

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 946**

51 Int. Cl.:

C07K 17/08 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 5/06 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
C07K 14/61 (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2008 E 08733888 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2272875**

54 Título: **Hormona del crecimiento modificada con polietilenglicol bicatenario, método de preparación y aplicación de esta**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2014

73 Titular/es:

BIOSTEED GENE EXPRESSION TECH. CO., LTD.
(100.0%)
No. 330, Wengjiao Road Xinyang Industrial Zone
Haicang
Xiamen, Fujian 361022, CN

72 Inventor/es:

ZHOU, WEIDONG;
LIAO, XIAOJIN;
SUN, LI;
ZHANG, LINZHONG;
LU, QINGSONG;
SHEN, SHIYE;
YANG, LISHAN;
ZHANG, DEFANG;
LIN, HUIHUANG y
ZHANG, PING

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 453 946 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Hormona del crecimiento modificada con polietilenglicol bicatenario, método de preparación y aplicación de esta

5 **Campo técnico**

[0001] La invención pertenece al campo de tecnología de preparación biológica, en particular a una hormona del crecimiento (GH) modificada con polietilenglicol bicatenario (PEG) con actividad biológica alta, y el método de preparación de esta, al igual que el uso de la hormona del crecimiento pegilada obtenida en el campo farmacéutico.

10

Estado de la técnica

[0002] La hormona de crecimiento humana (HuGH) es una hormona de proteína segregada por la glándula pituitaria anterior humana, el precursor de la cual consiste en 217 residuos de aminoácidos, donde los primeros 26 residuos de aminoácidos componen un péptido señal, y los restantes 191 residuos de aminoácidos componen la molécula madura. Hay dos enlaces disulfuro intra-moleculares (Cys79 y Cys191; Cys208 y Cys215), y la molécula no está glicosilada con un peso molecular de 22kD. La secuencia del HuGH se describe en SEC ID n.º: 1 (NCBI: P01241; AAA72260; Denoto F M, et al. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.*, 9: 3719-3730, 1981; Roskam W, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the human growth hormone structural gene. *Nucleic Acids Res.*, 7: 305-320, 1979; Martial J A, et al. Human growth hormone: Complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science*, 205: 602-607, 1979; Chen E Y, et al. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics*, 4: 479-497, 1989). Las funciones primarias del HuGH incluyen promover el crecimiento de una célula, órgano o hueso, y está íntimamente relacionado con el anabolismo del cuerpo (Iglesias P, et al. Recombinant human growth hormone therapy in malnourished dialysis patients: a randomized controlled study. *Am. J. Kidney Dis.*, 32(3): 454-463, 1998; Neely E K, Use and abuse of human growth hormone. *Annu. Rev. Med.*, 45:407-410, 1994). Después de más de 20 años de aplicación clínica de la hormona de crecimiento humana recombinante (rHuGH) producida por tecnología del ADN recombinante, la eficacia clínica y seguridad del rHuGH han sido demostradas.

15

20

25

30

35

40

[0003] Los resultados de muchas investigaciones han indicado que, rHuGH muestra efectos terapéuticos significativos en el tratamiento del enanismo, quemaduras, heridas, fracturas de hueso, úlceras de sangrado, insuficiencia renal, SIDA, trastornos anabólicos, enanismo por deficiencia de hormona del crecimiento endógena, síndrome Turner y deficiencia de la hormona del crecimiento adulta, y también muestra efecto significativo en la terapia antienvjecimiento. Actualmente, rHuGH es el único medicamento eficaz para el tratamiento del enanismo. En marzo de 2001, las indicaciones que han sido aprobadas por FDA para introducir investigación clínica de rHuGH incluyen: tratamiento intensivo de retención de nitrógeno de quemaduras severas, síndrome de intestino corto (administrado solo o en combinación con glutamina), detención del crecimiento relacionado con SIDA etc. Actualmente, las indicaciones de rHuGH que han sido aprobadas para el mercado incluyen: enanismo por deficiencia de la hormona del crecimiento endógena de adolescentes, enanismo relacionado con el síndrome Turner, enanismo por deficiencia de la hormona del crecimiento de órgano o espontáneo de adolescentes, síndrome Prader-Willi, trastorno del crecimiento prematuro, trastorno catabólico relacionado con SIDA, insuficiencia renal crónica relacionada con retraso del crecimiento y deficiencia de la hormona del crecimiento adulta etc.

