

Q.F.
B.T.



Libertad y Orden

REPÚBLICA DE COLOMBIA
DIVISIÓN DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PCT
PATENTE DE INVENCION


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

06-74318

TITULO: CONJUGADOS DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA
MONOPEGILADOS EN EL N-TERMINAL, PROCESO PARA SU PREPARACION
Y METODO PARA SU USO.

SOLICITANTE: PHARMACIA CORPORATION

DIRECCIÓN: 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, Missouri 63017-
1732, E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ, julio 28 de 2006

OLARTE RAISBECK



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-074318- -00000-0000
Fec: 2006-07-26 17 25.29 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII
Eve. 379 FASENACIONALI

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

04/09/06

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: PHARMACIA CORPORATION

Dirección: 700 Chesterfield Parkway West,
Chesterfield, Missouri 63017-1732, E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Delaware, E.U.A.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Btá
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: RORY E. FINN

Dirección: 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, Missouri 63017-1732, E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

PCT (86)

5

Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/000171

Fecha Enero 24, 2005

Publicación Internacional No. WO 2005/079838

Fecha Septiembre 1, 2005

6

Título (54) CONJUGADOS DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA
MONOPEGILADOS EN EL N-TERMINAL, PROCESO PARA SU PREPARACION Y
METODO PARA SU USO.

Clasificación Internacional (51) A61K 38/27.

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Febrero 4, 2004

(31) Número de Solicitud

10/771.895

9

Comprobante de pago No. 06-54.708

Fecha Julio 18 de 2006

10

ANEXOS☒

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

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Ver expediente No. 05-094.077 Adjunto copia simple

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

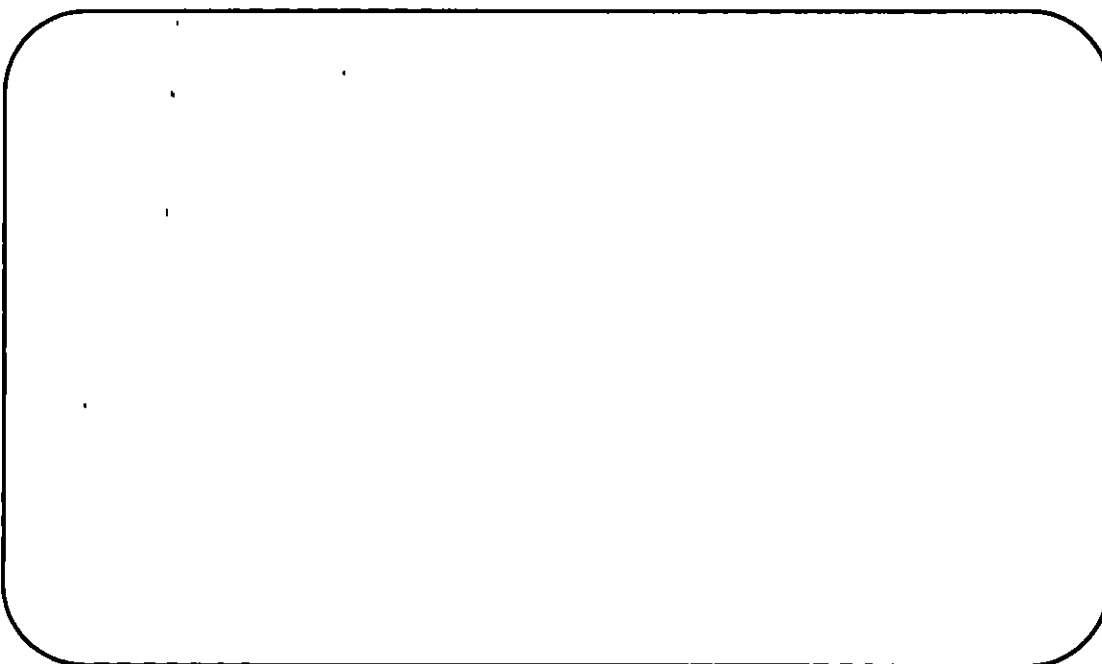
☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

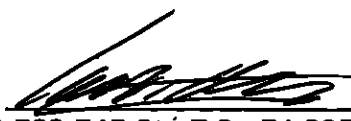
Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTEFIRMA: C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-074318- -00000-0000
S Fea 2006-07-26 17 26'29 Dep 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTE IYI
Ene 379 FASE NACIONAL II

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 54,708
FECHA : JULIO 18 DE 2006

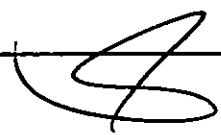
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
OLARTE RAISBEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	52202900	18/07/2006	3,092,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____


RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

4

TRADUCCION OFICIAL No. 04-210

Efectuada el día 17 de mayo de 2004, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 del 11 de febrero de 2002 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia.

Traducción Oficial de las autenticaciones notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por Pharmacia Corporation a Carlos R. Olarte, y/o James Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri, documento este que viene en español y se explica por sí solo.

(Fdo.) Grover F. Fuller Jr, Abogado Autorizado

La firma y cargo de Grover F. Fuller Jr, fueron debidamente certificados por el Notario Público Petrina Thompson el 4/30/05, quien estampo su firma y sello notarial al respaldo.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Distrito de Columbia - Estados Unidos de América
El presente documento público
2. Fue firmado por Petrina Thompson
3. Que actuó en su calidad de Notario Público del Distrito de Columbia
4. Lleva el sello del Distrito de Columbia.

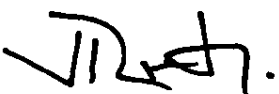

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C C 89 2.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION No 0138 DE FEBRERO 11.2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

5

Se certificó:

5. En Washington, D.C.
6. El 30 de abril de 2004
7. Por parte del Secretario del Distrito de Columbia
8. Bajo el Número 125758
9. Aparece Sello del Distrito de Columbia
10. Firmado por Sherryl H. Newman, Secretario Distrito de Columbia

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
C.C.80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRES RUEDA IGLESIAS
C. C 80 424 773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION No 0138 DE FEBRERO 11.2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
United States of America

PETRINA THOMPSON

2. This public document has been signed by ~~NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA~~

3 acting in the capacity of PETRINA THOMPSON, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE

DISTRICT OF COLUMBIA

4. bears the seal/stamp of

CERTIFIED

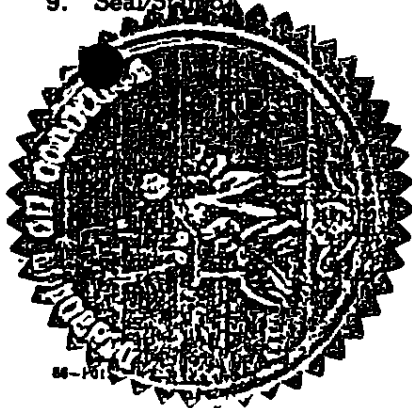
5 at Washington, D. C.

6. the 30 day of APRIL 2004

7. by Secretary of the District of Columbia

8. No. 125758

9. Seal/Stamp



10. Signature

Sherril H. Newman

SHERRIL H. NEWMAN

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER — TORRE C
CALLE 100 NO 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE +57-1 638-6200
FAX +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

PHARMACIA CORPORATION

700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, St. Louis,
MO 63017-1732, Estados Unidos de América.

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, James Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models, Industrial Designs and Obtainer's Certificates in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

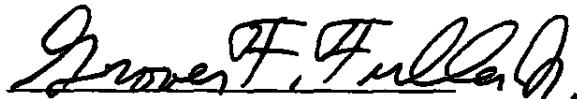
Poder

El suscrito,

domiciado en

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, James Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad, Diseños Industriales y Certificados de Obtentor de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones

Signature/Firma:



Date/Fecha:

28 april 2004

City/Country/Ciudad,País:

United State of América

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER — TORRE C
CALLE 100 No 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE +57-1 638-6200
FAX +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies

el Notario Público suscrito certifica

1. That

1 Que

Grover F. Fuller Jr.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

150 East 42nd Street, New York, NY 10017, U.S.A.

signed the foregoing document

suscribió el documento que antecede

2 That the grantor has executed the foregoing document as Authorized Attorney of Pharmacia Corporation.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de de

3 That Pharmacia Corporation, having its principal place of business located in St. Louis, Missouri, U.S.A.

4. Que con sede principal ubicada en

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s): Corporate by laws and Minutes authorizing representation of Mr. Grover Fuller.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s) Artículos de constitución y minutas autorizando la representación del Sr. Grover Fuller.

NOTARY PUBLIC (Signature):

Grover F. Fuller Jr.

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER — TORRE C
CALLE 100 No 8A-55 PISO 10
BOGOTÁ, COLOMBIA
TELEPHONE. +57-1 638-6200
FAX. +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

INSTRUCTIONS FOR THE POWER OF ATTORNEY

FILLING OUT THE FORM CORRECTLY

1. The document has TWO (2) pages that must be filled out, the Power of Attorney itself and the Notarial Certification that accompanies it.
2. Please substitute all of the text highlighted in yellow (and only that text) with the appropriate information (or substitute it with a blank space if filled in by hand by the person signing the document).
3. We do NOT need copies of the documents you will list in point 5 of the Notarial Certification.

LEGALIZATION

The signature of the corporate official issuing the Power of Attorney should be authenticated by means of a Notarial Certification as the one enclosed herewith. The Notary's signature should then be authenticated using one of the following two procedures:

1. the Apostille; or
2. if an Apostille is not available or convenient, follow the normal chain of authentication leading to the legalization of the document by the Colombian Consul (the normal chain is that the Notary's signature is authenticated by the Country Clerk; sometimes the Consul legalizes the signature of the Clerk; other times the clerk's signature will first have to be legalized by the Secretary of the respective State).

Please do not hesitate to contact us by telephone or e-mail (filings@olarteraisbeck.com) should you have any questions.

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2005/079838
PCT/IB2005/00017

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To.

RECEIVED

SEP 12 2005

FULLER, Grover, F., Jr.
Pfizer Inc.
P.O. Box 1027
St. Louis, MO 63006
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

PHARMACIA
GLOBAL PATENT DEPT
ST. LOUIS, MO

Date of mailing (day/month/year)

01 September 2005 (01.09.2005)

Applicant's or agent's file reference

PC32152A

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/IB2005/000171

International filing date (day/month/year)

24 January 2005 (24 01.2005)

Priority date (day/month/year)

04 February 2004 (04.02.2004)

Applicant

PHARMACIA CORPORATION et al

The International Bureau transmits herewith the following documents.



copy of the international application as published by the International Bureau on 01 September 2005 (01 09.2005) under No. WO 2005/079838



copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO

For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

Docketed

DATE

9/19/05

FOR

BY:

Medlin

Site: STL

SCANNED

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Idhir Britel

SEP 12 2005

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 70 60

Form PCT/IB/311 (January 2004)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1

(10) International Publication Number
WO 2005/079838 A1

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

WO 2005/079838 A1

(57) Abstract: The present invention provides a chemically modified human Growth Hormone (hGH) prepared by attaching a polyethylene glycol butyraldehyde moiety to the N-terminal phenylalanine of the protein. The chemically modified protein according to the present invention may have a much longer lasting hGH activity than that of the un-modified hGH, enabling reduced dose and scheduling opportunities. The present invention also includes methods of use for the treatment and/or prevention of diseases or disorders in which use of growth hormone is beneficial.

**N-TERMINALLY MONOPEGYLATED HUMAN GROWTH HORMONE
CONJUGATES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION, AND METHODS OF
USE THEREOF**

The present application claims priority to US application N° 10/771895 filed February 04, 2004, which is incorporated by reference in its entirety as if written herein.

FIELD OF THE INVENTION

[001] The present invention relates to a chemical modification, including PEGylation, of human Growth Hormone (hGH) and agonist variants thereof by which the chemical and/or physiological properties of hGH can be changed. The PEGylated hGH may have an increased plasma residency duration, decreased clearance rate, improved stability, decreased antigenicity, decreased PEGylation heterogeneity or a combination thereof. The present invention also relates to processes for the modification of hGH. In addition, the present invention relates to pharmaceutical compositions comprising the modified hGH. A further embodiment is the use of the modified hGH for the treatment of growth and development disorders.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[002] Human growth hormone (hGH) is a protein comprising a single chain of 191 amino acids cross-linked by two disulphide bridges and the monomeric form has a molecular weight of 22 kDa. Human GH is secreted by the pituitary gland and which also can be produced by recombinant genetic engineering. hGH will cause growth in all bodily tissues that are capable of growth. hGH plays an

important role not only in promoting growth in the growing phase in human beings but also in maintaining normal body composition, anabolism, and lipid metabolism (K. Barneis. And U. Keller, Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. 10:337 (1996)).

[003] Recombinant hGH has been commercially available for several years. Two types of therapeutically useful recombinant hGH preparations are present on the market: the authentic one, e.g. Genotropin™, or Nutropin™ and an analogue with an additional methionine residue at the N-terminal end, e.g. Somatonorm™. hGH is used to stimulate linear growth in patients with hypo pituitary dwarfism also referred to as Growth Hormone Deficiency (GHD) or Turner's syndrome but other indications have also been suggested including long-term treatment of growth failure in children who were born short for gestational age (SGA), for treatment of patients with Prader-Willi syndrome (PWS), chronic renal insufficiency (CRI), Aids wasting, and Aging. Adult GH deficiency (aGHD) patients have various problems, such as characteristic changes in body composition including increase in fat mass, decrease in lean body mass and extracellular fluid, and reduction of bone mineral density, metabolic abnormalities of lipids, and cardiovascular dysfunction. Many of those problems are improved by hGH replacement therapy (J. Verhelst J and R. Abs. *Drugs.*;62:2399 (2002)).

[004] A major biological effect of growth hormone (GH) is to promote growth in young mammals and maintenance of tissues in older mammals. The organ systems affected include the skeleton, connective tissue, muscles, and viscera such as liver, intestine, and kidneys. Growth hormones exert their effect through interaction with specific receptors on the target cell's membrane. hGH is a member of a family of homologous hormones that include placental lactogens, prolactins, and other genetic and

species variants or growth hormone (Nicol, C. S., et al. (1986) *Endocrine Reviews* 7: 169). hGH is unusual among these in that it exhibits broad species specificity and binds to either the cloned somatogenic (Leung, D. W., et al. [1987] *Nature* 330: 537) or prolactin receptor (Boutin, J. M., et al. [1988] *Cell*; 53: 69). The cloned gene for hGH has been expressed in a secreted form in *Escherichia coli* (Chang, C. N., et al. [1987] *Gene* 55:189), and its DNA and amino acid sequence has been reported (Goeddel, et al. [1979] *Nature* 281: 544; Gray, et al. [1985] *Gene* 39:247).

[005] Human growth hormone (hGH) participates in much of the regulation of normal human growth and development. This pituitary hormone exhibits a multitude of biological effects including linear growth (somatogenesis), lactation, activation of macrophages, insulin-like and diabetogenic effects among others (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). Growth hormone deficiency in children leads to dwarfism, which has been successfully treated for more than a decade by exogenous administration of hGH.

[006] In adults, as well as in children, hGH maintains a normal body composition by increasing nitrogen retention and stimulation of skeletal muscle growth, and by mobilization of body fat. Visceral adipose tissue is particularly responsive to hGH. In addition to enhanced lipolysis, hGH decreases the uptake of triglycerides into body fat stores. Serum concentrations of IGF-I (insulin-like growth factor-I), and IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3) are increased by hGH.

[007] Human growth hormone (hGH) is a single-chain polypeptide consisting of 191 amino acids (molecular weight 21,500). Disulfide bonds link positions 53 and 165

and positions 182 and 189. Niall, *Nature, New Biology*, 230:90 (1971). hGH is a potent anabolic agent, especially due to retention of nitrogen, phosphorus, potassium, and calcium. Treatment of hypophysectomized rats with GH can restore at least a portion of the growth rate of the rats. Moore et al., *Endocrinology* 122:2920-2926 (1988). Among its most striking effects in hypo pituitary (GH-deficient) subjects is accelerated linear growth of bone-growth-plate-cartilage resulting in increased stature. Kaplan, *Growth Disorders in Children and Adolescents* (Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1964).

[008] hGH causes a variety of physiological and metabolic effects in various animal models including linear bone growth, lactation, activation of macrophages, insulin-like and diabetogenic effects, and others (R. K. Chawla 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, *Ann. Rev. Physiol.* 47:469 (1985)). It has been reported that, especially in women after menopause, GH secretion declines with age. Millard et al., *Neurobiol. Aging*, 11:229-235 (1990); Takahashi et al., *Neuroendocrinology* M, L6- 137-142 (1987). See also Rudman et al., *J. Clin. Invest.*, 67:1361-1369 (1981) and Blackman, *Endocrinology and Aging*, 16:981 (1987). Moreover, a report exists that some of the manifestations of aging, including decreased lean body mass, expansion of adipose-tissue mass, and the thinning of the skin, can be reduced by GH treatment three times a week. See, e.g., Rudman et al., *N. Eng. J. Med.*, 323:1-6 (1990) and the accompanying article in the same journal issue by Dr. Vance (pp. 52-54). These biological effects derive from the interaction between hGH and specific cellular receptors. Two different human receptors have been

14

cloned, the hGH liver receptor (D. W. Leung et al., *Nature* 330:537(1987)) and the human prolactin receptor (J. M. Boutin et al., *Mol. Endocrinology*. 3:1455 (1989)). However, there are likely to be others including the human placental lactogen receptor (M. Freemark, M. Comer, G. Komer, and S. Handwerger, *Endocrinol.* 120:1865 (1987)). These homologous receptors contain a glycosylated extracellular hormone binding domain, a single transmembrane domain, and a cytoplasmic domain, which differs considerably in sequence and size. One or more receptors are assumed to play a determining role in the physiological response to hGH.

[009] It is generally observed that physiologically active proteins administered into a body can show their pharmacological activity only for a short period of time due to their high clearance rate in the body.

Furthermore, the relative hydrophobicity of these proteins may limit their stability and/or solubility.

[0010] For the purpose of decreasing the clearance rate, improving stability or abolishing antigenicity of therapeutic proteins, some methods have been proposed wherein the proteins are chemically modified with water-soluble polymers. Chemical modification of this type may block effectively a proteolytic enzyme from physical contact with the protein backbone itself, thus preventing degradation. Chemical attachment of certain water-soluble polymers may effectively reduce renal clearance due to increased hydrodynamic volume of the molecule. Additional advantages include, under certain circumstances, increasing the stability and circulation time of the therapeutic protein, increasing solubility, and decreasing immunogenicity. Poly(alkylene oxide), notably poly(ethylene glycol) (PEG), is one such chemical moiety that has been used in the preparation of therapeutic protein products (the verb "pegylate" meaning to attach

at least one PEG molecule). The attachment of poly(ethylene glycol) has been shown to protect against proteolysis, Sada, et al., *J. Fermentation Bioengineering* 71: 137-139 (1991), and methods for attachment of certain poly(ethylene glycol) moieties are available. See U.S. Pat. No. 4,179,337, Davis et al., "Non-Immunogenic Polypeptides," issued Dec. 18, 1979; and U.S. Pat. No. 4,002,531, Royer, "Modifying Enzymes with Polyethylene Glycol and Product Produced Thereby," issued Jan. 11, 1977. For a review, see Abuchowski et al., in Enzymes as Drugs. (J. S. Holcerberg and J. Roberts, eds. pp. 367-383 (1981)).

[0011] Other water-soluble polymers have been used, such as copolymers of ethylene glycol/propylene glycol, carboxymethylcellulose, dextran, poly(vinyl alcohol), poly(vinyl pyrrolidone), poly(-1,3-dioxolane), poly(-1,3,6-trioxane), ethylene/maleic anhydride copolymer, poly- amino acids (either homopolymers or random copolymers).

[0012] A number of examples of pegylated therapeutic proteins have been described. ADAGEN®, a pegylated formulation of adenosine deaminase, is approved for treating severe combined immunodeficiency disease. ONCASPAR®, a pegylated L-asparaginase has been approved for treating hypersensitive ALL patients. Pegylated superoxide dismutase has been in clinical trials for treating head injury. Pegylated α -interferon (U.S. 5,738,846, 5,382,657) has been approved for treating hepatitis; pegylated glucocerebrosidase and pegylated hemoglobin are reported to have been in preclinical testing. Another example is pegylated IL-6, EF 0 442 724, entitled, "Modified hIL-6," which discloses poly(ethylene glycol) molecules added to IL-6.

15

[0013] Another specific therapeutic protein, which has been chemically modified, is granulocyte colony stimulating factor, (G-CSF). G-CSF induces the rapid proliferation and release of neutrophilic granulocytes to the blood stream, and thereby provides therapeutic effect in fighting infection. European patent publication EP 0 401 384, published Dec. 12, 1990, entitled, "Chemically Modified Granulocyte Colony Stimulating Factor," describes materials and methods for preparing G-CSF to which poly(ethylene glycol) molecules are attached. Modified G-CSF and analogs thereof are also reported in EP 0 473 268, published Mar. 4, 1992, entitled "Continuous Release Pharmaceutical Compositions Comprising a Polypeptide Covalently Conjugated To A Water Soluble Polymer," stating the use of various G-CSF and derivatives covalently conjugated to a water soluble particle polymer, such as poly(ethylene glycol). A modified polypeptide having human granulocyte colony stimulating factor activity is reported in EP 0 335 423 published Oct. 4, 1989. Provided in U.S. 5,824,784 are methods for N-terminally modifying proteins or analogs thereof, and resultant compositions, including novel N-terminally chemically modified G-CSF compositions. U.S. 5,824,778 discloses chemically modified G-CSF.

[0014] For poly(ethylene glycol), a variety of means have been used to attach the poly(ethylene glycol) molecules to the protein. Generally, poly(ethylene glycol) molecules are connected to the protein via a reactive group found on the protein.

[0015] Amino groups, such as those on lysine residues or at the N-terminus, are convenient for such attachment. For example, Royer (U.S. Pat. No. 4,002,531, above) states that reductive alkylation was used for attachment of poly(ethylene glycol) molecules to an enzyme. Chamow et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 133-140 (1994) report the

modification of CD4 immunoadhesin with monomethoxypoly(ethylene glycol) aldehyde via reductive alkylation. The authors report that 50% of the CD4-Ig was MePEG-modified under conditions allowing control over the extent of pegylation. *Id.* at page 137. The authors also report that the *in vitro* binding capability of the modified CD4-Ig (to the protein gp 120) decreased at a rate correlated to the extent of MePEGylation *Ibid.* U.S. Pat. No. 4,904,584, Shaw, issued Feb. 27, 1990, relates to the modification of the number of lysine residues in proteins for the attachment of poly(ethylene glycol) molecules via reactive amine groups.

[0016] WO 93/00109 relates to a method for stimulating a mammal's or avian's GH responsive tissues comprising, maintaining a continuous, effective plasma GH concentration for a period of 3 or more days. One way of achieving such plasma concentration is stated to be by use of GH coupled to a macromolecular substance such as PEG (polyethylene glycol). The coupling to a macromolecular substance is stated to result in improved half-life. PEGylated human growth hormone has been reported in WO 93/00109 using mPEG aldehyde-5000 and mPEG N-hydroxysuccinimidyl ester (mPEG-NHS-5000). The use of mPEG-NHS resulted in heterogeneous mixtures of multiply PEGylated forms of hGH. WO 93/00109 also discloses the use of mPEG-maleimide to PEGylate cysteine hGH variants.

[0017] WO 99/03887 discloses a cysteine variant growth hormone that is PEGylated. Designated as BT-005, this conjugate is purported to be more effective at stimulating weight gain in growth hormone deficient rats and to have a longer half-life than hGH.

[0018] PEGylated human growth hormone has also been reported in Clark et al. using succinimidyl ester of carboxymethylated PEG (*Journal of Biological Chemistry* 271:21969-21977, 1996). Clark et al. describes derivatives

of hGH of increasing size using mPEG-NHS-5000, which selectively conjugates to primary amines. Increasing levels of PEG modification reduced the affinity for its receptor and increased the EC₅₀ in a cell-based assay up to 1500 fold. Olson et al., *Polymer Preprints* 38:568-569, 1997 discloses the use of N-hydroxysuccinimide (NHS)PEG and succinimidyl propionate (SPA)PEG to achieve multiply PEGylated hGH species.

[0019] WO 94/20069 prophetically discloses PEGylated hGH as part of a formulation for pulmonary delivery.

[0020] US 4,179,337 discloses methods of PEGylating enzymes and hormones to obtain physiologically active non-immunogenic, water-soluble polypeptide conjugates. GH is mentioned as one example of a hormone to be PEGylated.

[0021] EP 458064 A2 discloses PEGylation of introduced or naturally present cysteine residues in somatotropin. EP 458064 A2 further mentions the incorporation of two cysteine residues in a loop termed the omega loop stated to be located at residues 102-112 in wild type bovine somatotropin, more specifically EP 458064 A2 discloses the substitution of residues numbered 102 and 112 of bovine somatotropin from Ser to Cys and Tyr to Cys, respectively.

[0022] WO 95/11987 suggests attachment of PEG to the thio group of a cysteine residue being either present in the parent molecule or introduced by site directed mutagenesis. WO 95/11987 relates to PEGylation of protease nexin-1, however PEGylation in general of hGH and other proteins is suggested as well.

[0023] WO 99/03887 discloses, e.g., growth hormone modified by insertion of additional cys 25 serine residues and attachment of PEG to the introduced cysteine residues.

[0024] WO 00/42175 relates to a method for making proteins containing free cysteine residues for attachment

of PEG. WO 00/42175 discloses the following muteins of hGH: T3C, S144C and T148C and the cysteine PEGylation thereof. .

[0025] WO 97/11178 (as well as US 5849535, US 6004931, and US 6022711) relates to the use of GH variants as agonists or antagonists of hGH. WO 97/11178 also discloses PEGylation of hGH, including lysine PEGylation and the introduction or replacement of lysine (e.g. K168A and K172R). WO 97/11178 also discloses the substitution G120K.

[0026] WO 03/044056 discloses a variety of PEGylated hGH species including a branched 40K PEG aldehyde hGH conjugate..

[0027] The previous reports of PEGylated hGH require the attachment of multiple PEGs, which results in undesirable product heterogeneity, to achieve a hydrodynamic volume greater than the 70K molecular weight cut-off of the kidney filtration as described (Knauf, M.J. et al, *J. Biol. Chem.* 263:15064-15070, 1988).

[0028] Currently administration of rhGH is daily for a long period of time, and therefore a less frequent administration would be highly desirable. A hGH molecule with a longer circulation half-life would decrease the number of necessary administrations and potentially provide more optimal therapeutic hGH levels with concomitant enhanced therapeutic effect.

[0029] Despite a number of attempts to PEGylate hGH, there is still an unmet need for a PEGylated hGH molecule with the appropriate properties to be a viable commercial product. The present invention provides PEG-hGH conjugates having a single PEG attached predominately at the N-terminal phenylalanine of hGH, which provides advantages over other PEG-hGH conjugates. The attachment of multiple low molecular weight (5Kd) PEGs at α - or ϵ -amino sites (N-terminus and nine lysines in hGH) using

17

mPEG aldehyde-5000 or mPEG N-hydroxysuccinimidyl ester (mPEG-NHS-5000) has been described in WO 93/00109, Clark et al. (*Journal of Biological Chemistry* 271:21969-21977, 1996, and Olson et al. (*Polymer Preprints* 38:568-569, 1997). This results in a heterogeneous population. As an illustration hGH with nine lysines may have some molecules having ten PEGs attached, some with nine, some with eight, some with seven, some with six, some with five, some with four, some with three, some with two, some with one and some with zero. And, among the molecules with several, the PEG may not be attached at the same location on different molecules. This resulting heterogeneity is disadvantageous when developing a therapeutic product making conjugation, purification, and characterization difficult, costly, and highly irreproducible. Another approach (WO 00/42175) has been to use hGH variants containing free cysteine residues for attachment of PEG. However, this approach can lead to incorrectly folded protein having incorrectly paired disulfide bonds and resulting in a heterogeneous PEGylated product that has the PEG attached at some or all of the cysteines. Having multiple PEGs attached to multiple sites may lead to molecules that have less stable bounds between the PEG and the various sites, which can become dissociated at different rates. This makes it difficult to accurately predict the pharmacokinetics of the product resulting in inaccurate dosing. A heterogeneous product also poses unwanted problems in obtaining regulatory approval for the therapeutic product.

[0030] Therefore, it would be desirable to have a PEGylated hGH molecule that has a single PEG attached at a single site. The present invention addresses this need in a number of ways.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0031] The present invention relates to chemically modified hGH and agonist variants thereof, which have at least one improved chemical or physiological property selected from but not limited to decreased clearance rate, increased plasma residency duration, increased stability, improved solubility, and decreased antigenicity. Thus, as described below in more detail, the present invention has a number of aspects relating to chemically modifying polypeptides including but not limited to hGH and agonist variants thereof as well as specific modifications using a poly(ethylene glycol) butyraldehyde moiety.

[0032] The present invention also relates to methods of producing the chemically modified hGH and agonist variants thereof. Particularly, the present invention relates to a method of producing a chemically modified hGH using butyraldehyde, which results in greater N-terminal selectivity of attachment.

[0033] The present invention also relates to compositions comprising the chemically modified hGH and agonist variants thereof, alone or in combination with another therapeutic agent.

[0034] The present invention also relates to the use of the chemically modified hGH and agonist variants thereof of the present invention, alone or in combination with another therapeutic agent, in the prevention and/or treatment of disorders and/or diseases in which GH treatment is useful.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0035] Figure 1 is a HPLC tracing of tryptic map analysis of the reaction of hGH and 40K branched butyrylaldehyde hGH or 40K branched aldehyde hGH. The top panel is the tryptic map of 40K Branched butyraldehyde hGH. The middle panel is the tryptic map of 40K Branched aldehyde hGH. The bottom panel is the tryptic map of unPEGylated hGH. T1 is the N-terminal tryptic fragment.

[0036] Figure 2 shows the amino acid sequence of human growth hormone (SEQ ID NO:1).

[0037] Figure 3 shows 40K Branched butyraldehyde hGH efficacy in Rat Weight Gain Assay. Hypophysectomized female Sprague-Dawley rats were purchased at the age of 4-5 weeks (100-125 g) from Harlan Labs. Upon entering the animal facilities, the animals were maintained at a constant room temperature of 80°F and weighed daily for 4-10 days in order to establish basal growth rates. Starting at day 0, rats (~100g) in control groups then received one daily subcutaneous injection of ~0.3 mg/kg hGH (solid circles), or PBS (open circles), for eleven consecutive days. The 40K Branched butyraldehyde hGH test group (solid squares) received single doses of 1.8 mg/kg of PHA-794428 on days 0 and 6. There were 8-10 animals per group. Average growth +/- SEM is plotted.

[0038] Figure 4. shows the Dose-Responsive Growth Promoting Effects of 40K Branched butyraldehyde hGH in Rats. This efficacy study was performed in a manner similar to that described in Figure 3 except that a varied single dose of 40K Branched butyraldehyde hGH was administered (day 0, only) and the study ran for 6 days. Control groups received once-daily injections of either 0.3 mg/kg hGH (solid circles), or PBS vehicle (open circles) for six consecutive days. 40K Branched butyraldehyde hGH was dosed at 1.8 mg/kg (solid squares),

0.6 mg/kg (open squares), 0.2 mg/kg (solid triangles) or 0.067 mg/kg (open triangles). There were 8 animals per group.

[0039] Figure 5 shows tibial growth in response to 40K Branched butyraldehyde hGH. Hypophysectomized rats were treated as described in Figure 3. At day 11 animals were sacrificed, left tibias were removed and X-rayed and bone lengths were measured using a caliper. Average length $\pm$ SEM is plotted. Asterisks denote significant differences from control group ($p < 0.05$).

[0040] Figure 6 shows plasma IGF-1 levels for six-day efficacy study. Animals were treated as described Figure 4. Blood samples were taken at the various times and the serum IGF-1 levels determined by ELISA. Plotted are averages $\pm$ SEM.

