



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21), (22) Заявка: **2007149238/13**, 26.05.2006

(30) Конвенционный приоритет:
01.06.2005 US 60/686,726

(43) Дата публикации заявки: **20.07.2009** Бюл. № 20

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: **09.01.2008**

(86) Заявка РСТ:
DK 2006/000292 (26.05.2006)

(87) Публикация РСТ:
WO 2006/128460 (07.12.2006)

Адрес для переписки:
**103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент", пат.пов. А.Ю.Соболеву**

(71) Заявитель(и):
МАКСИДЖЕН ХОЛДИНГЗ ЛТД. (КУ)

(72) Автор(ы):
**ГЕРМАНСЕН Карстен (DK),
СОНИ Бобби (DK),
РАСМУССЕН Грете (DK)**

(54) ПЕГИЛИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ ГКСФ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**(57) Формула изобретения**

1. Способ увеличения стабильности и единообразия пегилированного полипептида ГКСФ, имеющего, по меньшей мере, одно звено ПЭГ, присоединенное к ε-аминогруппе остатка лизина или N-концевой аминогруппе, и, по меньшей мере, одно звено ПЭГ, присоединенное к гидроксильной группе, включающий подвергание полипептида действию повышенного рН выше 8,0 в течение периода времени, достаточного для удаления звеньев ПЭГ, присоединенных к гидроксильной группе, и понижения рН до около 8,0 или ниже.

2. Способ по п.1, где повышенный рН находится в интервале от приблизительно 8,5 до приблизительно 10,5.

3. Способ по п.2, где повышенный рН находится в интервале от приблизительно 9,0 до приблизительно 10,0.

4. Способ по п.3, где повышенный рН находится в интервале от приблизительно 9,2 до приблизительно 9,8, например, при приблизительно 9,5.

5. Способ по п.1, где полипептид подвергают действию повышенного рН в течение периода времени от приблизительно 2 до приблизительно 100 ч.

6. Способ по п.5, где полипептид подвергают действию повышенного рН в течение периода времени от приблизительно 4 до приблизительно 72 ч.

7. Способ по п.6, где полипептид подвергают действию повышенного рН в течение периода времени от приблизительно 8 до приблизительно 48 ч.

8. Способ по п.7, где полипептид подвергают действию повышенного рН в течение периода времени от приблизительно 12 до приблизительно 30 ч.

9. Способ по п.1, дополнительно включающий подвергание полипептида при пониженном рН, по меньшей мере, одному этапу хроматографической очистки.

10. Способ по п.9, где этап хроматографической очистки является ионообменной хроматографией.

11. Способ по п.10, где рН понижают ниже приблизительно 7,0 и этап хроматографической очистки является катионообменной хроматографией.

12. Способ по п.9, где этап хроматографической очистки является гельфильтрационной хроматографией.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, где пониженный рН находится в интервале от приблизительно 2,0 до приблизительно 5,0.

14. Способ по п.13, где пониженный рН находится в интервале от приблизительно 2,5 до приблизительно 4,5.

15. Способ получения пегилированного полипептида ГКСФ, включающий подвергание полипептида ГКСФ реакции пегилирования с помощью аминоксепифичного активированного полиэтиленгликоля (ПЭГ) для получения пегилированного интермедиата полипептида ГКСФ и последующее подвергание пегилированного интермедиата полипептида ГКСФ действию повышенного рН, по меньшей мере, приблизительно 9,0 в течение периода времени, достаточного для удаления звеньев ПЭГ, присоединенных к гидроксильной группе, для получения пегилированного полипептида ГКСФ.

16. Способ по п.15, где реакцию пегилирования проводят при рН в интервале приблизительно 7,0-9,0.

17. Способ по п.15, где реакцию пегилирования проводят при рН выше 9,0.

18. Способ по п.17, где реакцию пегилирования и последующее удаление звеньев ПЭГ, присоединенных к гидроксильной группе, проводят за один этап при одном и том же значении рН.

19. Способ по п.15, где аминоксепифичный активированный ПЭГ является мПЭГ-сукцинимидилпропионатом (мПЭГ-СПК), мПЭГ-сукцинимидилбутаноатом (мПЭГ-СБК) или мПЭГ-сукцинимидил- α -метилбутаноатом (мПЭГ-СМБ).