45

50

55

[0004] El polietilenglicol es un polímero orgánico inerte, biodegradable y no tóxico, y es importante en los campos tanto de la biotecnología como de la farmacéutica. La técnica de la modificación con PEG es conectar PEG a una proteína activa a través de un enlace covalente. Después de la polietilenglicolación (PEGilación), las propiedades de la proteína pueden mejorar significativamente, por ejemplo la prolongación de la vida media metabólica del medicamento, la reducción de inmunogenicidad, el aumento de seguridad, la mejora de eficacia terapéutica, la reducción de la frecuencia de dosificación, el aumento de la solubilidad de medicamento/solubilidad de agua, el aumento de resistencia contra la proteólisis, la facilitación de la liberación controlada del medicamento etcétera (Inada et al. *J. Bioact. and Compatible Polymers*, 5, 343, 1990; Delgado, et al. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 9, 249, 1992; Katre, *Advanced Drug Delivery Systems*, 10, 91, 1993 and Davis et al. U.S. Patent N.º 4179337). Se describe en la patente EE. UU. n.º 4179337 que después de enlazar PEG a una proteína tal como una enzima o insulina, la inmunogenicidad de la proteína se redujo, mientras que simultáneamente las actividades de la proteína se redujeron también, pero al mismo tiempo la proteína modificada retuvo una proporción determinada de las actividades de la proteína no modificada original. Tal efecto fue también encontrado en G-CSF (Satake-Ishikawa et al. *Cell Structure and Function*, 17, 157-160, 1992), IL-2 (Katre et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1487, 1987), TNF- α (Tsutsumi et al. *Jpn. J. Cancer Res.*, 85, 9, 1994), IL-6 (Inoue et al. *J. Lab. Clin. Med.*, 124, 529, 1994) y CD4-IgG (Chamow et al. *Bioconj. Chem.*, 5, 133, 1994).

60

[0005] Se describe en la patente EE. UU. n.º 5824784 que un modificador PEG con un grupo aldehído al final fue usado para obtener un PEG-G-CSF que fue modificado por un único PEG en un sitio fijo (aminoácido N-terminal de la proteína). El modificador PEG-NHS sintetizado por activación con N-hidroxisuccinimida (NHS) puede formar un enlace amida con grupo el ϵ -amino de lisina en G-CSF. PEG-NHS tiene una alta actividad química pero selectividad pobre, y así es difícil obtener un

producto modificado por un único PEG en un sitio fijo. En comparación con un producto modificado multi-PEG, el producto modificado mono-PEG es más homogéneo y es así beneficioso para la separación y purificación, que por lo tanto facilita el control de la calidad y asegura estabilidad entre lotes en la producción a gran escala.

5 [0006] Actualmente algunos tipos de fármacos de proteína terapéutica pegilada, tal como adenosina deaminasa pegilada (Adagen.RTM, Enzon Pharmaceuticals), L-asparaginasa pegilada (Oncapspar.RTM, Enzon Pharmaceuticals), interferón- α 2b pegilado (PEG-Intron.RTM, Schering-Plough) e interferón- α 2a pegilado (Pegasys, Roche), factor estimulante de colonias de granulocitos pegilado (Neulasta.RTM, Amgen), han sido aplicados clínicamente. El metabolismo *in vivo* de la fracción de PEG en un medicamento (o PEG en sí mismo) ha sido ya claramente entendido, y se ha probado que el PEG es un buen y
10 seguro modificador de medicamento sin ningún efecto adverso.

[0007] El PEG que se puede enlazar a un medicamento de proteína normalmente necesita ser derivatizado, de modo que uno o dos grupos terminales en los extremos de PEG pueden ser químicamente activados para poseer un grupo funcional apropiado que muestre actividad para, y así pueda formar un enlace covalente estable con, al menos un grupo funcional del medicamento al que se debe enlazar. Por ejemplo, PEG se puede enlazar al ϵ -NH₂ de un residuo de Lys en la cadena peptídica de proteína, o al α -NH₂ del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena peptídica de proteína. Hay normalmente tres formas de politilenglicoles que han sido usadas para modificar una proteína: una molécula de cadena lineal (EP 0593868; Yu-Sen Wang et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54: 547-570, 2002; Yu-Sen Wang et al. *Biochemistry*, 39, 10634-10640, 2000.), una molécula ramificada en forma de U (EP 0809996) y una molécula ramificada en forma de Y (CN1243779C, EP1496076). La Patente Europea n.º EP0809996 describe la PEGilación de IFN- α .
15
20