DETAILED DESCRIPTION

[0041] hGH and agonist variants thereof are members of a family of recombinant proteins, described in US 4,658,021 (methionyl human growth hormone - Met-1-191 hGH) and US 5,633,352. Their recombinant production and methods of use are detailed in US 4,342,832, 4,601,980; US 4,898,830; US 5,424,199; and US 5,795,745.

[0042] Any purified and isolated hGH or agonist variant thereof, which is produced by host cells such as *E. coli* and animal cells transformed or transfected by using recombinant genetic techniques, may be used in the present invention. Additional hGH variants are described in US 6,143,523 and WO 92/09690 published Jun. 11, 1992. Among them, hGH or agonist variant thereof, which is produced by the transformed *E. coli*, is particularly preferable. Such hGH or agonist variant thereof may be obtained in large quantities with high purity and homogeneity. For example, the above hGH or agonist

variant thereof may be prepared according to a method disclosed in US 4,342,832, 4,601,980; US 4,898,830; US 5,424,199; and US 5,795,745. The term "substantially has the following amino acid sequence" means that the above amino acid sequence may include one or more amino-acid changes (deletion, addition, insertion or replacement) as long as such changes will not cause any disadvantageous non-similarity in function to hGH or agonist variant thereof. It is more preferable to use the hGH or agonist variant thereof substantially having an amino acid sequence, in which at least one lysine, aspartic acid, glutamic acid, unpaired cysteine residue, a free N-terminal α -amino group or a free C-terminal carboxyl group, is included.

[0043] The term "hGH polypeptide or hGH protein", when used herein, encompasses all hGH polypeptides, preferably from mammalian species, more preferably from human and murine species, as well as their variants, analogs, orthologs, homologs, and derivatives, and fragments thereof that are characterized by promoting growth in the growing phase and in maintaining normal body composition, anabolism, and lipid metabolism. Preferably, the term "hGH polypeptide or protein" refers to the hGH polypeptide of SEQ ID NO:1 as well as its variants, homologs and derivatives exhibiting essentially the same biological activity (promoting growth in the growing phase and in maintaining normal body composition, anabolism, and lipid metabolism). More preferably, the term "hGH polypeptide or protein" refers to the polypeptide of SEQ ID NO 1.

[0044] The term "hGH polypeptide variants", as used herein, refers to polypeptides from the same species but differing from a reference hGH polypeptide. Generally, differences are limited so that the amino acid sequences of the reference and the variant are closely similar

overall and, in many regions, identical. Preferably, hGH polypeptides are at least 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to a reference hGH polypeptide, preferably the hGH polypeptide of SEQ ID NO:1. By a polypeptide having an amino acid sequence at least, for example, 95% "identical" to a query amino acid sequence, it is intended that the amino acid sequence of the subject polypeptide is identical to the query sequence except that the subject polypeptide sequence may include up to five amino acid alterations per each 100 amino acids of the query amino acid sequence. These alterations of the reference sequence may occur at the amino or carboxy terminal positions of the reference amino acid sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among residues in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. The query sequence may be an entire amino acid sequence of the reference sequence or any fragment specified as described herein.

[0045] Such hGH polypeptide variants may be naturally occurring variants, such as naturally occurring allelic variants encoded by one of several alternate forms of a hGH occupying a given locus on a chromosome of an organism, or isoforms encoded by naturally occurring splice variants originating from a single primary transcript. Alternatively, a hGH polypeptide variant may be a variant that is not known to occur naturally and that can be made using art-known mutagenesis techniques.

[0046] It is known in the art that one or more amino acids may be deleted from the N-terminus or C-terminus of a bioactive peptide or protein without substantial loss of biological function (see for instance, Ron et al., (1993), Biol Chem., 268 2984-2988 ; which disclosure is hereby incorporated by reference in its entirety).

[0047] It also will be recognized by one of ordinary skill in the art that some amino acid sequences of hGH polypeptides can be varied without significant effect of the structure or function of the protein. Such mutants include deletions, insertions, inversions, repeats, and substitutions selected according to general rules known in the art so as to have little effect on activity. For example, guidance concerning how to make phenotypically silent amino acid substitutions is provided in Bowie et al. (1990), Science 247:1306-1310, hereby incorporated by reference in its entirety, wherein the authors indicate that there are two main approaches for studying the tolerance of an amino acid sequence to change.

[0048] The first method relies on the process of evolution, in which mutations are either accepted or rejected by natural selection. The second approach uses genetic engineering to introduce amino acid changes at specific positions of a cloned hGH and selections or screens to identify sequences that maintain functionality. These studies have revealed that proteins are surprisingly tolerant of amino acid substitutions. The authors further indicate which amino acid changes are likely to be permissive at a certain position of the protein. For example, most buried amino acid residues require nonpolar side chains, whereas few features of surface side chains are generally conserved. Other such phenotypically silent substitutions are described in Bowie et al., (1990) supra, and the references cited therein.

[0049] Typically seen as conservative substitutions are the replacements, one for another, among the aliphatic amino acids Ala, Val, Leu and Phe; interchange of the hydroxyl residues Ser and Thr, exchange of the acidic residues Asp and Glu, substitution between the amide residues Asn and Gln, exchange of the basic residues Lys

and Arg and replacements among the aromatic residues Phe, Tyr. In addition, the following groups of amino acids generally represent equivalent changes: (1) Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr; (3) Val, Ile, Leu, Met, Ala, Phe; (4) Lys, Arg, His; (5) Phe, Tyr, Trp, His.

[0050] The term hGH polypeptide also encompasses all hGH polypeptides encoded by hGH analogs, orthologs, and/or species homologues. As used herein, the term "hGH analogs" refers to hGHs of different and unrelated organisms which perform the same functions in each organism but which did not originate from an ancestral structure that the organisms' ancestors had in common. Instead, analogous hGHs arose separately and then later evolved to perform the same function (or similar functions). In other words, analogous hGH polypeptides are polypeptides with quite different amino acid sequences but that perform the same biological activity, namely promoting growth in the growing phase and in maintaining normal body composition, anabolism, and lipid metabolism. As used herein, the term "hGH orthologs" refers to hGHs within two different species which sequences are related to each other via a common homologous hGH in an ancestral species but which have evolved to become different from each other. As used herein, the term "hGH homologs" refers to hGHs of different organisms which perform the same functions in each organism and which originate from an ancestral structure that the organisms' ancestors had in common. In other words, homologous hGH polypeptides are polypeptides with quite similar amino acid sequences that perform the same biological activity, namely promoting growth in the growing phase and in maintaining normal body composition, anabolism, and lipid metabolism. Preferably, hGH polypeptide homologs may be defined as polypeptides

exhibiting at least 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to a reference hGH polypeptide, preferably the hGH polypeptide of SEQ ID NO:1.

[0051] Thus, a hGH polypeptide according to the invention may be, for example: (i) one in which one or more of the amino acid residues are substituted with a conserved or non-conserved amino acid residue (preferably a conserved amino acid residue) and such substituted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code: or (ii) one in which one or more of the amino acid residues includes a substituent group: or (iii) one in which the hGH polypeptide is fused with another compound, such as a compound to increase the half-life of the polypeptide (for example, polyethylene glycol): or (iv) one in which the additional amino acids are fused to the above form of the polypeptide, such as an IgG Fc fusion region peptide or leader or secretory sequence or a sequence which is employed for purification of the above form of the polypeptide or a pro-protein sequence.

[0052] hGH polypeptides may be monomers or multimers. Multimers may be dimers, trimers, tetramers or multimers comprising at least five monomeric polypeptide units. Multimers may also be homodimers or heterodimers. Multimers of the invention may be the result of hydrophobic, hydrophilic, ionic and/or covalent associations and/or may be indirectly linked, by for example, liposome formation. In one example, covalent associations are between the heterologous sequences contained in a fusion protein containing a hGH polypeptide or fragment thereof (see, e.g., US Patent Number 5,478,925, which disclosure is hereby incorporated by reference in its entirety). In another example, a hGH polypeptide or fragment thereof is joined to one or more polypeptides that may be either hGH polypeptides or

heterologous polypeptides through peptide linkers such as those described in U.S. Pat. No. 5,073,627 (hereby incorporated by reference). Another method for preparing multimer hGH polypeptides involves use of hGH polypeptides fused to a leucine zipper or isoleucine zipper polypeptide sequence known to promote multimerization of the proteins in which they are found using techniques known to those skilled in the art including the teachings of WO 94/10308. In another example, hGH polypeptides may be associated by interactions between Flag® polypeptide sequence contained in fusion hGH polypeptides containing Flag® polypeptide sequence. hGH multimers may also be generated using chemical techniques known in the art such as cross-linking using linker molecules and linker molecule length optimization techniques known in the art (see, e.g., US 5,478,925), techniques known in the art to form one or more inter-molecule cross-links between the cysteine residues located within the sequence of the polypeptides desired to be contained in the multimer (see, e.g., US 5,478,925, addition of cysteine or biotin to the C terminus or N-terminus of hGH polypeptide and techniques to generate multimers containing one or more of these modified polypeptides (see, e.g., US 5,478,925), or any of the 30 techniques to generate liposomes containing hGH multimers (see, e.g., US Patent Number 5,478,925,)), which disclosures are incorporated by reference in their entireties.

[0053] As used herein, the term "hGH polypeptide fragment" refers to any peptide or polypeptide comprising a contiguous span of a part of the amino acid sequence of a hGH polypeptide, preferably the polypeptide of SEQ ID NO:1.

[0054] More specifically, a hGH polypeptide fragment comprising at least 6, preferably at least 8 to 10, more

preferably 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 75, 100, 125, 150, 175, 191 consecutive amino acids of a hGH polypeptide according to the present invention. hGH polypeptide fragment may additionally be described as sub-genuses of hGH polypeptides comprising at least 6 amino acids, wherein "at least 6" is defined as any integer between 6 and the integer representing the C-terminal amino acid of a hGH polypeptide including the polypeptide of SEQ ID NO:1. Further included are species of hGH polypeptide fragments at least 6 amino acids in length, as described above, that are further specified in terms of their N-terminal and C-terminal positions. Also encompassed by the term "hGH polypeptide fragment" as individual species are all hGH polypeptide fragments, at least 6 amino acids in length, as described above, that may be particularly specified by a N-terminal and C-terminal position. That is, every combination of a N-terminal and C-terminal position that a fragment at least 6 contiguous amino acid residues in length could occupy, on any given amino acid sequence of the sequence listing or of the present invention is included in the present invention.

[0055] It is noted that the above species of polypeptide fragments of the present invention may alternatively be described by the formula "a to b"; where "a" equals the N-terminal most amino acid position and "b" equals the C-terminal most amino acid position of the polynucleotide; and further where "a" equals an integer between 1 and the number of amino acids of a hGH polypeptide sequence minus 6, and where "b" equals an integer between 7 and the number of amino acids of the hGH polypeptide sequence; and where "a" is an integer smaller than "b" by at least 6.

[0056] The above hGH polypeptide fragments can be immediately envisaged using the above description and are

therefore not individually listed solely for the purpose of not unnecessarily lengthening the specification. Moreover, the above fragments do not necessarily need to have a hGH biological activity, although polypeptides having these activities are preferred embodiments of the invention, since they would be useful, for example, in immunoassays, in epitope mapping, epitope tagging, as vaccines, and as molecular weight markers. The above fragments may also be used to generate antibodies to a particular portion of the polypeptide.

[0057] Also encompassed by the term "hGH polypeptide fragment" are domains of hGH polypeptides. Such domains may eventually comprise linear or structural motifs and signatures including, but not limited to, leucine zippers, helix-turn-helix motifs, post-translational modification sites such as glycosylation sites, ubiquitination sites, alpha helices, and beta sheets, signal sequences encoding signal peptides which direct the secretion of the encoded proteins, sequences implicated in transcription regulation such as homeoboxes, acidic stretches, enzymatic active sites, substrate binding sites, and enzymatic cleavage sites. Such domains may present a particular biological activity such as DNA or RNA-binding, secretion of proteins, transcription regulation, enzymatic activity, substrate binding activity, etc...

[0058] A domain has a size generally comprised between 3 and 191 amino acids. In preferred embodiment, domains comprise a number of amino acids that is any integer between 6 and 191. Domains may be synthesized using any methods known to those skilled in the art, including those disclosed herein for the preparation of hGH polypeptides to produce anti-hGH antibodies. Methods for determining the amino acids that make up a domain with a particular biological activity include mutagenesis

studies and assays to determine the biological activity to be tested.

[0059] Particularly preferred fragments in the context of the present invention are hGH polypeptides retaining a substantial biological activity, namely promoting growth in the growing phase and in maintaining normal body composition, anabolism, and lipid metabolism.

[0060] Alternatively, the polypeptides of the invention may be scanned for motifs, domains and/or signatures in databases using any computer method known to those skilled in the art. Searchable databases include Prosite (Hofmann et al., (1999) *Nucl. Acids Res.* 27:215-219; Bucher and Bairoch (1994) *Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. Altman et al, Eds., pp53-61, AAAIPress, Menlo Park), Pfam (Sonnhammer et al., (1997) *Proteins* 28(3):405-20; Henikoff et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):228-30; Bateman et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):263-6), Blocks (Henikoff et al., (2000) *Electrophoresis* 21(9):1700-6), Print (Attwood et al., (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(1):182-8), Prodom (Sonnhammer and Kahn (1994) *Protein Sci.* 3(3):482-92; Corpet et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):267-9), Sbase (Pongor et al. (1993) *Protein Eng.* 6(4):391-5; Murvai et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):260-2), Smart (Schultz et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 5857-5864), Dali/FSSP (Holm and Sander (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(1):206-9 ; Holm and Sander (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(1):231-4 ; Holm and Sander (1999) *Nucleic Acids Res.* 27(1):244-7), HSSP (Sander and Schneider (1991) *Proteins* 9(1):56-68.), CATH (Orengo et al., (1997) *Structure* 5(8):1093-108; Pearl et al., (2000) *Biochem. Soc. Trans.* 28(2):269-75), SCOP (Murzin et al., (1995) *J. Mol. Biol.* 247(4):536-40; Lo Conte et al., (2000) *Nucleic Acids Res.*

28(1):257-9), COG (Tatusov et al., (1997) *Science* 278, 631 :637 ; Tatusov et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):33-6), specific family databases and derivatives thereof (Nevill-Manning et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 5865-5871; Yona et al., (1999) *Proteins* 37(3):360-78; Attwood et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):225-7), each of which disclosures are hereby incorporated by reference in their entireties. For a review on available databases, see issue 1 of volume 28 of *Nucleic Acid Research* (2000), which disclosure is hereby incorporated by reference in its entirety.

[0061] The term "hGH polypeptide fragment" also encompasses epitopes-bearing fragments. These epitopes may be antigenic epitopes or both an antigenic epitope and an immunogenic epitope. An immunogenic epitope is defined as a part of a protein that elicits an antibody response *in vivo* when the polypeptide is the immunogen. On the other hand, a region of polypeptide to which an antibody binds is defined as an antigenic epitope. An epitope can comprise as few as 3 amino acids in a spatial conformation, which is unique to the epitope. Generally an epitope consists of at least 6 such amino acids, and more often at least 8-10 such amino acids.

[0062] A hGH epitope-bearing fragment according to the invention may be any fragment which length is between 6 amino acid and the full-length sequence of a hGH polypeptide, preferably a fragment between 6 and 50 amino acid. The epitope-bearing fragments may be specified by either the number of contiguous amino acid residues (as a sub-genus) or by specific N-terminal and C-terminal positions (as species) as described above.

[0063] Fragments which function as epitopes may be produced by any conventional means (See, e.g., Houghten (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5131-5135 and U.S. 4,631,21, which disclosures are hereby incorporated by

reference in their entireties). Methods for determining the amino acids which make up an epitope include x-ray crystallography, 2-dimensional nuclear magnetic resonance, and epitope mapping, e.g., the Pepscan method described by Geysen et al., (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:3998-4002; PCT Publications WO 84/03564 and WO 84/03506, which disclosures are hereby incorporated by reference in their entireties. Another example is the algorithm of Jameson and Wolf, (1988), Comp. Appl. Biosci. 4:181-186 (said reference incorporated by reference in its entirety). The Jameson-Wolf antigenic analysis, for example, may be performed using the computer program PROTEAN, using default parameters (Version 4.0 Windows, DNASTAR, Inc.)

[0064] The present invention also provides for the exclusion of any hGH fragment species specified by N-terminal and C-terminal positions or of any fragment sub-genus specified by size in amino acid residues as described above. Any number of fragments specified by N-terminal and C-terminal positions or by size in amino acid residues as described above may be excluded as individual species. The present invention also provides for the exclusion of any hGH domain or epitope-bearing fragment in the same manner.

[0065] The hGH polypeptides of the present invention can be prepared in any suitable manner. Such hGH polypeptides and fragments thereof may be purified from natural sources, chemically synthesized, produced by recombinant techniques including *in vitro* translation techniques or expression in a recombinant cell able to express hGH cDNA, or a combination of these methods, using techniques known to those skilled in the art (See, for example, "Methods in Enzymology, Academic Press, 1993" for a variety of methods for purifying proteins; Creighton, (1983) Proteins: Structures and Molecular Principles,

W.H. Freeman & Co. 2nd Ed., T. E., New York; and Hunkapiller et al., (1984) Nature. 310(5973): 105-11 for chemical synthesis of proteins and Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, ed., Elsevier Press, NY for recombinant techniques, which disclosures are incorporated by reference in their entireties). The polypeptides of the present invention are preferably provided in an isolated form, and may be partially or preferably substantially purified.

[0066] The terms "polynucleotides having at least x% identity with a polynucleotides of reference" and "polypeptides having at least x% identity with a polypeptide of reference" encompass polynucleotides or polypeptides which residue (nucleotide or amino acid respectively) sequence exhibit an identity percentage, as defined below, equal or superior to x compared to said reference polynucleotide or polypeptide sequence, respectively.

[0067] The identity percentage is determined after optimal alignment of two polynucleotides or polypeptide sequences over a comparison window, wherein portions of the polynucleotide or polypeptide sequences in the comparison window may comprise additions or deletions of one or more residue in order to optimize sequence alignment. The comparison window contains a certain number of positions (either a residue or a gap corresponding to an insertion/deletion of a residue), this number of positions corresponding to the window size. Each window position may present one of the following situations:

1°/ There is a residue (nucleotide or amino acid) on this position on the first aligned sequence and a different residue at the same position on the second aligned sequence, in other words the second sequence has

a substituted residue at this position compared to the first sequence.

2°/ There is a residue (nucleotide or amino acid) on this position on the first aligned sequence and the same residue at the same position on the second aligned sequence.

3°/ There is a residue (nucleotide or amino acid) on this position on the first aligned sequence and no residue at the same position on the second aligned sequence, in other words the second sequence presents a deletion at this position compared to the first sequence.

The number of positions within the comparison window belonging to the first above-defined category is called R1.

The number of positions within the comparison window belonging to the second above-defined category is called R2.

The number of positions within the comparison window belonging to the third above-defined category is called R3.

[0068] The identity percentage (%id) is may be calculated by any of the following formulas:

$$\%id = R2 / (R1 + R2 + R3) \times 100, \text{ or}$$

$$\%id = (R2 + R3) / (R1 + R2 + R3) \times 100$$

[0069] Alignment of sequences to compare may be performed using any of the variety of sequence comparison algorithms and programs known in the art. Such algorithms and programs include, but are by no means limited to; TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, , FASTDB, WU-BLAST, Gapped-BLAST, PSI-BLAST (Pearson and Lipman, (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448; Altschul et al., (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., (1993), Nature hGHtics 3:266-272; Altschul et al., (1997), Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; Thompson et al., (1994), Nuc. Acids Res.. 22:4673-4680; Higgins et al.,

(1996), Meth. Enzymol. 266:383-402; Brutlag et al. (1990) Comp. App. Biosci. 6:237-245; Jones and Swindells, (2002) Trends Biochem Sci 27:161-4; Olsen et al. (1999) Pac Symp Biocomput; 302-13), the disclosures of which are incorporated by reference in their entirety.

[0070] In a particular embodiment, the Smith-Waterman method is used with scoring matrix such as PAM, PAM 250 or preferably with BLOSUM matrices such as BLOSUM60 or BLOSUM62 and with default parameters (Gap Opening Penalty=10 and Gap Extension Penalty=1) or with user-specified parameters preferably superior to default parameters.

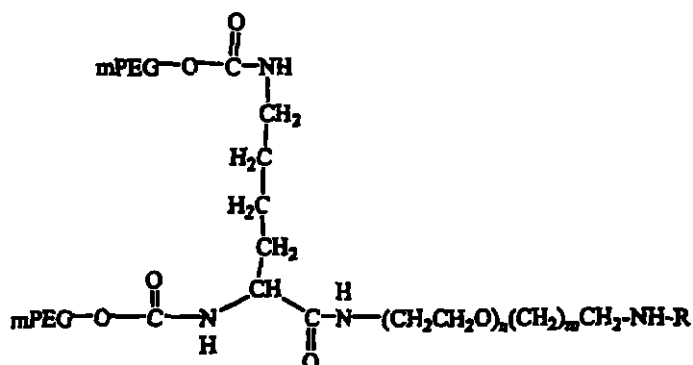
[0071] In another particular embodiment, protein and nucleic acid sequences are aligned using the Basic Local Alignment Search Tool ("BLAST") programs with the default parameters or with modified parameters provided by the user. Preferably, the scoring matrix used is the BLOSUM62 matrix (Gonnet et al., (1992), Science 256:1443-1445; Henikoff and Henikoff, (1993), Proteins 17:49-61, which disclosures are hereby incorporated by reference in their entirety). Less preferably, the PAM or PAM250 matrices may also be used (see, e.g., Schwartz and Dayhoff, (1978), eds., Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation, which disclosure is hereby incorporated by reference in its entirety).

[0072] In still another particular embodiment, polynucleotide or polypeptide sequences are aligned using the FASTDB computer program based on the algorithm of Brutlag et al. (1990), *supra*. Preferred parameters used in a FASTDB alignment of DNA sequences are:
Matrix=Unitary, k-tuple=4, Mismatch Penalty= 1, Joining Penalty=30, Randomization Group Length=0, Cutoff Score= 1, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty 0.05, Window Size=500

or the length of the subject nucleotide sequence, whichever is shorter. Preferred parameters used in a FASTDB amino acid alignment are: Matrix=PAM 0, k-tuple=2, Mismatch Penalty= 1, Joining Penalty=20, Randomization Group25Length=0, Cutoff Score= 1, Window Size=sequence length, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty=0.05, Window Size=500 or the length of the subject amino acid sequence, whichever is shorter.

[0073] According to the present invention, poly(ethylene glycol) is covalently bound through amino acid residues of hGH or agonist variant thereof. A variety of activated poly(ethylene glycol)s having a number of different functional groups, linkers, configurations, and molecular weights are known to one skilled in the art, which may be used to create PEG-hGH conjugates or PEG-hGH agonist variant conjugates (for reviews see 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) The present invention relates to a method of using aldehyde chemistry to direct selectivity of the PEG moiety to the N-terminus using a butyrylaldehyde linker moiety. The butyrylaldehyde linker results in increased N-terminal specificity compared to acetaldehyde linker (Table 1 and Figure 1).

[0074] An embodiment of the present invention is a human growth hormone-PEG conjugate having the structure of Formula I or Formula II



Formula I

or



Formula II

wherein

```
n is an integer between 1 and 10;
```

m is an integer between 1 and 10;

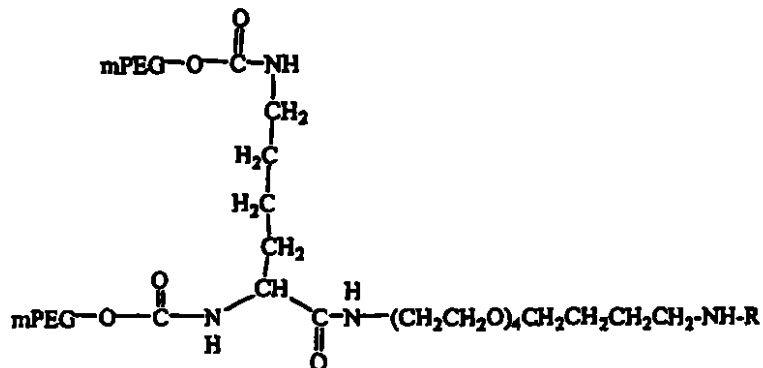
R is human growth hormone, methionyl growth hormone or a human growth hormone variant.

[0075] In a particular embodiment n is between 1 and 5 and m is between 1 and 5.

[0076] In a particular embodiment of Formula 1: n is 1 and m is 1; n is 1 and m is 2; n is 1 and m is 3; n is 1 and m is 4; n is 1 and m is 5; n is 1 and m is 6; n is 1 and m is 7; n is 1 and m is 8; n is 1 and m is 9; n is 1 and m is 10; n is 2 and m is 1; n is 2 and m is 2; n is 2 and m is 3; n is 2 and m is 4; n is 2 and m is 5; n is 2 and m is 6; n is 2 and m is 7; n is 2 and m is 8; n is 2 and m is 9; n is 2 and m is 10; n is 3 and m is 1; n is 3 and m is 2; n is 3 and m is 3; n is 3 and m is 4; n is 3 and m is 5; n is 3 and m is 6; n is 3 and m is 7; n is 3 and m is 8; n is 3 and m is 9; n is 3 and m is 10; n is 4 and m is 1; n is 4 and m is 2; n is 4 and m is 3; n is 4

and m is 4; n is 4 and m is 5; n is 4 and m is 6; n is 4
and m is 7; n is 4 and m is 8; n is 4 and m is 9; n is 4
and m is 10; n is 5 and m is 1; n is 5 and m is 2; n is 5
and m is 3; n is 5 and m is 4; n is 5 and m is 5; n is 5
and m is 6; n is 5 and m is 7; n is 5 and m is 8; n is 5
and m is 9; n is 5 and m is 10; n is 6 and m is 1; n is 6
and m is 2; n is 6 and m is 3; n is 6 and m is 4; n is 6
and m is 5; n is 6 and m is 6; n is 6 and m is 7; n is 6
and m is 8; n is 6 and m is 9; n is 7 and m is 10; n is 7
and m is 1; n is 7 and m is 2; n is 7 and m is 3; n is 7
and m is 4; n is 7 and m is 5; n is 7 and m is 6; n is 7
and m is 7; n is 7 and m is 8; n is 7 and m is 9; n is 7
and m is 10; n is 8 and m is 1; n is 8 and m is 2; n is 8
and m is 3; n is 8 and m is 4; n is 8 and m is 5; n is 8
and m is 6; n is 8 and m is 7; n is 8 and m is 8; n is 8
and m is 9; n is 8 and m is 10; n is 9 and m is 1; n is 9
and m is 2; n is 9 and m is 3; n is 9 and m is 4; n is 9
and m is 5; n is 9 and m is 6; n is 9 and m is 7; n is 9
and m is 8; n is 9 and m is 9; n is 9 and m is 10; n is
10 and m is 1; n is 10 and m is 2; n is 10 and m is 3; n
is 10 and m is 4; n is 10 and m is 5; n is 10 and m is 6;
n is 10 and m is 7; n is 10 and m is 8; n is 10 and m is
9; n is 10 and m is 10.

[0077] A specific embodiment is a human growth hormone-PEG conjugate having the structure:



or



wherein R is human growth hormone, methionyl human growth hormone or a human growth hormone variant.

[0078] Another specific embodiment of the present invention human growth hormone-PEG conjugate wherein the human growth hormone comprises or consists of the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

[0079] A specific embodiment of the present invention is a human growth hormone-PEG conjugate wherein greater than 80%, more preferably 81%, more preferably 82%, more preferably 83%, more preferably 84%, more preferably 85%, more preferably 86%, more preferably 87%, more preferably 88%, more preferably 89%, more preferably 90%, more preferably 91%, more preferably 92%, more preferably 93%, more preferably 94%, more preferably 95%, more preferably 96%, more preferably 97, and more preferably 98% of the polyethylene glycol is conjugated to the amino-terminal phenylalanine of the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

[0080] Another specific embodiment of the present invention is a human growth hormone-PEG conjugate wherein greater than 90% of the polyethylene glycol is conjugated to the amino-terminal phenylalanine of the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

[0081] Another specific embodiment of the present invention is a human growth hormone-PEG conjugate wherein greater than 95% of the polyethylene glycol is conjugated to the amino-terminal phenylalanine of the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

[0082] Another specific embodiment of the present invention is a human growth hormone-PEG conjugate wherein

greater than 98% of the polyethylene glycol is conjugated to an amino-terminal phenylalanine of the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

[0083] The poly(ethylene glycol) used in the present invention is not restricted to any particular form or molecular weight range. The poly(ethylene glycol) molecular weight may be between about 500 and about 100,000 Dalton. The term "about" indicating that in preparations of polyethylene glycol, some molecules will weigh more, some less, than the stated molecular weight and the stated molecular weight refers to the average molecular weight. It is understood that there is some degree of polydispersity associated with polymers such as poly(ethylene glycol). It is preferable to use PEGs with low polydispersity. Normally, a PEG with molecular weight of about 500 to about 60,000 is used. A specific PEG molecular weight range of the present invention is from about 1,000 to about 40,000. In another specific embodiment the PEG molecular weight is greater than about 5,000 to about 40,000. In another specific embodiment the PEG molecular weight about 20,000 to about 40,000. Other sizes may be used, depending on the desired therapeutic profile (e.g. duration of sustained release desired, the effects, if any on biological activity, the degree or lack of antigenicity and other known effects of the polyethylene to a therapeutic protein. For example the polyethylene glycol may have an average molecular weight of about 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10,000, 10,500, 11,000, 11,500, 12,000, 12,500, 13,000, 13,500, 14,000, 14,500, 15,000, 15,500, 16,000, 16,500, 17,000, 17,500, 18,000, 18,500, 19,000, 19,500, 20,000, 25,000, 30,000, 35,000, 40,000, 45,000, 50,000, 55,000, 60,000, 65,000, 70,000, 75,000, 80,000, 85,000, 90,000, 95,000, or 100,000 Dalton.

[0084] In another embodiment the poly(ethylene glycol) is a branched PEG having more than one PEG moiety attached (see U.S. 5,932,462; U.S. 5,342,940; U.S. 5,643,575; U.S. 5,919,455; U.S. 6,113,906; U.S. 5,183,660; Kodera Y., *Bioconjugate Chemistry* 5:283-288 (1994); and WO 02/09766. In a preferred embodiment the molecular weight of each poly(ethylene glycol) of the branched PEG is about 5,000-20,000. In a specific embodiment the molecular weight of each poly(ethylene glycol) of the branched PEG is about 20,000.

[0085] Poly(alkylene oxide)s, notably poly(ethylene glycol)s, are bound to hGH or agonist variant thereof via a terminal reactive group, which may or may not leave a linking moiety (spacer) between the PEG and the protein. In order to form the hGH conjugates or agonist variant thereof of the present invention, polymers such as poly(alkylene oxide) are converted into activated forms, as such term is known to those of ordinary skill in the art. The reactive group, for example, is a terminal reactive group, which mediates a bond between chemical moieties on the protein and poly(ethylene glycol). Typically, one or both of the terminal polymer hydroxyl end-groups, (i.e. the alpha and omega terminal hydroxyl groups) are converted into reactive functional groups, which allows covalent conjugation. This process is frequently referred to as "activation" and the poly(ethylene glycol) product having the reactive group is hereinafter referred to as "an activated poly(ethylene glycol)". In a specific embodiment one of the terminal polymer hydroxyl end-groups is converted or capped with a non-reactive group. In a specific embodiment one of the terminal polymer hydroxyl end-groups is converted or capped with a methyl group. As used herein, the term "mPEG" refers to a PEG, which is capped at one end with a methyl group. The mPEG can be represented structurally as



[0086] Polymers containing both α and ϵ linking groups are referred to as "bis-activated poly(alkylene oxides)" and are referred to as "bifunctional". Polymers containing the same reactive group on α and ϵ terminal hydroxyls are sometimes referred to as "homobifunctional" or "homobis-activated". Polymers containing different reactive groups on α and ϵ terminal hydroxyls are sometimes referred to as "heterobifunctional" (see for example WO 01/26692) or "heterobis-activated". Polymers containing a single reactive group are referred to as "mono-activated" polyalkylene oxides or "mono-functional". Other substantially non-antigenic polymers are similarly "activated" or "functionalized".

