3 дня или более. Утверждается, что одним способом достижения такой концентрации в плазме является использование GH, связанного с макромолекулярным веществом, таким как PEG (полиэтиленгликоль). Утверждается, что связывание с макромолекулярным веществом приводит к увеличению периода полужизни. В WO 93/00109 сообщается о гормоне роста человека, пэгилированном с использованием mPEG-альдегида-5000 и mPEG-N-гидроксисукцинимидилового эфира (mPEG-NHS-5000). Использование mPEG-NHS привело к гетерогенным смесям множества пэгилированных форм hGH. В WO 93/00109 также раскрыто использование mPEG-малеимида для пэгилирования цистеиновых вариантов hGH.

В WO 99/03887 раскрыт цистеиновый вариант гормона роста, который пэгилируют. Обозначенный как BT-005, этот конъюгат претендует на то, чтобы быть более эффективным в стимуляции увеличения массы крыс с дефицитом гормона роста и чтобы иметь более длительный период полужизни, чем период полужизни hGH.

Clark et al. также сообщили о гормоне роста человека, пэгилированном с использованием сукцинимидилового эфира карбоксиметилированного PEG (Journal of Biological Chemistry 271: 21969-21977, 1996). Clark et al. описывают производные hGH возрастающего размера, использующие mPEG-NHS-5000, которые селективно конъюгируются с первичными аминами. Возрастающие уровни PEG модификации снижали сродство к своему рецептору и повышали EC<sub>50</sub> в анализе, основанном на клетках, вплоть до 1500-кратной величины. В Olson et al., Polymer Preprints 38: 568-569, 1997 раскрыто применение N-гидроксисукцинимидила (NHS) PEG и сукцинимидилпропионата (SPA) PEG для получения множества видов пэгилированного hGH.

В WO 94/20069 предсказательно раскрыт пэгилированный hGH как часть препарата для доставки в легкие.

В US 4179337 раскрыты способы пэгилирования ферментов и гормонов для получения физиологически активных, неиммуногенных, водорастворимых полипептидных конъюгатов. GH упомянут как один пример гормона, который пэгилируют.

В EP 458064 A2 раскрыто пэгилирование введенных или природно присутствующих цистеиновых в соматотропине остатков. В EP 458064 A2 упоминается также включение двух цистеиновых остатков в петлю, называемую омега петлей, которая, как установлено, локализована на остатках 102-112 в дикого типа бычьего соматотропина. Более конкретно, в EP 458064 A2 раскрыта замена остатков под номерами 102 и 112 бычьего соматотропина от Ser до Cys и от Tyr до Cys, соответственно.

В WO 95/11987 предложено присоединение PEG к тиольной группе цистеинового остатка, который

либо присутствует в родительской молекуле, либо введен путем сайт-направленного мутагенеза. WO 95/11987 относится к пэгиллированию протеазы нексин-1, однако, предлагается также пэгиллирование в целом hGH и других белков.

В WO 99/03887 раскрыт, например, гормон роста, модифицированный путем вставки дополнительных цистеиновых остатков вместо сериновых остатков и присоединения PEG к введенным цистеиновым остаткам.

WO 00/42175 относится к способу изготовления белков, содержащих свободные цистеиновые остатки для присоединения PEG. В WO 00/42175 раскрыты следующие мутеины hGH: T3C, S144C и T148C и их цистеин-пэгиллирование.

WO 9711178 (а также US 5849535, US 6004931 и US 6022711) относится к применению вариантов GH в качестве агонистов или антагонистов hGH. В WO 9711178 также раскрыто пэгиллирование hGH, включающее пэгиллирование лизина и введение или замещение лизина (например, K168A и I72R). В WO 9711178 также раскрыто замещение G120K.

В предыдущих сообщениях о пэгиллировании hGH требуется присоединение множества PEG, приводящее к нежелательной гетерогенности продукта, для достижения гидродинамического объема, большего, чем отсечка 70K молекулярной массы почечной фильтрации, как описано Knauf, M.J. et al. в J. Biol. Chem. 263: 15064-15070, 1988.

Молекула GH с более длительным полупериодом циркуляции могла бы снизить число необходимых введений и потенциально обеспечить более оптимальные терапевтические уровни hGH с конкомитант-усиленным терапевтическим эффектом.

Согласно настоящему изобретению предложены химически модифицированные конъюгаты hGH, имеющие пониженную гетерогенность, пониженную скорость клиренса, повышенную продолжительность пребывания в плазме, улучшенную растворимость, увеличенную стабильность, пониженную антигенность или их комбинации.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение относится к химически модифицированному hGH и его вариантам-агонистам, которые обладают по меньшей мере одним улучшенным химическим или физиологическим свойством, выбранным из, но не ограниченным ими, пониженной скорости клиренса, повышенной продолжительности пребывания в плазме, увеличенной стабильности, улучшенной растворимости и пониженной антигенности. Таким образом, как описано ниже более подробно, настоящее изобретение имеет целый ряд аспектов, относящихся к химическому модифицированию hGH и его вариантов-агонистов, а также к конкретным модификациям с использованием различных полиэтиленгликолевых группировок.

Настоящее изобретение также относится к способам получения химически модифицированного hGH и его вариантов-агонистов.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим химически модифицированный hGH и его варианты-агонисты.

Модифицированный hGH и его варианты-агонисты по настоящему изобретению могут быть полезны в лечении, без ограничения, карликовости (GHD), GHD взрослых, синдрома Тернера, в длительном лечении недостаточности роста у детей, которые родились с малым для гестационного возраста размером тела (SGA), для лечения пациентов с синдромом Прадера-Вилли (PWS), хронической почечной недостаточностью (CRI), связанного со СПИДом истощения, старением, последней стадией почечной недостаточности и кистозным фиброзом.

### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1 представляет воспроизведение восстановительного и невосстановительного SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) анализа продуктов реакции hGH и 20K PEG-ALD и анионообменно очищенного 20K PEG-ALD hGH. Дорожка 1. Белковые стандарты молекулярной массы. Дорожка 2. Восстановленный hGH - 10 мкг. Дорожка 3. Реакционная смесь восстановленного 20K линейного PEG-ALD hGH - 10 мкг. Дорожка 4. Восстановленный анионообменно очищенный 20K линейный PEG-ALD hGH - 10 мкг. Дорожка 5. Слепой контроль. Дорожка 6. Невосстановленный hGH - 10 мкг. Дорожка 7. Реакционная смесь невосстановленного 20K линейного PEG-ALD hGH - 10 мкг. Дорожка 8. Невосстановленный анионообменно очищенный 20K линейный PEG-ALD hGH - 10 мкг. Дорожка 9. Слепой контроль. Дорожка 10. Белковые стандарты молекулярной массы.

Фиг. 2 представляет воспроизведение невосстановительного SDS-PAGE анализа различных анионообменно очищенных пэгиллированных молекул hGH. Дорожка 1. Белковые стандарты молекулярной массы. Дорожка 2. hGH - 10 мкг. Дорожка 2. 4-6 x 5K PEG-SPA hGH - 10 мкг. Дорожка 3. 20K линейный PEG-ALD hGH - 10 мкг. Дорожка 4. 20K разветвленный PEG-ALD hGH - 10 мкг. Дорожка 5. 40K разветвленный PEG hGH - 10 мкг.

Фиг. 3 показывает воспроизведения профилей RP-HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой) элюирования трипсиновых гидролизатов hGH, 40K Br PEG-ALD hGH и 40K Br PEG-NHS hGH. PEG, связанный преимущественно с N-концом hGH (как показано в 40K Br ALD hGH), приводит к снижению пика N-концевого (T1) фрагмента с получением нового Пэгиллированного T1 пика.

Фиг. 4 представляет сравнение *in vivo* биоактивности непэгилированного hGH, дозированного ежедневно (0,3 мг/кг/сутки), с биоактивностью моноэгилированного hGH, дозированного подкожно (п.к.) 1 раз каждые 6 дней (1,8 мг/кг), иллюстрируя увеличение массы гипофизэктомизированных крыс в течение периода 11 суток.

Фиг. 5 представляет сравнение *in vivo* биоактивности непэгилированного hGH, дозированного п.к. ежедневно (0,3 мг/кг/сутки), с биоактивностью 4-6 x 5K PEG-SPA-hGH, моноэгилированного 20K разветвленным PEG-ALD hGH и моноэгилированного 40K разветвленным PEG-ALD hGH, каждого дозированного п.к. 1 раз каждые 6 дней (1,8 мг/кг), иллюстрируя увеличение массы гипофизэктомизированных крыс в течение периода 11 суток.

Фиг. 6 представляет сравнение *in vivo* биоактивности непэгилированного hGH, дозированного п.к. ежедневно (0,3 мг/кг/сутки), с биоактивностью 4-6 x 5K PEG-СМНВА-hGH, моноэгилированного 20K линейным ALD, моноэгилированного 30K линейным ALD, моноэгилированного 20K разветвленным PEG-ALD hGH и моноэгилированного 40K разветвленным PEG-ALD hGH, каждого дозированного п.к. 1 раз каждые 6 дней (1,8 мг/кг), иллюстрируя увеличение роста большеберцовой кости у гипофизэктомизированных крыс в течение периода 11 суток.

Фиг. 7 представляет сравнение *in vivo* биоактивности однократной 1,8 мг/кг п.к. дозы непэгилированного hGH, моноэгилированного 5K линейного PEG-ALD hGH, моноэгилированного 20K линейного PEG-ALD hGH, моноэгилированного 20K разветвленного PEG-ALD hGH, моноэгилированного 20K линейного PEG-гидразида hGH, моноэгилированного 30K линейного PEG-ALD hGH, моноэгилированного 40K разветвленного PEG-ALD hGH, 4-6 x 5K PEG SPA hGH, 4-6 x 5K PEG-СМНВА hGH, иллюстрируя увеличение уровней IGF-1 в плазме у гипофизэктомизированных крыс в течение периода 9 суток.

#### Подробное описание

hGH и его варианты-агонисты являются членами семейства рекомбинантных белков, описанных в US 4658021 и US 5633352. Их рекомбинантное получение и способы применения подробно описаны в US 4342832, US 4601980, US 4898830, US 5424199 и US 5795745.