20. Способ по п.15, где аминоксепифичный активированный ПЭГ является мПЭГ-сукцинимидилпропионатом (мПЭГ-СПК) с молекулярным весом приблизительно 5 кДа.

21. Способ по п.15, где повышенный рН находится в интервале от приблизительно 9,2 до 11,0.

22. Способ по п.21, где повышенный рН находится в интервале от приблизительно 9,2 до 10,0.

23. Пегилированный полипептид ГКСФ, полученный способом по любому из предшествующих пунктов.

24. Пегилированный полипептид ГКСФ по п.23, где полипептид является вариантом ГКСФ, включающим замещения K16R, K34R, K40R, T105K и S159K относительно ГКСФ дикого типа человека.

25. Композиция, включающая смесь изомеров по положению ПЭГ пегилированного полипептида ГКСФ, где полипептид включает замещения K16R, K34R, K40R, T105K и S159K относительно ГКСФ дикого типа человека и где, по меньшей мере, приблизительно 80% изомеров по положению ПЭГ полипептида являются лизин/N-концевыми изомерами по положению ПЭГ, имеющими три присоединенных звена ПЭГ.

26. Композиция по п.25, где, по меньшей мере, приблизительно 85% изомеров по положению ПЭГ полипептида являются лизин/N-концевыми изомерами по положению ПЭГ, имеющими три присоединенных звена ПЭГ.

27. Композиция по п.25, где, по меньшей мере, приблизительно 95% изомеров по положению ПЭГ полипептида являются лизин/N-концевыми изомерами по положению ПЭГ, имеющими три присоединенных звена ПЭГ.

28. Композиция по п.25, где, по меньшей мере, приблизительно 80% изомеров по положению ПЭГ полипептида, имеющих три присоединенных звена ПЭГ, состоят из двух изомеров по положению ПЭГ, где у одного из изомеров звенья ПЭГ присоединены по N-концевому остатку, Лиз23 и Лиз159 и у другого изомера звенья

ПЭГ присоединены по N-концевому остатку, Лиз105 и Лиз159.

29. Композиция по п.26, где, по меньшей мере, приблизительно 85% изомеров по положению ПЭГ полипептида, имеющих три присоединенных звена ПЭГ, состоят из двух изомеров по положению ПЭГ, где у одного из изомеров звенья ПЭГ присоединены по N-концевому остатку, Лиз23 и Лиз159 и у другого изомера звенья ПЭГ присоединены по N-концевому остатку, Лиз105 и Лиз159.

30. Композиция по п.27, где, по меньшей мере, приблизительно 90% изомеров по положению ПЭГ полипептида, имеющих три присоединенных звена ПЭГ, состоят из двух изомеров по положению ПЭГ, где у одного из изомеров звенья ПЭГ присоединены по N-концевому остатку, Лиз23 и Лиз159 и у другого изомера звенья ПЭГ присоединены по N-концевому остатку, Лиз105 и Лиз159.

31. Композиция, включающая смесь изомеров по положению ПЭГ пегилированного полипептида ГКСФ, где полипептид включает замещения K16R, K34R, K40R, T105K и S159K относительно ГКСФ дикого типа человека и где, по меньшей мере, приблизительно 80% изомеров по положению ПЭГ полипептида являются лизин/N-концевыми изомерами по положению ПЭГ, имеющими три присоединенных звена ПЭГ после хранения в водной композиции сравнения в течение 3 месяцев при температуре 5°C.

32. Композиция, включающая фармацевтически приемлемый носитель и пегилированный полипептид ГКСФ по п.23 или 24 или композицию по любому из пп.25-31.

33. Способ получения смеси лизин/N-концевых изомеров по положению ПЭГ рекомбинантного полипептида ГКСФ, включающего замещения K16R, K34R, K40R, T105K и S159K относительно ГКСФ дикого типа человека, включающий:

- а) экспрессию рекомбинантного полипептида ГКСФ в клетке-хозяине;
- б) выделение рекомбинантного полипептида ГКСФ;
- в) проведение реакции выделенного рекомбинантного полипептида ГКСФ с аминоксифичным активированным ПЭГ для получения множества изомеров по положению ПЭГ рекомбинантного полипептида ГКСФ и
- г) проведение реакции множества изомеров по положению ПЭГ при pH от 8,5 до 10,5 для получения множества частично депегилированных лизин/N-концевых изомеров по положению ПЭГ рекомбинантного полипептида ГКСФ.