[0087] The activated polymers are thus suitable for mediating a bond between chemical moieties on the protein, such as α - or ϵ -amino, carboxyl or thiol groups, and poly(ethylene glycol). Bis-activated polymers can react in this manner with two protein molecules or one protein molecule and a reactive small molecule in another embodiment to effectively form protein polymers or protein-small molecule conjugates through cross linkages.

[0088] In one preferred embodiment of the invention secondary amine or amide linkages are formed using the N-terminal α -amino group or ϵ -amino groups of lysine of hGH or agonist variant thereof and the activated PEG. In another preferred aspect of the invention, a secondary amine linkage is formed between the N-terminal primary α - or ϵ -amino group of hGH or agonist variant thereof and single or branched chain PEG aldehyde by reductive alkylation with a suitable reducing agent such as NaCNBH_3 , NaBH_3 , Pyridine Borane etc. as described in

Chamow et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 133-140 (1994), US Pat No. 4,002,531, WO 90/05534, and US Pat. No 5,824,784.

[0089] In a preferred embodiment at least 70%, preferably at least 80%, preferably at least 81%, preferably at least 82%, preferably at least 83%, preferably at least 84%, preferably at least 85%, preferably at least 86%, preferably at least 87%, preferably at least 88%, preferably at least 89%, preferably at least 90%, preferably at least 91%, preferably at least 92%, preferably at least 93%, preferably at least 94%, preferably at least 95%, preferably at least 96%, preferably at least 97%, and most preferably at least 98% of the poly(ethylene glycol) is on the amino terminal α -amino group.

[0090] Conjugation reactions, referred to as pegylation reactions, were historically carried out in solution with molar excess of polymer and without regard to where the polymer will attach to the protein. Such general techniques, however, have typically been proven inadequate for conjugating bioactive proteins to non-antigenic polymers while retaining sufficient bioactivity. One way to maintain the hGH or agonist variant thereof bioactivity is to substantially avoid the conjugation of those hGH or agonist variant thereof reactive groups associated with the receptor binding site(s) in the polymer coupling process. Another aspect of the present invention is to provide a process of conjugating poly(ethylene glycol) to hGH or agonist variant thereof maintaining high levels of retained activity.

[0091] The chemical modification through a covalent bond may be performed under any suitable condition generally adopted in a reaction of a biologically active substance with the activated poly(ethylene glycol). The conjugation reaction is carried out under relatively mild

30

conditions to avoid inactivating the hGH or agonist variant thereof. Mild conditions include maintaining the pH of the reaction solution in the range of 3 to 10 and the reaction temperatures within the range of from about 0°-37°C. In the cases where the reactive amino acid residues in hGH or agonist variant thereof have free amino groups, the above modification is preferably carried out in a non-limiting list of suitable buffers (pH 3 to 10), including phosphate, MES, citrate, acetate, succinate or HEPES, for 1-48 hrs at 4°-37°C. In targeting N-terminal amino groups with reagents such as PEG aldehydes pH 4-7 is preferably maintained. The activated poly(ethylene glycol) may be used in about 0.01-100 times, preferably about 0.01-2.5 times, the molar amount of the number of free amino groups of hGH or agonist variant thereof. On the other hand, where reactive amino acid residues in hGH or agonist variant thereof have the free carboxyl groups, the above modification is preferably carried out in pH from about 3.5 to about 5.5, for example, the modification with poly(oxyethylenediamine) is carried out in the presence of carbodiimide (pH 4-5) for 1-24 hrs at 4°-37°C. The activated poly(ethylene glycol) may be used in 0.01-300 times the molar amount of the number of free carboxyl groups of hGH or agonist variant thereof.

[0092] In separate embodiments, the upper limit for the amount of polymer included in the conjugation reactions exceeds about 1:1 to the extent that it is possible to react the activated polymer and hGH or agonist variant thereof without forming a substantial amount of high molecular weight species, i.e. more than about 20% of the conjugates containing more than about one strand of polymer per molecule of hGH or agonist variant thereof. For example, it is contemplated in this

aspect of the invention that ratios of up to about 6:1 can be employed to form significant amounts of the desired conjugates which can thereafter be isolated from any high molecular weight species.

[0093] In another aspect of this invention, bifunctionally activated PEG derivatives may be used to generate polymeric hGH or agonist variant thereof-PEG molecules in which multiple hGH or agonist variant thereof molecules are crosslinked via PEG. Although the reaction conditions described herein can result in significant amounts of unmodified hGH or agonist variant thereof, the unmodified hGH or agonist variant thereof can be readily recycled into future batches for additional conjugation reactions. The processes of the present invention generate surprisingly very little, *i.e.* less than about 30% and more preferably, less than about 10%, of high molecular weight species and species containing more than one polymer strand per hGH or agonist variant thereof. These reaction conditions are to be contrasted with those typically used for polymeric conjugation reactions wherein the activated polymer is present in several-fold molar excesses with respect to the target. In other aspects of the invention, the polymer is present in amounts of from about 0.1 to about 50 equivalents per equivalent of hGH or agonist variant thereof. In other aspects of the invention, the polymer is present in amounts of from about 1 to about 10 equivalents per equivalent of hGH or agonist variant thereof.

[0094] The conjugation reactions of the present invention initially provide a reaction mixture or pool containing mono- and di-PEG-hGH conjugates, unreacted hGH, unreacted polymer, and usually less than about 20% high molecular weight species. The high molecular weight species include conjugates containing more than one

polymer strand and/or polymerized PEG-hGH or agonist variant thereof species. After the unreacted species and high molecular weight species have been removed, compositions containing primarily mono- and di-polymer-hGH or agonist variant thereof conjugates are recovered. Given the fact that the conjugates for the most part include a single polymer strand, the conjugates are substantially homogeneous. These modified hGH or agonist variant thereof have at least about 0.1% of the *in vitro* biological activity associated with the native or unmodified hGH or agonist variant thereof as measured using standard FDC-P1 cell proliferation assays, (Clark et al. *Journal of Biological Chemistry* 271:21969-21977, 1996), receptor binding assay (US 5,057,417), or hypophysectomized rat growth (Clark et al. *Journal of Biological Chemistry* 271:21969-21977, 1996). In preferred aspects of the invention, however, the modified hGH or agonist variant thereof have about 25% of the *in vitro* biological activity, more preferably, the modified hGH or agonist variant thereof have about 50% of the *in vitro* biological activity, more preferably, the modified hGH or agonist variant thereof have about 75% of the *in vitro* biological activity, and most preferably the modified hGH or agonist variant thereof have equivalent or improved *in vitro* biological activity.

[0095] The processes of the present invention preferably include rather limited ratios of polymer to hGH or agonist variant thereof. Thus, the hGH or agonist variant thereof conjugates have been found to be predominantly limited to species containing only one strand of polymer. Furthermore, the attachment of the polymer to the hGH or agonist variant thereof reactive groups is substantially less random than when higher molar excesses of polymer linker are used. The unmodified hGH or agonist variant thereof present in the reaction

pool, after the conjugation reaction has been quenched, can be recycled into future reactions using ion exchange or size exclusion chromatography or similar separation techniques.

[0096] A poly(ethylene glycol)-modified hGH or agonist variant thereof, namely chemically modified protein according to the present invention, may be purified from a reaction mixture by conventional methods which are used for purification of proteins, such as dialysis, salting-out, ultrafiltration, ion-exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography (HIC), gel chromatography and electrophoresis. Ion-exchange chromatography is particularly effective in removing unreacted poly(ethylene glycol) and hGH or agonist variant thereof. In a further embodiment of the invention, the mono- and di-polymer-hGH or agonist variant thereof species are isolated from the reaction mixture to remove high molecular weight species, and unmodified hGH or agonist variant thereof. Separation is effected by placing the mixed species in a buffer solution containing from about 0.5-10 mg/mL of the hGH or agonist variant thereof-polymer conjugates. Suitable solutions have a pH from about 4 to about 10. The solutions preferably contain one or more buffer salts selected from KCl, NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $NaHCO_3$, $NaBO_4$, CH_3CO_2H , and NaOH.

[0097] Depending upon the reaction buffer, the hGH or agonist variant thereof polymer conjugate solution may first have to undergo buffer exchange/ultrafiltration to remove any unreacted polymer. For example, the PEG-hGH or agonist variant thereof conjugate solution can be ultrafiltered across a low molecular weight cut-off (10,000 to 30,000 Dalton) membrane to remove most unwanted materials such as unreacted polymer, surfactants, if present, or the like.

[0098] The fractionation of the conjugates into a pool containing the desired species is preferably carried out using an ion exchange chromatography medium. Such media are capable of selectively binding PEG-hGH or agonist variant thereof conjugates via differences in charge, which vary in a somewhat predictable fashion. For example, the surface charge of hGH or agonist variant thereof is determined by the number of available charged groups on the surface of the protein. These charged groups typically serve as the point of potential attachment of poly(alkylene oxide) polymers. Therefore, hGH or agonist variant thereof conjugates will have a different charge from the other species to allow selective isolation.

[0099] Strongly polar anion or cation exchange resins such as quaternary amine or sulfopropyl resins, respectively, are used for the method of the present invention. Ion exchange resins are especially preferred. A non-limiting list of included commercially available cation exchange resins suitable for use with the present invention are SP-hitrap®, SP Sepharose HP® and SP Sepharose® fast flow. Other suitable cation exchange resins e.g. S and CM resins can also be used. A non-limiting list of anion exchange resins, including commercially available anion exchange resins, suitable for use with the present invention are Q-hitrap®, Q Sepharose HP®, and Q sepharose® fast flow. Other suitable anion exchange resins, e.g. DEAE resins, can also be used.

[00100] For example, the anion or cation exchange resin is preferably packed in a column and equilibrated by conventional means. A buffer having the same pH and osmolality as the polymer conjugated hGH or agonist variant thereof solution is used. The elution buffer

preferably contains one or more salts selected from KCl, NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $NaHCO_3$, $NaBO_4$, and $(NH_4)_2CO_3$. The conjugate-containing solution is then adsorbed onto the column with unreacted polymer and some high molecular weight species not being retained. At the completion of the loading, a gradient flow of an elution buffer with increasing salt concentrations is applied to the column to elute the desired fraction of polyalkylene oxide-conjugated hGH or agonist variant thereof. The eluted pooled fractions are preferably limited to uniform polymer conjugates after the cation or anion exchange separation step. Any unconjugated hGH or agonist variant thereof species can then be back washed from the column by conventional techniques. If desired, mono and multiply pegylated hGH or agonist variant thereof species can be further separated from each other via additional ion exchange chromatography or size exclusion chromatography.

[00101] Techniques utilizing multiple isocratic steps of increasing concentration of salt or pH can also be used. Multiple isocratic elution steps of increasing concentration will result in the sequential elution of di- and then mono-hGH or agonist variant thereof-polymer conjugates.

[00102] The temperature range for elution is between about 4°C and about 25°C. Preferably, elution is carried out at a temperature of from about 4°C to about 22°C. For example, the elution of the PEG-hGH or agonist variant thereof fraction is detected by UV absorbance at 280 nm. Fraction collection may be achieved through simple time elution profiles.

[00103] A surfactant can be used in the processes of conjugating the poly(ethylene glycol) polymer with the hGH or agonist variant thereof moiety. Suitable surfactants include ionic-type agents such as sodium

dodecyl sulfate (SDS). Other ionic surfactants such as lithium dodecyl sulfate, quaternary ammonium compounds, taurocholic acid, caprylic acid, decane sulfonic acid, etc. can also be used. Non-ionic surfactants can also be used. For example, materials such as poly(oxyethylene) sorbitans (Tweens), poly(oxyethylene) ethers (Tritons) can be used. See also Neugebauer, A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry (1992) Calbiochem Corp. The only limitations on the surfactants used in the processes of the invention are that they are used under conditions and at concentrations that do not cause substantial irreversible denaturation of the hGH or agonist variant thereof and do not completely inhibit polymer conjugation. The surfactants are present in the reaction mixtures in amounts from about 0.01-0.5%; preferably from 0.05-0.5%; and most preferably from about 0.075-0.25%. Mixtures of the surfactants are also contemplated.

[00104] It is thought that the surfactants provide a temporary, reversible protecting system during the polymer conjugation process. Surfactants have been shown to be effective in selectively discouraging polymer conjugation while allowing lysine-based or amino terminal-based conjugation to proceed.

[00105] The present poly(ethylene glycol)-modified hGH or agonist variant thereof has a more enduring pharmacological effect, which may be possibly attributed to its prolonged half-life *in vivo*.

[00106] Another embodiment of the invention relates to methods for the prevention and/or treatment of a disease or disorder in which use of GH, preferably hGH is beneficial, comprising administering to a patient in need thereof a therapeutically effective amount of a poly(ethylene glycol)-modified hGH of the invention or agonist variant thereof, alone or in combination with

another therapeutic agent. The invention also relate to the use of a poly(ethylene glycol)-modified hGH of the invention or agonist variant thereof in the manufacture of a medicament for the prevention and/or treatment of a disease or disorder in which use of GH, preferably hGH is beneficial. In addition, the invention also relates to a pharmaceutical composition comprising a poly(ethylene glycol)-modified hGH of the invention or agonist variant thereof for the prevention and/or treatment of a disease or disorder in which use of GH, preferably hGH is beneficial.

[00107] Diseases or disorders in which the use of GH is beneficial include, but are limited to, growth hormone deficiency (GHD), adult growth hormone deficiency (aGHD), Turner's syndrome, growth failure in children who were born short for gestational age (SGA), Prader-Willi syndrome (PWS), chronic renal insufficiency (CRI), Aids wasting, Aging, end-stage Renal Failure, Cystic Fibrosis, Erectile dysfunction, HIV lipodystrophy, Fibromyalgia, Osteoporosis, Memory disorders, Depression, Crohn's disease, Skeletal dysplasias, Traumatic brain injury, Subarachnoid haemorrhage, Noonan's syndrome, Down's syndrome, Idiopathic short stature (ISS), End stage renal disease (ESRD), Very low birth weight (VLBW), Bone marrow stem cell rescue, Metabolic syndrome, Glucocorticoid myopathy, Short stature due to glucocorticoid treatment in children, and Failure of growth catching for short premature children.

[00108] In a more specific embodiment of the invention, the poly(ethylene glycol)-modified hGH of the invention or agonist variants thereof are used in the prevention and/or treatment of a disorders or diseases selected from the group consisting of GHD, aGHD, SGA, PWS, Turner's syndrome and CRI.

[00109] In another more specific embodiment of the invention, the poly(ethylene glycol)-modified hGH of the invention or agonist variants thereof are used in the prevention and/or treatment of a disorders or diseases selected from the group consisting of idiopathic short stature, very low birth weight, traumatic brain injury, metabolic syndrome, and Noonian's syndrome.

[00110] Another embodiment of the invention relate to pharmaceutical compositions comprising a poly(ethylene glycol)-modified hGH of the invention or agonist variant thereof, alone or in combination with another therapeutic agent, and at least one pharmaceutically acceptable excipient or carrier. The present poly(ethylene glycol)-modified hGH or agonist variant thereof may then be formulated into pharmaceuticals containing also a pharmaceutically acceptable diluent, an agent for preparing an isotonic solution, a pH-conditioner and the like in order to administer them into a patient.

[00111] The above pharmaceuticals may be administered subcutaneously, intramuscularly, intravenously, pulmonary, intradermally, or orally, depending on a purpose of treatment. A dose may be also based on the kind and condition of the disorder of a patient to be treated, being normally between 0.1 mg and 5 mg by injection and between 0.1 mg and 50 mg in an oral administration for an adult.

[00112] As used herein, the poly(ethylene glycol)-modified hGH or agonist variants thereof of the present invention may be used in combination with another therapeutic agent. As used herein, the terms "co-administration", "co-administered" and "in combination with", referring to the compounds A and one or more other therapeutic agents, is intended to mean, and does refer to and include the following :

- simultaneous administration of such combination of A and therapeutic agent(s) to a patient in need of treatment, when such components are formulated together into a single dosage form which releases said components at substantially the same time to said patient,

- substantially simultaneous administration of such combination of A and therapeutic agent(s) to a patient in need of treatment, when such components are formulated apart from each other into separate dosage forms which are taken at substantially the same time by said patient, whereupon said components are released at substantially the same time to said patient

- sequential administration of such combination of A and therapeutic agent(s) to a patient in need of treatment, when such components are formulated apart from each other into separate dosage forms which are taken at consecutive times by said patient with a significant time interval between each administration, whereupon said components are released at substantially different times to said patient; and

- sequential administration of such combination of A and therapeutic agent(s) to a patient in need of treatment, when such components are formulated together into a single dosage form which releases said components in a controlled manner whereupon they are concurrently, consecutively, and/or overlappingly administered at the same and/or different times by said patient.

[00113] Suitable examples of other therapeutic agents which may be used in combination with A, their pharmaceutically acceptable salts and/or their derived forms include, but are by no mean limited to: aromatase inhibitors such as exemestane, formestane, atamestane, fadrozole, letrozole, vorozole and anastrozole; free fatty acid regulators including fibric acid derivatives (such as fenofibrate, clofibrate, gemfibrozil,

bezafibrate and ciprofibrate) and nicotinic acid derivatives such as acipimox; insulin sensitizing agents including but not limited to biguanides such as metformin, PPAR gamma insulin sensitizing agents and thiazolidenediones such as troglitazone and rosiglitazone Troglitazone, 5-[[4-[3,4-Dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2H-]-benzopyran-2-yl) methoxy]phenyl]methyl-2,4-thiazolidinedione V411 (DIABII, Glaucanin) Pioglitazone (ACTOS, AD 4833, U 72107, U 72107A, U 72107E, ZACTOS) Chemical Name: 2,4-Thiazolidinedione, 5-[[4-[2-(5-ethyl-2-pyridinyl) ethoxy]phenyl]methyl]-, monohydrochloride, (a/-); Rosiglitazone (Avandia, BRL 49653, BRL 49653C) Chemical Name: 2,4 Thiazolidinedione, 5-[[4-[2- (methyl-2-pyridinylarnino)ethoxy]phenyl]methyl]; 25 Bexarotene-oral (LGD 1069 oral, Targretin oral, Targretin, Targretyn oral Targrexin oral) Chemical Name: 4-[1-(3,5,5,8,8-Pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl) ethenyl]benzoic acid; ZD 2079, (ICI D 2079) (Chemical Name: R)-N-[2-4- (Carboxymethyl) 30 phenoxy]ethyl)-N-(2-hydroxy-2-phenethyl) ammonium chloride: Netoglitazone, (Isaglitazone, MCC 555, RWJ 241947) (Chemical Name: 5-[6(2-Fluorobenzoyloxy)naphthalen-2-ylmethyl]thiazolidine-2,4-dione) ; INS (D-chiro-inositol) (Chemical Name: D-1,2,3,4,5,6- Hexahydroxycyclohexane), ON 2344 (DRF 2593); Dexlipotam, Chemical Name: 5(R)-(1,2-Dithiolan-3-yl) pentaloic 35 acid; HQL 975, Chemical Name: 3-[4- [2-(5-Methyl-2-phenyloxazol-4-yl) ethoxy]phenyl]-2(S)-(propylamino) propionic acid; YM 268, Chemical Name: 5,5'-Methylene-bis(1,4-phenylene)bismethylenebis (thiazolidine-2,4-dione). I PPAR agonists under development include: Reglitazar (JTT 501, PNU 182716, PNU 716) (Chemical Name: Isoxazolidien-3, 5-dione, i 4-[[4-(2-phenyl-5-methyl)-1,3-oxazolyl]ethoxyphenyl-4] methyl-, (4RS)); I (RP 297, Chemical Name: 10 5-(2,4-

Dioxothiazolidin-5-ylmethyl)-2-methoxy-N-[4-(trifluoromethyl) benzylbenzamide; R 119702 (CI 1037, CS 011) ChemicalName: (/)-5-[4-(5-Methoxy- 1H benzimidazol-2-ylmethoxy)benzyl] thiazolin-2,4-dione; hydrochloride; 15 DRF 2189, Chemical Name: 5-[[4-[2-(1-Indolyl)ethoxy]phenyl]methyl] thiazolidine-2,4-dione; cortisol synthesis inhibitors such as Ketoconazole, econazole or miconazole; growth hormones such as somatropin or somatorm and their derivatives such as human growth hormone fusion proteins such as ALBUTROPIN; polyethylene glycol growth hormones such as the cysteine-pegylated growth hormone, BT 005 (Bolder BioTechnology Inc.); growth hormone secretagogues such as, for example, SM 130686 (Sumitomo) capromorelin (Pfizer), mecasermin (Fujisawa), sermorelin (Salk Institute, Bio-Technology General), somatrem, somatomedin (C Llorente; Pharmacia Corporation) examorelin, tabimorelin; CP 464709 (Pfizer), LY 426410 and LY 444711 (Lilly); 8-(aminoalkoxyimino)-8H-dibenzo[a,e]triazolo[4,5-c]cycloheptenes as disclosed in WO2002057241, 2-substituted dibenzo[a,e]1,2,3-triazolo[4,5-c][7]annulen-8-ones as described in WO2002056873 growth hormone releasing peptides GHRP-6 and GHRP-1 as described in U.S. Patent No. 4,411,890, and publications WO 89/07110, WO 89/07111, B-HT920, hexarelin and GHRP-2 as described in WO 93/04081 or growth hormone releasing hormone (GHRH, also designated GRF) and its analogs, somatomedins including IGF-1 and IGF-2 and their derivatives such as SomatoKine - a recombinant fusion of insulin-like growth factor-1 and its binding protein, BP-3, alpha-2-adrenergic agonists such as clonidine, xylazine, detomidine and medetomidine or serotonin 5HT_{1D} agonists such as sumatriptan or agents which inhibit somatostatin or its release such as physostigmine and pyridostigmine, ThGRF 1-44 (Theratechnologies); L 165166 (Merck & Company);

dipeptide derivatives as described in WO9858947, Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV such as amino-acylpyrrolidine nitrile as described in US6521644, WO95/15309 and WO98/19998; Beta-amino heterocyclic dipeptidyl peptidase inhibitors such as those described in US20030100563 and WO2003082817; growth hormone releasing compounds as described in US20030055261, US20030040483, EP 18 072, EP 83 864, WO 89/07110, WO 89/01711, WO 89/10933, WO 88/9780, WO 83/02272, WO 91/18016, WO 92/01711, WO 93/04081, WO 9514666, EP0923539, U.S. Patent Nos. 5,206,235, 5,283,241, 5,284,841, 5,310,737, 5,317,017, 5,374,721, 5,430,144, 5,434,261, 5,438,136, 5,494,919, 5,494,920, 5,492,916, 5,536,716 and 5,578,593, WO 94/13696, WO 94/19367, WO 95/03289, WO 95/03290, WO 95/09633, WO 95/11029, WO 95/12598, WO 95/13069, WO 95/14666, WO 95/16675, WO 95/16692, WO 95/17422, WO 95/17423, WO 95/34311, and WO 96/02530, Piperidines, pyrrolidines and hexahydro-1H-azepines as described in US5804578, US5783582, WO2004007468, AMIDO SPIROPIPERIDINES such as those described in WO0104119, 2-amino-5-pyrimidine acetic acid compounds including 2-[(5,6-Dimethyl-2-benzoimidazolyl)amino]-4-hydroxy-6-methyl-5-pyrimidine acetic acid (2) and 2-[(5,6-Dimethyl-2-benzoimidazolyl)amino]-4-hydroxy-6-methyl-5-pyrimidine acetic acid, ethyl ester as described in US6329383, benzimidazoles as described in EP1155014, analogous peptidyl compounds related to GRF and the peptides of U.S. Patent 4,411,890, antagonists of gonadotropin releasing hormone such as those described in WO0170228, WO0170227, WO0170228, WO0069433, WO0004013, WO995156, WO9951595, WO9951231-4, WO9941251-2, WO9921557, WO9921553 and 6-AZAINDOLE COMPOUNDS as described in WO0053602, WO0053185, WO0053181, WO0053180, WO0053179, WO0053178, US6288078; IGF-1 secretagogues; insulin-like growth

factor-2 (IGF- 2 or somatomedin A) and IGF-2 secretagogues; myostatin antagonists and compounds which inhibit fibroblast growth factor receptor-3 (FGFR-3) tyrosine kinase.

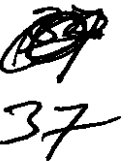
[00114] The polymeric substances included are also preferably water-soluble at room temperature. A non-limiting list of such polymers include poly(alkylene oxide) homopolymers such as poly(ethylene glycol) or poly(propylene glycols), poly(oxyethylenated polyols), copolymers thereof and block copolymers thereof, provided that the water solubility of the block copolymers is maintained.

[00115] As an alternative to PEG-based polymers, effectively non-antigenic materials such as dextran, poly(vinyl pyrrolidones), poly(acrylamides), poly(vinyl alcohols), carbohydrate-based polymers, and the like can be used. Indeed, the activation of α - and ϵ -terminal groups of these polymeric substances can be effected in fashions similar to that used to convert poly(alkylene oxides) and thus will be apparent to those of ordinary skill. Those of ordinary skill in the art will realize that the foregoing list is merely illustrative and that all polymer materials having the qualities described herein are contemplated. For purposes of the present invention, "effectively non-antigenic" means all materials understood in the art as being nontoxic and not eliciting an appreciable immunogenic response in mammals.

Definitions

[00116] The following is a list of abbreviations and the corresponding meanings as used interchangeably herein:

g	gram(s)
---	---------



mg milligram(s)
ml or mL milliliter(s)
RT room temperature
PEG poly (ethylene glycol)

[00117] The complete content of all publications, patents, and patent applications cited in this disclosure are herein incorporated by reference as if each individual publication, patent, or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

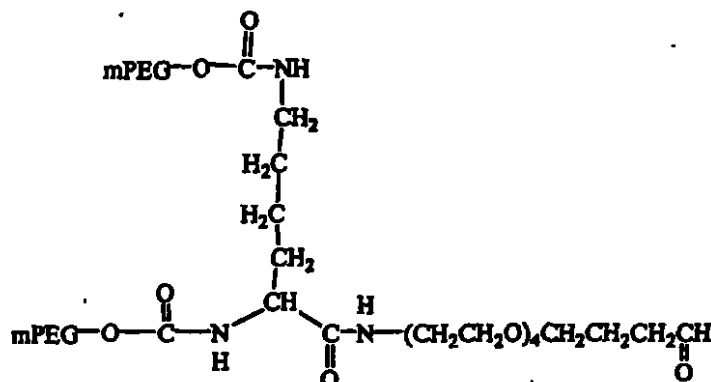
[00118] Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for the purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to one skilled in the art in light of the teachings of this invention that changes and modifications can be made without departing from the spirit and scope of the present invention. The following examples are provided for exemplification purposes only and are not intended to limit the scope of the invention, which has been described in broad terms above.

[00119] In the following examples, the hGH is that of SEQ ID NO:1. It is understood that other members of the hGH or agonist variant thereof family of polypeptides could also be pegylated in a similar manner as exemplified in the subsequent examples.

EXAMPLES

Example 1

Branched 40,000 MW PEG-butyrylaldehyde hGH



[00120] This example demonstrates a method for generation of substantially homogeneous preparations of N-terminally monopegylated hGH by reductive alkylation. Methoxy-branched PEG-butyrylaldehyde reagent of approximately 40,000 MW (Shearwater Corp.) was selectively coupled via reductive amination to the N-terminus of hGH by taking advantage of the difference in the relative pK_a value of the primary amine at the N-terminus versus pK_a values of primary amines at the ϵ -amino position of lysine residues. hGH protein dissolved at 10 mg/mL in 25 mM Hepes (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7.0, (optionally 25 mM MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6.0, 10 mM Sodium Acetate (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5), was reacted with Methoxy-PEG-butyrylaldehyde, M-PEG-ALD, (Shearwater Corp., Huntsville, AL) by addition of M-PEG-ALD to yield a relative PEG:hGH molar ratio of 2:1. Reactions were catalyzed by addition of stock 1M $NaCNBH_4$ (Sigma Chemical, St. Louis, MO), dissolved in H_2O , to a final concentration of 10-50 mM. Reactions were carried out in the dark at RT for 18-24 hours. Reactions were stopped by addition of 1 M Tris (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ~pH 7.6 to a final Tris concentration of 50 mM

or diluted into appropriate buffer for immediate purification.

[00121] Table 1 shows the percent, as determined by Size Exclusion Chromatography, of multi-PEGylated species, mono-PEGylated conjugate, un-reacted PEG, and final purification yield for 40K branched PEG-aldehyde and 40K branched PEG-butyrylaldehyde. The PEG-butyrylaldehyde results in increased mono-PEGylated conjugate, decreased levels of un-reacted PEG, and increased final yield compared to PEG-aldehyde.

TABLE 1

Comparison of 40K Branched PEG-ALD-hGH and 40K branched PEG-Butyrylaldehyde-hGH		
Species in the reaction mix:		
	40K PEG-aldehyde hGH	40K PEG-butyrylaldehyde-hGH
multi-PEG product	4.02%	5.03%
mono-PEG product	48.70%	61.02%
un-reacted hGH	41.80%	29.20%
Final purification yield	30.80%	44.70%

Example 2

Straight Chain 30,000 MW PEG-butyrylaldehyde hGH

[00122] Methoxy-linear 30,000 MW PEG-butyrylaldehyde reagent is coupled to the N-terminus of hGH using the procedure described for Example 1.

Example 3

Straight chain 20,000 MW PEG-butyrylaldehyde hGH

[00123] Methoxy-linear 20,000 MW PEG-butyrylaldehyde reagent is coupled to the N-terminus of hGH using the procedure described for Example 1.

Example 4

Purification of Pegylated hGH

[00124] Pegylated hGH species were purified from the reaction mixture to >95% (SEC analysis) using a single ion exchange chromatography step.

Anion exchange chromatography

[00125] The PEG hGH species were purified from the reaction mixture to >95% (SEC analysis) using a single anion exchange chromatography step. Mono-pegylated hGH was purified from unmodified hGH and multi-pegylated hGH species using anion exchange chromatography. A typical 20K butyrylaldehyde hGH reaction mixture (5-100 mg protein), as described above, was purified on a Q-Sepharose Hitrap column (1 or 5 mL) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) or Q-Sepharose fast flow column (26/20, 70 mL bed volume) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) equilibrated in 25 mM HEPES, pH 7.3 (Buffer A). The reaction mixture was diluted 5-10X with buffer A and loaded onto the column at a flow rate of 2.5 mL/min. The column was washed with 8 column volumes of buffer A. Subsequently, the various hGH species were eluted from the column in 80-100 column volumes of Buffer A and a linear NaCl gradient of 0-100 mM. The eluant was monitored by absorbance at 280 nm (A_{280}) and 5 mL fractions were collected. Fractions were pooled as to extent of pegylation, e.g., mono, di, tri etc. (as

assessed in example 15). The pool was then concentrated to 0.5-5 mg/mL in a Centriprep YM10 concentrator (Amicon, Technology Corporation, Northborough, MA). Protein concentration of pool was determined by A_{280} using an extinction coefficient of 0.78

Cation Exchange Chromatography

[00126] Cation exchange chromatography is carried out on an SP Sepharose high performance column (Pharmacia XK 26/20, 70 ml bed volume) equilibrated in 10 mM sodium acetate pH 4.0 (Buffer B). The reaction mixture is diluted 10X with buffer B and loaded onto the column at a flow rate of 5 mL/min. Next the column is washed with 5 column volumes of buffer B, followed by 5 column volumes of 12% buffer C (10 mM acetate pH 4.5, 1 M NaCl). Subsequently, the PEG-hGH species are eluted from the column with a linear gradient of 12 to 27% buffer C in 20 column volumes. The eluant is monitored at 280 nm and 10 mL fractions were collected. Fractions are pooled according to extent of pegylation (mono, di, tri etc.), exchanged into 10 mM acetate pH 4.5 buffer and concentrated to 1-5 mg/mL in a stirred cell fitted with an Amicon YM10 membrane. Protein concentration of pool is determined by A_{280} nm using an extinction coefficient of 0.78.