Любой очищенный и выделенный hGH или его вариант-агонист, который продуцируется клетками-хозяевами, такими как *E. coli* и животные клетки, трансформированными или трансфицированными с использованием рекомбинантно-генетических методик, может быть использован в настоящем изобретении. Дополнительные варианты hGH описаны в заявке US Ser. No. 07/715300, поданной 14 января 1991, в заявке US Ser. No. 07/743614, поданной 9 августа 1991, и в WO 92/09690, опубликованной 11 января 1992. Среди них hGH или его вариант-агонист, который продуцируется трансформированной *E. coli*, особенно предпочтителен. Такой hGH или его вариант-агонист может быть получен в больших количествах с высокой чистотой и гомогенностью. Например, вышеуказанный hGH или его вариант-агонист может быть получен способом, описанным в US 4342832, US 4601980, US 4898830, US 5424199 и US 5795745. Термин "по существу, имеет следующую аминокислотную последовательность" означает, что вышеуказанная аминокислотная последовательность может включать в себя изменение одной или более чем одной аминокислоты (делецию, присоединение, вставку или замену), поскольку такие изменения не будут вызывать какого-либо неблагоприятного несходства в функции для hGH или его варианта-агониста. Более предпочтительно использовать hGH или его вариант-агонист, по существу, имеющий аминокислотную последовательность, в которую включены по меньшей мере один (одна) лизин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, неспаренный цистеиновый остаток, свободная N-концевая  $\alpha$ -аминогруппа или свободная C-концевая карбоксильная группа.

В соответствии с настоящим изобретением полиэтиленгликоль ковалентно связан через аминокислотные остатки hGH или его варианта-агониста. Специалисту в данной области известно множество активированных полиэтиленгликолей, имеющих целый ряд различных функциональных групп, линкеров, конфигураций и молекулярных масс, которые могут быть использованы для создания конъюгатов PEG-hGH или конъюгатов PEG-вариант-агонист hGH (смотри обзор в Roberts M.J. et al., *Adv. Drug Del. Rev.* 54: 459-476, 2002; Harris J.M. et al., *Drug Delivery Systems* 40: 538-551, 2001). Аминокислотный остаток может представлять собой любой реакционноспособный остаток(ки), имеющий(ие), например, свободные amino-, карбоксильные, сульфгидрильные (тиольные), гидроксильные, гуанидинильные или имидзильные группы, с которыми концевая реакционноспособная группа активированного полиэтиленгликоля может быть связана. Аминокислотные остатки, имеющие свободные аминогруппы, могут включать лизиновые остатки и/или N-концевой аминокислотный остаток, аминокислотные остатки, имеющие свободную карбоксильную группу, могут включать аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту и/или C-концевые аминокислотные остатки, аминокислотные остатки, имеющие свободный сульфгидрил (тиол), такие как цистеин, аминокислотные остатки, имеющие свободный гидроксил, такие как серин или тирозин, аминокислотные остатки, имеющие свободный гуанидинил, такие как аргинин, и аминокислотные остатки, имеющие свободный имидзильный, такие как гистидин.

В другом воплощении оксимный химизм (Lemieux & Bertozzi Tib. Tech. 16: 506-513, 1998) используется для направленного воздействия на N-концевые сериновые остатки.

Полиэтиленгликоль, используемый согласно настоящему изобретению, не ограничен какой-либо конкретной формой или диапазоном молекулярной массы. Молекулярная масса полиэтиленгликоля мо-

жет находиться между 500 и 100000. Обычно используют полиэтиленгликоль с молекулярной массой 500-60000 и предпочтительно от 1000 до 40000. Более предпочтительно молекулярная масса составляет более 5000 до примерно 40000.

Еще в одном воплощении полиэтиленгликоль представляет собой разветвленный PEG, имеющий более чем одну присоединенную PEG группировку. Предпочтительные примеры разветвленных PEG описаны в US 5932462, US 5342940, US 5643575, US 5919455, US 6113906, US 5183660, WO 02/09766, Kodera Y., *Bioconjugate Chemistry* 5: 283-288 (1994) и Yamasaki et al., *Agric. Biol. Chem.*, 52: 2125-2127, 1998. В предпочтительном воплощении молекулярная масса каждого полиэтиленгликоля разветвленного PEG составляет 5000-20000.

Полиалкиленоксиды, особенно полиэтиленгликоли, связывают с hGH или его вариантом-агонистом через концевую реакционноспособную группу, которая может оставлять или может не оставлять связывающую группу (спейсер) между PEG и белком. Для того, чтобы образовать конъюгаты hGH или его вариантов-агонистов по настоящему изобретению, полимеры, такие как полиалкиленоксид, превращают в активированные формы, как этот термин известен среднему специалисту в данной области. Например, реакционноспособная группа представляет собой концевую реакционноспособную группу, которая опосредует связь между химическими группировками на белке, такими как amino-, карбоксильные или тиольные группы, и полиэтиленгликолем. Обычно одну или обе концевые группы гидроксильного конца полимера (то есть альфа и омега концевые гидроксильные группы) превращают в реакционноспособные функциональные группы, которые дают возможность ковалентной конъюгации. Этот процесс часто называют "активацией", а полиэтиленгликолевый продукт, имеющий реакционноспособную группу, здесь и далее называют "активированным полиэтиленгликолем". Полимеры, содержащие как  $\alpha$ , так и  $\epsilon$  связывающие группы, называют "бис-активированными" полиалкиленоксидами и "бифункциональными". Полимеры, содержащие одинаковую реакционноспособную группу на  $\alpha$  и  $\epsilon$  концевых гидроксилах, иногда называют "гомобифункциональными" или "гомобис-активированными". Полимеры, содержащие разные реакционноспособные группы на  $\alpha$  и  $\epsilon$  концевых гидроксилах, иногда называют "гетеробифункциональными" (смотри, например, WO 01/26692) или "гетеробис-активированными". Полимеры, содержащие одну реакционноспособную группу, называют "моноактивированными" полиалкиленоксидами или "монофункциональными". Аналогично, другие, по существу, неантигенные полимеры являются "активированными" или "функционализированными".

Таким образом, активированные полимеры подходят для опосредования связи между химическими группировками на белке, такими как  $\alpha$ - или  $\epsilon$ -амино-, карбоксильная или тиольная группы, и полиэтиленгликолем. бис-Активированные полимеры могут взаимодействовать таким образом с двумя белковыми молекулами или одной белковой молекулой и небольшой реакционноспособной молекулой в другом воплощении для эффективного образования белковых полимеров или конъюгатов белок-небольшая молекула через поперечные связи.

Функциональные группы, способные взаимодействовать либо с аминоконцевой  $\alpha$ -аминогруппой, либо  $\epsilon$ -аминогруппой лизина, имеющих на hGH или его варианте-агонисте, включают N-гидроксисукцинимидиловые эфиры, карбонаты, такие как n-нитрофенил или сукцинимидил (US 5808096, 5612460, US 5324844, US 55122614); карбонилимидазол; азлактоны (US 5321095, US 5567422); циклические имидтионы (US 5405877, 5349001); изоцианаты или изотиоцианаты (Greenwald R.B., *J. Org. Chem.*, 60: 331-336, 1995); тресилхлорид (EP 714402, EP 439508); галогенформаты (WO 96/40792) и альдегиды.

Функциональные группы, способные взаимодействовать с карбоновокислотными группами, реакционноспособными карбонильными группами и окисленными углеводными группировками на hGH или его варианте-агонисте, включают первичные амины и гидразиновые и гидразидные функциональные группы, такие как ацилгидразиды, карбазаты, полукарбаматы, тиокарбазаты и т.д. (WO 01/70685).

Меркаптогруппы, если они имеются на hGH или его варианте-агонисте, также могут быть использованы в качестве мест присоединения для подходящим образом активированных полимеров с реакционноспособными группами, такими как тиолы, малеимиды, сульфоны и фенилглиоксали (смотри, например, патент США № 5093531, описание которого включено сюда изобретения путем ссылки). Другие нуклеофилы, способные взаимодействовать с электрофильным центром, включают, но не ограничиваются ими, например, гидроксил, amino, карбоксил, тиол, активный метилен и т.п.

Охвачены также полимеры, включающие в себя липофильные и гидрофильные группировки, раскрытые в US 5359030 и US 5681811, US 5438040 и 5359030.

В WO 98/32466 также раскрыты галогенированные PEG, которые могут взаимодействовать с amino-, тиольными группами и ароматическими гидроксигруппами, которые непосредственно ковалентно присоединяют PEG к белку.

В одном предпочтительном воплощении изобретения вторичные аминные или амидные связи образуют с использованием N-концевой  $\alpha$ -аминогруппы или  $\epsilon$ -аминогруппы лизина hGH или его варианта-агониста и активированного PEG. Еще в одном предпочтительном аспекте изобретения вторичную аминную связь образуют между N-концевой первичной  $\alpha$ - или  $\epsilon$ -аминогруппой hGH или его варианта-агониста и одноцепочечным или разветвленным PEG альдегидом путем восстановления подходящим восстано-

вителем, таким как  $\text{NaCNBH}_3$ ,  $\text{NaBH}_3$ , пиридинборан и т.п., как описано в Chamow et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 133-140 (1994) и в US 5824784.

В предпочтительном воплощении по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 81%, предпочтительно по меньшей мере 82%, предпочтительно по меньшей мере 83%, предпочтительно по меньшей мере 84%, предпочтительно по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 86%, предпочтительно по меньшей мере 88%, предпочтительно по меньшей мере 89%, предпочтительно по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, предпочтительно по меньшей мере 92%, предпочтительно по меньшей мере 93%, предпочтительно по меньшей мере 94%, предпочтительно по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 96%, предпочтительно по меньшей мере 97% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% полиэтиленгликоля находится на аминоконцевой  $\alpha$ -аминогруппе.

В другом предпочтительном воплощении изобретения полимеры, активированные амидобразующими линкерами, такими как сукцинимидильные эфиры, циклические имидтионы или т.п., используют для осуществления образования связи между hGH или его вариантом-агонистом и полимером (смотри, например, патент США № 5349001, патент США № 5405877 и Greenwald, et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 17: 101-161, 2000, которые включены в данное описание изобретения путем ссылки). Один предпочтительный активированный полиэтиленгликоль, который может связываться со свободными аминоконцевыми hGH или его варианта-агониста, представляет собой одноцепочечный или разветвленный N-гидроксисукцинимидполиэтиленгликоль и может быть получен путем активации эфиров янтарной кислоты полиэтиленгликоля N-гидроксисукцинимидом.