[0008] Se cree generalmente en la técnica que, después de la modificación con PEG, las propiedades de la mayoría de proteínas sufrirán los siguientes cambios: 1. la inmunogenicidad y antigenicidad se reducen; 2. la vida media cíclica se prolonga; 3. la solubilidad aumenta; 4. la proteína es tolerante a proteólisis; 5. la disponibilidad biológica aumenta; 6. la toxicidad disminuye; 7. la termoestabilidad y estabilidad mecánica aumenta; 8. el punto isoelectrónico, el comportamiento electroforético, y propiedades dinámicas cambian, etc. Además, uno de los puntos más importantes es que la modificación con PEG tendrá como resultado la reducción de las actividades celulares de una proteína, que es principalmente debido a los grupos que han sido introducidos en el producto final, incluyendo PEG y los enlaces entre PEG y la proteína que debe ser modificada, y también relacionado con las condiciones de acoplamiento al igual que el producto secundario generado. Doris Brugger et al. (Patente EE. UU., Pub. n.º: US 2004/0223950 A1) divulga que los productos de modificación del interferon- α 2a mono-modificado por un único UPEG bicatenario en uno de diferentes sitios muestran actividades antivirales *in vitro* significativamente diferentes, donde el producto de modificación mono-modificado por UPEG en el sitio Lys31 tiene la máxima actividad específica, mientras que el producto mono-modificado por UPEG en el sitio Lys121 tiene la actividad específica mínima, donde la diferencia entre ambos puede ser hasta 5 veces.
25
30
35

[0009] Li, Weihua et al. (China Patent Pub. N.º: CN 1477126A) divulga un método de preparación de una hormona del crecimiento modificada con PEG. Se prefiere llevar a cabo la reacción de modificación de la hormona del crecimiento por PEG ramificado (mPEGn-NHS) a pH 6,5-7,0, y la actividad biológica de la hormona del crecimiento purificada mono-modificada por PEG ramificado en un único sitio fue medida utilizando ratas con las glándulas pituitarias quitadas. Los resultados demuestran que la hormona del crecimiento acoplada a PEG (donde PEG es PEG-NHS bicatenario con un peso molecular de 40kD) tiene efecto de aumento de peso comparable a la misma cantidad de hormona del crecimiento inyectada diariamente.
40
45

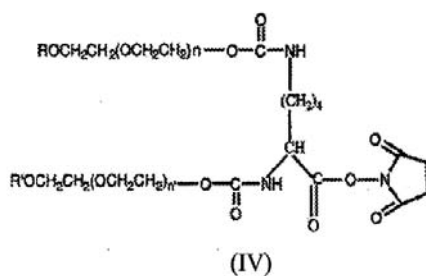
Resumen de la invención

[0010] La invención proporciona un método de preparación de una hormona del crecimiento modificada con PEG bicatenario, que comprende:

50 a) en una solución con un pH no inferior a 6,0, preferiblemente no inferior a 7,0, preferiblemente no inferior a 8,0, preferiblemente no inferior a 9,0, preferiblemente no inferior a 9,5, preferiblemente no inferior a 10,0, de la forma más preferible pH 10,5, poner en contacto PEG bicatenario ramificado en forma de U o de Y con la hormona del crecimiento, preferiblemente hormona de crecimiento humana, preferiblemente la proporción molar de la hormona del crecimiento respecto al PEG bicatenario siendo aproximadamente 1: 2;

55 b) evaluar el producto modificado por PEG en un único sitio obtenido en el paso a) en SDS-PAGE de concentración apropiada, preferiblemente 12% SDS-PAGE, donde el producto muestra dos bandas o es principalmente una banda de peso molecular aparente inferior;

60 c) separar y recuperar el producto de peso molecular aparente inferior en dichas dos bandas que está modificado por PEG en un único sitio;



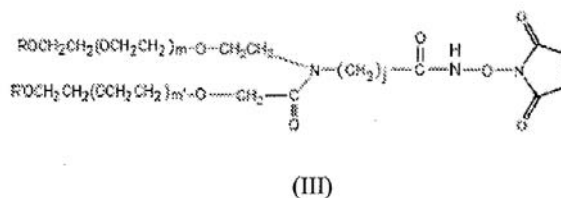
5

10 donde, R y R' son independientemente alquilo de bajo peso molecular, preferiblemente alquilo C₁-C₄; n y n' indican el grado de polimerización y pueden ser cualquier número entero; n+n' está preferiblemente entre 600 y 1500, de la forma más preferible 910; el peso molecular medio del PEG con forma de U es de aproximadamente 26kD a 66kD, de la forma más preferible aproximadamente 40 kD.

15 [0015] En una forma de realización preferida, la invención proporciona un método de preparación de una hormona del crecimiento modificada con PEG bicatenario, que comprende:

20 a) poner en contacto en una solución con pH 9,0 o 10,5, el PEG de la siguiente fórmula (III) con la hormona de crecimiento humana, donde la proporción molar de la hormona del crecimiento respecto al PEG bicatenario es aproximadamente 1: 2;

20



25

30 donde, R y R' son independientemente alquilo de bajo peso molecular, preferiblemente alquilo C₁-C₄, de la forma más preferible metilo; m+m' es 910; j es un número entero de 1 a 12; el peso molecular total medio del PEG es aproximadamente 40kD;

35 b) evaluar el producto modificado por el PEG en un único sitio obtenido en el paso a) en 12% SDS-PAGE, donde el producto muestra dos bandas;

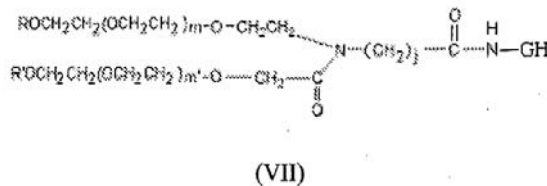
40 c) purificación, separación y recuperación del producto de peso molecular aparente inferior que está modificado en un único sitio, usando cromatografía de gel seleccionada de cromatografía Q Sepharose FF, cromatografía DEAE Sepharose FF o cromatografía MacroCap SP.