Example 5

Biochemical Characterization

[00127] The purified pegylated hGH pools were characterized by non-reducing SDS-PAGE, non-denaturing Size Exclusion Chromatography, and peptide mapping.

Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography (SEC-HPLC)

Non-denaturing SEC-HPLC

[00128] The reaction of Methoxy-PEG of various attachment chemistries, sizes, linkers, and geometries with hGH, anion exchange purification pools and final purified products were assessed using non-denaturing SEC-HPLC. Analytical non-denaturing SEC-HPLC was carried out using a column, Superdex 200 7.8 mm X 30 cm, (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) in 20 mM Phosphate pH 7.2, 150 mM NaCl at a flow rate of 0.5 mL/minute (optionally Tosohaas G4000PWXL Amersham Bioscience, Piscataway, NJ). PEGylation greatly increases the hydrodynamic volume of the protein resulting in a shift to an earlier retention time. New species were observed in the PEG aldehyde hGH reaction mixtures along with unmodified hGH. These PEGylated and non-PEGylated species were separated on Q-Sepharose chromatography, and the resultant purified mono PEG-Aldehyde hGH species were subsequently shown to elute as a single peak on non-denaturing SEC (> 95% purity). The Q-Sepharose chromatography step effectively removed free PEG, hGH, and multi PEGylated hGH species from the mono-Pegylated hGH

Denaturing SEC-HPLC

[00129] The reaction of the butyrylaldehyde polyethylene glycols with hGH, anion exchange purification, and final purified products are assessed using denaturing SEC-HPLC. Analytical denaturing SEC-HPLC is carried out using a Tosohaas 3000SWXL column 7.8 mm X 30 cm (Tosohaas Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) in 100 mM Phosphate pH 6.8, 0.1% SDS at a flow rate of 0.8 mL/minute. PEGylation greatly increases the hydrodynamic volume of the protein resulting in a shift to an earlier retention time. PEGylated and non-PEGylated species are separated on Q-Sepharose chromatography

SDS PAGE/PVDF transfer

[00130] SDS-PAGE was used to assess the reaction PEG butyrylaldehyde with hGH and the purified final products. SDS-PAGE was carried out on 1 mm thick 10-20% Tris tricine gels (Invitrogen, Carlsbad, CA) under reducing and non-reducing conditions and stained using a Novex Colloidal Coomassie™ G-250 staining kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Bands are blotted onto PVDF membrane for subsequent N-terminal sequence identification.

Analytical anion exchange HPLC

[00131] The PEG butyrylaldehyde/hGH reaction mixture, anion exchange purification fractions, and final purified products were assessed using analytical anion exchange HPLC. Analytical anion exchange HPLC was carried out using a Tosohaas Q5PW or DEAE-PW anion exchange column, 7.5 mm x 75 mm (Tosohaas Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) in 50 mM Tris pH 8.6 at a flow rate of 1 mL/min. Samples were eluted with a linear gradient of 5-200 mM NaCl.

N-terminal Sequence and Peptide Mapping

[00132] Automated Edman degradation chemistry was used to determine the NH₂-terminal protein sequence. An Applied Biosystems Model 494 Procise sequencer (Perkin Elmer, Wellesley, MA) was employed for the degradation. The respective PTH-AA derivatives were identified by RP-HPLC analysis in an on-line fashion employing an Applied Biosystems Model 140C PTH analyzer fitted with a Perkin Elmer/Brownlee 2.1 mm i.d. PTH-C18 column.

[00133] Tryptic digest were performed at a concentration of 1 mg/mL and typically 50 ug of material is used per digest. Trypsin was added such that the trypsin to PEG-hGH ratio was 1:30 (w/w). Tris buffer was

present at 30 mM, pH 7.5. Samples were incubated at room temperature for 16 ± 0.5 hours. Reactions were quenched by the addition of 50 μ L of 1N HCl per mL of digestion solution. Samples were diluted, prior to placing the samples in the autosampler, to a final concentration of 0.25 mg/mL in 6.25 % acetonitrile. Acetonitrile was added first (to 19.8% acetonitrile), mixed gently, and then water is added to final volume (four times the starting volume). Extra digestion solution may be removed and stored for up to 1 week at -20°C .

[00134] A Waters Alliance 2695 HPLC system was used for analysis, but other systems should produce similar results. The column used was an Astec C-4 polymeric 25 cm x 4.6 mm column with 5 μ m particles. Experiments were conducted at ambient temperature on a typical load of 50 μ g of protein per sample. Buffer A is 0.1% trifluoroacetic acid in water; buffer B is 0.085% trifluoroacetic acid in acetonitrile. The gradient was as follows:

Time	A%	B%	C%	D%	Flow	Curve
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

[00135] The column is heated to 40°C using a heat jacket. Peaks were detected using a Waters 996 PDA detector collecting data between 210 and 300 nm. The extracted chromatogram at 214 nm was used for sample analysis.

[00136] Tryptic maps were performed for hGH, 40K branched PEG-aldehyde, and 40K branched butyrylaldehyde

(Figure 1). The N-terminal tryptic fragment was referred to as T-1. The percent T-1 present compared to unPEGylated hGH is shown in Table 2. This data suggest that 90% of the PEG modification is at the N-terminus with remainder apparently linked to one of several possible lysine residues using PEG-aldehyde compared to greater than 98% at the N-terminus using PEG-butyrylaldehyde.

TABLE 2

	% T-1 present	% T-1 present compared to unPEGylated hGH
hGH	28.0%	
PEG-aldehyde/hGH	2.6%	9.2%
PEG-butyrylaldehyde/hGH	0.3%	1.2%

Example 6

Pharmacodynamic Studies

Rat weight Gain

[00137] Female Sprague Dawley rats, hypophysectomized at Taconic Labs, were prescreened for growth rate for a period of 7 to 11 days. Rats were divided into groups of eight. Group 1 consisting of rats given either daily or day 0 and day 6 subcutaneous dose of vehicle. Group 2 were given daily subcutaneous dose of GH (30µg/rat/dose). Group 3 were given subcutaneous doses of GH on day 0 and day 6 (180µg/rat/dose). Group 4 were given subcutaneous doses of 40k branched PEG-butyrylaldehyde-hGH on day 0,6 (180µg/rat/dose). Hypophysectomized rats were monitored for weight gain by weighing at least every other day during the study. Figure 3 & 4.

Rat tibia length

[00138] Animals in 11 Day weight gain studies at day 11 were sacrificed, left tibias were removed and X-rayed and bone lengths were measured using a caliper. Figure 5

IGF-1 Studies

[00139] Animals from six-day weight gain studies were used. Blood samples were taken at the various times during the study and the serum IGF-1 levels determined by ELISA. Figure 6

Serum biochemistry studies

[00140] Animals in 11 Day weight gain studies were used to evaluate serum biochemistry values on Day 7 following cumulative administration of 1.8 mg/kg on Day 0 and 6 as shown in Table 3.

42

Table 3

Assay	Vehicle	hGH (11 days at 300 µg/kg/day)	PEG-hGH (1.8 mg/kg at Day 0 and 6)
ALB (g/dL)	4.07±0.04	4.06±0.05	4.18±0.03*†
ALP (U/L)	311±15	309±16	280±14
ALT (U/L)	53.6±2.4	51.1±2.2	51.3±2.6
AST (U/L)	149±7	131±4	137±11
BUN (mg/dL)	37.4±1.6	26.7±1.5*	27.9±0.6*
Ca ²⁺ (mg/dL)	10.9±0.1	11.5±0.1*	11.0±0.1†
Chol (mg/dL)	85.1±2.8	76.9±3.6*	115.3±2.8*†
CRE (mg/dL)	0.62±0.02	0.60±0.01	0.59±0.01
Glucose (mg/dL)	73.4±4.7	79.6±4.7	67.1±8.9
Phos (mg/dL)	8.26±0.28	9.59±0.16*	8.42±0.23†
TP (g/dL)	6.36±0.10	6.48±0.10	6.39±0.06
TBA (µmol/L)	10.0±0.5	7.6±0.4*	11.0±0.4†
SDH (U/L)	11.9±1.0	9.7±1.4	10.6±0.7
Triglycerides (mg/dL)	57.4±4.0	47.8±5.7	45.7±3.9*
LDH (U/L)	786±72	762±94	914±189
Na ⁺ (mmol/L)	147±0.5	146±0.8	145±0.6*
K ⁺ (mmol/L)	5.94±0.09	6.31±0.16*	6.71±0.17*†
Cl ⁻ (mmol/L)	103±0.5	102±0.5	102±0.6

* p < 0.10 vs Vehicle, † p < 0.05 vs hGH.

ALB, albumin; ALP, Alkaline Phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; Ca²⁺, calcium; Chol, cholesterol; CRE, creatinine; Phos, phosphate; TP, total protein; TBA, total bile acid; SDH, sorbitol dehydrogenase; LDH, lactic dehydrogenase; Na⁺, sodium; K⁺, potassium; Cl⁻, chlorine.

[00141] Blood urea nitrogen concentration at Day 11 decreased significantly (p < 0.10) by the same extent relative to the vehicle group in the hGH- and PHA-794428-treated animals. This is indicative of increased nitrogen utilization as a result of new protein synthesis during enhanced growth.

Pharmacokinetic Studies

[00142] Pharmacokinetic studies were conducted in normal, cannulated Sprague-Dawley male rats. Injections were made as a single subcutaneous bolus of 100µg/kg/rat GH or PEG-GH using six rats per group. Blood samples were taken over one to five days as appropriate for assessment of relevant PK parameters. GH and PEG-GH blood levels were monitored at each sampling using immuno-assay.

hGH Immunoassay

[00143] hGH and pegylated hGH protein concentration levels in mouse and cynomolgus monkey plasma were determined using the hGH AutoDELFIA kit fluorescence immunoassay (PerkinElmer). Rat and human IGF-1 levels were monitored by immunoassay kit (Diagnostic System Laboratories)

Non-compartmental Pharmacokinetic Properties for hGH-PEG conjugate of Example 1 in Non-human Primates.

[00144] The hGH-PEG conjugate of Example 1 was administered to cynomolgus monkeys as 0.18 mg/kg intravenous (iv) or subcutaneous (sc) bolus injections (Table 4). PK parameters were determined using mean data for n=3 animals. Plasma concentrations were measured using the AutoDELFIA kit fluorescence immunoassay (PerkinElmer) and a standard curve pre-determined for the PEG-GH conjugate.

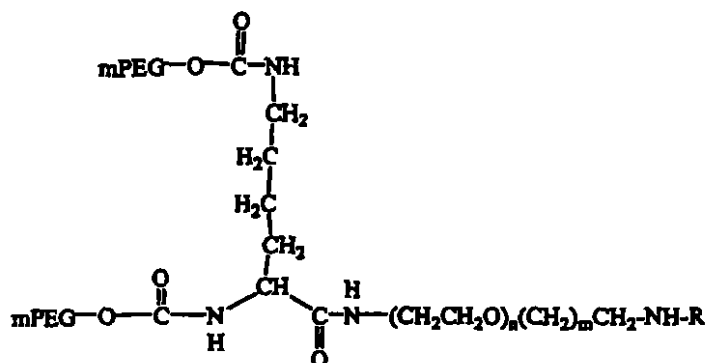
Table 4

Dose (mg/kg)	iv 0.18 / sc 0.18
CL, iv (ml/hr/kg)	0.8
V _{ss} (ml/kg)	28.0
T _{1/2} , iv (hr)	25.0
T _{1/2} , sc (hr)	61.2
SC AUC (µg/ml*hr)	195
SC Bioavailability (%)	84
T _{max} , sc (hr)	32

253
43

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for the prevention and/or
5 treatment of a disease or disorder in which use of
growth hormone is beneficial, comprising
administering to a patient in need thereof a
therapeutically effective amount of a poly(ethylene
glycol)-modified hGH having the structure of formula
10 I or II.



Formula I

or



Formula II

wherein

```
n is an integer between 1 and 10;
```

```
20      m is an integer between 1 and 10;
```

R is human growth hormone or methionyl growth hormone.

alone or in combination with another therapeutic agent, wherein said disease or disorder in which use of growth hormone is beneficial is selected from the group consisting of Erectile dysfunction, HIV lipodystrophy, Fibromyalgia, Osteoporosis, Memory disorders, Depression, Crohn's disease, Skeletal dysplasias, Traumatic brain injury, Subarachnoid haemorrhage, Noonan's syndrome, Down's syndrome,

Idiopathic short stature (ISS), End stage renal disease (ESRD), Very low birth weight (VLBW), Bone marrow stem cell rescue, Metabolic syndrome, Glucocorticoid myopathy, Short stature due to
5 glucocorticoid treatment in children, and Failure of growth catching for short premature children.

2. The method of claim 1, wherein said disease or disorder in which use of GH is beneficial is
10 selected from the group consisting of idiopathic short stature, very low birth weight, traumatic brain injury, metabolic syndrome, and Noonan's syndrome.

3. The method of either claim 1 or 2, wherein
15 n equals 4 and m equals 3.

4. The method of claim 3, wherein said poly(ethylene glycol)-modified hGH is having the structure of formula I with n equals 4 and m equals
20 3.

5 The method of claim 1, wherein said human growth hormone comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.
25

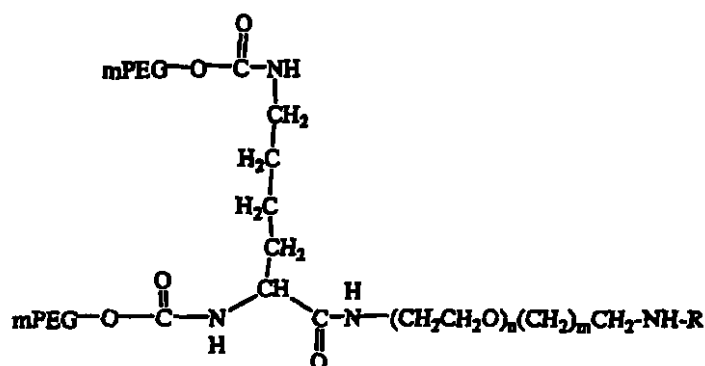
6. The method of claim 5, wherein greater than 90% of said polyethylene glycol is conjugated to an amino-terminal phenylalanine of the amino acid
sequence of SEQ ID NO:1.
30

7. The method of claim 6, wherein greater than 95% of said polyethylene glycol is conjugated to an amino-terminal phenylalanine of the amino acid
sequence of SEQ ID NO:1.
35

44

8. The method of claim 1, wherein each mPEG has a molecular weight of about 20 kDa.

9. A composition comprising a human growth hormone-PEG conjugate of formula I or II in combination with another therapeutic agent, and at least one pharmaceutically acceptable carrier.



Formula I

or



Formula II

wherein

n is an integer between 1 and 10;

m is an integer between 1 and 10;

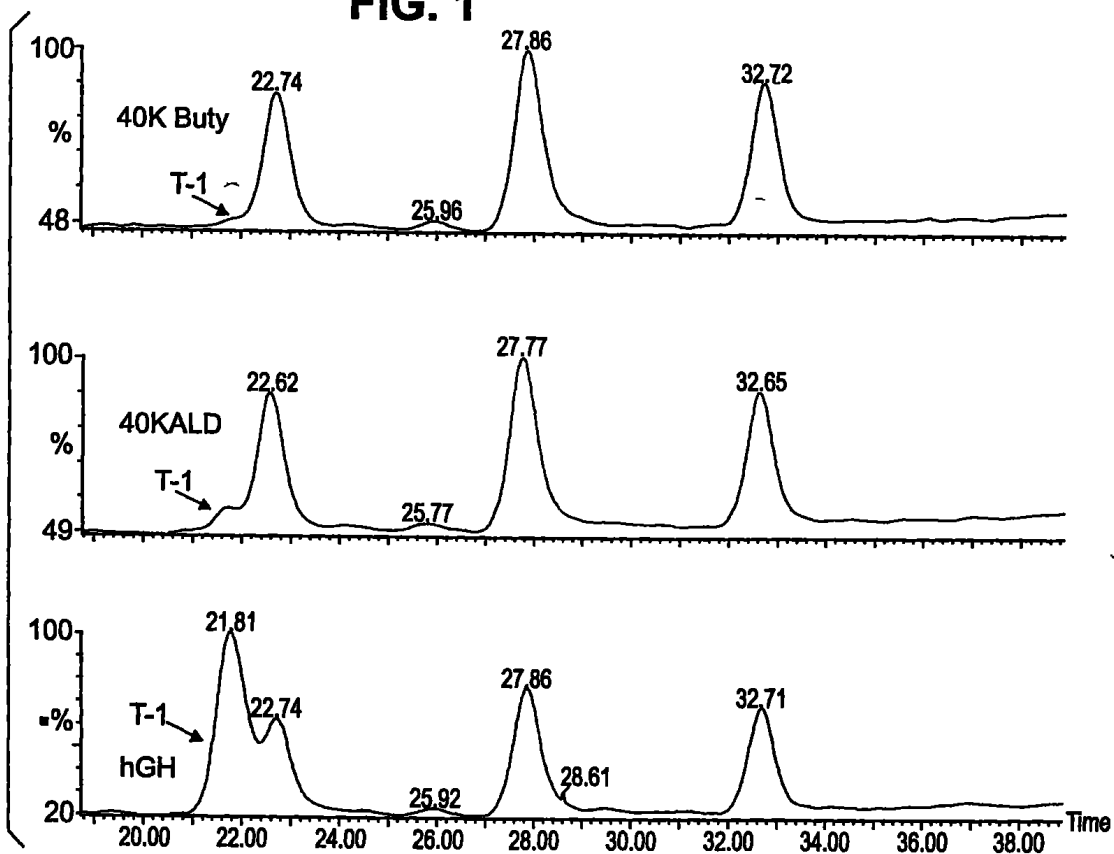
R is human growth hormone or methionyl growth hormone.

10. The composition of claim 9, wherein said poly(ethylene glycol)-modified hGH is having the structure of formula I with n equals 4 and m equals 3.

45

W/O 2005/079838

FIG. 1



1/6

PCT/IB2005/000171

45

2/6

FIG. 2

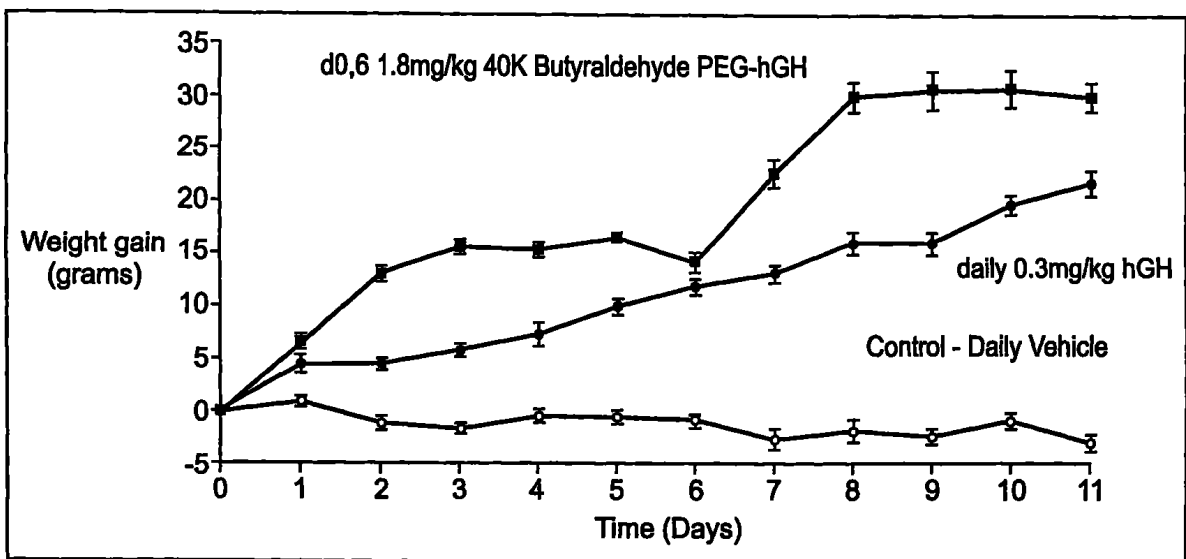
Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe	Asp	Asn	12
Ala	Met	Leu	Arg	Ala	His	Arg	Leu	His	Gln	Leu	Ala	24
Phe	Asp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Glu	Glu	Ala	Tyr	Ile	36
Pro	Lys	Glu	Gln	Lys	Tyr	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro	48
Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	60
Pro	Ser	Asn	Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	72
Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	84
Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Ser	Leu	Arg	Ser	Val	96
Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	108
Asn	Val	Tyr	Asp	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly	120
Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	132
Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Ile	Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser	144
Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp	Ala	Leu	156
Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	Lys	168
Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Val	180
Gln	Cys	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe		191

SEQ. ID NO.: 1

42

W/O 2005/079838

FIG. 3



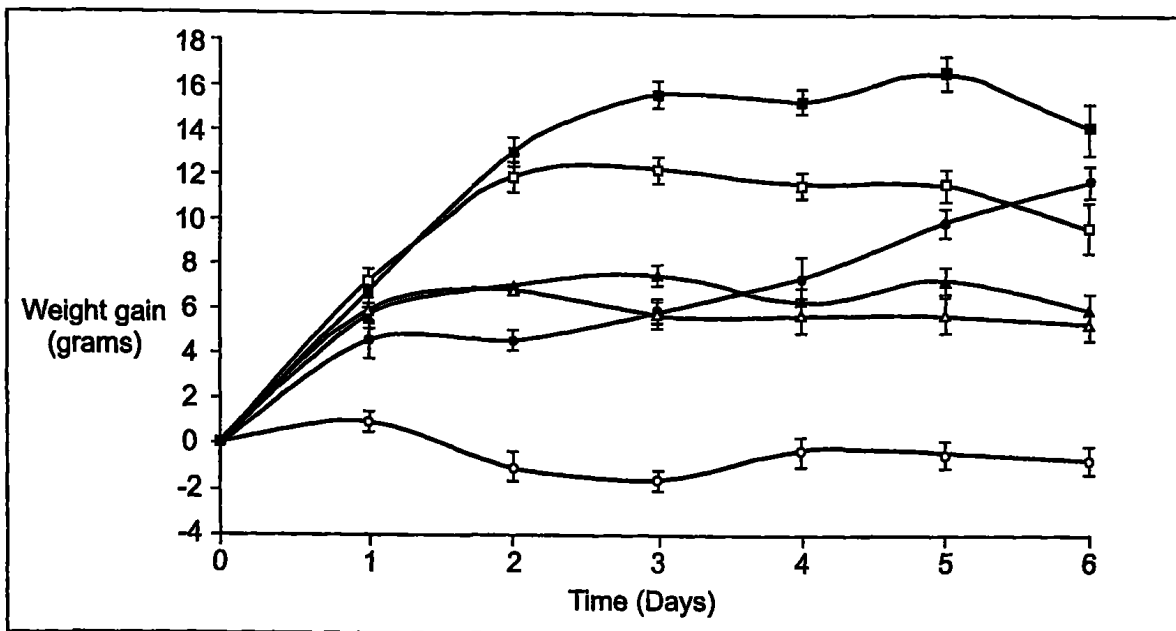
3/6

PCT/IB2005/000171

42

Handwritten signature

FIG. 4

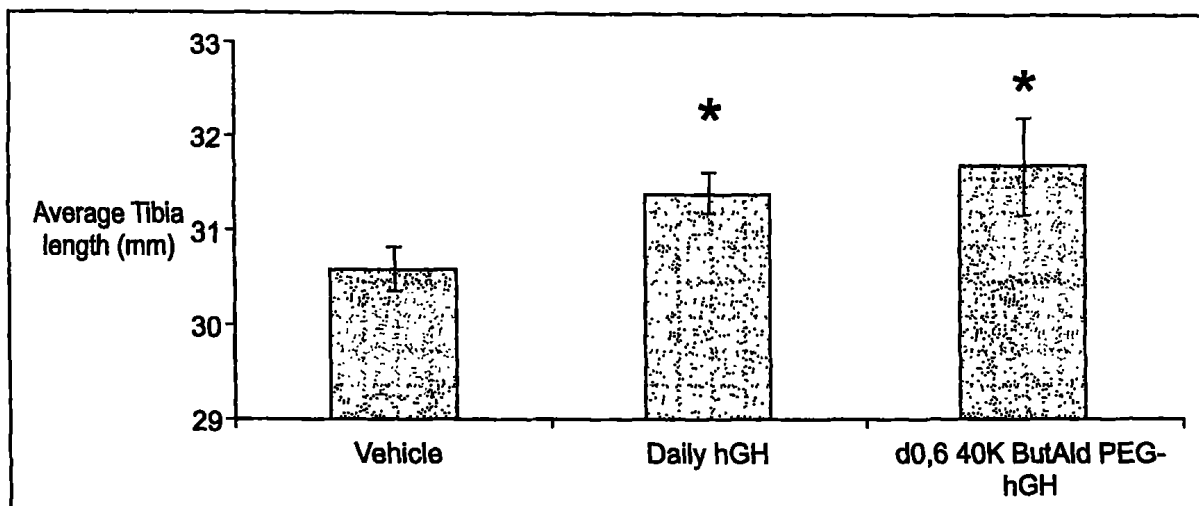


4/6

- | | |
|-----------------------|----------------------|
| ○ Control | ○ 0.6 mg/kg PEG hGH |
| ● hGH 300 ug/kg daily | ● 0.2 mg/kg PEG hGH |
| ■ 1.8 mg/kg PEG hGH | ▲ .067 mg/kg PEG hGH |

Handwritten signature

FIG. 5

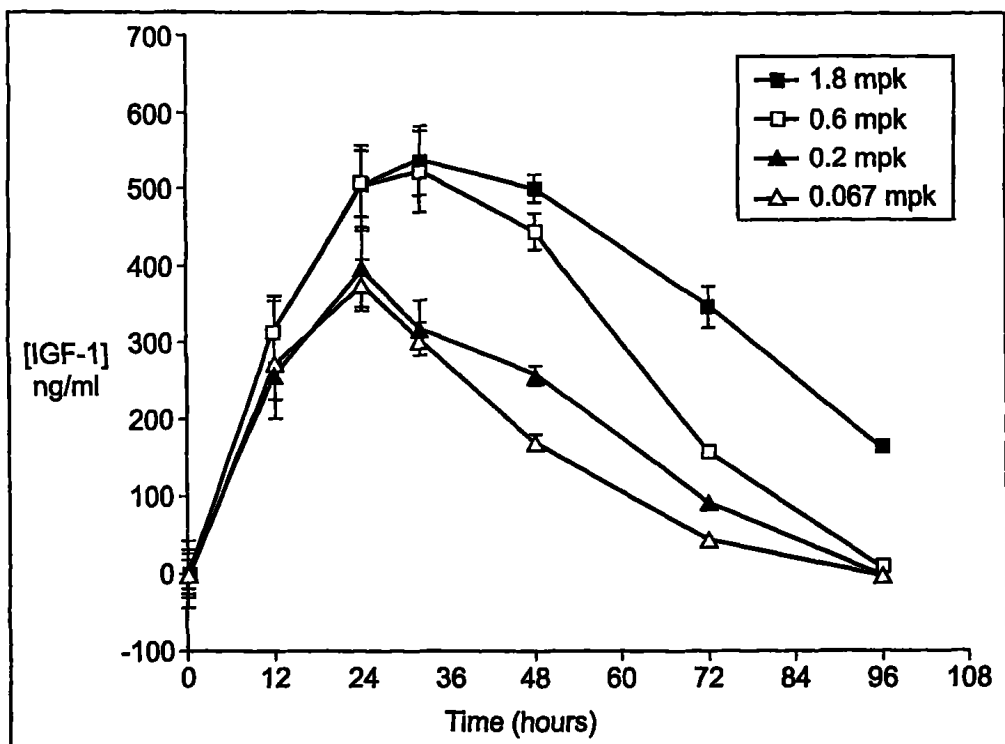


5/6

8

32

FIG. 6



SEQUENCE LISTING

<110> Pharmacia Corporation
Finn, Rory

<120> N-TERMINALLY MONOPEGYLATED HUMAN GROWTH HORMONE CONJUGATES,
PROCESS FOR THEIR PREPARATION, AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 32152A

<150> 10/771895

<151> 2004-02-04

<160> 1

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

he Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn 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 Asn Pro
35 40 45

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

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn 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 Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn 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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intr: Application No
PCT/IB2005/000171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/27

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/142870 A1 (FINN RORY F) 22 July 2004 (2004-07-22) the whole document	1-10
A	WO 03/044056 A (PHARMACIA CORPORATION; FINN, RORY, F; LAO, WEI; SIEGEL, NED, R; BOX R0) 30 May 2003 (2003-05-30) cited in the application the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 May 2005

Date of mailing of the international search report

20/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Engl, B

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de EE.UU. nº 10/771895, presentada el 4 de Febrero, 2004, que se incorpora como referencia en su totalidad como si se escribiera en la presente memoria.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a una modificación química, que incluye PEGilación, de la hormona del crecimiento humana (hGH) y sus variantes agonistas, mediante la cual se pueden cambiar las propiedades químicas y/o fisiológicas de la hGH. La hGH PEGilada puede tener un mayor tiempo de permanencia en el plasma, menor velocidad de aclaramiento, mejor estabilidad, menor antigenicidad, menor
10 heterogeneidad de PEGilación o una de sus combinaciones. La presente invención también se refiere a procedimientos para modificar la hGH. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la hGH modificada. Una realización adicional es el uso de la hGH modificada para el tratamiento de trastornos del crecimiento y desarrollo.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La hormona del crecimiento humana (hGH) es una proteína que comprende una sola cadena de 191 aminoácidos reticulada por dos puentes disulfuro, y la forma monómera tiene un peso molecular de 22 kDa. La GH humana es segregada por la glándula pituitaria, y también se puede producir por ingeniería genética recombinante.
20 La hGH producirá crecimiento en todos los tejidos corporales que pueden crecer. La hGH juega un papel importante, no sólo en la promoción del crecimiento en la fase de crecimiento de los seres humanos, sino también en el mantenimiento de la composición corporal, anabolismo, y metabolismo de lípidos normales (K. Barneis. and U. Keller, *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 10:337 (1996)).

25 La hGH recombinante ha estado disponible en el comercio durante varios años. En el mercado se encuentran dos tipos de preparaciones de hGH recombinante terapéuticamente útiles: la auténtica, p. ej. Genotropin® o Nutropin®, y un análogo con un resto de metionina adicional en el extremo N-terminal, p. ej. Somatonorm®. La hGH se usa para estimular el crecimiento lineal en paciente con enanismo hipofisario
30 denominado también deficiencia de la hormona del crecimiento (DHC) o síndrome de Turner, pero también se han sugerido otras indicaciones incluyendo el tratamiento a largo plazo del retraso de crecimiento en niños que nacieron pequeños para la edad gestacional, para el tratamiento de pacientes con síndrome de Prader-Willi (SPW), insuficiencia renal crónica (IRC), emaciación por SIDA, y envejecimiento. Los pacientes
35 con deficiencia de la GH en adultos (DHCa) tienen diferentes problemas, tales como

cambios característicos de la composición corporal incluyendo aumento de la masa de grasa, disminución de la masa magra corporal y fluido extracelular, y reducción de la densidad mineral ósea, anomalías metabólicas de los lípidos y disfunción cardiovascular. Muchos de estos problemas mejoran con la terapia de sustitución con hGH (J. Verhelst J and R., *Abs. Drugs.*; 62:2399 (2002)).