Другие предпочтительные воплощения изобретения включают использование других активированных полимеров для образования ковалентных связей этого полимера с hGH или его вариантом-агонистом через  $\epsilon$ -амино- или другие группы. Например, изоцианатные или изотиоцианатные формы терминально активированных полимеров могут быть использованы для образования связей на основе мочевины или тиомочевины с аминоконцевыми лизина (Greenwald R.B., *J. Org. Chem.*, 60: 331-336, 1995).

Еще в одном предпочтительном аспекте изобретения карбаматные (уретановые) связи образованы с аминоконцевыми белка, как описано в патентах US 5122614, 5324844 и 5612640, которые включены сюда путем ссылки. Примеры включают полимеры, активированные N-сукцинимидилкарбонатом, паранитрофенилкарбонатом и карбонилимидазолом. В другом предпочтительном воплощении данного изобретения бензотриазолкарбонатное производное PEG связано с аминоконцевыми на hGH или его варианте-агонисте.

Другой аспект представляет собой пролекарство или форму пролонгированного высвобождения hGH или его варианта-агониста, состоящую из водорастворимого полимера, такого как полиэтиленгликоль, присоединенного к молекуле hGH или его варианта-агониста через функциональный линкер, который, безусловно, может быть разрушен ферментативным или pH-направленным гидролизом для высвобождения свободного hGH или его варианта-агониста или другого производного hGH или его варианта-агониста.

Пролекарство может также представлять собой "двойное пролекарство" (Bundgaard in *Advanced Drug-Delivery Reviews* 3: 39-65, 1989), предполагающее использование каскада латенциации. В таких системах гидролитическая реакция включает в себя начальную, скорость-ограничивающую (медленную) ферментативную или pH-направленную стадию и вторую стадию, включающую быстрый неферментативный гидролиз, который происходит только после протекания первой стадии. Такой высвобождаемый полимер обеспечивает получение белковых конъюгатов, которые недолговечны и могли бы действовать в качестве резервуара, который непрерывно высвобождает hGH или его вариант-агонист. Такие функциональные линкеры описаны в US 5614549; US 5840900; US 5880131; US 5965119; US 5965565; US 6011042; US 6153655; US 6180095 B1; US 6413507; Greenwald R.B. et al., *J. Med. Chem.* 42: 3657-3667, 1999; Lee, S. et al., *Bioconjugate Chem.* 12: 163-169, 2001; Garman A.J. et al., *FEBS Lett.* 223: 361-365, 1987; Woghiren C. et al., *Bioconjugate Chem.* 4: 314-318, 1993; Roberts M.J. et al., *J. Pharm. Sci.* 87: 1440-1445, 1998; Zhao X., in *Ninth Int. Symp. Recent Adv. Drug Delivery Syst.* 199; Greenwald R.B. et al., *J. Med. Chem.* 43: 475-487, 2000; и Greenwald R.B. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 17: 101-161, 2000. Zalipsky et al., 28<sup>th</sup> Int. Symp. On controlled Release of Bioactive Materials 1; 73-74, 2001.

Реакции конъюгирования, называемые реакциями пэгирования, исторически осуществляли в растворе с молярным избытком полимера и безотносительно к тому, где полимер будет присоединяться к белку. Однако такие общие методики обычно оказывались не пригодными для конъюгирования биоактивных белков с неантигенными полимерами с одновременным сохранением достаточной биоактивности. Один способ сохранения биоактивности hGH или его варианта-агониста заключается в том, чтобы в процессе присоединения полимера, по существу, избежать конъюгации тех реакционноспособных групп hGH или его варианта-агониста, которые ассоциируются с сайтом(ами) связывания рецептора. Другой аспект настоящего изобретения заключается в создании способа конъюгирования полиэтиленгликоля с hGH или его вариантом-агонистом с сохранением высоких уровней остаточной активности.

Химическая модификация посредством ковалентной связи может быть осуществлена в любых под-

ходящих условиях, обычно принятых в реакции биологически активного вещества с активированным полиэтиленгликолем. Реакцию конъюгации проводят в относительно мягких условиях, чтобы избежать инактивации hGH или его варианта-агониста. Мягкие условия включают поддержание pH реакционного раствора в пределах от 3 до 10 и температуры реакции в пределах от примерно 0 до 37°C. В случаях, когда реакционноспособные аминокислотные остатки в hGH или его варианте-агонисте имеют свободные аминогруппы, вышеуказанную модификацию предпочтительно осуществляют в подходящем буфере (pH от 3 до 10), выбранном из неограниченного перечня, в том числе фосфатном, MES, цитратном, ацетатном, сукцинатном или HEPES, в течение 1-48 ч при 4-37°C. При направленном воздействии на N-концевые аминогруппы реагентами, такими как PEG альдегиды, предпочтительно поддерживают pH 4-8. Активированный полиэтиленгликоль можно использовать в примерно 0,05-100-кратном, предпочтительно примерно 0,01-2,5-кратном молярном количестве от числа свободных аминогрупп hGH или его варианта-агониста. С другой стороны, если реакционноспособные аминокислотные остатки в hGH или его варианте-агонисте имеют свободные карбоксильные группы, вышеуказанную модификацию предпочтительно проводят при pH от примерно 3,5 до примерно 5,5. Например, модификацию с полиоксиэтилендиамином проводят в присутствии карбодиимида (pH 3,5-5) в течение 1-24 ч при 4-37°C. Активированный полиэтиленгликоль можно использовать в 0,05-300-кратном молярном количестве от числа свободных карбоксильных групп hGH или его варианта-агониста.

В отдельных воплощениях верхний предел количества полимера, включаемого в реакции конъюгации, превышает примерно 1:1 до степени, которая возможна для взаимодействия активированного полимера и hGH или его варианта-агониста без образования значительного количества высокомолекулярных продуктов, то есть более примерно 20% конъюгатов, содержащих более чем примерно одну цепь полимера на молекулу hGH или его варианта-агониста. Например, в данном аспекте изобретения предполагается, что соотношения вплоть до примерно 6:1 могут быть использованы для образования значительных количеств желаемых конъюгатов, которые затем могут быть выделены из любых высокомолекулярных продуктов.

В другом аспекте данного изобретения бифункционально активированные производные PEG могут быть использованы для создания полимерного hGH или его вариант-агонист-PEG молекул, в которых множество молекул hGH или его варианта-агониста поперечно-сшиты посредством PEG. Хотя описанные здесь реакционные условия могут приводить к значительным количествам немодифицированного hGH или его варианта-агониста, немодифицированный hGH или его вариант-агонист легко можно рециклизовать в будущие партии для последующих реакций конъюгации. К удивлению, способы по настоящему изобретению производят очень мало, то есть менее примерно 30% и более предпочтительно менее примерно 10%, высокомолекулярных продуктов и продуктов, содержащих более одной полимерной цепи на hGH или его варианте-агонисте. Эти реакционные условия резко отличаются от условий, обычно используемых для реакций полимерной конъюгации, где активированный полимер присутствует в несколько-кратном молярном избытке относительно мишени. В других аспектах изобретения полимер присутствует в количествах от примерно 0,1/аминогруппа до примерно 50 экв. на эквивалент hGH или его варианта-агониста. В других аспектах изобретения полимер присутствует в количествах от примерно 1 до примерно 10 экв. на эквивалент hGH или его варианта-агониста.

Реакции конъюгации по настоящему изобретению первоначально обеспечивают получение реакционной смеси или пула, содержащего моно- и ди-PEG-hGH конъюгаты, непрореагировавший hGH, непрореагировавший полимер и обычно менее примерно 20% высокомолекулярных продуктов. Высокомолекулярные продукты включают конъюгаты, содержащие более одной цепи полимера и/или продукты полимеризованного PEG-hGH или его варианта-агониста. После удаления непрореагировавших продуктов и высокомолекулярных продуктов выделяют композиции, содержащие, главным образом, конъюгаты моно- и диполимер-hGH или его вариант-агонист. Принимая во внимание тот факт, что конъюгаты по большей части включают одну цепь полимера, эти конъюгаты, по существу, являются гомогенными. Эти модифицированные hGH или его варианты-агонисты обладают по меньшей мере примерно 0,1% *in vitro* биологической активности, связанной с нативным или немодифицированным hGH или его вариантом-агонистом, измеренной с использованием стандартных анализов пролиферации клеток FDC-P1 (Clark et al. *Journal of Biological Chemistry* 271: 21969-21977, 1996), анализа связывания рецептора (US 5057417) или роста гипопизэктомизированных крыс (Clark et al. *Journal of Biological Chemistry* 271: 21969-21977, 1996). Однако в предпочтительных аспектах изобретения модифицированный hGH или его вариант-агонист обладают примерно 25% *in vitro* биологической активности, более предпочтительно модифицированный hGH или его вариант-агонист обладает примерно 50% *in vitro* биологической активности, более предпочтительно модифицированный hGH или его вариант-агонист обладает примерно 75% *in vitro* биологической активности и наиболее предпочтительно модифицированный hGH или его вариант-агонист обладает эквивалентной или улучшенной *in vitro* биологической активностью.

Способы по настоящему изобретению предпочтительно включают, скорее, ограниченные соотношения полимера и hGH или его варианта-агониста. Так, было обнаружено, что конъюгаты hGH или его варианта-агониста преимущественно ограничены продуктами, содержащими только одну цепь полимера. Более того, связывание полимера с реакционноспособными группами hGH или его варианта-агониста

является, по существу, менее случайным, чем когда используют более высокие молярные избытки полимерного линкера. Немодифицированный hGH или его вариант-агонист, присутствующий в реакционном пуле после завершения реакции конъюгации, может быть рециклизован в будущие реакционные смеси с использованием ионообменной хроматографии или размер-эксклюзионной хроматографии или подобных методик разделения.