34. Способ по п.33, где аминоксифичный активированный ПЭГ выбирают из группы, состоящей из мПЭГ-сукцинимидилпропионата (мПЭГ-СПК), мПЭГ-сукцинимидилбутаноата (мПЭГ-СБК) или мПЭГ-сукцинимидил- α -метилбутаноата (мПЭГ-СМБ).

35. Способ по п.33 или 34, дополнительно включающий подвергание множества лизин/N-концевых изомеров по положению ПЭГ рекомбинантного полипептида ГКСФ одному или более этапам хроматографической очистки для получения, по существу, очищенной смеси лизин/N-концевых изомеров по положению ПЭГ полипептида ГКСФ.

36. Способ по п.35, дополнительно включающий объединение эффективной дозы, по существу, очищенной смеси лизин/N-концевых изомеров по положению ПЭГ рекомбинантного полипептида ГКСФ, по меньшей мере, с одним фармацевтически приемлемым наполнителем для получения фармацевтической композиции.

37. Множество частично депегилированных лизин/N-концевых изомеров по положению ПЭГ, полученных с помощью способа по п.33.

38. По существу, очищенная смесь лизин/N-концевых изомеров по положению ПЭГ, полученная с помощью способа по п.35.

39. Фармацевтическая композиция, полученная с помощью способа по п.36.

40. Способ повышения уровня нейтрофилов у пациента, страдающего от недостаточного уровня нейтрофилов или находящегося в группе риска, включающий введение упомянутому пациенту эффективной дозы пегилированного полипептида ГКСФ по п.23 и 24 или композиции по любому из пп.25-32 или 36-39.

41. Способ по п.40, где недостаточный уровень нейтрофилов является результатом

химиотерапии или радиотерапии.

42. Применение пегилированного полипептида ГКСФ по п.23 или 24 или композиции по любому из пп.25-32 или 36-39 для производства медикамента для увеличения уровня нейтрофилов у пациента, страдающего от недостаточного уровня нейтрофилов или находящегося в группе риска.

43. Применение по п.42, где недостаточный уровень нейтрофилов является результатом химиотерапии или радиотерапии.

44. Композиция, включающая гомогенную смесь изомеров по положению ПЭГ пегилированного варианта ГКСФ, где, по меньшей мере, приблизительно 80% изомеров по положению ПЭГ смеси состоит из двух изомеров по положению ПЭГ, где каждый имеет звенья ПЭГ, состоящие из двух звеньев ПЭГ, присоединенных к ε-аминогруппам лизина, и одного звена ПЭГ, присоединенного к N-концевой аминогруппе.

45. Композиция по п.44, где, по меньшей мере, приблизительно 85% изомеров по положению ПЭГ гомогенной смеси состоят из двух изомеров по положению ПЭГ, где каждый имеет звенья ПЭГ, состоящие из двух звеньев ПЭГ, присоединенных к ε-аминогруппам лизина, и одного звена ПЭГ, присоединенного к N-концевой аминогруппе.

46. Композиция по п.44, где, по меньшей мере, приблизительно 90% изомеров по положению ПЭГ гомогенной смеси состоят из двух изомеров по положению ПЭГ, где каждый имеет звенья ПЭГ, состоящие из двух звеньев ПЭГ, присоединенных к ε-аминогруппам лизина, и одного звена ПЭГ, присоединенного к N-концевой аминогруппе.

47. Композиция, включающая фармацевтически приемлемый носитель и композицию по любому из пп.44-46.

48. Способ повышения уровня нейтрофилов у пациента, страдающего от недостаточного уровня нейтрофилов или находящегося в группе риска, включающий введение упомянутому пациенту эффективной дозы композиции по любому из пп.44-46.

49. Применение композиции по любому из пп.44-46 для производства медикамента для повышения уровня нейтрофилов у пациента, страдающего от недостаточного уровня нейтрофилов или находящегося в группе риска.

RU 2007149238 A

RU 2007149238 A