Un efecto biológico principal de la hormona del crecimiento (GH) es promover el crecimiento en mamíferos jóvenes y mantener los tejidos en los mamíferos mayores. Entre los sistemas de órganos afectados se incluyen el esqueleto, tejido conjuntivo, músculos, y vísceras tales como hígado, intestino, y riñones. Las hormonas del crecimiento ejercen su efecto por la interacción con receptores específicos en la membrana de la célula objetivo. La hGH es un miembro de la familia de hormonas homólogas que incluye lactógenos placentales, prolactinas, y otras variantes de especie o genéticas, u hormona del crecimiento (Nicoll, C. S., et al. (1986) *Endocrine Reviews* 7: 169). La hGH es poco común dentro de éstas, en cuanto que presenta una especificidad de especie amplia y se une al receptor somatogénico (Leung, D. W., et al. [1987] *Nature* 330; 537) o de prolactina clonados (Boutin, J. M., et al. [1988] *Cell*; 53: 69). El gen clonado para la hGH se ha expresado en una forma secretada en *Escherichia coli* (Chang, C. N., et al. [1987] *Gene* 55:189), y se han descrito su ADN y la secuencia de aminoácidos (Goeddel, et al. ([1979] *Nature* 281: 544; Gray, et al. [1985] *Gene* 39:247).

La hormona del crecimiento humana (hGH) participa en buena parte de la regulación del crecimiento y desarrollo humano normal. Esta hormona hipofisaria presenta una multitud de efectos biológicos incluyendo crecimiento lineal (somatogénesis), lactancia, activación de macrófagos, efectos de tipo insulina y diabetogénicos entre otros (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). La deficiencia de hormona del crecimiento en niños conduce al enanismo, el cual se ha tratado satisfactoriamente durante más de una década mediante administración exógena de hGH.

En adultos, así como en niños, la hGH mantiene una composición corporal normal aumentando la retención de nitrógeno y estimulación del crecimiento musculoesquelético, y movilizand la grasa corporal. El tejido adiposo visceral es particularmente sensible a la hGH. Además de potenciar la lipólisis, la hGH disminuye la captación de triglicéridos en los almacenes de grasa corporales. Las concentraciones de IGF-I (factor de crecimiento de tipo insulina I), y IGFBP3 (proteína

de unión al factor de crecimiento de tipo insulina 3) aumentan por la hGH.

La hormona del crecimiento humana (hGH) es un polipéptido de una sola cadena que consiste en 191 aminoácidos (peso molecular 21.500). Los enlaces disulfuro unen las posiciones 53 y 165, y las posiciones 182 y 189. Niall, *Nature, New Biology*, 230:90 (1971). La hGH es un potente agente anabólico, especialmente debido a la retención de nitrógeno, fósforo, potasio y calcio. El tratamiento de ratas hipofisectomizadas con GH puede restablecer al menos una parte de la tasa de crecimiento de las ratas. Moore et al., *Endocrinology* 122:2920-2926 (1988). Entre sus efectos más llamativos en los sujetos con hipopituitarismo (deficiencia de GH) está el crecimiento lineal acelerado del cartílago de la placa ósea, dando como resultado un aumento de la estatura. Kaplan, Growth Disorders in Children and Adolescents (Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1964).

La hGH produce una variedad de efectos fisiológicos y metabólicos en diferentes modelos animales incluyendo crecimiento óseo lineal, lactancia, activación de macrófagos, efectos de tipo insulina y diabetógenos, y otros (R. K. Chawla 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. Vanee, *J. Clin. Invest.* 82:745 (1988); J. P. Hughes and H. G. Friesen, *Ann. Rev. Physiol.* 47:469 (1985)). Se ha descrito que, especialmente en mujeres después de la menopausia, la secreción de GH disminuye con la edad. Millard et al., *Neurobiol. Aging*, 11:229-235 (1990); Takahashi et al., *Neuroendocrinology* M, L6-137-142 (1987). Véase también, Rudman et al., *J. Clin. Invest.*, 67:1361-1369 (1981) y Blackman, *Endocrinology and Aging*, 16:981 (1987). Además, según un estudio algunas manifestaciones del envejecimiento, incluyendo la disminución de masa magra del cuerpo, expansión de la masa de tejido adiposo, y el adelgazamiento de la piel, se pueden reducir con tratamiento con GH tres veces por semana. Véase, por ejemplo, Rudman et al., *N. Eng. J. Med.*, 323:1-6 (1990) y el artículo adjunto en la misma revista de Dr. Vanee (pp. 52-54). Estos efectos biológicos derivan de la interacción entre la hGH y receptores celulares específicos. Se han clonado dos receptores humanos diferentes, el receptor hepático de la hGH (D. W. Leung et al., *Nature* 330:537(1987)) y el receptor humano de la prolactina (J. M. Boutin et al., *Mol. Endocrinology*. 3:1455 (1989)). Sin embargo, es probable que haya otros incluyendo el receptor de lactógeno placentar humano (M. Freemark, M. Comer, G. Komer, and S. Handwerger, *Endocrinol.* 120:1865 (1987)). Estos receptores homólogos contienen un dominio extracelular glicosilado de unión a la hormona, un solo dominio transmembrana, y un dominio

citoplasmático, que difieren considerablemente en secuencia y tamaño. Se supone que uno o más receptores juegan un papel determinante en la respuesta fisiológica a la hGH.

5 En general se observa que las proteínas fisiológicamente activas administradas en un cuerpo pueden mostrar su actividad farmacológica sólo durante un periodo de tiempo corto debido a su alta tasa de aclaramiento en el cuerpo. Además, la hidrofobicidad relativa de estas proteínas puede limitar su estabilidad y/o solubilidad.

10 Con el propósito de disminuir la tasa de aclaramiento, mejorar la estabilidad o suprimir la antigenicidad de las proteínas terapéuticas, se han propuesto algunos métodos en los que las proteínas son modificadas químicamente con polímeros solubles en agua. La modificación química de este tipo puede bloquear eficazmente el contacto físico de una enzima proteolítica con la propia cadena principal de la proteína, evitando así la degradación. La unión química de algunos polímeros solubles en agua puede reducir eficazmente el aclaramiento renal debido al mayor volumen
15 hidrodinámico de la molécula. Entre las ventajas adicionales se incluyen, en algunas circunstancias, aumento de la estabilidad y tiempo en la circulación de la proteína terapéutica, aumento de la solubilidad, y disminución de la inmunogenicidad. El poli(óxido de alquileo), particularmente el polietilenglicol (PEG), es uno de dichos restos químicos que se puede usar para preparar productos proteínicos terapéuticos
20 (el verbo "pegilar" significa unir al menos una molécula de PEG). Se ha mostrado que la unión del polietilenglicol protege frente a la proteólisis, Sada, et al., *J. Fermentation Bioengineering* 71: 137-139 (1991), y se encuentran disponibles métodos para unir algunos restos de polietilenglicol. Véase la patente de EE.UU. nº 4.179.337, Davis et al., "Non-Immunogenic Polypeptides," presentado el 18 de Diciembre, 1979; y patente de EE.UU. nº 4.002.531, Royer, "Modifying Enzymes with Polyethylene Glycol and Product Produced Thereby," presentada el 11 de Enero, 1977. Para una revisión, véase Abuchowski et al., en Enzymes as Drugs. (J. S. Holcerberg and J. Roberts, eds. pp. 367-383 (1981)).

30 Se han usado otros polímeros solubles en agua, tales como copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli(1,3-dioxolano), poli(1,3,6-trioxano), copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios).

Se han descrito una serie de ejemplos de proteínas pegiladas terapéuticas. ADAGEN®, una formulación pegilada de la adenosina-desaminasa, está aprobada para
35 tratar la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave OCASPAR®, una L-

asparaginasa pegilada ha sido aprobada para tratar todos los paciente con hipersensibilidad. La superóxido-dismutasa pegilada se ha usado en ensayos clínicos para tratar lesiones en la cabeza. El α -interferón pegilado (documentos de EE.UU. 5.738.846, 5.382.657) ha sido aprobado para tratar la hepatitis; se describe que la glucocerebrosidasas pegilada y hemoglobina pegilada se han usado en ensayos preclínicos. Otro ejemplo, es la IL-6 pegilada, documento EF 0442724, titulado, "Modified hIL-6," que describe la adición de moléculas de polietilenglicol a la IL-6.

Otra proteína terapéutica específica, que ha sido modificada químicamente, es el factor estimulante de colonia de granulocitos, (G-CSF). La G-CSF induce la proliferación y liberación rápida de granulocitos neutrófilos al torrente sanguíneo, y así proporciona el efecto terapéutico de lucha contra la infección. La publicación de patente Europea EP 0401384, publicada el 12 de Diciembre, 1990, titulada, "Chemically Modified Granulocyte Colony Stimulating Factor," describe materiales y métodos para preparar la G-CSF a la que se unen moléculas de polietilenglicol. También se describen G-CSF modificados y sus análogos en el documento EP 0473268, publicado el 4 de Marzo, 1992, titulado "Continuous Release Pharmaceutical Compositions Comprising a Polypeptide Covalently Conjugated To A Water Soluble Polymer", que describen el uso de diferentes G-CSF y derivados conjugados covalentemente a un polímero soluble en agua, tal como el polietilenglicol. Se describe un polipéptido modificado que tiene actividad de factor estimulante de colonia de granulocitos humano en el documento EP 0335423 publicado el 4 de Octubre, 1989. En el documento de EE.UU. 5.824.784 se describen métodos para modificar proteínas en el extremo N o sus análogos, y composiciones resultantes, incluyendo composiciones de G-CSF químicamente modificadas en el extremo N. El documento de EE.UU. 5.824.778 describe G-CSF químicamente modificado.

Para el polietilenglicol, se ha usado una variedad de medios para unir moléculas de polietilenglicol a la proteína. En general, se conectan moléculas de polietilenglicol a la proteína por un grupo reactivo de la molécula.

Para dicha unión son convenientes grupos amino, tales como los de los restos lisina o del extremo N. Por ejemplo, Royer (Patente de EE.UU. nº 4.002.531, véase antes) describe que se usó la alquilación reductora para unir moléculas de polietilenglicol a una enzima. Chamow et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 133-140 (1994) describen la modificación de la inmunoadhesina CD4 con monometoxipolietilenglicol-aldehído por alquilación reductora. Los autores describen que con MePEG se modificaban el 50% de las CD4-Ig en condiciones que permitían el control en el grado

de pegilación. Véase antes en la página 137. Los autores también describen que la capacidad de unión in vitro de esta CD4-Ig modificada (a la proteína gp 120) disminuye en una tasa que se correlaciona con el grado de MePEGilación. Ibíd. La patente de EE.UU. nº 4.904.584, Shaw, presentada el 27 de Febrero, 1990, se refiere a la modificación del número de restos de lisina en proteínas, para la unión de moléculas de polietilenglicol por grupos amino reactivos.

El documento WO 93/00109 se refiere a un método para estimular un tejido sensible a la GH mamífero o aviar, que comprende mantener una concentración de GH en el plasma eficaz y continua durante un periodo de 3 o más días. Se describe que un modo de lograr dicha concentración en el plasma es mediante el uso de la GH acoplada a una sustancia macromolecular tal como el PEG (polietilenglicol). Se describe que el acoplamiento a una sustancia macromolecular da como resultado una mejor semivida. Se ha descrito la hormona del crecimiento humana PEGilada en el documento WO 93/00109 usando mPEG-aldehído-5000 y mPEG-(éster de N-hidroxisuccinimidilo) (mPEG-NHS-5000). El uso de mPEG-NHS dio como resultado mezclas heterogéneas de múltiples formas de hGH pegilados. El documento WO 93/00109 también describe el uso de mPEG-maleimida para Pegilar variantes de hGH con cisteína.

El documento 99/03887 describe una variante con cisteína de la hormona del crecimiento que es PEGilada. Denominada BT-005, se supone que este conjugado es más eficaz para estimular la ganancia de peso en las ratas con deficiencia en hormona del crecimiento, y que tienen una semivida más larga que la hGH.

Clark et al., también han descrito la hormona del crecimiento humana PEGilada usando éster de succinimidilo de PEG carboximetilado (*Journal of Biological Chemistry* 271:21969-21977, 1996). Clark et al. describen derivados de hGH de tamaños crecientes usando mPEG-NHS-5000, que se conjuga selectivamente con aminas primarias. Los niveles crecientes de modificación con PEG reducían la afinidad por su receptor y aumentaban la CE_{50} en un ensayo basado en células hasta 1500 veces. Olson et al., *Polymer Preprints* 38:568-569, 1997, describen el uso de N-hidroxisuccinimida (NHS)-PEG y propionato de succinimidilo (SPA)PEG para lograr especies de hGH PEGiladas.

El documento WO 94/20069 describe proféticamente hGH PEGilada como parte de una formulación para suministro pulmonar.

El documento US 4.179.337 describe métodos de PEGilación de enzimas y hormonas para obtener conjugados de polipéptido solubles en agua, no inmunógenos

y fisiológicamente activos. Se menciona la GH como un ejemplo de una hormona para PEGilar.

El documento EP 458064 A2 describe la PEGilación de restos de cisteína naturales o que se han introducido en la somatotropina. El documento EP 458064 A2
5 además menciona la incorporación de dos restos de cisteína en un bucle denominado bucle omega, que se describe que está situado en los restos 102-112 en la somatotropina bovina salvaje, más específicamente el documento EP 458064 A2 describe la sustitución de los restos 102 a 112 de la somatotropina bovina de la Ser a Cys y de Tyr a Cys respectivamente.

10 El documento 95/11987 sugiere la unión de PEG en el grupo tio de un resto de cisteína que está presente en la molécula pariente o se introduce por mutagénesis dirigida. El documento WO 95/11987 se refiere a la PEGilación de la proteasa nexin-1, sin embargo también se sugiere la PEGilación en general de hGH y otras proteínas.

15 El documento WO 99/03887 describe, por ejemplo, la hormona del crecimiento modificada por inserción de restos de serina 25 cys y la unión de PEG a los restos de cisteína introducidos.

El documento WO 00/42175 se refiere a un método para preparar proteínas que contienen restos de cisteína libres para la unión de PEG. El documento WO 00/42175 describe las siguientes mutaciones de la hGH: I3C, S144C y T148C y su
20 PEGilación en la cisteína.

El documento WO 97/11178 (así como US 5.849.535, US 6.004.931, y US 6.022.711) se refiere al uso de variantes de GH como agonistas o antagonistas de la hGH. El documento WO 97/11178 también describe PEGilación de la hGH, incluyendo PEGilación de lisina y la introducción o sustitución de lisina (por ejemplo, K168A,
25 K172R). El documento WO 97/11178 también describe la sustitución G120K.

El documento WO 03/044056 describe una variedad de especies de hGH pegiladas incluyendo un conjugado de PEG(ramificado 40K)-aldehído y hGH.

Las descripciones previas de hGH PEGilada requieren la unión de múltiples PEG, lo cual da como resultado una heterogeneidad del producto indeseable, para
30 lograr un volumen hidrodinámico mayor que el corte de exclusión de peso molecular 70K de la filtración renal (Knauf, M.J. et al, *J. Biol. Chem.* 263:15064-15070, 1988).

Actualmente, la administración de rhGH es diaria durante un periodo de tiempo largo, y por lo tanto sería un conveniente una administración menos frecuente. Una molécula de hGH con una semivida más larga en la circulación disminuiría el número
35 de administraciones necesarias y potencialmente proporcionaría niveles de hGH

terapéuticos óptimos con el efecto terapéutico potenciado simultáneo.

A pesar de una serie de intentos para PEGilar la hGH, sigue siendo necesario una molécula de hGH PEGilada con las propiedades adecuadas para que sea un producto comercial viable. La presente invención proporciona conjugados PEG-hGH que tienen un solo PEG unido predominantemente en la fenilalanina N-terminal de la hGH, que proporciona ventajas frente a otros conjugados de PEG-hGH. Se ha descrito la unión de múltiples PEG de bajo peso molecular (5 kd) en los sitios α - o ϵ -amino (extremo N y nueve lisinas en la hGH) usando mPEG-aldehído-5000 o mPEG-(éster de N-hidroxisuccinimido) (mPEG-NHS-5000) en el documento WO 93/00109, Clark et al. (10 *Journal of Biological Chemistry* 271:21969-21977, 1996), y Olson et al. (*Polymer Preprints* 38:568-569, 1997). Esto da como resultado una población heterogénea. Como ilustración una hGH con nueve lisinas puede tener algunas moléculas que tengan diez PEG unidas, algunas con nueve, algunas con ocho, algunas con siete, algunas con seis, algunas con cinco, algunas con cuatro, algunas con tres, algunas con dos, algunas con una y algunas sin ninguna. Y entre las moléculas que tienen varios PEG, el PEG puede no estar unido en los mismos sitios en las diferentes moléculas. Esta heterogeneidad resultante es desventajosa cuando se desarrolla un producto terapéutico, haciendo que la conjugación, purificación y caracterización sean difíciles, costosas y altamente irreproducibles. Otro método ha sido (documento WO 20 00/42175) el uso de variantes de hGH que contienen restos de cisteína libres para la unión del PEG. Sin embargo, esta estrategia puede conducir al doblamiento incorrecto de la proteína con enlaces disulfuro incorrectamente emparejados y dar como resultado un producto PEGilado heterogéneo que tiene los PEG unidos a algunas o todas las cisteínas. Tener múltiples PEG unidos a múltiples sitios puede conducir a 25 moléculas que tienen menos enlaces estables entre el PEG y los diferentes sitios, que se pueden disociar a diferentes velocidades. Esto hace difícil predecir exactamente las farmacocinéticas del producto dando como resultado la dosificación incorrecta. Un producto heterogéneo también plantea problemas no deseado para obtener la aprobación reguladora para el producto terapéutico.

30 Por lo tanto, sería conveniente tener una molécula hGH PEGilada que tiene un solo PEG unido en un solo sitio. La presente invención aborda esta necesidad en una serie de formas.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la hGH químicamente modificada y sus 35 variantes agonistas, que tienen al menos una propiedad química o fisiológica mejorada

seleccionada, pero no limitada, de menor velocidad de aclaramiento, mayor duración del tiempo de permanencia en el plasma, mayor estabilidad, mayor solubilidad, y menor antigenicidad. Por lo tanto, como se describe a continuación con más detalle, la presente invención tiene una serie de aspectos que se refieren a modificar químicamente polipéptidos, incluyendo pero sin limitar, la hGH y sus variantes agonistas, así como modificaciones específicas usando un resto de polietilenglicol-butiraldehído.

La presente invención también se refiere a métodos para producir la hGH químicamente modificada y sus variantes agonistas. Particularmente, la presente invención se refiere a un método para producir una hGH químicamente modificada usando butiraldehído, que da como resultado una mayor selectividad N-terminal de la unión.

La presente invención también se refiere al uso de la hGH químicamente modificada y su variante agonista de la presente invención, sola o combinada con otro agente terapéutico.

La presente invención también se refiere al uso de la hGH químicamente modificada y su variante agonista de la presente invención, sola o combinada con otro agente terapéutico para prevenir y/o tratar trastornos y/o enfermedades en las es útil el tratamiento con la GH.

20 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 es un HPLC que traza un análisis de mapa trípico de la reacción de la hGH y la PEG(ramificado 40K)butiraldehído-hGH o la PEG(ramificada 40K)aldehído-hGH. El panel superior es el mapa trípico de la PEG(ramificado 40K)butiraldehído-hGH. El panel medio es el mapa trípico de la PEG(ramificado 40K)aldehído-hGH. El panel inferior es el mapa trípico de la hGH sin PEGilar. T1 es el fragmento trípico N-terminal.

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento humana. (ID SEC Nº:1).

La Figura 3 muestra la eficacia de la PEG(ramificado 40K)butiraldehído-hGH en el ensayo de ganancia de peso en ratas. Se compraron ratas hembra Sprague-Dawley hipofisectomizadas de 4-5 semanas de edad (100-125 g) de Harlan Labs. Después de introducirlos en las instalaciones de los animales, los animales se mantuvieron a una temperatura ambiente constante de 26,7°C y se pesaron diariamente durante 4-10 días con el

fin de establecer las tasas de crecimiento iniciales. Empezando el día 0, las ratas (~100 g) de los grupos testigos recibieron una inyección subcutánea diaria de ~0,3 mg/kg de hGH (círculos negros), o PBS (círculos blancos), durante once días consecutivos. El grupo de ensayo de PEG(ramificado 40K)butiraldehído-hGH (cuadrados negros) recibieron dosis únicas de 1,8 mg/kg de PHA-794428 los días 0 y 6. Había 8-10 animales por grupo. Se representa gráficamente el crecimiento medio +/- ETM.

La Figura 4 muestra los efectos de promoción del crecimiento sensible a la dosis de la PEG(ramificado 40K)butiraldehído-hGH en ratas. Este estudio de eficacia se llevó a cabo de una forma similar al descrito en la Figura 3, excepto que se administró una sola dosis variada de la PEG(ramificado 40K)butiraldehído-hGH (día 0, sólo) y el estudio se llevó a cabo durante 6 días. Los grupos testigo recibieron inyecciones diarias de hGH 0,3 mg/kg (círculos negros), o vehículo PBS (círculos blancos) durante seis días consecutivos. La PEG(ramificado 40K)butiraldehído-hGH se administró con una dosis de 1,8 mg/kg (cuadrados negros), 0,6 mg/kg (cuadrados blancos), 0,2 mg/kg (triángulos negros) o 0,067 mg/kg (triángulos blancos). Había 8 animales por grupo.

La Figura 5 muestra el crecimiento de la tibia como respuesta a la PEG(ramificado 40K)butiraldehído-hGH. Ratas hipofisectomizadas se trataron como se ha descrito en la Figura 3. El día 11 los animales se sacrificaron, se sacaron las tibias izquierdas y se realizó un análisis por rayos X y se midieron las longitudes de los huesos usando un calibre. Se representa gráficamente la longitud media +/- ETM. Los asteriscos indican diferencias significativas con el grupo testigo ($p < 0,05$).

La Figura 6 muestra los niveles de IGF-1 en el plasma durante el estudio de eficacia de 6 días. Los animales se trataron como se describe en la Figura 4. Se tomaron muestras de sangre en diferentes momentos de tiempo, y se determinaron los niveles de IGF-1 en el suero por ELISA. Se representan gráficamente las medias +/- ETM.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La hGH y sus variantes agonistas son miembros de una familia de proteínas recombinantes, descritas en el documento US 4.658.021 (metionil-hormona del crecimiento humana - Met-1-191-hGH) y documento US 5.633.352. Su producción

recombinante y métodos de uso se detallan en los documentos US 4.342.832. 4.601.980; US 4.898.830; US 5.424.199; y US 5.795.745.

Se puede usar cualquier hGH purificada y aislada o su variante agonista, que sea producida por células hospedantes tales como E. Coli y células animales transformadas o transfectadas usando técnicas genéticas recombinantes. Se describen variantes de hGH adicionales en los documentos US 6.143.523 y WO 92/09690 publicado el 11 de Junio, 1992. Entre ellos, es particularmente preferida la hGH o su variante agonista que es producida por E. coli transformada. Dicho hGH o su variante agonista se pueden obtener en grandes cantidades con alta pureza y homogeneidad. Por ejemplo, la hGH o su variante agonista anteriores, se pueden preparar de acuerdo con un método descrito en los documentos US 4.342.832, 4.601.980; US 4.898.830; US 5.424.199; y US 5.795.745. La expresión "tiene sustancialmente la siguiente secuencia de aminoácidos" significa que la secuencia de aminoácidos anterior puede incluir uno o más cambios de aminoácidos (eliminación, adición, inserción o sustitución) con la condición de que dichos cambios no produzcan ninguna desventaja de no similitud en la función de la hGH o su variante agonista. Es más preferible usar la hGH o su variante agonista que tienen sustancialmente una secuencia de aminoácidos, en la que se ha incluido al menos una lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, restos de cisteína desapareado, un grupo α -amino N-terminal libre o un grupo carboxilo C-terminal libre.

La expresión "polipéptido de hGH o proteína de hGH", cuando se usa en esta memoria, abarca todos los polipéptidos de hGH, preferiblemente de especie mamífero, más preferiblemente de ser humano y especie murina, así como sus variantes, análogos, ortólogos, homólogos, y derivados, y sus fragmentos, que se caracterizan por promover el crecimiento en la fase de crecimiento y mantener la composición corporal, anabolismo y metabolismo de lípidos normales. Preferiblemente, la expresión "polipéptido o proteína de hGH" se refiere al polipéptido de hGH del ID SEC N°: 1, así como a sus variantes, homólogos y derivados que presentan esencialmente la misma actividad biológica (promoción del crecimiento en la fase de crecimiento y mantenimiento de la composición corporal, anabolismo y metabolismo de lípidos normales). Más preferiblemente, la expresión "polipéptido o proteína de hGH" se refiere al polipéptido del ID SEC N°: 1.

La expresión "variantes del polipéptido de hGH", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a polipéptidos de la misma especie pero que se diferencian de un polipéptido de hGH de referencia. En general, las diferencias están limitadas, de forma

que las secuencias de aminoácidos del polipéptido de referencia y la variante son muy similares en conjunto, y en muchas regiones son idénticos. Preferiblemente, los polipéptidos de hGH son al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticos a un polipéptido de hGH de referencia, preferiblemente el polipéptido de hGH del ID SEC N°: 1. Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es, al menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos dada, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objetivo sea idéntica a la secuencia dada, excepto que la secuencia polipeptídica objetivo puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos dada. Estas alteraciones de la secuencia de referencia se pueden producir en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier otra parte entre esas posiciones terminales, intercalados individualmente entre restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia. La secuencia dada puede ser una secuencia entera de aminoácidos de la secuencia de referencia o cualquier fragmento especificado como se describe en la presente memoria.

Dichas variantes del polipéptido de hGH pueden ser variantes naturales, tales como las variantes alélicas naturales codificadas por una o varias formas alternativas de una hGH, que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo, o isoformas codificadas por variantes de ajuste naturales que se originan de un solo transcrito primario. Alternativamente, una variante del polipéptido de hGH puede ser una variante que se sabe que es natural, y que se puede hacer usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica.

En la técnica se sabe que se pueden eliminar uno o más aminoácidos del extremo N o extremo C de un péptido o proteína bioactivos sin pérdida sustancial de la función biológica (véase, por ejemplo, Ron et al., (1993), *Biol. Chem.*, 268 2984-2988; cuya descripción se incorpora por la presente en su totalidad como referencia).

Un experto en la técnica también reconocerá que algunas secuencias de aminoácidos de polipéptidos de hGH se pueden variar sin efecto significativo de la estructura o función de la proteína. Dichas mutaciones incluyen eliminaciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas de acuerdo con reglas generales conocidas en la técnica, de forma que tengan un efecto pequeño en la actividad. Por ejemplo, Bowie et al. (1990), *Science* 247:1306-1310, incorporada por la presente en su totalidad como referencia, proporcionan orientación en relación a como hacer sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas, y los autores

indican que hay dos métodos principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio.

El primer método se basa en el proceso de la evolución, en el que las mutaciones son aceptadas o rechazadas por selección natural. El segundo método usa ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de una hGH clonada y selecciones o cribados para identificar secuencias que mantienen la funcionalidad. Estos estudios han puesto de manifiesto que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones de aminoácidos. Los autores indican además, que cambios de aminoácidos es probable que estén permitidos en una posición determinada de la proteína. Por ejemplo, los restos de aminoácidos más enterrados requieren cadenas laterales no polares, siendo así que en general se conservan pocas características de cadenas laterales de superficie. Otras sustituciones fenotípicamente silenciosas son descntas por Bowie et al., (1990) véase antes, y las referencias citadas en éste.

Típicamente se consideran sustituciones conservadoras las sustituciones, de un aminoácido por otro, entre los aminoácidos alifáticos, Ala, Val, Leu y Phe; intercambio de los restos hidroxílicos Ser y Thr, intercambio de los restos ácidos Asp y Glu, sustitución entre los restos amídicos Asn y Gln, intercambio de los restos básicos Lys y Arg, y sustituciones entre los restos aromáticos Phe y Tyr. Además, los siguientes grupos de aminoácidos en general representan cambios equivalentes: (1) Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr; (2) Cys, Ser, Tyr, Thr; (3) Val, He, Leu, Met, Ala, Phe; (4) Lys, Arg, His; (5) Phe, Tyr, Trp, His.

La expresión polipéptido de hGH también abarca todos los polipéptidos de hGH codificados por análogos, ortólogos y/o especies homólogas de la hGH. Tal como se usa en esta memoria, la expresión "análogos de la hGH" se refiere a hGH de organismos diferentes y no relacionados que llevan a cabo las mismas funciones en cada organismo, pero que no provienen de una estructura ancestral que los ancestros de los organismos tenían en común. En su lugar, las hGH análogas surgen por separado y más tarde evolucionan para realizar la misma función (o funciones similares). En otras palabras, los polipéptidos de hGH análogas son polipéptidos con secuencias de aminoácidos bastante diferentes pero que realizan la misma actividad biológica, particularmente promover el crecimiento en la fase de crecimiento y mantener la composición corporal, anabolismo y metabolismo de lípidos normales. Tal como se usa en esta memoria, la expresión "ortólogos de la hGH" se refiere a hGH de dos especies diferentes, cuyas secuencias están relacionadas entre sí por una hGH

homóloga en una especie ancestral, pero que han evolucionado para hacerse diferentes entre sí. Tal como se usa en esta memoria, la expresión "homólogos de la hGH" se refiere a hGH de diferentes organismos que realizan la misma función en cada organismo, y que provienen de una estructura ancestral que los ancestros de los organismos tenían en común. En otras palabras, los polipéptidos de hGH homólogos son polipéptidos con secuencias de aminoácidos bastante similares que realizan la misma actividad biológica, particularmente promover el crecimiento en la fase de crecimiento y mantener la composición corporal, anabolismo y metabolismo de lípidos normales. Preferiblemente, los polipéptidos de hGH homólogos se pueden definir como polipéptidos que son al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticos respecto a un polipéptido de hGH de referencia, preferiblemente el polipéptido de hGH del ID SEC N°: 1.

Por lo tanto, un polipéptido de hGH de acuerdo con la invención, puede ser, por ejemplo: (i) uno en el que uno o más de los restos de aminoácidos se sustituyan por un resto de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un resto de aminoácido conservado) y dicho resto de aminoácido sustituido puede ser o no codificado por el código genético; o (ii) uno en el que uno o más de los restos de aminoácido incluyan un grupo sustituyente; o (iii) uno en el que el polipéptido de hGH se fusione con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol); o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales se fusionen a la forma anterior del polipéptido, tal como un péptido de la región de fusión Fc de IgG o secuencia líder o secretora o una secuencia que se use para purificar la forma anterior del polipéptido o una secuencia de proproteína.

Los polipéptidos de hGH pueden ser monómeros o multímeros. Los multímeros pueden ser dímeros, trímeros, tetrámeros o multímeros que comprenden al menos cinco unidades de polipéptido monómero. Los multímeros también pueden ser homodímeros o heterodímeros. Los multímeros de la invención pueden ser el resultado de asociaciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes y/o se pueden unir indirectamente, por ejemplo, por formación de liposomas. En un ejemplo, las asociaciones covalentes son entre las secuencias heterólogas contenidas en una proteína de fusión que contiene un polipéptido de hGH o su fragmento (véase por ejemplo, la patente de EE.UU. número 5.478.925, cuya descripción se incorpora por la presente en su totalidad como referencia). En otro ejemplo, un polipéptido de hGH o su fragmento se une a uno o más polipéptidos que pueden ser polipéptidos de hGH o polipéptidos heterólogos, por conectores peptídicos tales como los descritos en la

patente de EE.UU. nº 5.073.627 (incorporada por la presente como referencia). Otro método para preparar polipéptidos de hGH multímeros implica el uso de polipéptidos de hGH fusionados a una secuencia de polipéptido cremallera de leucina o cremallera de isoleucina que se sabe que promueve la multimerización de las proteínas en las que se encuentran, usando técnicas conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo las enseñanzas del documento WO 94/10308. En otro ejemplo, los polipéptidos de hGH pueden estar asociados por interacciones entre las secuencias de polipéptido Flag® contenidas en polipéptidos de hGH de fusión que contienen la secuencia polipeptídica Flag®. Los multímeros de hGH también se pueden generar usando técnicas químicas conocidas en la técnica, tales como reticulaciones usando moléculas conectoras y técnicas de optimización de la longitud de la molécula conectora (véase, p. ej., el documento US 5.478.925), técnicas conocidas en la técnica para formar una o más reticulaciones entre moléculas entre los restos de cisteína situados dentro de la secuencia de los polipéptidos que se quiere que estén contenidos en el multímero (véase, p. ej., el documento US 5 478.925), adición de cisteína o biotina en el extremo C o extremo N del polipéptido de hGH y técnicas para generar multímeros que contienen uno o más de estos polipéptidos modificados (véase, p. ej., documento US 5.478.925), o cualquiera de las 30 técnicas para generar liposomas que contienen multímeros de hGH (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. número 5.478.925), cuyas descripciones se incorporan en su totalidad como referencia.