Полиэтиленгликоль-модифицированный hGH или его вариант-агонист, а именно химически модифицированный белок по настоящему изобретению, может быть очищен от реакционной смеси общепринятыми способами, которые используют для очистки белков, такими как диализ, высаливание, ультрафильтрация, ионообменная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC), гель-хроматография и электрофорез. Ионообменная хроматография особенно эффективна в удалении непрореагировавших полиэтиленгликоля и hGH или его варианта-агониста. В дополнительном воплощении изобретения продукты моно- и диполимер-hGH или его вариант-агонист выделяют из реакционной смеси, чтобы удалить высокомолекулярные продукты и немодифицированный hGH или его вариант-агонист. Разделение осуществляют путем помещения смешанных продуктов в буферный раствор, содержащий от примерно 0,5 до 10 мг/мл конъюгатов hGH или его вариант-агонист-полимер. Подходящие растворы имеют pH от примерно 4 до примерно 8. Растворы предпочтительно содержат одну или более чем одну буферную соль, выбранную из KCl, NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaBO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H и NaOH.

В зависимости от реакционного буфера раствор полимерного конъюгата hGH или его варианта-агониста сначала можно подвергнуть буферному обмену/ультрафильтрации для удаления любого непрореагировавшего полимера. Например, раствор конъюгата PEG-hGH или его вариант-агонист можно подвергнуть ультрафильтрации через отсекающую низкую молекулярную массу (от 10000 до 30000 Да) мембрану для удаления большей части нежелательных материалов, таких как непрореагировавший полимер, поверхностно-активные вещества, если они присутствуют, или т.п.

Фракционирование конъюгатов в пул, содержащий желаемые продукты, предпочтительно осуществляют с использованием среды ионообменной хроматографии. Такая среда способна селективно связывать конъюгаты PEG-hGH или его вариант-агонист за счет разницы в заряде, которая варьирует предсказуемым до некоторой степени образом. Например, поверхностный заряд hGH или его варианта-агониста определяется числом доступных заряженных групп на поверхности белка. Эти заряженные группы обычно служат в качестве точки потенциального присоединения полиалкиленоксидных полимеров. Следовательно, конъюгаты hGH или его варианта-агониста будут иметь заряд, отличающийся от заряда других продуктов, что дает возможность селективного выделения.

Сильно полярные анионо- или катионообменные смолы, такие как соответственно четвертичные аминные или сульфопропиловые смолы, используют для способа по настоящему изобретению. Ионообменные смолы особенно предпочтительны. Неограниченный перечень охваченных коммерчески доступных катионообменных смол, подходящих для использования согласно настоящему изобретению, включает в себя SP-hitrap<sup>®</sup>, SP Sepharose HP<sup>®</sup> и SP Sepharose<sup>®</sup> fast flow. Другие подходящие катионообменные смолы, например S и CM смолы, также могут быть использованы. Неограниченный перечень анионообменных смол, в том числе коммерчески доступных анионообменных смол, подходящих для использования согласно настоящему изобретению, включает в себя Q-hitrap<sup>®</sup>, Q Sepharose HP<sup>®</sup> и Q Sepharose<sup>®</sup> fast flow. Другие подходящие анионообменные смолы, например DEAE смолы, также могут быть использованы.

Например, анионо- или катионообменную смолу предпочтительно упаковывают в колонку и уравнивают общепринятыми средствами. Используют буфер, имеющий такой же pH и осмолярность, как и раствор конъюгированного с полимером hGH или его варианта-агониста. Буфер для элюирования предпочтительно содержит одну или более чем одну соль, выбранную из KCl, NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaBO<sub>4</sub> и (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Конъюгатсодержащий раствор затем адсорбируют на колонку с непрореагировавшим полимером, и некоторые высокомолекулярные продукты не удерживаются. При завершении загрузки градиентный поток буфера для элюирования с увеличением концентрации соли наносят на колонку для элюирования желаемой фракции конъюгированного с полиалкиленоксидом hGH или его варианта-агониста. Элюированные объединенные фракции предпочтительно ограничены однородными конъюгатами полимеров после стадии катионо- или анионообменного разделения. Любые неконъюгированные hGH или его вариант-агонист продукты затем можно удалить обратной промывкой колонки общепринятыми методами. При желании, далее моно- и мультипегилированные hGH или его вариант-агонист продукты можно отделить друг от друга путем дополнительной ионообменной хроматографии или размер-эксклюзионной хроматографии.

Методики с многократными изократическими стадиями с увеличением концентрации соли или pH также могут быть использованы. Многократные изократические стадии элюирования с увеличением концентрации должны приводить к последовательному элюированию ди-, а затем моно-hGH или его вариант-агонист-полимерных конъюгатов.

Температурный диапазон для элюирования находится между примерно 4 и примерно 25°C. Предпочтительно элюирование проводят при температуре между от примерно 4 и примерно 22°C. Например, элюирование фракции PEG-hGH или его вариант-агонист определяют по УФ-поглощению при 280 нм.

Сбора фракции можно достичь через простые временные профили элюирования.

Поверхностно-активное вещество может быть использовано в способе конъюгирования полиэтиленгликолевого полимера с группировкой hGH или его варианта-агониста. Подходящие поверхностно-активные вещества включают агенты ионного типа, такие как додецилсульфат натрия (SDS). Другие ионные поверхностно-активные вещества, такие как додецилсульфат лития, четвертичные аммониевые соединения, таурохолевая кислота, каприловая кислота, декансульфоновая кислота и т.п., также могут быть использованы. Неионные поверхностно-активные вещества также могут быть использованы. Например, могут быть использованы такие материалы, как полиоксиэтиленсорбитаны (Tweens), полиоксиэтиленэфиры (Tritons). Смотри также Neugebauer, A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry (1992) Calbiochem Corp. Единственным ограничением на поверхностно-активные вещества, используемые в способах по настоящему изобретению, является то, что их используют в условиях и при концентрациях, которые не вызывают значительной необратимой денатурации hGH или его варианта-агониста и не ингибируют полностью конъюгацию полимера. Поверхностно-активные вещества присутствуют в реакционных смесях в количествах от примерно 0,01 до 0,5%, предпочтительно от 0,05 до 0,5% и наиболее предпочтительно от примерно 0,075 до 0,25%. Допускаются также смеси поверхностно-активных веществ.

Считается, что поверхностно-активные вещества обеспечивают временную обратимую защитную систему в процессе конъюгирования полимера. Было показано, что поверхностно-активные вещества избирательно препятствуют агрегации полимеров, в то же время давая возможность протекания конъюгации по лизину или аминоконцу.

Полиэтиленгликоль-модифицированный hGH или его вариант-агонист по настоящему изобретению обладает более устойчивым фармакологическим эффектом, который, возможно, может быть связан с его пролонгированным периодом полужизни *in vivo*.

К тому же полиэтиленгликоль-модифицированный hGH или его вариант-агонист по настоящему изобретению может быть полезен для лечения гипогипофизарной карликовости (GHD), недостаточности гормона роста у взрослых, синдрома Тернера, недостаточности роста у детей, которые родились с малым для гестационного возраста размером тела (SGA), синдрома Прадера-Вилли (PWS), хронической почечной недостаточности (CRI), связанного со СПИДом истощения и старения.

Полиэтиленгликоль-модифицированный hGH или его вариант-агонист по настоящему изобретению может быть приготовлен в виде фармацевтических средств, содержащих также фармацевтически приемлемый разбавитель, агент для получения изотонического раствора, pH-кондиционер и т.п., для введения их пациенту.

Вышеуказанные фармацевтические средства можно вводить подкожно, внутримышечно, внутривенно, в легкие, интрадермально или перорально в зависимости от назначения лечения. Доза может зависеть также от вида и состояния нарушения у пациента, которого лечат, причем обычно она находится между 0,1 и 5 мг при инъекции и между 0,1 и 50 мг при пероральном введении для взрослого.

Охваченные полимерные вещества предпочтительно также водорастворимы при комнатной температуре. Неограниченный перечень таких полимеров включает гомополимеры полиалкиленоксида, такие как полиэтиленгликоль или полипропиленгликоли, полиоксиэтиленированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры при условии сохранения водорастворимости блок-сополимеров.

В качестве альтернативы полимерам на основе PEG могут быть использованы эффективно неантигенные материалы, такие как декстран, поливинилпирролидоны, полиакриламиды, поливиниловые спирты, полимеры на основе углеводов и т.п. Действительно, активация  $\alpha$ - и  $\omega$ -концевых групп этих полимерных веществ может быть осуществлена способами, подобными способам, используемым для превращения полиалкиленоксидов, и, следовательно, должна быть очевидна специалисту в данной области. Специалистам в данной области будет понятно, что вышеупомянутый перечень является просто иллюстративным и что имеются в виду все полимерные материалы, имеющие качества, описанные здесь. Для целей настоящего изобретения "эффективно неантигенный" означает все материалы, о которых в данной области техники известно, что они нетоксичны и не вызывают заметного иммунного ответа у млекопитающих.

#### Определения

Ниже представлен перечень сокращений и их соответствующих значений, которые используются в материалах заявки взаимозаменяемо:

г	грамм(ы)
мг	миллиграмм(ы)
мл	миллилитр(ы)
КТ	комнатная температура
PEG	полиэтиленгликоль

Полное содержание всех публикаций, патентов и патентных заявок, процитированных в данном описании изобретения, включено сюда путем ссылки, как если бы каждая(ый) отдельная(ый) публикация, патент или патентная заявка были включены сюда специально и индивидуально.

Хотя вышеупомянутое изобретение подробно описано путем иллюстрации и приведения примера в

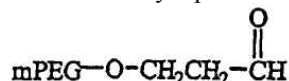
целях ясности понимания специалистом, в свете данного изобретения, должно быть очевидно, что изменения и модификации могут быть сделаны без отступления от сущности и объема настоящего изобретения. Следующие ниже примеры приведены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения объема изобретения, которое выше описано в более широких терминах.

В нижеследующих примерах hGH представляет собой hGH с последовательностью SEQ ID NO: 1. Понятно, что другие члены семейства полипептидов hGH или его варианта-агониста также могут быть пэгилированы способом, аналогичным проиллюстрированному в последующих примерах.

Все процитированные ссылки, патенты или заявки во всей их полноте включены в данное описание изобретения путем ссылки, как если бы они были написаны здесь.

Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано путем ссылки на следующие ниже примеры, которые, однако, не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1. Прямоцепочечный PEG-ALD с молекулярной массой 20000 hGH.



Этот пример демонстрирует способ получения, по существу, гомогенных препаратов hGH, монопэгилированных по N-концу, путем восстановительного алкилирования. Реагент метокси-линейный PEG-пропиональдегид с молекулярной массой приблизительно 20000 (Shearwater Corp.) селективно связывали с N-концом hGH путем восстановительного аминирования, пользуясь разницей в величине относительной  $\text{pK}_a$  первичного амина по N-концу против величин  $\text{pK}_a$  первичных аминов по  $\epsilon$ -аминоположению лизиновых остатков. hGH белок, растворенный в концентрации 10 мг/мл в 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6,0, 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0 или в 10 mM ацетате натрия (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4,5, подвергали взаимодействию с метокси-PEG-пропиональдегидом, M-PEG-ALD (Shearwater Corp., Huntsville, AL) путем добавления M-PEG-ALD до получения относительного молярного соотношения PEG:hGH 0,1:0,7 на амин (возможно, 8% ацетонитрила также может быть добавлено). Реакции катализировали путем добавления исходного раствора 1M  $\text{NaCNBH}_4$  (Sigma Chemical, St. Louis, MO), растворенного в  $\text{H}_2\text{O}$ , до конечной концентрации 10-50 mM. Реакции проводили в темноте при температуре от 4°C до КТ в течение 18-24 ч. Реакции останавливали путем добавления 1M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ~pH 7,6 до конечной концентрации Tris 50 mM или разводили в подходящем буфере для немедленной очистки.

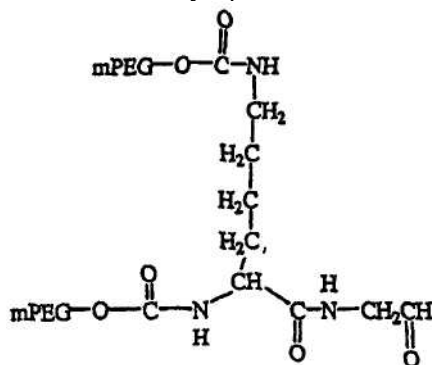
Пример 2. Прямоцепочечный PEG-ALD с молекулярной массой 30000 hGH.

Реагент метокси-линейный PEG-пропиональдегид с молекулярной массой 30000 (Shearwater Corp.) связывали с N-концом hGH, используя методику, описанную для примера 1.

Пример 3. Прямоцепочечный PEG-ALD с молекулярной массой 5000 hGH.

Реагент метокси-линейный PEG-пропиональдегид с молекулярной массой 5000 (Fluka) связывали с N-концом hGH, используя методику, описанную для примера 1.

Пример 4. Разветвленный PEG-ALD с молекулярной массой 40000 hGH.

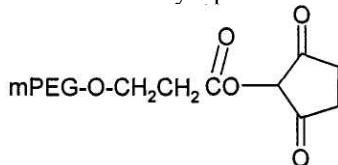


Реагент метокси-разветвленный PEG-альдегид (PEG2-ALD) с молекулярной массой 40000 (Shearwater Corp.) связывали с N-концом hGH, используя методику, описанную для примера 1.

Пример 5. Разветвленный PEG-ALD с молекулярной массой 20000 hGH.

Реагент метокси-разветвленный PEG-альдегид (PEG2-ALD) с молекулярной массой 20000 (Shearwater Corp.) связывали с N-концом hGH, используя методику, описанную для примера 1, с использованием молярных соотношений PEG к hGH от 0,1 до 0,5 на амин.

Пример 6. Прямоцепочечный SPA-PEG с молекулярной массой 30000 hGH.

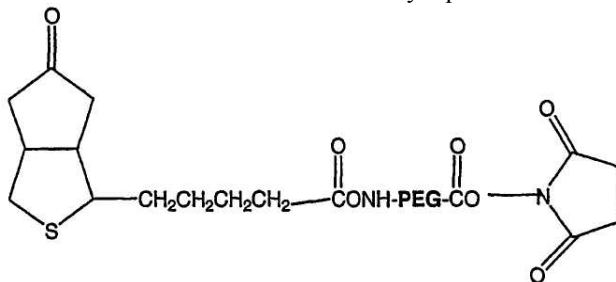


Этот пример демонстрирует способ получения, по существу, гомогенных препаратов моноэтилированного hGH с использованием N-гидроксисукцинимидовых (NHS) активных эфиров. Исходный раствор белка hGH растворяли в концентрации 10 мг/мл в 0,25M HEPES буфере, pH 7,2 (возможно, 8% ацетонитрила также может быть добавлено). Этот раствор затем подвергали взаимодействию с метокси-PEG-сукцинимидилпропионатом (SPA-PEG) путем добавления SPA-PEG до получения относительного молярного соотношения PEG:hGH от 0,1 до 0,65 на амин. Реакции проводили при температуре от 4°C до КТ в течение от 5 мин до 1 ч. Реакции останавливали путем снижения pH до 4,0 0,1н. уксусной кислотой или путем добавления 5-кратного молярного избытка Tris HCl.

Пример 7. Прямоцепочечный SPA-PEG с молекулярной массой 20000 hGH.

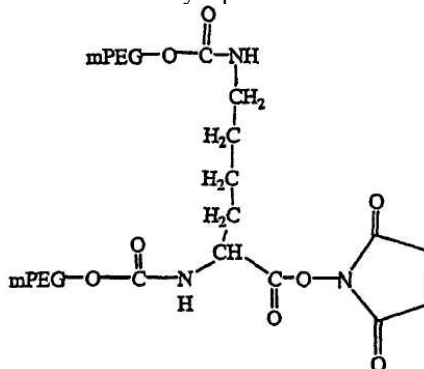
Реагент прямоцепочечный SPA-PEG с молекулярной массой 20000 (Shearwater Corp.) связывали с N-концом hGH, используя методику, описанную для примера 6.

Пример 8. Прямоцепочечный биотин-SPA-PEG с молекулярной массой 3400 hGH.



Реагент прямоцепочечный биотин- PEG-CO<sub>2</sub>-NHS с молекулярной массой 3400 (Shearwater Corp.) связывали с hGH, используя методику, описанную для примера 6.

Пример 9. Разветвленный NHS-PEG с молекулярной массой 10000 hGH.



Разветвленный PEG2-NHS с молекулярной массой 10000 (Shearwater Corp.) связывали с hGH, используя методику, описанную для примера 6.

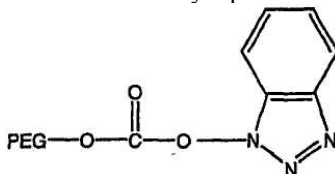
Пример 10. Разветвленный NHS-PEG с молекулярной массой 20000 hGH.

Разветвленный PEG2-NHS с молекулярной массой 20000 (Shearwater Corp.) связывали с hGH, используя методику, описанную для примера 6.

Пример 11. Разветвленный NHS-PEG с молекулярной массой 40000 hGH.

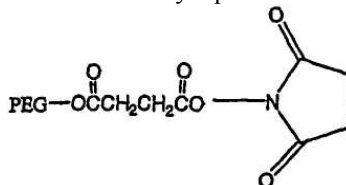
Разветвленный PEG2-NHS с молекулярной массой 40000 (Shearwater Corp.) связывали с hGH, используя методику, описанную для примера 6.

Пример 12. Прямоцепочечный PEG-BTC с молекулярной массой 20000 hGH.



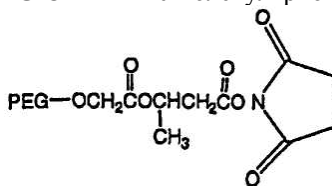
PEG-BTC с молекулярной массой 20000 (Shearwater Corp.) связывали с hGH, используя методику, описанную для примера 6. Этот пример демонстрирует способ получения, по существу, гомогенных препаратов эгиллированного hGH с использованием бензотриазолкарбонатных производных PEG.

Пример 13. Прямоцепочечный PEG-SS с молекулярной массой 5000 hGH.



Сукцинимидилсукцинат-PEG с молекулярной массой 5000 (SS-PEG) (Shearwater Corp.) связывали с hGH, используя методику, описанную для примера 6. Этот пример демонстрирует способ получения, по существу, гомогенных препаратов пэгилированного hGH с использованием гидролизуемой связи.

Пример 14. Прямоцепочечный PEG-СМ-НВА с молекулярной массой 20000 hGH.

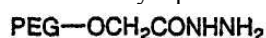


Карбоксиметилгидроксимасляную кислоту-PEG с молекулярной массой 20000 (СМ-НВА-PEG) (Shearwater Corp.) связывали с hGH, используя методику, описанную для примера 6. Этот пример демонстрирует способ получения, по существу, гомогенных препаратов пэгилированного hGH с использованием гидролизуемой связи.

Пример 15. Прямоцепочечный 2-4 х PEG-СМ-НВА с молекулярной массой 5000 hGH.

PEG-СМ-НВА с молекулярной массой 5000 (Shearwater Corp.) связывали с hGH, используя процедуру, описанную для примера 13.

Пример 16. Прямоцепочечный HZ-PEG с молекулярной массой 20000 hGH.



Этот пример демонстрирует способ получения, по существу, гомогенных препаратов пэгилированного hGH с использованием метокси-PEG-гидразида, HZ-PEG, с молекулярной массой 20000 (Shearwater Corp.). Исходный раствор белка hGH растворяли в концентрации 10 мг/мл в 10 mM MES, pH 4,0. Этот раствор затем подвергали взаимодействию с HZ-PEG путем добавления твердого вещества до получения относительного молярного соотношения PEG:hGH от 0,1 до 5,0 на карбоксильную группу. Реакции катализировали карбодиимидом (EDC, EOAC, EDEC) в конечной концентрации от 2 до 4 mM. Реакции осуществляли при 4°C в течение периода от 2 ч до в течение ночи или при комнатной температуре в течение периода от 10 мин до в течение ночи. Реакции останавливали путем удаления неконъюгированного PEG и карбодиимида путем очистки катионным обменом.

Пример 17. Мультипэгилированные продукты.

Модифицированные hGHs, имеющие два или более присоединенных PEG (мультипэгилированные), были получены также из продуктов примеров 1 и 4 и отделены от монопэгилированных продуктов с использованием анионообменной хроматографии. Модифицированные hGH, имеющие два или более присоединенных PEG (мультипэгилированные), также отделяли от монопэгилированных продуктов с использованием катионообменной хроматографии. Модифицированные hGH, имеющие два или более присоединенных PEG (мультипэгилированные), также были получены в примеров 2, 3, 5-13 и очищены аналогично примерам 1 и 4.