Tal como se usa en esta memoria, la expresión "fragmento de polipéptido de hGH" se refiere a cualquier péptido o polipéptido que comprende un tramo contiguo de una parte de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de hGH, preferiblemente el polipéptido del ID SEC Nº: 1.

Más específicamente, un fragmento de polipéptido de hGH comprende al menos 6, preferiblemente al menos de 8 a 10, más preferiblemente 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 75, 100, 125, 150, 175, 191 aminoácidos consecutivos de un polipéptido de hGH de acuerdo con la presente invención. El fragmento de polipéptido de hGH se puede describir adicionalmente como un subgénero de los polipéptidos de hGH que comprende al menos 6 aminoácidos, en el que "al menos 6" se define como cualquier número entero entre 6 y el número entero que representa el aminoácido C-terminal de un polipéptido de hGH, incluyendo el polipéptido del ID SEC Nº 1. Se incluyen además especies de fragmentos de polipéptido de hGH de al menos 6 aminoácidos de longitud, como se ha descrito antes, que se especifican además en términos de sus posiciones N-terminal y C-terminal. También están abarcados por la expresión "fragmento de

polipéptido de hGH" como especies individuales todos los fragmentos de polipéptido de hGH, de al menos 6 aminoácidos de longitud, como se ha descrito antes, que se pueden especificar particularmente por una posición N-terminal y C-terminal. Es decir, cada combinación de una posición N-terminal y C-terminal que pueda ocupar un
5 fragmento de al menos 6 restos de aminoácidos contiguos de longitud, en cualquier secuencia de aminoácidos dada del listado de secuencias de la presente invención, está incluida en la presente invención.

Hay que indicar que las especies de fragmentos de polipéptidos anteriores de la presente invención se pueden describir alternativamente por la fórmula "a a b"; donde
10 "a" es igual a la posición del aminoácido N-terminal, y "b" es igual a la posición de aminoácido C-terminal del polinucleótido; y además donde "a" es igual a un número entero entre 1 y el número de aminoácidos de una secuencia de polipéptido de hGH menos 6, y donde "b" es igual a un número entero entre 7 y el número de aminoácidos de la secuencia de polipéptido de hGH; y donde "a" es un número entero menor que
15 "b" en al menos 6.

Los fragmentos del polipéptido de hGH anterior se pueden prever inmediatamente usando la descripción anterior y por lo tanto no se listan individualmente sólo con el propósito de no alargar innecesariamente la memoria descriptiva. Además, los fragmentos anteriores no es necesario que tengan una
20 actividad biológica de hGH, aunque los polipéptidos que tienen estas actividades son realizaciones de la invención preferidas, ya que serían útiles, por ejemplo, en inmunoensayos, en cartografía de epítomos, marcaje de epítopo, como vacunas, y como marcadores de peso molecular. Los fragmentos anteriores también se pueden usar para generar anticuerpos contra una parte particular del polipéptido.

25 También están abarcados en la expresión "fragmento del polipéptido de hGH" los dominios de los polipéptidos de hGH. Dichos dominios finalmente pueden comprender patrones o identificadores lineales o estructurales incluyendo, pero sin limitar, cremalleras de leucina, patrones de hélice-vuelta-hélice, sitios de modificación postraslacionales tales como sitios de glicosilación, sitios de ubiquitinación, hélices
30 alfa, láminas beta, péptidos señal que codifican secuencias señal que dirigen la secreción de las proteínas codificadas, secuencias implicadas en la regulación de la transcripción tales como homosecuencias, alargadores ácidos, sitios activos enzimáticos, sitios de unión de sustrato, y sitios de escisión enzimáticos. Dichos dominios pueden presentar una actividad biológica particular tal como unión a ADN o
35 ARN, secreción de proteínas, regulación de la transcripción, actividad enzimática,

actividad de unión a sustrato, etc.

Un dominio tiene un tamaño comprendido generalmente entre 3 y 191 aminoácidos. En una realización preferida, los dominios comprenden un número de aminoácidos que es cualquier número entero entre 6 y 191. Los dominios se pueden sintetizar usando cualesquiera métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo los descritos en la presente memoria para preparar polipéptidos de hGH para producir anticuerpos anti-hGH. Entre los métodos para determinar los aminoácidos que componen un dominio con una actividad biológica particular, se incluyen estudios y ensayos de mutagénesis para determinar la actividad biológica que se va a ensayar.

Los fragmentos particularmente preferidos en el contexto de la presente invención, son polipéptidos de hGH que retienen sustancialmente la actividad biológica, particularmente la promoción del crecimiento en la fase de crecimiento, y el mantenimiento de la composición corporal, anabolismo y metabolismo de lípidos normales.

Alternativamente, se pueden buscar los patrones, dominios y/o identificadores de polipéptidos de la invención en bases de datos usando cualquier método de ordenador conocido por los expertos en la técnica. Entre las bases de datos para buscar se incluyen Prosite (Hofmann et al., (1999) *Nucl. Acids Res.* 27:215-219; Bucher and Bairoch (1994) *Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. Altman et al, Eds., pp53-61, AAAIPress, Menlo Park), Pfam (Sonnhammer et al., (1997) *Proteins* 28 (3) :405-20; Henikoff et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28 (1) :228-30; Bateman et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):263-6), Blocks (Henikoff et al., (2000) *Electrophoresis* 21(9):1700-6), Print (Attwood et al., (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(1):182-8), Prodom (Sonnhammer and Kahn (1994) *Protein Sci.* 3(3) :482-92; Corpet et al. (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1):267-9), Sbase (Pongor et al. (1993) *Protein Eng.* 6(4):391-5; Murvai et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1).260-2), Smart (Schultz et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5857-5864), Dali/FSSP (Holm and Sander (1996) *Nucleic Acids Res.* 24(l):206-9 ; Holm and Sander (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(l):231-4; Holm and Sander (1999) *Nucleic Acids Res.* 27(1):244-7), HSSP (Sander and Schneider (1991) *Proteins* 9(1):56-68.), CATH (Orengo et al., (1997) *Structure* 5 (8): 1093-108; Pearl et al., (2000) *Biochem. Soc. Trans.* 28(2) :269-75), SCOP (Murzin et al., (1995) *J. Mol. Biol.* 247(4):536-40; Lo Conte et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28 (1) :257-9), COG (Tatusov et al., (1997) *Science* 278, 631 :637; Tatusov et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(l):33-

6), bases de datos de familias específicas y sus derivados (Nevill-Manning et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 5865-5871; Yona et al., (1999) *Proteins* 37 (3) :360-78; Attwood et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28 (1) :225-7), cada una de cuyas descripciones se incorpora por la presente en su totalidad como referencia. Para una
5 revisión de bases de datos disponibles, véase número 1 del volumen 28 de *Nucleic Acid Research* (2000), cuya descripción se incorpora aquí en su totalidad como referencia.

La expresión "fragmento de polipéptido de hGH" también abarca fragmentos que llevan epítomos. Estos epítomos pueden ser epítomos antigénicos o tanto un
10 epítomo antigénico como un epítomo inmunógeno. Un epítomo inmunógeno se define como una parte de una proteína que provoca una respuesta de anticuerpo in vivo cuando el polipéptido es el inmunógeno. Por otra parte, una región del polipéptido a la que se une un anticuerpo se define como un epítomo antigénico. Un epítomo puede comprender tan pocos como 3 aminoácidos en una conformación espacial, que es
15 única para el epítomo. Generalmente, un epítomo consiste en al menos 6 de dichos aminoácidos, y con más frecuencia al menos 8-10 de dichos aminoácidos.

Un fragmento que lleva epítomo de la hGH de acuerdo con la invención, puede ser cualquier fragmento cuya longitud está entre 6 aminoácidos y la secuencia de longitud completa de un polipéptido de hGH, preferiblemente un fragmento entre 6 y 50
20 aminoácidos. Los fragmentos que llevan epítomo se pueden especificar por el número de restos de aminoácidos contiguos (como un subgénero) o por las posiciones N-terminal y C-terminal (como especie) como se ha descrito antes.

Los fragmentos que funcionan como epítomos se pueden preparar por cualquier medio convencional (véase, p. ej., Houghten (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
25 82:5131-5135 y patente de EE.UU. 4.631.21, cuyas descripciones se incorporan por la presente en su totalidad como referencia). Entre los métodos para determinar los aminoácidos que componen un epítomo se incluyen cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear bidimensional, y cartografía de epítomos, p. ej., el método de Pepscan descrito por Geysen et al., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
30 81:3998-4002; publicaciones PCT WO 84/03564 y WO 84/03506, cuyas descripciones se incorporan por la presente en su totalidad como referencia. Otro ejemplo es el algoritmo de Jameson and Wolf, (1988), *Comp. Appl. Biosci.* 4:181-186 (dicha referencia se incorpora en su totalidad como referencia). El análisis antigénico de Jameson-Wolf, se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando el programa de ordenador
35 PROTEAN, usando los parámetros por defecto (Versión 4.0 Windows, DNSTAR, Inc.)

La presente invención también proporciona la exclusión de cualquier especie de fragmento de hGH especificado por las posiciones N-terminal y C-terminal, o de cualquier fragmento especificado por el subgénero por el tamaño de restos de aminoácidos como se ha descrito antes. Se puede excluir como especie individual cualquier serie de fragmentos especificados por las posiciones N-terminal y C-terminal o por el tamaño de los restos de aminoácidos como se ha descrito antes. La presente invención también proporciona la exclusión de cualquier dominio de hGH o fragmento que lleva epítopo de la misma forma.

Los polipéptidos de hGH de la presente invención se pueden preparar de cualquier forma adecuada. Dichos polipéptidos de hGH y sus fragmentos se pueden purificar de fuentes naturales, se pueden sintetizar químicamente, producir por técnicas recombinantes incluyendo técnicas de traducción in vitro o expresión en una célula recombinante capaz de expresar el ADNc de la hGH, o una combinación de estos métodos, usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, "Methods in Enzymology, Academic Press, 1993" para una variedad de métodos para purificar proteínas; Creighton, (1983) Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co. 2nd Ed., T. E., New York; and Hunkapiller et al., (1984) *Nature*, 310(5973): 105-11, para la síntesis química de proteínas, y Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, ed., Elsevier Press, NY, para técnicas recombinantes, cuyas descripciones se incorporan en su totalidad como referencia). Los polipéptidos de la presente invención se proporciona preferiblemente en una forma aislada, y pueden estar parcialmente o preferiblemente sustancialmente purificados.

Las expresiones "polinucleótidos que son al menos x% idénticos a un polinucleótidos de referencia" y "polipéptidos que son x% idénticos a un polipéptido de referencia", abarcan polinucleótidos o polipéptidos cuya secuencia de restos (nucleótidos o aminoácidos respectivamente) presenta un porcentaje de identidad, como se define a continuación, igual o superior a x, comparado con dicho polinucleótido o polipéptido de referencia, respectivamente.

El porcentaje de identidad se determina después del alineamiento óptimo de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos en una ventana de comparación, en el que las partes de las secuencias de los polinucleótidos o polipéptidos en la ventana de comparación pueden comprender adiciones o eliminación de uno o más restos con el fin de optimizar el alineamiento de la secuencia. La ventana de comparación contiene un cierto número de posiciones (sea un resto o un hueco que corresponden a una inserción/delección de un resto), correspondiendo dicho número de posiciones al

tamaño de la ventana. Cada posición de la ventana puede presentar una de las siguientes situaciones:

1º) Hay un resto (nucleótido o aminoácido) en esta posición en la primera secuencia alineada, y un resto diferente en la misma posición en la segunda secuencia alineada, en otras palabras la segunda secuencia tiene un resto sustituido en esta posición comparado con la primera secuencia.

2º) Hay un resto (nucleótido o aminoácido) en esta posición en la primera secuencia alineada, y el mismo resto en la misma posición en la segunda secuencia alineada.

3º) Hay un resto (nucleótido o aminoácido) en esta posición en la primera secuencia alineada, y no hay resto en la misma posición en la segunda secuencia alineada, en otras palabras, la segunda secuencia presenta una eliminación en esta posición comparado con la primera secuencia.

El número de posiciones dentro de la ventana de comparación que pertenecen a la primera categoría antes definida se llama R1.

El número de posiciones dentro de la ventana de comparación que pertenecen a la segunda categoría antes definida se llama R2.

El número de posiciones dentro de la ventana de comparación que pertenecen a la tercera categoría antes definida se llama R3.

El porcentaje de identidad (%id) se puede calcular por cualquiera de las siguientes fórmulas:

$$\%id = R2 / (R1+R2+R3) \times 100, \text{ o}$$

$$\%id = (R2+R3) / (R1+R2+R3) \times 100$$

El alineamiento de secuencias para la comparación se puede llevar a cabo usando cualquiera de una variedad de algoritmos y programas de comparación de secuencias conocidos en la técnica. Entre dichos programas y algoritmos se incluyen, pero no se limita, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, FASTDB, WU-BLAST, Gapped-BLAST, PSI-BLAST (Pearson and Lipman, (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448; Altschul et al., (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul et al., (1993), *Nature hGhtics* 3:266-272; Altschul et al., (1997), *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; Thompson et al., (1994), *Nuc. Acids Res*, 22:4673-4680; Higgins et al., (1996), *Meth. Enzymol.* 266:383-402; Brutlag et al. (1990) *Comp. App. Biosci.* 6:237-245; Jones and Swindells, (2002) *Trends Biochem. Sci.* 27:161-4; Olsen et al. (1999) *Pac. Symp. Biocomput.*; 302-13), cuyas descripciones se incorporan en su totalidad como referencia.

En una realización particular, se usa el método de Smith-Waterman, con una matriz de puntuación tal como PAM, PAM 250 o preferiblemente con matrices BLOSUM tales como BLOSUM60 o BLOSUM62 y con los parámetros por defecto (penalización para la apertura de hueco = 10 y penalización para la extensión de un hueco = 1) o con parámetros especificados por el usuario, preferiblemente superiores a los parámetros por defecto.

En otra realización particular, las secuencias de las proteínas y ácidos nucleicos se alinean usando los programas Basic Local Alignment Search Tool ("BLAST") con los parámetros por defecto, o con parámetros modificados proporcionados por el usuario. Preferiblemente, la matriz de puntuación usada es la matriz BLOSUM62 (Gonnet et al., (1992), *Science* 256:1443-1445; Henikoff and Henikoff, (1993), *Proteins* 17:49-61, cuyas descripciones se incorporan aquí en su totalidad como referencia). Menos preferiblemente, también se pueden usar las matrices PAM o PAM250 (véase, p. ej., Schwartz and Dayhoff, (1978), eds., Matrices for Detecting Distance Relationships; Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation, cuya descripción se incorpora por la presente en su totalidad como referencia).

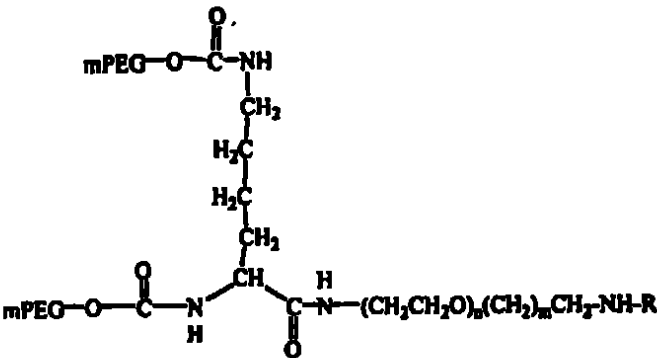
Todavía en otra realización particular, las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos se alinean usando el programa de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. (1990), véase antes. Los parámetros preferidos usados en un alineamiento de FASTDB de secuencias de ADN son: Matriz = Unitary, k-tuple = 4, penalización por mal apareamiento = 1, penalización por unión = 20, longitud de grupo aleatorizada = 0, puntuación de corte = 1, penalización por hueco = 5, penalización por tamaño de hueco = 0,05, tamaño de ventana = 500 o la longitud de la presente secuencia de nucleótidos, siempre que sea más corta. Los parámetros preferidos usados en el alineamiento de aminoácidos en FASTDB son: matriz = PAM, k-tuple = 2, penalización por mal apareamiento = 1, penalización por unión = 20, longitud de grupo aleatorizada = 0, puntuación de corte = 1, penalización por hueco = 5, penalización por tamaño de hueco = 0,05, tamaño de ventana = 500 o la longitud de la presente secuencia de aminoácidos, siempre que sea más corta.

De acuerdo con la presente invención, el polietilenglicol se une covalentemente por restos de aminoácidos de la hGH o sus variantes agonistas. Los expertos en la técnica conocen una variedad de polietilenglicoles activados que tienen una serie de grupos funcionales, conectores, configuraciones y pesos moleculares diferentes, que se pueden usar para crear conjugados de PEG-hGH o conjugados de PEG-agonista

de hGH (para revisiones véase Roberts M.J. et al., *Adv. Drug Del. Rev.* 54:459-476, 2002), Harris J.M. et al., *Drug Delivery Sytems* 40:538-551, 2001). La presente invención se refiere a un método que usa la química de aldehídos para dirigir selectivamente el resto PEG al extremo N, usando un resto conector de butirilaldehído.

5 El conector de butirilaldehído da como resultado una mayor especificidad N-terminal comparado con el conector de acetaldehído (Tabla 1 y Figura 1).

Una realización de la presente invención es un conjugado de hormona del crecimiento humana-PEG que tiene la estructura de la Fórmula I o Fórmula II



Fórmula I

o



Fórmula II

en la que

- n es un número entero entre 1 y 10;
- m es un número entero entre 1 y 10;

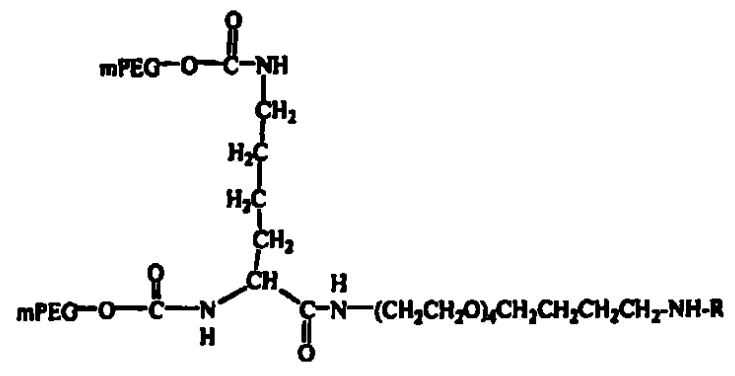
R es la hormona humana del crecimiento, metionil-hormona del crecimiento, o una variante de la hormona del crecimiento.

En una realización particular n es entre 1 y 5 y m es entre 1 y 5.

En una realización particular de la Fórmula I: n es 1 y m es 1; n es 1 y m es 2; n es 1 y m es 3; n es 1 y m es 4; n es 1 y m es 5; n es 1 y m es 6; n es 1 y m es 7; n es 1 y m es 8; n es 1 y m es 9; n es 1 y m es 10; n es 2 y m es 1; n es 2 y m es 2; n es 2 y m es 3; n es 2 y m es 4; n es 2 y m es 5; n es 2 y m es 6; n es 2 y m es 7; n es 2 y m es 8; n es 2 y m es 9; n es 2 y m es 10; n es 3 y m es 1; n es 3 y m es 2; n es 3 y m es 3; n es 3 y m es 4; n es 3 y m es 5; n es 3 y m es 6; n es 3 y m es 7; n es 3 y m es 8; n es 3 y m es 9; n es 3 y m es 10; n es 4 y m es 1; n es 4 y m es 2; n es 4 y m es 3; n es 4 y m es 4; n es 4 y m es 5; n es 4 y m es 6; n es 4 y m es 7; n es 4 y m es 8; n es 4 y m es 9; n es 4 y m es 10; n es 5 y m es 1; n es 5 y m es 2; n es 5 y m es 3; n es 5 y m es 4; n es 5 y m es 5; n es 5 y m es 6; n es 5 y m es 7; n es 5 y m es 8; n es 5 y m es 9;

n es 5 y m es 10; n es 6 y m es 1; n es 6 y m es 2; n es 6 y m es 3; n es 6 y m es 4; n es 6 y m es 5; n es 6 y m es 6; n es 6 y m es 7; n es 6 y m es 8; n es 6 y m es 9; n es 7 y m es 10; n es 7 y m es 1; n es 7 y m es 2; n es 7 y m es 3; n es 7 y m es 4; n es 7 y m es 5; n es 7 y m es 6; n es 7 y m es 7; n es 7 y m es 8; n es 7 y m es 9; n es 7 y m es 10; n es 8 y m es 1; n es 8 y m es 2; n es 8 y m es 3; n es 8 y m es 4; n es 8 y m es 5; n es 8 y m es 6; n es 8 y m es 7; n es 8 y m es 8; n es 8 y m es 9; n es 8 y m es 10; n es 9 y m es 1; n es 9 y m es 2; n es 9 y m es 3; n es 9 y m es 4; n es 9 y m es 5; n es 9 y m es 6; n es 9 y m es 7; n es 9 y m es 8; n es 9 y m es 9; n es 9 y m es 10; n es 10 y m es 1; n es 10 y m es 2; n es 10 y m es 3; n es 10 y m es 4; n es 10 y m es 5; n es 10 y m es 6; n es 10 y m es 7; n es 10 y m es 8; n es 10 y m es 9; n es 10 y m es 10.

Una realización específica es un conjugado de hormona del crecimiento humana-PEG que tiene la estructura



O



en la que R es la hormona del crecimiento humana, metionil-hormona del crecimiento humana o una variante de la hormona del crecimiento humana.

Otra realización específica de la presente invención, es el conjugado de hormona del crecimiento humana-PEG en el que la hormona del crecimiento humana comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del ID SEC N°: 1.

Una realización específica de la presente invención es un conjugado de hormona del crecimiento humana-PEG en el que más de 80%, más preferiblemente 81%, más preferiblemente 82%, más preferiblemente 83%, más preferiblemente 84%, más preferiblemente 85%, más preferiblemente 86%, más preferiblemente 87%, más preferiblemente 88%, más preferiblemente 89%, más preferiblemente 90%, más preferiblemente 91%, más preferiblemente 92%, más preferiblemente 93%, más preferiblemente 94%, más preferiblemente 95%, más preferiblemente 96%, más preferiblemente 97%, y más preferiblemente 98%, del polietilenglicol está conjugado a

la fenilalanina amino terminal de la secuencia de aminoácidos del ID SEC Nº: 1.

Otra realización específica de la presente invención es un conjugado de hormona del crecimiento humana-PEG en el que más de 90% del polietilenglicol está conjugado a la fenilalanina amino terminal de la secuencia de aminoácidos del ID SEC Nº: 1.

Otra realización específica de la presente invención es un conjugado de hormona del crecimiento humana-PEG en el que más de 95% del polietilenglicol está conjugado a la fenilalanina amino terminal de la secuencia de aminoácidos del ID SEC Nº: 1.

Otra realización específica de la presente invención es un conjugado de hormona del crecimiento humana-PEG en el que más de 98% del polietilenglicol está conjugado a la fenilalanina amino terminal de la secuencia de aminoácidos del ID SEC Nº: 1.

El polietilenglicol usado en la presente invención no está restringido a ninguna forma particular o intervalo de peso molecular. El peso molecular del polietilenglicol puede estar entre aproximadamente 500 y aproximadamente 100.000 Dalton. El término "aproximadamente" indica que en las preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más, y algunas menos, que el peso molecular expuesto, y el peso molecular expuesto se refiere al peso molecular medio. Se entiende que hay algún grado de polidispersidad asociada con polímeros tales como el polietilenglicol. Es preferible usar PEG con baja polidispersidad. Normalmente, se usa un PEG con un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 60.000. Un intervalo de peso molecular de PEG específico de la presente invención es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 40.000. En otra realización específica el peso molecular del PEG es mayor que aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 40.000. En otra realización específica, el peso molecular del PEG es de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000. Se pueden usar otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado (p. ej., duración de la liberación sostenida deseada, los efectos, si hay alguno en la actividad biológica, el grado o falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietileno en una proteína terapéutica). Por ejemplo, el polietilenglicol puede tener un peso molecular medio de aproximadamente 200, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 8.500, 9.000, 9.500, 10.000, 10.500, 11.000, 11.500, 12.000, 12.500, 13.000, 13.500, 14.000, 14.500, 15.000, 15.500, 16.000, 16.500, 17.000, 17.500, 18.000, 18.500, 19.000, 19.500, 20.000, 25.000, 30.000, 35.000, 40.000, 45.000, 50.000,

55.000, 60 000, 65 000, 70.000, 75 000, 80.000, 85.000, 90.000, 95.000, ó 100.000 Dalton.

En otra realización, el polietilenglicol es un PEG ramificado que tiene más de un resto de PEG unido (véase los documentos de EE.UU. 5.932.462; EE.UU. 5.342.940; EE.UU. 5.643.575; EE.UU. 5.919.455; EE.UU. 6.113.906; EE.UU. 5.183.660; Kodera Y., *Bioconjugate Chemistry* 5:283-288 (1994); y WO 02/09766. En una realización preferida, el peso molecular de cada polietilenglicol del PEG ramificado es de aproximadamente 5.000-20.000. En una realización específica, el peso molecular de cada polietilenglicol del PEG ramificado es aproximadamente 20.000.

Los poli(óxidos de alquileo), particularmente los polietilenglicoles, se unen a la hGH o su variante agonista por un grupo terminal reactivo, que puede dejar o no un resto conector (espaciador) entre el PEG y la proteína. Con el fin de formar los conjugados de la hGH o su variante agonista de la presente invención, los polímeros tales como los poli(óxido de alquileo) se convierten en formas activadas, tal como entienden dicha expresión los expertos en la técnica. El grupo reactivo, por ejemplo, es un grupo terminal reactivo, que media un enlace entre los restos químicos en la proteína y el polietilenglicol. Típicamente, uno o ambos grupos hidroxilo terminales de los extremos del polímero (es decir, los grupos hidroxilo terminales alfa y omega) se convierten en grupos funcionales reactivos, que permiten la conjugación covalente. Este procedimiento se denomina con frecuencia "activación" y el producto de polietilenglicol que tiene el grupo reactivo se denomina en lo sucesivo "un polietilenglicol activado". En una realización específica, uno o más grupos hidroxilo terminales del polímero, se convierten o rematan con un grupo no reactivo. En una realización específica uno de los grupos hidroxilo terminales del polímero se convierten o rematan con un grupo metilo. Tal como se usa en la presente memoria, el término "mPEG" se refiere a un PEG, que está rematado en un extremo con un grupo metilo. El mPEG se puede representar estructuralmente como



Los polímeros que contienen tanto grupos de unión α como ϵ , se denominan "poli(óxidos de alquileo) bis-activados". Los polímeros que contienen el mismo grupo reactivo en los hidroxilos terminales α y ϵ se denominan a veces "homobifuncionales" u "homobis-activados". Los polímeros que contienen diferentes grupos reactivos en los hidroxilos terminales α y ϵ se denominan a veces "heterobifuncionales" (véase por ejemplo el documento WO 01/26692) o "heterobis-activados". Los polímeros que contienen un solo grupo reactivo se denominan poli(óxidos de alquileo) "mono-

activados" o "mono-funcionales". Otros polímeros sustancialmente no antigénicos son "activados" o "funcionalizados" de la misma forma.

Por lo tanto, los polímeros activados son adecuados para mediar un enlace entre los restos químicos en la proteína, tal como grupos α - o ϵ - amino, carboxilo o tiol, y el polietilenglicol. Los polímeros bis-activados pueden reaccionar de esta forma con dos moléculas de proteína o una molécula de proteína y una molécula pequeña reactiva en otra realización para formar eficazmente conjugados de proteína-polímeros o proteína-molécula pequeña por enlaces cruzados.

En una realización preferida de la invención, se forman uniones de amina secundaria o amida usando el grupo α -amino terminal o grupos ϵ -amino de la lisina de la hGH o su variante agonista y el PEG activado. En otro aspecto preferido de la invención, se forma una unión de amina secundaria entre el grupo α -amino o ϵ -amino primarios N-terminales de la hGH o su variante agonista y la cadena de PEG-aldehído sola o ramificada por alquilación reductora con un agente de reducción adecuado tal como NaCNBH_3 , NaBH_3 , piridina-borano, etc. como describen Chamow et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 133-140 (1994), patente de EE.UU. nº. 4.002.531, WO 90/05534, y patente de EE.UU. nº. 5.824.784.

En una realización preferida, al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, preferiblemente al menos 81%, preferiblemente al menos 82%, preferiblemente al menos 83%, preferiblemente al menos 84%, preferiblemente al menos 85%, preferiblemente al menos 86%, preferiblemente al menos 87%, preferiblemente al menos 88%, preferiblemente al menos 89%, preferiblemente al menos 90%, preferiblemente al menos 91%, preferiblemente al menos 92%, preferiblemente al menos 93%, preferiblemente al menos 94%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 96%, preferiblemente al menos 97%, y más preferiblemente al menos 98% del polietilenglicol está en el grupo α -amino-terminal.

Las reacciones de conjugación, denominadas reacciones de pegilación, históricamente se han llevado a cabo en solución con exceso molar de polímero y sin tener en cuenta donde se uniría el polímero a la proteína. Sin embargo, dichas técnicas generales, se ha demostrado típicamente que no son adecuadas para conjugar proteínas bioactivas a polímeros no antigénicos y que se retenga suficiente bioactividad. Una forma de mantener la bioactividad de la hGH o su variante agonista es evitar sustancialmente la conjugación de los grupos reactivos de la hGH o su variante agonista asociados con el(los) sitio(s) de unión del receptor, en el procedimiento de acoplamiento del polímero. Otro aspecto de la presente invención es

proporcionar un procedimiento para conjugar polietilenglicol a la hGH o su variante agonista manteniendo altos niveles de actividad retenida.

La modificación química mediante un enlace covalente se puede llevar a cabo en cualesquiera condiciones adecuadas adoptadas generalmente en una reacción de una sustancia biológicamente activa con el polietilenglicol activado. La reacción de conjugación se lleva a cabo en condiciones relativamente suaves para evitar la inactivación de la hGH o su variante agonista. Las condiciones suaves incluyen mantener el pH de la solución de la reacción en el intervalo de 3 a 10 y las temperaturas de reacción en el intervalo de aproximadamente 0-37°C. En los casos en los que los restos de aminoácidos reactivos en la hGH o su variante agonista tienen grupos amino libres, la modificación anterior se lleva a cabo preferiblemente en una lista no limitada de tampones adecuados (pH 3 a 10), incluyendo fosfatos, MES, citrato, acetato, succinato o HEPES, durante 1-48 horas a 4°-37°C. Cuando el objetivo son grupos amino N-terminales con reactivos tales como PEG-aldehídos, preferiblemente se mantiene pH 4-7. Se puede usar el polietilenglicol activado en una cantidad de aproximadamente 0,01-100 veces, preferiblemente aproximadamente 0,01-2,5 veces, la cantidad molar del número de grupos amino libres de la hGH o su variante agonista. Por otra parte, cuando los restos de aminoácidos reactivos en la hGH o su variante agonista tienen grupos carboxilo libres, la modificación anterior se lleva a cabo preferiblemente en un pH de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 5,5, por ejemplo, la modificación con polioxietilendiamina se lleva a cabo en presencia de carbodiimida (pH 4-5) durante 1-24 horas a 4°-37°C. El polietilenglicol activado se puede usar en una cantidad de 0,01-300 veces la cantidad molar del número de grupos carboxilo libres de la hGH o su variante agonista.