Пример 18. Очистка пэгилированного hGH.

Пэгилированные hGH продукты очищали от реакционной смеси до чистоты более 95% (SEC анализ) одностадийной ионообменной хроматографией.

#### Анионообменная хроматография

PEG-hGH продукты очищали от реакционной смеси до чистоты более 95% (SEC анализ) одностадийной анионообменной хроматографией. Монопэгилированный hGH очищали от немодифицированного hGH и мультипэгилированных hGH продуктов с использованием анионообменной хроматографии. Типичную реакционную смесь 20K альдегид hGH (5-100 мг белка), как описано выше, очищали на Q-Sepharose Nitrap колонке (1 или 5 мл) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) или Q-Sepharose fast flow колонке (26/20, объем слоя 70 мл) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), уравновешенной в 25 mM HEPES, pH 7,3 (буфер А). Реакционную смесь разбавляли 5-10-кратно буфером А и загружали на колонку со скоростью потока 2,5 мл/мин. Колонку промывали 8-колоночными объемами буфера А. Затем различные hGH продукты элюировали с колонки в 80-100-колоночные объемы буфера А и линейный градиент NaCl 0-100 mM. Элюант контролировали по поглощению при 280 нм ( $A_{280}$ ) и 5 мл фракции собирали. Фракции объединяли по степени пэгилирования, например моно, ди, три и т.д. (как определено в примере 15). Пул затем концентрировали до 0,5-5 мг/мл в концентраторе Centriprep YM10 (Amicon, Technology Corporation, Northborough, MA). Концентрацию белка в пуле определяли по  $A_{280}$ , используя коэффициент экстинкции 0,78. Общий выход очищенного моно 20K PEG-альдегид-hGH из этого процесса составил 25-30%.

#### Катионообменная хроматография

Катионообменную хроматографию проводят на высокоэффективной колонке SP Sepharose (Pharmacia ХК 26/20, объем слоя 70 мл), уравновешенной в 10 mM ацетате натрия, pH 4,0 (буфер В). Реакционную смесь разбавляют 10-кратно буфером В и загружают на колонку со скоростью потока 5 мл/мин. Затем колонку промывают 5-колоночными объемами буфера В, а затем 5-колоночными объемами 12% буфера С (10 mM ацетат, pH 4,5, 1M NaCl). После этого PEG-hGH продукт элюируют с колонки линейным гра-

диентом от 12 до 27% буфера С в 20-колоночные объемы. Элюант контролируют при 280 нм и собирают 10 мл фракции. Фракции объединяют по степени пэгилирования (моно, ди, три и т.д.), обменивают в 10 мМ ацетатный буфер, pH 4,5, и концентрируют до 1-5 мг/мл во встряхиваемой кювете, оснащенной мембраной Amicon YM10. Концентрацию белка в пуле определяют по поглощению при A280 нм, используя коэффициент экстинкции 0,78. Общий выход монопэгилированного hGH из этого процесса составляет от 10 до 50%.

Пример 19. Биохимическая характеристика.

Пулы очищенного пэгилированного hGH характеризовали восстановительным и невосстановительным SDS-PAGE, денатурирующей и денатурирующей размер-экслюзионной хроматографией, аналитической анионообменной хроматографией, N-концевым секвенированием, хроматографией гидрофобного взаимодействия и HPLC с обращенной фазой.

Размер-экслюзионная хроматография-высокоэффективная жидкостная хроматография (SEC-HPLC)

Неденатурирующая SEC-HPLC.

Реакцию метокси-PEG различных химизмов присоединения, размеров, линкеров и геометрий с hGH, пулы анионообменной очистки и конечные очищенные продукты оценивали с использованием неденатурирующей SEC-HPLC. Аналитическую неденатурирующую SEC-HPLC осуществляли с использованием колонки Tosohaas G4000PWXL, 7,8 мм x 30 см (Tosohaas Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) или Superdex 200 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) в 20 мМ фосфате с pH 7,2, 150 мМ NaCl при скорости потока 0,5 мл/мин. Пэгилирование сильно увеличивает гидродинамический объем белка, приводя к сдвигу к более раннему времени удерживания. Новые продукты наблюдались в реакционных смесях PEG альдегид hGH наряду с немодифицированным hGH. Эти пэгилированные и непэгилированные продукты разделяли хроматографией на Q-Sepharose, и затем было показано, что полученные очищенные моно-PEG-альдегид-hGH продукты элюируются в виде единичного пика при неденатурирующей SEC (чистота более 95%). Стадия хроматографии на Q-Sepharose обеспечила эффективное удаление свободных PEG, hGH и мультипэгилированных hGH продуктов из монопэгилированных hGH. Неденатурирующая SEC-HPLC продемонстрировала, что эффективный размер различных пэгилированных hGH был намного больше, чем их соответственные теоретические молекулярные массы (табл. 1).

Таблица 1

Размер-экслюзионная хроматография (SEC)

	Молекулярная масса (теоретическая)	Размер (SEC)
HGH	22000	21000
4-6 x 5K PEG-SPA GH	47000	128000
2-4 x 5K PEG-CMHBA (NHS) GH	37000	71000
20K PEG-ALD GH	42000	120000
20K разветвленный PEG-ALD GH	42000	114000
20K PEG-CMHBA (NHS) GH	42000	115000
20K PEG-Гидразид 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 разветвленный PEG-ALD GH	62000	330000
40K разветвленный PEG-NHS GH	62000	253000

Денатурирующая SEC-HPLC.

Взаимодействие различных метокси-PEG с hGH, фракций анионообменной очистки и конечные очищенные продукты оценивали с использованием денатурирующей SEC-HPLC. Аналитическую денатурирующую SEC-HPLC осуществляли с использованием колонки Tosohaas 3000SWXL 7,8 мм x 30 см, (Tosohaas Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) в 100 мМ фосфате с pH 6,8, 0,1% SDS при скорости потока 0,8 мл/мин. Пэгилирование сильно увеличивает гидродинамический объем белка, приводя к сдвигу к более раннему времени удерживания. Новые продукты наблюдались в реакционной смеси 20K PEG альдегид hGH наряду с немодифицированным hGH. Эти пэгилированные и непэгилированные продукты

разделяли хроматографией на Q-Sepharose, и затем было показано, что полученный очищенный моно 20K PEG-альдегид hGH элюируется в виде единичного пика при денатурирующей SEC (чистота более 95%). Стадия хроматографии на Q-Sepharose обеспечила эффективное удаление свободных PEG, hGH и мультимодифицированных hGH продуктов из мономодифицированного hGH.

#### SDS PAGE/PVDF перенос.

SDS-PAGE использовали для оценки реакции различных PEG реагентов с hGH и очищенными конечными продуктами. Примеры этой методики показаны с использованием моно 20K линейного и разветвленного 20K и 40K PEG альдегида и 4x6 5K SPA PEG (фиг. 1 и 2). SDS-PAGE осуществляли на 10-20% Tris трициновых гелях толщиной 1 мм (Invitrogen, Carlsbad, CA) в восстановительных и невосстановительных условиях и окрашивали с использованием набора для окрашивания Novex Colloidal Coomassie™ G-250 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Очищенные моно PEG-альдегид hGH продукты мигрируют в виде одной основной полосы на SDS-PAGE. Полосы блоттировали на PVDF (поливинилиденфторидную) мембрану для последующей идентификации N-концевой последовательности.

#### Аналитическая анионообменная HPLC.

Аналитическую анионообменную HPLC использовали для оценки реакции различных mPEG с hGH, фракциями анионообменной очистки и конечными очищенными продуктами. Аналитическую анионообменную HPLC осуществляли с использованием Tosohaas Q5PW или DEAE-PW анионообменной колонки 7,5x75 мм (Tosohaas Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) в 50 mM Tris, pH 8,6, при скорости потока 1 мл/мин. Образцы элюировали линейным градиентом 5-200 mM NaCl.

#### HPLC с обращенной фазой (RP-HPLC).

Реакционные смеси PEG-GH и очищенные пэгиллированные продукты анализировали RP-HPLC для идентификации hGH продуктов, моно- и мультимодифицированных hGH продуктов и для отслеживания окисленных форм hGH, а также изоформ PEG hGH, имеющих единственный PEG, связанный по различным сайтам (например, N-конец против ε-аминогрупп лизина). RP-HPLC осуществляли с использованием колонки RP-HPLC Zorbax SB-CN 150 или 250x4,6 мм (3,5 или 5 мм). Эксперименты проводили при температуре окружающей среды при типичной загрузке 10 мг белка на образец. Буфер А представляет собой 0,1% трифторуксусную кислоту в воде, буфер В представляет собой 0,1% трифторуксусную кислоту в ацетонитриле. Градиент, который приводит к 1/2% увеличению в В в минуту, следующий:

Стадия	Время	Поток	%А	%В	Стадия
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-концевая последовательность и пептидное картирование.

Химизм автоматизированного расщепления Эдмана использовали для определения NH<sub>2</sub>-концевой последовательности белка. Секвенатор Applied Biosystems Model 494 Procise (Perkin Elmer, Wellesley, MA) использовали для расщепления. Соответствующие PTH-AA производные идентифицировали RP-HPLC анализом в оперативном режиме, используя Applied Biosystems Model 140C PTH анализатор, снабженный колонкой PTH-C18 Perkin Elmer/Brownlee с внутренним диаметром 2,1 мм. Полосы белков 20K линейного и 20 и 40K разветвленного PEG-ALD hGH, перенесенные на PVDF мембраны, или растворы очищенных 20K линейного и разветвленного 20 и 40K PEG-ALD hGH секвенировали. Наблюдался очищенный 20K линейный PEG-hGH, дающий основной сигнал (выход приблизительно 88%), который обладал ожидаемой последовательностью для hGH, за исключением отсутствия N-концевой аминокислоты. Этот результат является таким, как и ожидалось для белка, пэгиллированного по N-концу посредством химического взаимодействия с альдегидом. Остаток первого цикла является невыделяемым из-за присоединенной PEG группировки. Минорный сигнал (выход приблизительно 12%) имел правильную N-концевую аминокислотную последовательность. Учитывая, что пик, снятый с RP-HPLC, является 100% пэгиллированным, эти данные предполагают, что приблизительно 88% PEG модификации имеет место по N-концу, а остальная часть, очевидно, связана с одним из нескольких возможных лизиновых остатков.

Триптические гидролизаты готовили в концентрации 1 мг/мл и, как правило, использовали 50 мкг материала на гидролизат. Трипсин добавляли так, чтобы отношение трипсина к PEG-hGH составляло 1:30 (мас./мас.). Tris-буфер присутствовал в концентрации 30 mM, pH 7,5. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 16±0,5 ч. Реакции гасили путем добавления 50 мкл 1N. HCl на мл гидролизного раствора. Перед помещением образцов в автодозатор образцы разводили до конечной концентрации 0,25 мг/мл в 6,25% ацетонитриле. Ацетонитрил добавляли первым (до 19,8% ацетонитрила), осторожно перемешивали, а затем добавляли воду до конечного объема (четырехкратный начальный объем). Избыточный гидролизный раствор можно удалить и хранить в течение вплоть до 1 недели при -20°C.

Для анализа использовали HPLC систему Waters Alliance 2695, но другие системы должны давать

аналогичные результаты. Использовали полимерную колонку Astec C-4 25 см x 4,6 мм с частицами 5 мкм. Эксперименты проводили при температуре окружающей среды при типичной загрузке 50 мкг белка на образец. Буфер А представляет собой 0,1% трифторуксусную кислоту в воде, буфер В представляет собой 0,085% трифторуксусную в ацетонитриле. Градиент следующий:

Время	A%	B%	C%	D%	Поток	Кривая
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

Колонку нагревали до 40°C, используя нагревательную рубашку. Пики определяли, используя Waters 996 PDA детектор, собирающий данные между 210 и 300 нм. Полученную при 214 нм хроматограмму использовали для анализа образцов для определения степени N-концевого пэгилирования (потеря фрагмента T-1), как показано в табл. 2.

Таблица 2

Образец	%T-1 присутствующего	%T-1 потерянного	%T-1, присутствующего по сравнению с контролем
Альдегид			
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 разветвленный	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 разветвленный	20,9	79,1	73,5

Пример 20. Фармакодинамические исследования.

Исследования эффективности на гипопизэктомированных крысах

Самок крыс Sprague Dawley, гипопизэктомированных в Harlan Labs, предварительно исследовали на скорость роста в течение периода 7-10 дней. Затем исследования роста проводили в течение 11 дней. Крысы были разделены на группы по 6-8. Группа 1 состояла из крыс, которым либо ежедневно, либо в день 0 и в день 6 подкожно вводили дозу(ы) носителя. Группе 2 ежедневно подкожно вводили дозы GH (0,3 мг/кг/доза). Группе 3 подкожно вводили дозы GH в день 0 и в день 6 (1,8 мг/кг/доза). Группе 4 подкожно вводили дозы PEG-GHs в дни 0, 6 (1,8 мг/кг/доза). Осуществляли мониторинг увеличения массы гипопизэктомированных крыс взвешиванием их, по меньшей мере, через день на протяжении всего исследования. Увеличения массы (среднее +/- SEM (среднеквадратическая погрешность измерения)) для 20K PEG-ALD hGH, 20K и 40K разветвленного PEG-ALD hGH, и 4-6x 5PEG-SPA hGH, дозированных раз в неделю, были аналогичны увеличениям при ежедневном дозировании hGH (фиг. 3 и 4). В табл. 3 суммировано общее увеличение массы (среднее +/- SEM) на день 11 при еженедельном дозировании различных пэгилированных молекул hGH по отношению к ежедневному дозированию hGH.

Таблица 3

## Увеличение массы крысы

Соединение	Однократная еженедельная доза (мг/кг)	Ежедневное увеличение массы в граммах/день (день 0-день 11) (среднее $\pm$ SEM)	% увеличения массы относительно ежедневного hGH увеличения (среднее)
hGH (непэгилированный)	1,8	0,97 $\pm$ 0,12	39%
5K линейный PEG- ALD GH	1,8	0,96 $\pm$ 0,27	36%
20K линейный PEG- ALD GH	1,8	1,99 $\pm$ 0,13 1,43 $\pm$ 0,08 1,7 $\pm$ 0,10	73%
20K линейный CM- HBA PEG GH	1,8	2,36 $\pm$ 0,11	99%
20K линейный PEG- HYD GH	1,8	2,62 $\pm$ 0,22	99%
20K разветвленный PEG-ALD GH	1,8	2,24 $\pm$ 0,07	87%
30K линейный PEG- ALD GH	1,8	2,11 $\pm$ 0,06 1,85 $\pm$ 0,14	94%
30K линейный PEG- SPA GH	1,8	2,6 $\pm$ 0,1	117%
40K разветвленный PEG-ALD GH	1,8	2,57 $\pm$ 0,08	100%
40K разветвленный PEG-NHS GH	1,8	2,53 $\pm$ 0,09	121%
2x20K 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%
2x30K линейный PEG-SPA GH	1,8	3,1 $\pm$ 0,1	134%

По завершении каждого исследования роста животных умерщвляли и анализировали длины костей (большеберцовых). На фиг. 6 показано изменение длины большеберцовой кости (среднее  $\pm$  SEM) на день 11 в ответ на различные конъюгаты PEG-GH, дозированные в день 0 и день 6, или hGH, дозированный ежедневно.

## Уровни IGF-1 у гипопизэктомированных крыс

Эксперименты проводили, как указано выше для исследования увеличения массы, однако, образцы крови отбирали в день 0, 1, 2, 3, 4, 5 и при умерщвлении животных в день 9. Уровни IGF-1 определяли с помощью ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). На фиг. 7 представлено сравнение увеличений уровней IGF-1 в сыворотке (среднее  $\pm$  SEM) у гипопизэктомированных крыс либо после ежедневного дозирования hGH, либо после однократной дозы hGH, либо после дозирования пэгилированного hGH в день 0, день 6.

## Фармакокинетические исследования

Фармакокинетические исследования проводили на нормальных, Sprague-Dawley самцах крыс, мышах и обезьянах Cynomolgus. Инъекции делали либо в виде однократного подкожного (п.к.) болюса 1,8 мг/кг, либо в виде однократной в.в. (внутривенной) дозы 1,0 мг/кг GH или PEG-GH крысам и мышам, используя 6 крыс и до 60 мышей на группу. У обезьян Cynomolgus дозу GH или PEG-GH 0,18 мг/кг использовали и для однократного подкожного болюса, и для в.в. инъекции, используя 2-4 обезьяны на группу. Образцы крови отбирали в течение 1-5 дней, где как подходит, для оценки релевантных ФК (фармакокинетических) параметров (табл. 4). ( $t_{1/2}$ ) = предельный период полужизни, (Cl) = клиренс, (Tmax) = время до максимальной концентрации, Vss = объемное распределение (видимое) в устойчивом состоянии, и (Cmax) = максимальные уровни концентрации GH и PEG-GH в крови, регистрируемые с использованием иммуноанализа при каждом отборе образца.

## Иммуноанализ hGH

Уровни концентрации hGH и пэгилированного hGH белка в плазме крысы, мыши и обезьяны Cynomolgus определяли с использованием hGH AutoDELFIА набора для флуоресцентного иммуноанализа (PerkinElmer Life Sciences), используя соответствующий PEG hGH для построения стандартной кривой.

Таблица 4

Виды	Параметры	40K Br ALD hGH	40K Br NHS hGH	30K ALD hGH	20K ALD hGH	4-6 x 5K SPA
мышь	Доза (мг/кг)	в.в. 1,0 п.к. 1,8	в.в. 1,0 п.к. 1,8	в.в. 1,0 п.к. 1,8	в.в. 1,0 п.к. 1,0	в.в. 1,0 п.к. 1,8
	CL (мл/ч/кг)	2,29	2,12	4,43	7,89	4,53
	Vss (мл/кг)	18	16	24	17	51
	T <sub>1/2</sub> , в.в. (ч)	4,3	3,8	2,8	1,8	11
	T <sub>1/2</sub> , п.к. (ч)	4	6,2	3,7	2,5	9
	Tmax, п.к. (ч)	11	9	6	3	12
	SC AUC (площадь под кривой) (мкг/мл*ч)	682	577	160	31	668
	SC Биодоступ- ность (%)	87	67	39	24	167
крыса	Доза (мг/кг)	в.в. 1,0 п.к. 1,8	в.в. 1,0 п.к. 1,8	в.в. 1,0 п.к. 1,8	в.в. 1,8 п.к. 1,8	в.в. 1,0 п.к. 1,8
	CL (мл/ч/кг)	1,36	1,75	5,75	9,9	2,9
	Vss (мл/кг)	19	25	44	33	36
	T <sub>1/2</sub> , в.в. (ч)	5,4	5,8	3,6	2,2	24
	T <sub>1/2</sub> , п.к. (ч)	5,8	7,1	6,7	2,9	29
	Tmax, п.к. (ч)	24	22	12	9	20
	SC AUC (площадь под кривой) (мкг/мл*ч)	398	344	97	70	249
	SC Биодоступ- ность (%)	30	33	31	39	40
Супо	Доза (мг/кг)	в.в. 0,18 п.к. 0,18	в.в. 0,18 п.к. 0,18	в.в. 0,18 п.к. 0,18	в.в. 0,18 п.к. 0,18	в.в. 0,18 п.к. 0,18
	CL (мл/ч/кг)	1,83	0,78	1,94	2,19	0,49
	Vss (мл/кг)	57	20	29	44	25
	T <sub>1/2</sub> , в.в. (ч)	21	13,6	14,9	7,3	38
	T <sub>1/2</sub> , п.к. (ч)	19	21	12	8,3	35
	Tmax, п.к. (ч)	22	22	10	8	32
	SC AUC (площадь под кривой) (мкг/мл*ч)	100	483	125	38	242
	SC Биодоступ- ность (%)	64	77	97	44	66

## Перечень последовательностей

&lt;110&gt; Pharmacia Corporation

Finn, Rory

Liao, Wei

Siegel, Ned

&lt;120&gt; CHEMICALLY-MODIFIED HUMAN GROWTH HORMONE CONJUGATES

&lt;130&gt; 03582/1/PCT

&lt;150&gt; US 60/331907

&lt;151&gt; 2001-11-20

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 191

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 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

03582\_1\_PCT.ST25.txt  
 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

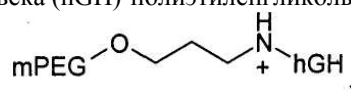
Lys Phe Asp Thr Asp Ser His Asp Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asp Tyr  
 145 150 155 160

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

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат гормон роста человека (hGH)-полиэтиленгликоль (PEG) формулы



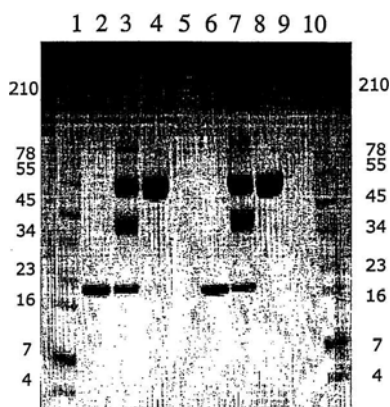
где гормон роста человека (hGH) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а mPEG представляет собой метоксиполиэтиленгликоль, конъюгированный с аминоконцевой  $\alpha$ -аминогруппой в SEQ ID NO: 1.