En realizaciones separadas, el límite superior para la cantidad de polímero incluido en las reacciones de conjugación supera aproximadamente 1:1 la cantidad que puede reaccionar de polímero activado y hGH o su variante agonista sin formar una cantidad sustancial de especies de alto peso molecular, es decir, más de aproximadamente 20% de los conjugados que contengan más de aproximadamente una cadena de polímero por molécula de hGH o su variante agonista. Por ejemplo, en este aspecto de la invención, se contempla que se pueden usar relaciones de hasta aproximadamente 6:1 para formar cantidades significativas de los conjugados deseados que después se pueden aislar de cualquier especie de peso molecular alto.

En otro aspecto de esta invención, se pueden usar derivados de PEG activados bifuncionales para generar moléculas de PEG-hGH o su variante agonista polímeras,

en las que múltiples moléculas de hGH o su variante agonista están reticuladas mediante el PEG. Aunque las condiciones de reacción descritas en esta memoria pueden producir cantidades significativas de hGH o su variante agonista sin modificar, la hGH o su variante agonista sin modificar se puede reciclar fácilmente en lotes
5 posteriores para reacciones de conjugación adicionales. Los procedimientos de la presente invención, sorprendentemente generan muy poco, es decir, menos de aproximadamente 30%, y más preferiblemente, menos de 10% de especies de alto peso molecular y especies que contienen más de una cadena de polímero por hGH o su variante agonista. Estas condiciones de reacción contrastan con las usadas
10 típicamente para las reacciones de conjugación de polímeros, en las que el polímero activado está presente con un exceso molar de varias veces con respecto al objetivo. En otros aspectos de la invención, el polímero está presente en cantidades de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 equivalentes por equivalente de hGH o su variante agonista. En otros aspectos de la invención, el polímero está presente en
15 cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 equivalentes por equivalente de hGH o su variante agonista.

Las reacciones de conjugación de la presente invención proporcionan inicialmente una mezcla o conjunto de reacción que contiene conjugados de mono- y di-PEG-hGH, hGH sin reaccionar, polímero sin reaccionar, y normalmente menos de
20 aproximadamente 20% de especies de alto peso molecular. Las especies de alto peso molecular incluyen conjugados que contienen más de una cadena de polímero, y/o especies de PEG-hGH o su variante agonista polimerizadas. Después de separar las especies sin reaccionar y especies de alto peso molecular, se recuperan las composiciones que contienen conjugados de mono- y di-polímero-hGH o su variante
25 agonista. Dado que la mayor parte de los conjugados incluyen una sola cadena de polímero, los conjugados son sustancialmente homogéneos. Estas hGH o su variante agonista modificadas tienen al menos aproximadamente 0,1% de la actividad biológica in vitro asociada con la hGH o su variante agonista nativa o sin modificar, medido usando ensayos de proliferación de células FDC-P1 patrón (Clark et al. *Journal of*
30 *Biological Chemistry* 271:21969-21977, 1996), ensayo de unión al receptor (documento US 5.057.417), o crecimiento de rata hipofisectomizada (Clark et al. *Journal of Biological Chemistry* 271:21969-21977, 1996). Sin embargo, en aspectos preferidos de la invención, la hGH o su variante agonista modificada tiene aproximadamente 25% de la actividad biológica in vitro, más preferiblemente, la hGH o su variante agonista
35 modificada tiene aproximadamente 50% de la actividad biológica in vitro, más

preferiblemente, la hGH o su variante agonista modificada tiene aproximadamente 75% de la actividad biológica in vivo, y más preferiblemente la hGH o su variante agonista tiene una actividad in vivo equivalente o mejor.

Los procedimientos de la presente invención preferiblemente incluyen relaciones de polímero a hGH o su variante agonista bastante limitadas. Así, se ha encontrado que los conjugados de hGH o su variante agonista están limitados predominantemente a especies que contienen sólo una cadena de polímero. Además, la unión del polímero a los grupos reactivos de la hGH o su variante agonista es sustancialmente menos aleatoria que cuando se usan mayores excesos molares del conector polímero. La hGH o su variante agonista sin modificar presente en la mezcla de reacción, después de inactivar la reacción de conjugación, se puede reciclar a reacciones posteriores usando cromatografía de intercambio iónico o de exclusión por tamaños, o técnicas de separación similares.

Una hGH o su variante agonista modificada con polietilenglicol, particularmente una proteína químicamente modificada de acuerdo con la presente invención, se puede purificar de una mezcla de reacción por métodos convencionales que se usan para purificar proteínas, tales como diálisis, precipitación por adición de sal, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía en gel y electroforesis. La cromatografía de intercambio iónico es particularmente eficaz para separar el polietilenglicol sin reaccionar y la hGH o su variante agonista. En una realización adicional de la invención, las especies mono- y di-polímero-hGH o su variante agonista se aíslan de la mezcla de reacción para separar las especies de alto peso molecular, y la hGH o su variante agonista sin modificar. La separación se lleva a cabo poniendo las especies mezcladas en una solución tampón que contiene aproximadamente 0,5-10 mg/ml de los conjugados de hGH o su variante agonista-polímero. Las soluciones adecuadas tienen un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10. Las soluciones contienen preferiblemente una o más sales de tamponamiento seleccionadas de KCl, NaCl, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $NaHCO_3$, $NaBO_4$, CH_3CO_2H y NaOH.

Dependiendo del tampón de reacción, puede ser necesario someter primero la solución del conjugado de hGH o su variante agonista y polímero, a intercambio de tampón/ultrafiltración para separar cualquier polímero sin reaccionar. Por ejemplo, la solución de conjugado de PEG-hGH o su variante agonista se puede ultrafiltrar a través de una membrana con corte de exclusión de peso molecular bajo (10.000 a 30.000 Dalton) para separar la mayor parte de los materiales no deseados tales como

polímero sin reaccionar, tensioactivos, si están presentes, o similar.

El fraccionamiento de los conjugados en una mezcla que contiene las especies deseadas, se lleva a cabo preferiblemente usando un medio de cromatografía de intercambio iónico. Dichos medios pueden unir selectivamente conjugados de PEG-hGH o su variante agonista por diferencias de la carga, que varía de una forma algo predecible. Por ejemplo, la carga de la superficie de la hGH o su variante agonista se determina por el número de grupos cargados disponibles en la superficie de la proteína. Estos grupos cargados típicamente sirven como punto de unión potencial de polímeros de poli(óxido de alquileo). Por lo tanto, los conjugados de hGH o su variante agonista tendrán diferente carga respecto a las otras especies, para permitir el aislamiento selectivo.

Para el método de la presente invención, se usan resinas de intercambio aniónico o catiónico fuertemente polares, tales como resinas de amina cuaternaria o sulfopropilo, respectivamente. Se prefieren especialmente las resinas de intercambio iónico. Una lista no limitante de resinas de intercambio catiónico disponibles en el comercio adecuadas para usar con la presente invención son SP-hitrap®, SP Sepharose HP® y SP Sepharose® de flujo rápido. También se pueden usar otras resinas de intercambio catiónico adecuadas, por ejemplo resinas S y CM. Una lista no limitante de resinas de intercambio aniónico, incluyendo resinas de intercambio aniónico disponibles en el comercio, adecuadas para usar con la presente invención son Q-hitrap®, Q Sepharose HP®, y Q sepharose®, de flujo rápido. También se pueden usar otras resinas de intercambio aniónico adecuadas, por ejemplo, resinas DEAE.

Por ejemplo, la resina de intercambio aniónico o catiónico preferiblemente se empaqueta en una columna y se equilibra por medios convencionales. Se usa un tampón que tiene el mismo pH y osmolalidad que la solución de conjugado de polímero y hGH o su variante agonista. El tampón de elución contiene preferiblemente una o más sales seleccionadas de KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄, y (NH₄)₂CO₃. Después, la solución que contiene conjugado se adsorbe en la columna, donde el polímero sin reaccionar y algunas especies de alto peso molecular no son retenidas. Cuando se completa la carga, se aplica a la columna un flujo con gradiente de un tampón de elución con concentraciones salinas crecientes para eluir la fracción deseada de conjugado de poli(óxido de alquileo) y hGH o su variante agonista. Las fracciones combinadas eluidas se limitan preferiblemente a conjugados de polímero uniformes, después de la etapa de separación de intercambio catiónico o aniónico. Después cualquier especie de hGH o su variante agonista no

conjugada se puede volver a lavar de la columna por técnicas convencionales. Si se desea, se pueden separar además entre sí especies de hGH o su variante agonista mono y multipegiladas, mediante una cromatografía de intercambio iónico adicional o cromatografía de exclusión por tamaños.

- 5 También se pueden usar técnicas que usan múltiples etapas isocráticas de concentración salina o pH crecientes. Múltiples etapas de elución isocrática de concentración creciente darán como resultado la elución secuencial de conjugados de di- y después mono-hGH o su variante agonista-polímero.

- 10 El intervalo de temperatura para la elución es entre aproximadamente 4°C y aproximadamente 25°C. Preferiblemente, la elución se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 22°C. Por ejemplo, la elución de la fracción de PEG-hGH o su variante agonista se detecta por absorbancia UV a 280 nm. La recolección de fracciones se puede lograr mediante perfiles de elución sencillos.

- 15 Se puede usar un tensioactivo en el procedimiento de conjugación del polímero de polietilenglicol con el resto de la hGH o su variante agonista. Entre los tensioactivos adecuados se incluyen agentes de tipo iónico tales como dodecil-sulfato sódico. También se pueden usar otros tensioactivos iónicos tales como docecil-sulfato de litio, compuestos de amonio cuaternario, ácido taurocólico, ácido caprílico, ácido decano-sulfónico, etc. También se pueden usar tensioactivos no iónicos. Por ejemplo,
- 20 materiales tales como polioxietilen-sorbitanes (Tweens), polioxietilen-éteres (Tritons). Véase también Neugebauer, A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry (1992) Calbiochem Corp. Las únicas limitaciones de los tensioactivos usados en los procedimientos de la invención, son que se usen en condiciones y concentraciones que no produzcan una sustancial desnaturalización
- 25 irreversible de la hGH o su variante agonista, y no inhiban completamente la conjugación del polímero. Los tensioactivos están presentes en las mezclas de reacción en cantidades de aproximadamente 0,01-0,5%, preferiblemente de 0,05-0,5%; y más preferiblemente de aproximadamente 0,075-0,25%. También se contemplan mezclas de tensioactivos.

- 30 Se cree que los tensioactivos proporcionan un sistema de protección temporal y reversible durante el procedimiento de conjugación del polímero. Se ha mostrado que los tensioactivos son eficaces para rechazar selectivamente la conjugación del polímero, pero permitiendo que se produzca la conjugación basada en lisina o basada en amino terminal.

- 35 La hGH modificada con polietilenglicol o su variante agonista modificada tiene

un efecto farmacológico más duradero, que se puede atribuir posiblemente a su semivida in vivo más prolongada.

Otra realización de la invención se refiere a métodos para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno en el que el uso de la GH, preferiblemente hGH es
5 beneficioso, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una hGH modificada con polietilenglicol de la invención o su variante agonista, sola o combinado con otro agente terapéutico. La invención también se refiere al uso de una hGH modificada con polietilenglicol de la invención o su variante agonista para fabricar un medicamento para prevenir y/o tratar una
10 enfermedad o trastorno en el que el uso de la GH, preferiblemente la hGH, es beneficioso. Además, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una hGH modificada con polietilenglicol de la invención o su variante agonista para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno en el que el uso de la GH, preferiblemente la hGH, es beneficioso.

15 Entre las enfermedades y trastornos en los que la GH es beneficiosa se incluyen, pero no se limita, deficiencia de la hormona del crecimiento (DHC), deficiencia de la hormona del crecimiento en adultos (DHCa), síndrome de Turner, retraso del crecimiento en niños que nacieron pequeños para la edad gestacional (PEG), síndrome de Prader-Willi (SPW), insuficiencia renal crónica (IRC), emaciación
20 por SIDA, envejecimiento, insuficiencia renal terminal, fibrosis quística, disfunción eréctil, lipodistrofia por VIH, fibromialgia, osteoporosis, trastornos de la memoria, depresión, enfermedad de Crohn, displasias esqueléticas, lesión cerebral traumática, hemorragia subaracnoide, síndrome de Noonan, síndrome de Down, estatura baja idiopática (EBI), enfermedad renal terminal (ERT), muy bajo peso al nacimiento
25 (MBPN), rescate de células madre de la médula ósea, síndrome metabólico, miopatía glucocorticoide, estatura baja debida al tratamiento de niños con glucocorticoides, y retraso del crecimiento en niños prematuros bajos.

En una realización más específica de la invención, la hGH modificada con polietilenglicol de la invención o su variante agonista, se usan para prevenir y/o tratar
30 trastornos o enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en GHD, PEG, SPW, síndrome de Turner e IRC.

En otra realización más específica de la invención, la hGH modificada con polietilenglicol de la invención o su variante agonista se usan para prevenir y/o tratar
35 trastornos o enfermedades seleccionados del grupo que consiste en estatura baja idiopática, muy bajo peso al nacimiento, lesión cerebral traumática, síndrome

metabólico, y síndrome de Noonan.

Otra realización de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una hGH modificada con polietilenglicol de la invención o su variante agonista, sola o combinada con otro agente terapéutico, y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Después, la hGH modificada con polietilenglicol de la invención o su variante agonista presente, se pueden formular en productos farmacéuticos que contienen también un diluyente farmacéuticamente aceptable, un agente para preparar una solución isotónica, un acondicionador del pH y similares, con el fin de administrarlo a un paciente.

Los productos farmacéuticos anteriores se pueden administrar por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, pulmonar, intradérmica, u oral, dependiendo del propósito del tratamiento. Una dosis también se puede basar en la clase y estado del trastorno de un paciente que se va a tratar, estando normalmente entre 0,1 mg y 5 mg por inyección, y entre 0,1 mg y 50 mg en una administración oral para un adulto.

Tal como se usa en la presente memoria, el polietilenglicol-hGH modificada o su variante agonista de la presente invención se puede usar combinado con otro agente terapéutico. Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "coadministración", "coadministrado" y "combinado con" en relación con los compuestos A y uno o más agentes terapéuticos distintos, se pretende que signifiquen, se refieran e incluyan de lo siguiente:

- administración simultánea de dicha combinación de A y el(los) agente(s) terapéutico(s) a un paciente que necesite tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una sola forma de dosificación que libera dichos componentes sustancialmente al mismo tiempo en dicho paciente,

- administración simultánea de dicha combinación de A y el(los) agente(s) terapéutico(s) a un paciente que necesite tratamiento, cuando dichos componentes se formulan por separado en formas de dosificación separadas, que son tomadas sustancialmente al mismo tiempo por dicho paciente, de forma que dichos componentes son liberados sustancialmente al mismo tiempo en dicho paciente,

- administración secuencial de dicha combinación de A y el(los) agente(s) terapéutico(s) a un paciente que necesite tratamiento, cuando dichos componentes se formulan por separado en formas de dosificación separadas, que son tomadas en tiempos consecutivos por dicho paciente con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, de forma que dichos componentes son liberados sustancialmente en distintos momentos en dicho paciente; y

- administración secuencial de dicha combinación de A y el(los) agente(s) terapéutico(s) a un paciente que necesite tratamiento, cuando dichos compuestos se formulan juntos en una sola forma de dosificación que libera dichos componentes en una forma controlada de modo que son administrados al mismo tiempo, consecutivamente y/o superponiéndose en el mismo momento y/o momentos diferentes en dicho paciente.

Entre los ejemplos adecuados de otros agente terapéuticos que se pueden usar combinados con A, sus sales farmacéuticamente aceptables y/o sus formas derivadas, se incluyen, pero no se limitan· inhibidores de aromatasa tales como exemestano, formestano, atamestano, fadrozol, letrozol, vorozol y anastrozol; reguladores de ácidos grasos libres incluyendo derivados de ácido fibrico (tales como fenofibrato, clofibrato, gemfibrozil, bezafibrato y ciprofibrato) y derivados del ácido nicotínico tales como acipimox; agentes sensibilizadores de insulina incluyendo, pero sin limitar, biguanidas tales como metformina, agentes sensibilizadores de insulina PPAR y tiazolodionas tales como troglitazona y rosiglitazona. Troglitazona, 5-[[4-[3,4-dihidro-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2H-]-benzopiran-2-il)metoxi]fenil]metil-3-2,4-tiazolidindiona V411 (DIABII, Glaucanina) Pioglitazona (ACTOS, AD 4833, U 72107, U 72107A, U 72107E, ZACTOS) Nombre químico: 2,4-Tiazolidindiona, monohidrocloruro del 5-[[4-[2-(5-etil-2-piridinil)etoxi]fenil]metilo], (a/-); Rosiglitazona (Avandia, BRL 49653, BRL 49653C) Nombre químico: 2,4-Tiazolidindiona, 5-[[4-[2-(metil-2-piridinilamino)etoxi]fenil]metilo]; Bexaroteno-oral (LGD 1069 oral, Targretin oral, Targretin, Targretin oral, Targrexin oral) Nombre químico: ácido 4-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)etenil]benzoico; ZD 2079, (ICI D 2079) (Nombre químico: cloruro de (R)-N-[2-4-(carboximetil) 30 fenoxi]etil)-N-(2-hidroxi-2-fenetil)amonio: Netoglitazona, (Isaglitazona, MCC 555, RWJ 241947) (Nombre químico. 5-[6(2-fluorobenciloxi)naftalen-2-ilmetil]tiazolidin-2,4-diona); INS (D-qui-ro-inositol) (Nombre químico: D-1,2,3,4,5,6-hexahidroxíciclohexano), ON 2344 (DRF 2593); Dexlipotam, Nombre químico: ácido 5(R)-(1,2-ditolan-3-il)pentanoico 35; HQL 975, Nombre químico: ácido 3-[4-[2-(5-metil-2-feniloxazol-4-il)etoxi]fenil]-2(S)-(propilamino)propiónico; IM 268, Nombre químico: 5,5'-metilen-bis(1,4-fenilen)bismetilenbis(tiazolidin-2,4-diona). Entre los agonistas de PPAR I que se están desarrollando se incluyen: Reglitazar (JTT 501, PNU 182716, PNU 716) (Nombre químico: Isoxazolidien-3,5-diona, y 4-[[4-(2-fenil-5-metil)-1,3-oxazolil]etoxifenil-4]metilo, (4RS)); I (RP 297, Nombre químico: 10 5-(2,4-dioxotiazolidin-5-ilmetil)-2-metoxi-N-[4-(trifluorometil)bencilbenzamida; R 119702 (CI 1037, CS 011) Nombre químico: hidrocloruro de la (-)-5-[4-(5-metoxi-1Hbencimidazol-

2-ilmetoxi)bencil]tiazolin-2,4-diona; 15 DRF 2189, Nombre químico: 5-[[4-[2-(1-indolil)etoxi]fenil]metil]tiazolidin-2,4-diona; inhibidores de la síntesis de cortisol tales como ketoconazol, econazol o miconazol; hormonas del crecimiento tales como somatropina o somatorm y sus derivados tales como proteína de fusión de la

5 hormona del crecimiento tales como ALBUTROPIN; hormonas del crecimiento con polietilenglicol, tales como hormona del crecimiento pegilada en la cisteína, BT 005 (Bolder BioTechnology Inc.); secretagogos de la hormona del crecimiento, tales como por ejemplo, SM 130686 (Sumitomo) capromorelina (Pfizer), mecasermina (Fujisawa), sermorelina (Salk Institute, Bio-Technology General), somatrem, somatomedina (C

10 Llorente; Pharmacia Corporation) examorelina, tabimorelina; CP 464709 (Pfizer), LI 426410 y LI 444711 (Lilly); 8-(aminoalcoxiimino)-8H-dibenzo[a,e]triazolo[4,5-c]cicloheptenos como se describen en el documento WO2002057241, dibenzo[a,e]1,2,3-triazolo[4,5-c][7]anulen-8-onas sustituidas en 2, como se describe en el documento WO2002056873, péptidos liberadores de la hormona del crecimiento

15 GHRP-6 y GHRP-1 como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.411.890, y las publicaciones WO 89/07110, WO 89/07111, B-HT920, hexarelina y GHRP-2 como se describe en el documento WO 93/04081, u hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH, también denominada GRF) y sus análogos, somatomedinas incluyendo IGF-1 e IGF-2 y sus derivados tales como SomatoKine, una fusión

20 recombinante de un factor de crecimiento de tipo insulina y su proteína de unión, BP-3, agonistas alfa adrenérgicos tales como clonidina, xilazina, detomidina y medetomidina o agonistas de la serotonina 5HTID tales como surnitriptán o agentes que inhiben la somatostatina o su liberación tal como fisostigmina y piridostigmina, TGRF 1-44 (Teratechnologies); L 165166 (Merck & Company); derivados dipeptídicos como se describen en el documento WO9858947, inhibidores de la dipeptidil-peptidasa IV tales

25 como aminoacilpirrolidina-nitrilo como se describe en los documentos US6521644, WO95/15309 y WO98/19998; inhibidores de la dipeptidil-peptidasa beta-aminoheterocíclicos tales como los descritos en los documentos US20030100563 y WO2003082817; y compuestos de liberación de la hormona del crecimiento, tales

30 como los descritos en los documentos US20030055261, US20030040483, EP 18072, EP 83864, WO 89/07110, WO 89/01711, WO 89/10933, WO 88/9780, WO 83/02272, WO 91/18016, WO 92/01711, WO 93/04081, WO 9514666, EP0923539, patentes de EE.UU. nº 5.206.235, 5.283.241, 5.284.841, 5.310.737, 5.317.017, 5.374.721, 5.430.144, 5.434.261, 5.438.136, 5.494.919, 5.494.920, 5.492.916, 5.536.716 y

35 5.578.593, WO 94/13696, WO 94/19367, WO 95/03289, WO 95/03290, WO 95/09633,

WO 95/11029, WO 95/12598, WO 95/13069, WO 95/14666, WO 95/16675, WO 95/16692, WO 95/17422, WO 95/17423, WO 95/34311, y WO 96/02530, piperidinas, pirrolidinas y hexahidro-1H-azepinas como se describe en los documentos US5804578, US5783582, WO2004007468, AMIDO-ESPIROPIPERIDINAS tales como las descritas en el documento WO0104119, compuestos de ácido 2-amino-5-pirimidin-acético incluyendo ácido 2-[(5,6-dimetil-2-benzoimidazolil)amino]-4-hidroxi-6-metil-5-pirimidin-acético (2) y éster etílico del ácido 2-[(5,6-dimetil-2-benzoimidazolil)amino]-4-hidroxi-6-metil-5-pirimidin-acético, como se describe en el documento US6329383, bencimidazoles como se describe en el documento EP1155014, compuestos de peptidilo análogos relacionados con GRF y los péptidos de la patente de EE.UU. 4.411.890, antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina, tal como los descritos en los documentos WO0170228, WO0170227, WO0170228, WO0069433, WO0004013, WO995156, WO9951595, WO9951231-4, WO9941251-2, WO9921557, WO9921553 y compuestos de 6-AZAIINDOL como se describen en los documentos WO0053602, WO0053185, WO0053181, WO0053180, WO0053179, WO0053178, US6288078; secretagogos del IGF-1; factor del crecimiento de tipo insulina 2 (IGF-2 o somatomedina A) y secretagogos de IGF-2; antagonistas de miostatina que inhiben el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR-3) de la tirosina-quinasa.

Las sustancias polímeras incluidas también son preferiblemente solubles en agua a temperatura ambiente. Una lista no limitante de dichos polímeros, incluye homopolímeros de poli(óxido de alquileo) tales como polietilenglicol o polipropilenglicol, poli(polióles oxietilenados), sus copolímeros y sus copolímeros de bloques, con la condición de que en los copolímeros de bloques se mantenga la solubilidad.

Como alternativa a los polímeros basados en PEG, se pueden usar materiales eficazmente no antígenos tales como dextrano, polivinilpirrolidonas, poliacrilamidas, poli(alcoholes vinílicos), polímeros basados en hidratos de carbono y similares. Realmente, la activación de los grupos α y ϵ terminales de estas sustancias polímeras se puede llevar a cabo de formas similares a las usadas para convertir los poli(óxidos de alquileo), y por lo tanto serán evidentes para los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica comprenderán que la lista anterior es simplemente ilustrativa, y que se contemplan todos los materiales polímeros descritos en la presente memoria. Para los propósitos de la presente invención, "eficazmente no antígenos" significa todos los materiales que se entiende en la técnica que no son tóxicos y no provocan una respuesta inmunógena apreciable en mamíferos.

Definiciones

A continuación se da una lista de abreviaturas y los correspondientes significados que se usan de forma intercambiable en la presente memoria:

	g	gramo(s)
5	mg	miligramo(s)
	ml	mililitro(s)
	T.a.	temperatura ambiente
	PEG	polietilenglicol

El contenido completo de todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patentes citadas en esta descripción, se incorporan en la presente memoria como referencia, como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente que se incorpora como referencia.

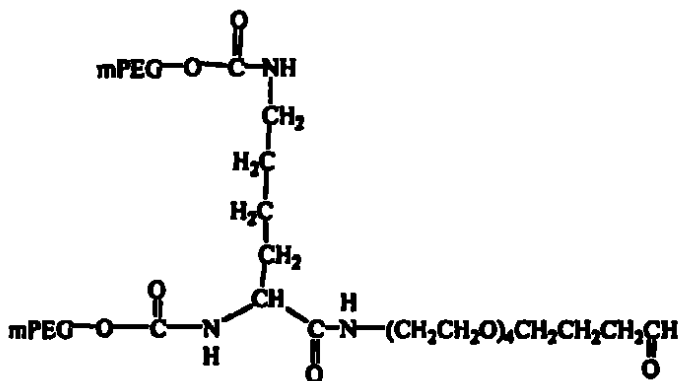
Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con el propósito de que se entienda con claridad, será evidente para el experto en la técnica, a la luz de las enseñanzas de esta invención, que se pueden hacer cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo con propósitos de ejemplo, y no se pretende que limiten el alcance de la invención, que se ha descrito antes en términos generales.

El los siguientes ejemplos, la hGH es la del ID SEC N°: 1. Se entiende que otros miembros de la familia de polipéptidos de la hGH o su variante agonista, también se pueden pegar de una forma similar como se ejemplifica en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

PEG(ramificado de PM 40.000)-butirilaldehído-hGH



Este ejemplo demuestra un método para generar preparaciones sustancialmente homogéneas de hGH monopegilada en el extremo N, por alquilación

reductora. Se acopló selectivamente el reactivo metoxi-PEG ramificado-butilaldehído de PM aproximadamente 40.000 (Shearwater Corp.) por aminación reductora al extremo N de la hGH, aprovechando la diferencia en el valor de pK_a relativo de la amina primaria en el extremo N frente a los valores de pK_a de las aminas primarias en la posición ϵ -amino de los restos de lisina. Se hizo reaccionar la proteína hGH disuelta con una concentración de 10 mg/ml en Hepes 25 mM (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7,0, (opcionalmente MES 25 mM (Sigma Chemical , St. Louis, MO) pH 6,0, acetato sódico 10 mM (Sigma Chemical , St. Louis, MO) pH 4,5), con metoxi-PEG-butirilaldehído, M-PEG-ALD, (Shearwater Corp., Huntsville, AL) por adición de M-PEG-ALD, para dar una relación molar de PEG:hGH relativa de 2:1. Las reacciones se catalizaron por adición de solución madre de $NaCNBH_4$ 1 M (Sigma Chemical , St. Louis, MO), disuelto en H_2O , hasta una concentración final de 10-50 mM. Las reacciones se llevaron a cabo en la oscuridad a T.a. durante 18-24 horas. Las reacciones se pararon por adición de Tris 1 M (Sigma Chemical , St. Louis, MO), pH 7,6, hasta una concentración final de Tris de 50 mM, o se diluyeron en el tampón adecuado para la purificación inmediata.

La Tabla 1 muestra el porcentaje, determinado por cromatografía de exclusión por tamaño, de las especies multi-PEGiladas, conjugado mono-PEGilado, PEG sin reaccionar, y rendimiento de la purificación final del PEG(ramificado 40K)-aldehído y PEG(ramificado 40K)-butirilaldehído. El PEG-butirilaldehído da como resultado más conjugado mono-PEGilado, menores niveles de PEG sin reaccionar, y mayor rendimiento final comparado con el PEG-aldehído.

TABLA 1

Comparación de PEG(ramificado 40K)-ALD-hGH y PEG(ramificado 40K)-Butirilaldehído-hGH		
Especies en la reacción		
mezcla:		
	PEG(40K)-aldehído hGH	PEG(40K)-butirilaldehído-hGH
producto multi-PEG	4,02%	5,03%
producto mono-PEG	48,70%	61,02%
hGH sin reaccionar	41,80%	29,20%
Rendimiento de la purificación final	30,80%	44,70%

Ejemplo 2

PEG(cadena lineal PM 30.000)-butiraldehído-hGH

Se acopla el reactivo metoxi-PEG(lineal PM 30.000)-butiraldehído con el extremo N de la hGH usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

5 Ejemplo 3

PEG(cadena lineal PM 20.000)-butiraldehído-hGH

Se acopla el reactivo metoxi-PEG(lineal PM 20.000)-butiraldehído con el extremo N de la hGH usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

Ejemplo 4**10 Purificación de la hGH pegilada**

Las especies de hGH pegiladas se purificaron de la mezcla de reacción a >95% (análisis SEC) usando una sola etapa de cromatografía de intercambio iónico.

Cromatografía de intercambio aniónico

- Las especies de hGH pegiladas se purificaron de la mezcla de reacción a >95% (análisis SEC) usando una sola etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Se purificó la hGH monpegilada de las especies hGH sin modificar y hGH multipegilada usando cromatografía de intercambio aniónico. Se purificó una mezcla de reacción de PEG(20K)-butiraldehído-hGH típica (5-100 mg de proteína), como se ha descrito antes en una columna de Q-Sepharose Hitrap (1 ó 5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) o columna de Q-Sepharose de flujo rápido (26/20, volumen del lecho 70 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) equilibrada en HEPES 25 mM, pH 7,3 (Tampón A). La mezcla de reacción se diluyó 5-10X con tampón A y se cargó en la columna con un caudal de 2,5 ml/min. La columna se lavó con 8 volúmenes de columna del tampón A. Posteriormente, se eluyeron las diferentes especies de hGH de la columna en 80-100 volúmenes de columna de tampón A y un gradiente lineal de NaCl de 0-100 mM. El eluyente se controló por absorbancia a 280 nm (A_{280}) y se recogieron fracciones de 5 ml. Las fracciones se mezclaron según el grado de pegilación, p. ej., mono, di, tri, etc. (evaluado como en el ejemplo 15). Después la mezcla se concentró a 0,5-5 mg/ml en un concentrador Centriprep YM10 (Amicon, Technology Corporation, Northborough, MA). Se determinó la concentración de proteína de la mezcla por la A_{280} usando un coeficiente de extinción de 0,78.

Cromatografía de intercambio catiónico

- La cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo en una columna de alto rendimiento de SP Sepharosa (Pharmacia XK 26/20, volumen del lecho 70 ml) equilibrada en acetato sódico 10 mM pH 4,0 (Tampón B). La mezcla de reacción se

diluye 10X con tampón B y se carga en la columna con un caudal de 5 ml/min. Después la columna se lava con 5 volúmenes de columna del tampón B, seguido de 5 volúmenes de columna de tampón C al 12% (acetato 10 mM pH 4,5, NaCl 1 M). Posteriormente, las especies PEG-hGH se eluyen de la columna con un gradiente lineal de tampón C al 12 a 27% en 20 volúmenes de columna. El eluyente se controla a 280 nm y se recogen fracciones de 10 ml. Las fracciones se juntan de acuerdo con el grado de pegilación (mono, di, tri, etc.), se intercambian en tampón de acetato 10 mM pH 4,5, y se concentran a 1-5 mg/ml en una celda agitada provista de una membrana Amicon YM10. La concentración de proteína de la mezcla se determina por A280 nm usando un coeficiente de extinción de 0,78.

Ejemplo 5

Caracterización bioquímica

Las mezclas de hGH pegilada purificada se caracterizaron por SDS-PAGE no reductora, cromatografía de exclusión por tamaños no desnaturizante, y cartografía de péptidos.

Cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaños (SEC-HPLC)

SEC-HPLC no desnaturizante

Se evaluaron la reacción de metoxi-PEG con diferentes procedimientos químicos de unión, tamaños, conectores y geometrías con la hGH, las mezclas de purificación de intercambio aniónico y los productos de purificación finales, usando SEC-HPLC no desnaturizante. La SEC-HPLC analítica no desnaturizante se llevó a cabo usando una columna Superdex 200, 7,8 mm X 30 cm (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) en fosfato 20 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, con un caudal de 0,5 ml/minuto (opcionalmente Tosohaas G4000PWXL Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). La PEGilación aumenta mucho el volumen hidrodinámico de la proteína dando como resultado un desplazamiento a un tiempo de retención menor. Se observaron nuevas especies en las mezclas de reacción de PEG-aldehído-hGH junto con la hGH. Estas especies PEGiladas y no PEGiladas se separaron en cromatografía con Q-Sepharosa, y las especies de mono-PEG-aldehído-hGH purificadas resultantes, posteriormente se mostró que eluían como un solo pico en la SEC no desnaturizante (>95% de pureza). La etapa de cromatografía en Q-Sepharose separó eficazmente el PEG libre, la hGH, y las especies de hGH multi-PEGiladas de la hGH mono-Pegilada.

SEC-HPLC desnaturizante

Se evaluaron la reacción de los polietilenglicoles-butiraldehído con la hGH, la

purificación por intercambio aniónico, y los productos finales purificados, usando la SEC-HPLC desnaturizante. La SEC-HPLC desnaturizante analítica se lleva a cabo usando una columna Tosohaas 3000SWXL de 7,8 mm X 30 cm (Tosohaas Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) en fosfato 100 mM pH 6,8, SDS al 0,1% con un caudal de 0,8 ml/minuto. La PEGilación aumenta mucho el volumen hidrodinámico de la proteína dando como resultado un desplazamiento de un tiempo de retención menor. Las especies PEGiladas y no PEGiladas se separan por cromatografía en Q-Sepharose.

Transferencia SDS PAGE/PVDF

Se usó SDS-PAGE para evaluar la reacción del PEG-butiraldehído con hGH, y los productos finales purificados. La SDS-PAGE se llevó a cabo en geles de Tris-tricina al 10-20% de 1 mm de grosor (Invitrogen, Carlsbad, CA) en condiciones reductoras y no reductoras, y se tiñeron usando el kit de tinción Novex Colloidal Coomassie® G-250 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las bandas se transfieren a una membrana de PVDF para la posterior identificación de la secuencia N-terminal.

HPLC de intercambio aniónico analítica

Se evaluaron la mezcla de reacción de PEG-butiraldehído/hGH, las fracciones de purificación por intercambio aniónico, y los productos finales purificados, usando HPLC de intercambio aniónico analítica. La HPLC de intercambio aniónico analítica se llevó a cabo usando una columna de intercambio aniónico Tosohaas Q5PW o DEAE-PW, 7,5 mm X 75 mm (Tosohaas Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) en Tris 50 mM, pH 8,6 con un caudal de 1 ml/min. Las muestras se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl 5-200 mM.

Secuencia N-terminal y cartografía del péptido

Se usó la química de degradación de Edman automatizada para determinar la secuencia de la proteína N-terminal. Se usó un secuenciador Applied Biosystems Model 494 Procise (Perkin Elmer, Wellesley, MA) para la degradación. Los respectivos derivados PTH-AA se identificaron por análisis con RP-HPLC de una forma en serie usando un analizador de PTH Applied Biosystems modelo 140C equipado con una columna de Perkin Elmer/Brownlee 2,1 mm d.i., PTH-C18.

Las digestiones con tripsina se llevaron a cabo con una concentración de 1 mg/ml y típicamente se usaron 50 µg de material por digestión. Se añadió tripsina de forma que la relación de tripsina a PEG-hGH era 1:30 (peso/peso). El tampón tris estaba presente con una concentración 30 mM, pH 7,5. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante $16 \pm 0,5$ horas. Las reacciones se inactivaron por la adición de 50 µl de HCl 1 N por ml de solución de digestión. Las muestras se diluyeron,

antes de poner las muestras en el autoinyector de muestras, con una concentración final de 0,25 mg/ml en acetonitrilo al 6,25%. Primero se añadió acetonitrilo (hasta acetonitrilo al 19,8%), se mezcló bien, y después se añadió agua hasta el volumen final (cuatro veces el volumen inicial). La solución de digestión adicional se puede separar y almacenar durante hasta 1 semana a -20°C.

Se usó un sistema de HPLC Waters Alliance 2695 para el análisis, pero otros sistemas producirían resultados similares. La columna usada era una columna Astec C-4 polímera de 25 cm x 4,6 mm con partículas de 5 µm. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente con una carga típica de 50 µg de proteína por muestra.

El tampón A es ácido trifluoroacético en agua al 0,1%; el tampón B es ácido trifluoroacético en acetonitrilo al 0,085%. El gradiente era el siguiente:

Tiempo	% A	% B	% C	% D	Caudal	Curva
0,00	0,0	0,0	100,00	0,0	1,000	1
90,00	0,0	0,0	55,00	45,00	1,000	6
90,10	0,0	0,0	0,0	100,00	1,000	6
91,00	0,0	0,0	0,0	100,00	1,000	6
91,10	0,0	0,0	100,00	0,0	1,000	6
95,00	0,0	0,0	100,00	0,0	1,000	6

La columna se calienta a 40°C usando una camisa de calentamiento. Los máximos se detectaron usando un detector Waters 996 PDA que recoge datos entre 210 y 300 nm. El cromatograma obtenido a 214 nm se usó para el análisis de la muestra.

Se llevaron a cabo mapas trípticos para la hGH, PEG(ramificado 40K)-aldehído, y PEG(ramificado 40K)-butiraldehído (Figura 1). El fragmento tríptico N-terminal se denominó T-1. En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de T-1 presente comparado con la hGH sin PEGilar. Estos datos sugieren que el 90% de la modificación con PEG es en el extremo N, estando el resto aparentemente unido a uno de los varios restos de lisina posibles, cuando se usa PEG-aldehído comparado con más de 98% en el extremo N cuando se usa PEG-butiraldehído.

TABLA 2

	% de T-1 presente	% de T-1 presente comparado con la hGH sin PEGilar
hGH	28,0%	
PEG-aldehído/hGH	2,6%	9,2%
PEG-butiraldehído/hGH	0,3%	1,2%

Ejemplo 6**Estudios farmacodinámicos****Ganancia de peso en la rata**

5 Ratas Sprague Dawley hembra, hipofisectomizadas en Taconic Labs, se clasificaron previamente según la tasa de crecimiento durante un periodo de 7 a 11 días. Las ratas se dividieron en grupos de ocho. El grupo 1 consistía en ratas a las que se administró diariamente o el día 0 y día 6 dosis subcutánea de vehículo. Al grupo 2 se administró una dosis subcutánea diaria de GH (30 µg/rata/dosis). Al grupo 3 se administraron dosis subcutáneas de GH el día 0 y el día 6 (180 µg/rata/dosis). Al grupo 10 4 se administraron dosis subcutáneas de PEG(ramificado 40k)-butiraldehído-hGH el día 0 y 6 (180 µg/rata/dosis). Se controló en las ratas hipofisectomizadas la ganancia de peso, pesando al menos en días alternativos durante el estudio. Figuras 3 y 4.

Longitud de la tibia de rata

15 Los animales de los estudios de ganancia de peso de 11 días, se sacrificaron el día 11, se sacaron las tibias izquierdas y se analizaron por rayos X, y se midieron las longitudes de los huesos usando un calibre. Figura 5.

Estudios de IGF-1

Se usaron los animales de los estudios de ganancia de peso de seis días. Se tomaron muestras de sangre en diferente tiempos durante el estudio, y se 20 determinaron los niveles de IGF-1 en el suero por ELISA. Figura 6.

Estudios bioquímicos del suero

Se usaron los animales de los estudios de ganancia de peso de 11 días para evaluar los valores bioquímicos del suero el día 7 después de la administración acumulada de 1,8 mg/kg el día 0 y 6, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Ensayo	Vehículo	hGH (11 días con 300 µg/kg/día)	PEG-hGH (1,8 µg/kg/el día 0 y 6)
ALB (g/dL)	4,07±0,04	4,06±0,05	4,18±0,03*†
FAL (U/L)	311±15	309±16	280±14
ALT (U/L)	53,6±2,4	51,1±2,2	51,3±2,6
AST (U/L)	149±7	131±4	137±11
BUN (mg/dL)	37,4±1,6	26,7±1,5*	27,9±0,6*
Ca ²⁺ (mg/dL)	10,9±0,1	11,5±0,1*	11,0±0,1†
Col (mg/dL)	85,1±2,8	76,9±3,6*	115,3±2,8*†
CRE (mg/dL)	0,62±0,02	0,60±0,01	0,59±0,01
Glucosa (mg/dL)	73,4±4,7	79,6±4,7	67,1±8,9
Fos (mg/dL)	8,26±0,28	9,59±0,16*	8,42±0,23†
PT (g/dL)	6,36±0,10	6,48±0,10	6,39±0,06
ABT (µmol/L)	10,0±0,5	7,6±0,4*	11,0±0,4†
SDH (U/L)	11,9±1,0	9,7±1,4	10,6±0,7
Triglicéridos (mg/dL)	57,4±4,0	47,8±5,7	45,7±3,9*
LDH (U/L)	786±72	762±94	914±189
Na ⁺ (mmol/L)	147±0,5	146±0,8	145±0,6*
K ⁺ (mmol/L)	5,94±0,09	6,31±0,16*	6,71±0,17*†
Cl ⁻ (mmol/L)	103±0,5	102±0,5	102±0,6

*p<0,10 frente al vehículo, † p<0,05 frente a hGH

ALB, albúmina; FAL, fosfatasa alcalina; ALT, alanina-aminotransferasa; AST, aspartato-aminotransferasa; BUN, nitrógeno ureico en sangre; Ca²⁺, calcio; Col, colesterol; CRE, creatinina; Fos, fosfato; PT, proteína total; ABT, ácido biliar total; SDH, sorbitol-deshidrogenasa; LDH, láctico-deshidrogenasa; Na⁺, sodio; K⁺, potasio; Cl⁻, cloruro

La concentración nitrógeno ureico en sangre el día 11 disminuyó significativamente (p <0,10) en la misma medida respecto al grupo de vehículo en los animales tratados con hGH y PHA-794428. Esto indica el aumento del uso de nitrógeno como resultado

de la nueva síntesis de proteína durante el crecimiento potenciado.

Estudios farmacocinéticos

- 5 Los estudios farmacocinéticos se llevaron a cabo en ratas macho Sprague–Dawley normales canulada. Las inyecciones se administraron como un solo bolo subcutáneo de 100 µg/kg/rata de GH p PEG-GH usando seis ratas por grupo. Se tomaron muestras de sangre durante uno a cinco días según fuera adecuado para la evaluación de los parámetros FC relevantes. Se controlaron los niveles en sangre de GH y PEG-GH en cada muestra usando inmunoensayo.

Inmunoensayo de hGH

- 10 Se determinaron los niveles de concentración de proteína hGH y hGH pegilada en el plasma de ratón y de mono cynomologus, usando el inmunoensayo de fluorescencia con el kit AutoDELFIA hGH (PerkinElmer). Se controlaron los niveles de IGF-1 en rata y ser humano mediante el kit de inmunoensayo (Diagnostic System Laboratories).

- 15 ***Propiedades farmacocinéticas no compartimentales para el conjugado de hGH-PEG del Ejemplo 1 en primates no humanos***

Se administró el conjugado de hGH-PEG del Ejemplo 1 a monos cynamologus como inyecciones de bolo intravenosas (iv) o subcutáneas (sc) de 0,18 mg/kg (Tabla 4). Los parámetros FC se determinaron usándolos datos medios para n=3 animales.

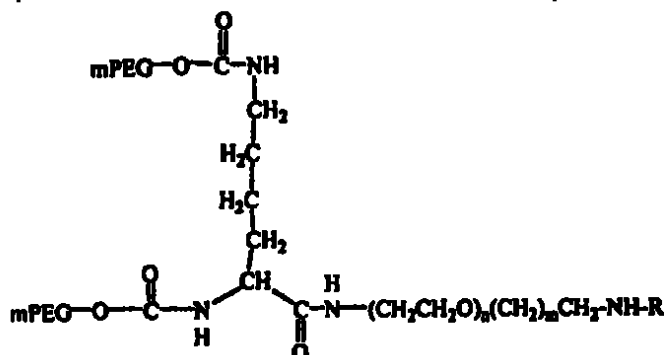
- 20 Las concentraciones en el plasma se midieron usando el kit de autoDELFIA de inmunoensayo de fluorescencia (PerkinElmer) y una curva predeterminada patrón para el conjugado de PEG-GH.

Tabla 4

Dosis (mg/kg)	iv 0,18 / sc 0,18
CL, iv (ml/h/kg)	0,8
Vd (ml/kg)	28,0
T1/2, iv (h)	25,0
T1/2, sc (h)	61,2
ABC SC (ug/ml*h)	195
Biodisponibilidad SC (%)	84
Tmax, sc (h)	32

REIVINDICACIONES

1. Un método para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno en el que es beneficioso el uso de la hormona del crecimiento, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de la hGH modificada con polietilenglicol que tiene la estructura de la fórmula I o II,



Fórmula I

o



Fórmula II

en la que

n es un número entero entre 1 y 10;

m es un número entero entre 1 y 10;

- 15 R es la hormona humana del crecimiento, metionil-hormona del crecimiento, sola o combinada con otro agente terapéutico, en el que dicha enfermedad o trastorno en el que es beneficioso el uso de la hormona del crecimiento, se selecciona del grupo que consiste en disfunción eréctil, lipodistrofia por VIH, fibromialgia, osteoporosis, trastornos de la memoria, depresión, enfermedad de Crohn, displasias
- 20 esqueléticas, lesión cerebral traumática, hemorragia subaracnoidea, síndrome de Noonan, síndrome de Down, estatura baja idiopática (EBI), enfermedad renal terminal (ERT), muy bajo peso al nacimiento (MBPN), rescate de células madre de la médula ósea, síndrome metabólico, miopatía glucocorticoide, estatura baja debida al tratamiento con glucocorticoide en niños, y retraso de crecimiento en niños pequeños
- 25 prematuros.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno en el que es beneficioso el uso de la GH, se selecciona del grupo que consiste en estatura baja idiopática, peso muy bajo al nacer, lesión cerebral traumática, síndrome

- 48 -

en la que

n es un número entero entre 1 y 10;

m es un número entero entre 1 y 10;

R es la hormona humana del crecimiento, metionil-hormona del crecimiento.

5

10. La composición de la reivindicación 9, en la que dicha hGH modificada con polietilenglicol tiene la estructura de la fórmula I con n igual a 4 y m igual a 3.

-

RESUMEN

La presente invención proporciona una hormona del crecimiento humana (hGH) químicamente modificada preparada por unión de un resto de polietilenglicol-butiraldehído a la fenilalanina N-terminal de la proteína. La proteína químicamente modificada de acuerdo con la presente invención puede tener una actividad de hGH que dura más tiempo que la de la hGH sin modificar, permitiendo una dosis menor y oportunidades de planificación. La presente invención también incluye métodos de uso para el tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos en los que es beneficioso el uso de la hormona del crecimiento.

LISTAS DE SECUENCIAS

- <110> Pharmacia Corporation
Finn, Rory
- <120> CONJUGADOS DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA MONOPEGILADOS
EN EL EXTREMO N, PROCEDIMIENTO PARA SU PREPARACIÓN Y MÉTODOS
PARA USARLOS
- <130> 32152A
- <150> 10/771895
- <151> 2004-02-04
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 191
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn 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 Asn Pro
35 40 45

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

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn 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 Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn 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

- 51 -

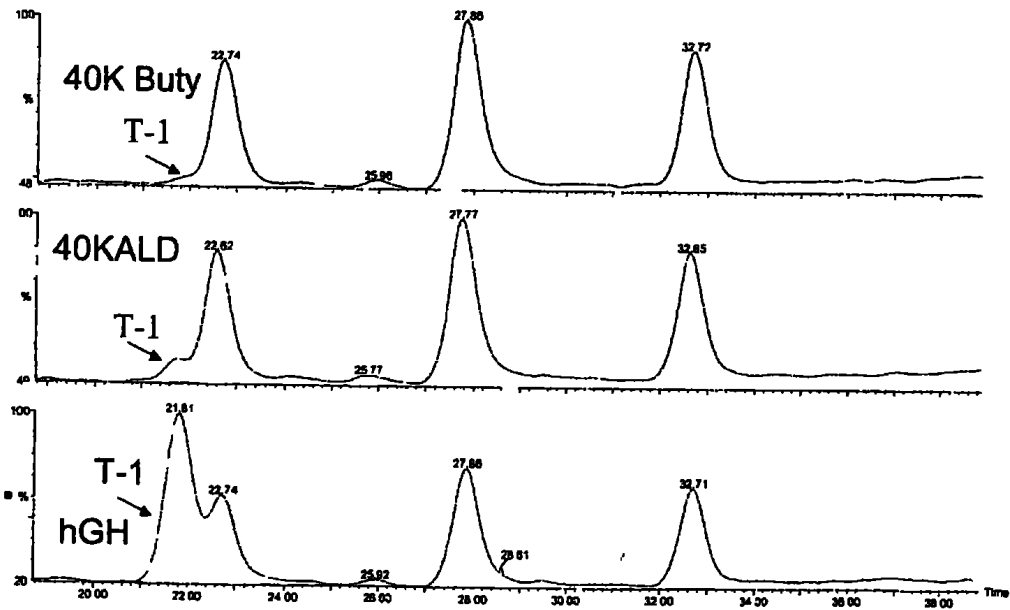
Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr
145					150					155					160

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	

64

Figura 1



52

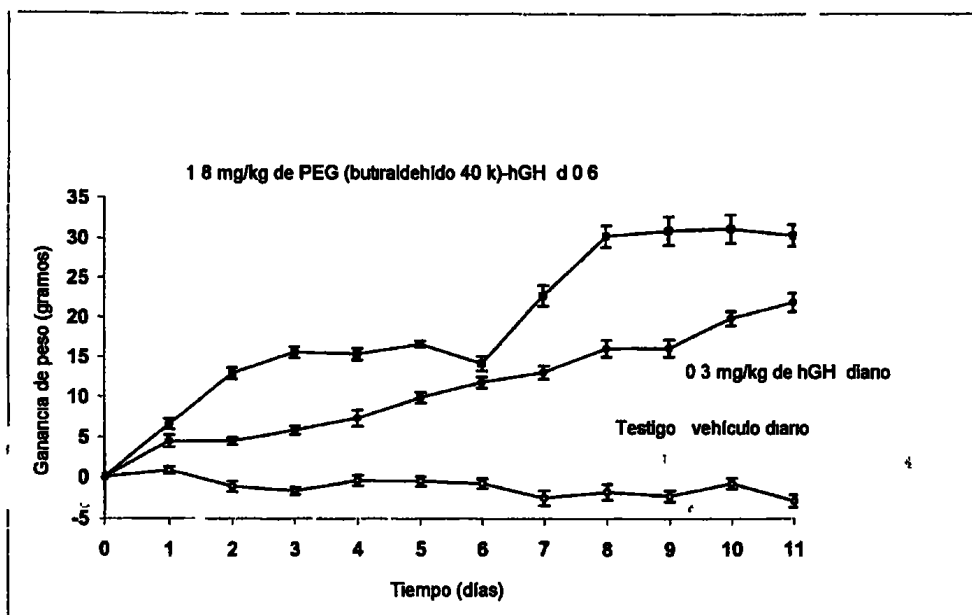
64

Figura 2

Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe	Asp	Asn	12
Ala	Met	Leu	Arg	Ala	His	Arg	Leu	His	Gln	Leu	Ala	24
Phe	Asp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Glu	Glu	Ala	Tyr	Ile	36
Pro	Lys	Glu	Gln	Lys	Tyr	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro	48
Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	Ser	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	60
Pro	Ser	Asn	Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	72
Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	84
Ser	Trp	Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Ser	Leu	Arg	Ser	Val	96
Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	108
Asn	Val	Tyr	Asp	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly	120
Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	132
Pro	Arg	Thr	Gly	Gln	Ile	Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser	144
Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	His	Asn	Asp	Asp	Ala	Leu	156
Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	Arg	Lys	168
Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Val	180
Gln	Cys	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe		191

SEC ID N° 1

Figura 3



54

106

Figura 4

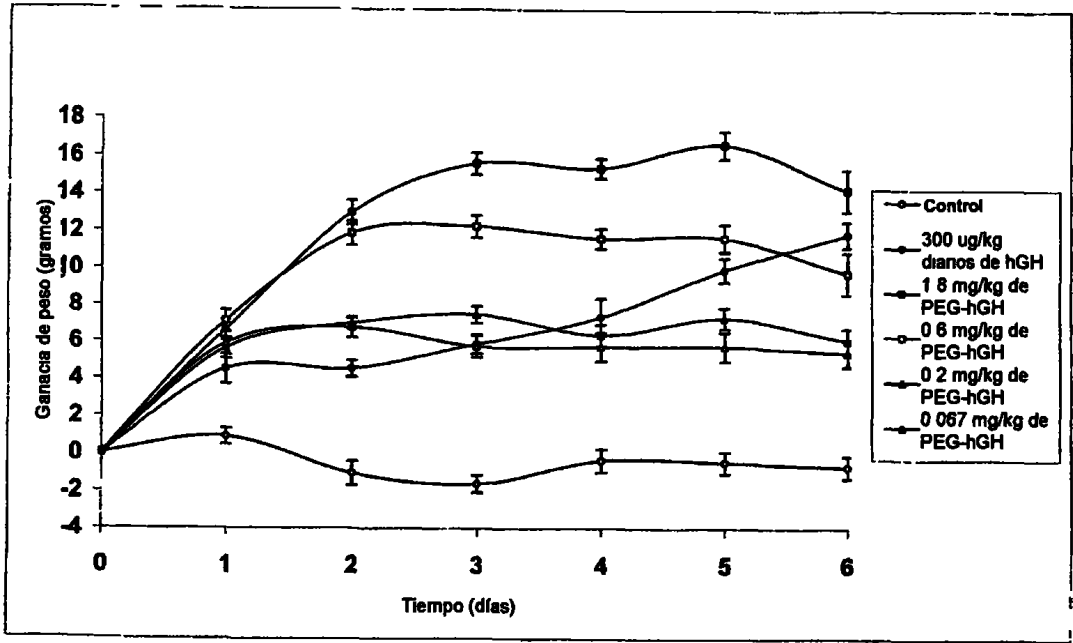
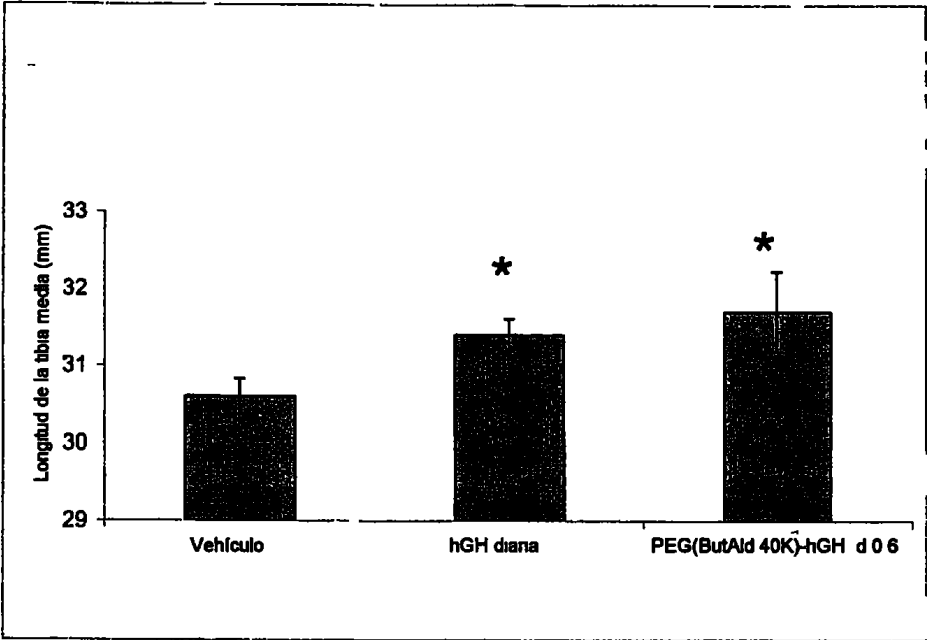


Figura 5

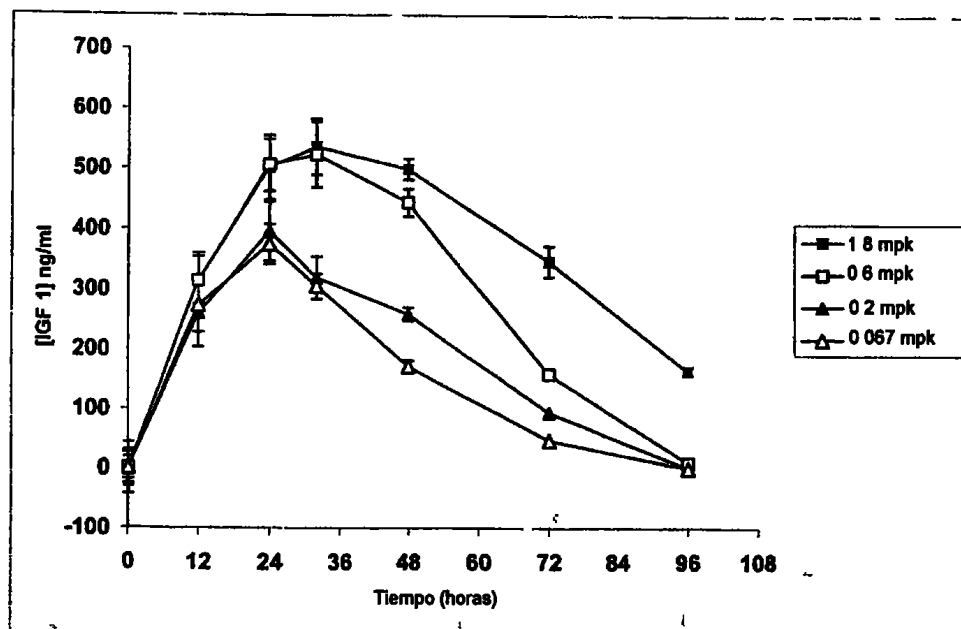


108

109

7

Figura 6



57

109

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-074318 00000-0000
Fec 2006-07 26 17 26 29 Dep 2020 NUECREACION
Tra 11 PATENTEIYN
Eve 379 FASENACIONALI

PETITORIO - FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

04/09/06

SOLICITUD DE

1

☒

Patente de Invencion

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capitulo I

☒

Capitulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre PHARMACIA CORPORATION

Dirección 700 Chesterfield Parkway West,
Chesterfield, Missouri 63017 1732, E U A

Nacionalidad o Domicilio ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución Delaware, E U A

Teléfono

Fax

E-mail

IDENTIFICACION

C C

☐

NIT

☐

C E

☐

Otro

☐

Cual

Numero

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre CARLOS R. OLARTE

Dirección World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A 37 Piso 10

Telefono 601 7700 Fax 601 7799

E-mail office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACION

C C

☒

NIT

☐

C E

☐

Otro

☐

Cual

Numero 79 782 747 Bta
TP 74 295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre RORY F. FINN

Dirección 700 Chesterfield Parkway West, Chesterfield, Missouri 63017
1732, E U A

Nacionalidad o Domicilio ESTADOUNIDENSE

PCT (86)

5

Solicitud Internacional No PCT/IB2005/000171

Fecha

Enero 24, 2005

Publicacion Internacional No WO 2005/079838

Fecha

Septiembre 1, 2005

6

Titulo (54) CONJUGADOS DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA
MONOPEGILADOS EN EL N-TERMINAL. PROCESO PARA SU PREPARACION Y
METODO PARA SU USO

Clasificación Internacional (51) A61K 38/27

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) Pais de Origen

US

(32) Fecha

Febrero 4 2004

(31) Numero de Solicitud

10/771 895

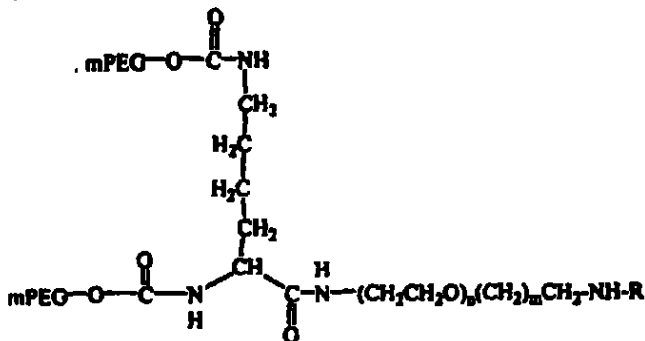
9

Comprobante de pago No 06-54 708

Fecha Julio 18 de 2006

REIVINDICACIONES

Un método para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno en el que es beneficioso el uso de la hormona del crecimiento, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de la hGH modificada en polietilenglicol que tiene la estructura de la fórmula I o II,



Fórmula I

O



Fórmula II

en la que

n es un número entero entre 1 y 10;

m es un número entero entre 1 y 10;

R es la hormona humana del crecimiento, metionil-hormona del crecimiento,

sola o combinada con otro agente terapéutico, en el que dicha enfermedad o trastorno en el que es beneficioso el uso de la hormona del crecimiento, se selecciona del grupo que consiste en disfunción eréctil, lipodistrofia por VIH, fibromialgia, osteoporosis, trastornos de la memoria, depresión, enfermedad de Crohn, displasias óseas, lesión cerebral traumática, hemorragia subaracnoidea, síndrome de Noonan, síndrome de Down, estatura baja idiopática (EBI), enfermedad renal terminal (ERT), muy bajo peso al nacimiento (MBPN), rescate de células madre de la médula ósea, síndrome metabólico, miopatía glucocorticoide, estatura baja debida al tratamiento con glucocorticoide en niños, y retraso de crecimiento en niños pequeños prematuros.

El método de la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno en el que es beneficioso el uso de la GH, se selecciona del grupo que consiste en estatura baja idiopática, peso muy bajo al nacer, lesión cerebral traumática, síndrome

metabólico y síndrome de Noonan.

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION: PCT

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Descripción de la invención []
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotografica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable _____

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador 3 82 08 40
Fax 350 52 20
E-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogota, D C , Colombia

113

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PHARMACIA CORPORATION

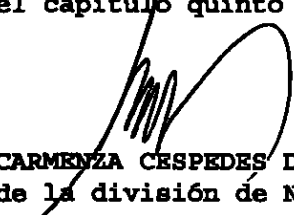
REFERENCIA	Radicación No.	6 74318
	Solicitud internacional	IB2005/000171
	Fecha inicio fase nacional	04/09/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	11111

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior, requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 29 SET. 2006
a alvarado