2. Конъюгат по п.1, где указанная аминоконцевая  $\alpha$ -аминогруппа находится на фенилаланине аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

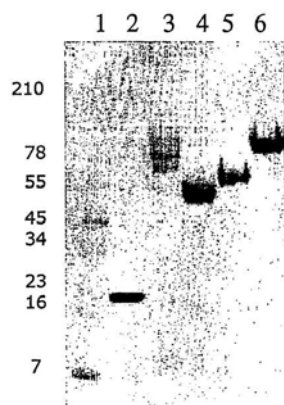
3. Конъюгат по п.2, где по меньшей мере 90% указанного метоксиполиэтиленгликоля конъюгировано с аминоконцевым фенилаланином.

4. Конъюгат по п.3, где указанный метоксиполиэтиленгликоль имеет молекулярную массу примерно 30 кДа.

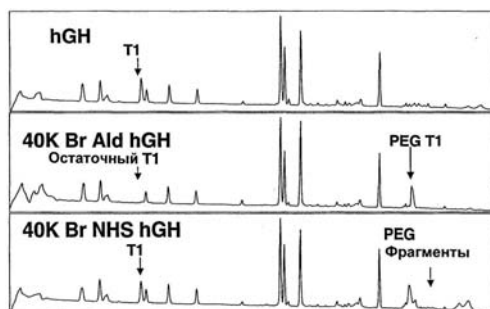
5. Способ лечения пациента с нарушением роста или развития, выбранным из группы, состоящей из дефицита гормона роста (GHD), синдрома Тернера, хронической почечной недостаточности, малого для гестационного возраста размера тела (SGA), при котором указанному пациенту вводят терапевтически эффективное количество hGH конъюгата по пп.1, 2, 3 или 4.



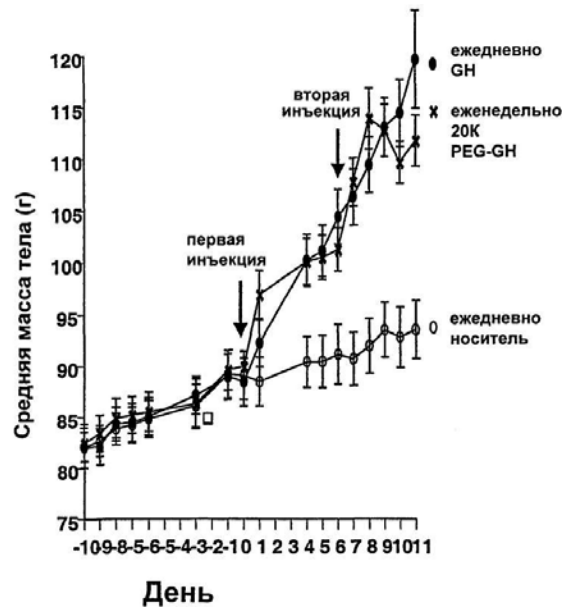
Фиг. 1



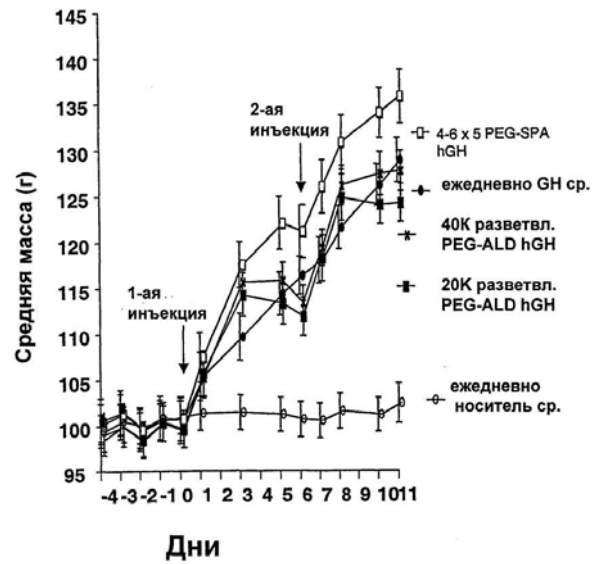
Фиг. 2



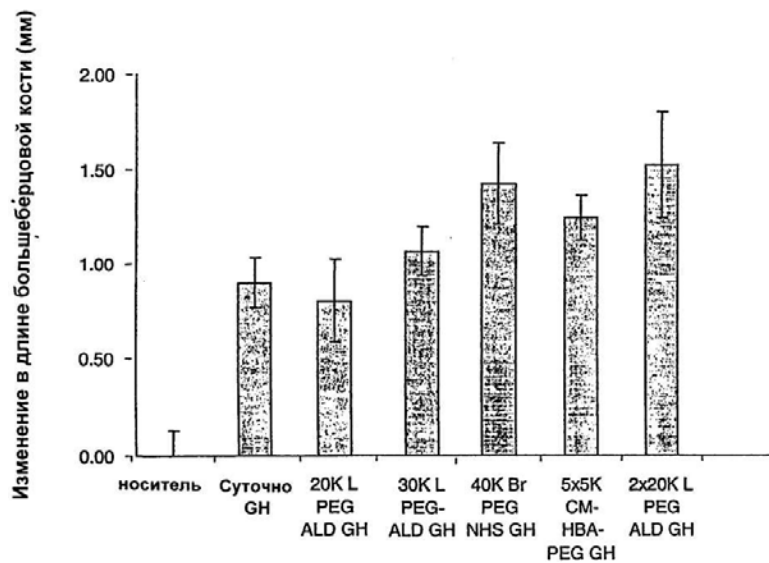
Фиг. 3



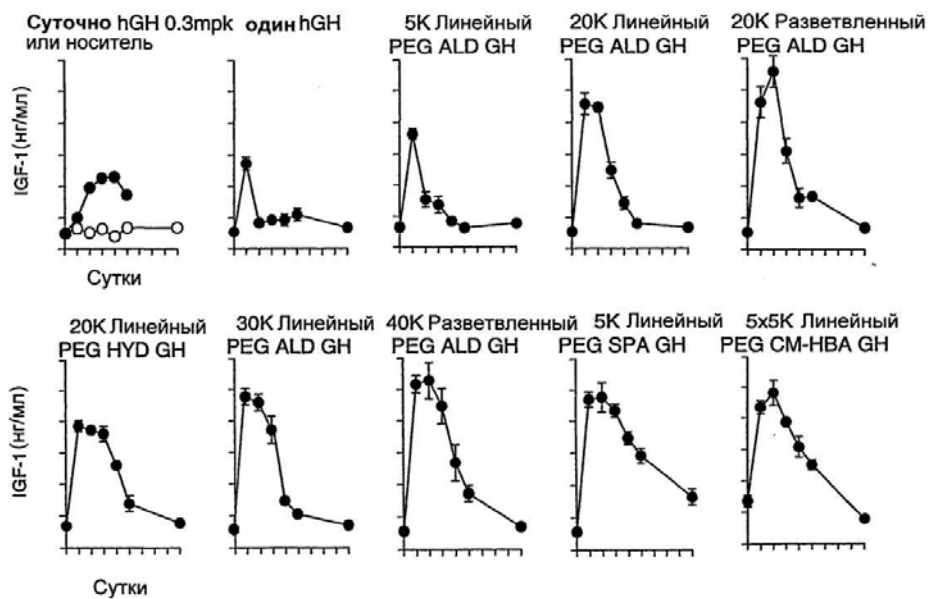
Фиг. 4



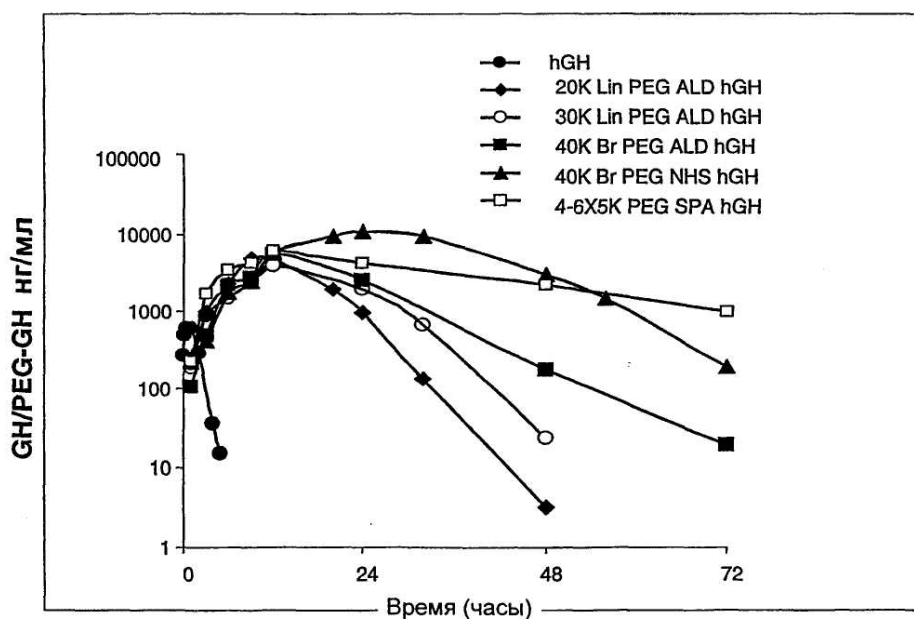
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6