[0016] La invención también proporciona una hormona del crecimiento pegilada preparada según el método descrito anteriormente, donde la hormona del crecimiento es extraída de una fuente natural o es una hormona del crecimiento recombinante obtenida por las biotecnologías recombinantes, preferiblemente la hormona del crecimiento tiene la secuencia de SEC ID n.º:1.

45

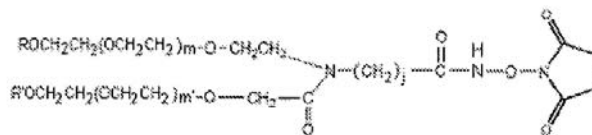
[0017] En una forma de realización preferida, la invención proporciona una hormona del crecimiento pegilada de la siguiente fórmula (VII), que se prepara según el método descrito anteriormente y tiene un peso molecular de 62kD:

50



55

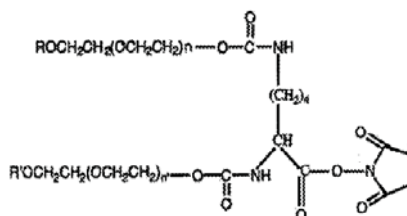
60 donde, R y R' son independientemente alquilo de bajo peso molecular, preferiblemente alquilo C₁-C₄, de la forma más preferible metilo; m+m' es 910; y j es un número entero de 1 a 12.



(III)

donde, R y R' son independientemente alquilo de bajo peso molecular, preferiblemente alquilo C₁-C₄, de la forma más preferible metilo; m y m' indican el grado de polimerización y pueden ser cualquier número entero; m+m' está preferiblemente entre 600 y 1500, de la forma más preferible 910; j es un número entero de 1 a 12; preferiblemente el peso molecular total medio del PEG es de aproximadamente 26 kD a 60 kD, preferiblemente 40 kD.

[0022] En una forma de realización preferida, la invención proporciona un método de preparación de una preparación de hormona del crecimiento modificada con PEG bicatenario, donde el PEG bicatenario es PEG con forma de U de la siguiente fórmula estructural (IV),

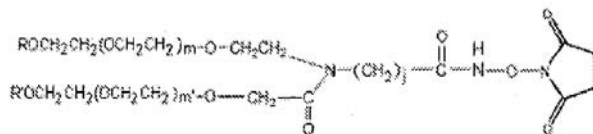


(IV)

donde, R y R' son independientemente alquilo de bajo peso molecular, preferiblemente alquilo C₁-C₄; n y n' indican el grado de polimerización y pueden ser cualquier número entero; n+n' está preferiblemente entre 600 y 1500, de la forma más preferible 910; el peso molecular medio del PEG con forma de U es de aproximadamente 26kD a 66kD, de la forma más preferible aproximadamente 40 kD.

[0023] En una forma de realización preferida, la invención también proporciona un método de preparación de una preparación de hormona del crecimiento modificada con PEG bicatenario, que comprende:

a) en una solución con pH 9,0 o 10,5, poner el PEG de la siguiente fórmula (III) en contacto con la hormona de crecimiento humana, donde la proporción molar de la hormona del crecimiento respecto al PEG bicatenario es aproximadamente 1: 2



(III)

donde, R y R' son independientemente alquilo de bajo peso molecular, preferiblemente alquilo C₁-C₄; m+m' es 910, j es un número entero de 1 a 12; el peso molecular total medio del PEG es aproximadamente 40 kD;

b) evaluar el producto modificado por PEG en un único sitio obtenido en el paso a) en 12% SDS-PAGE;

c) separar y recuperar el producto modificado por PEG en un único sitio usando cromatografía de gel seleccionada de cromatografía Q Sepharose FF, cromatografía DEAE Sepharose FF o cromatografía MacroCap SP, y el contenido en SDS-

una rata con su glándula pituitaria eliminada como modelo animal y la hormona de crecimiento humana recombinante como control positivo, la actividad biológica *in vivo* del producto de alta actividad celular modificado en un único sitio se evalúa según el bioensayo de hormona crecimiento como se describe en Pharmacopoeia of the People's Republic of China, version 2005, Volume 2, Appendix XII P. El producto de alta actividad celular modificado en un único sitio tiene una actividad específica biológica significativamente más alta que la hormona del crecimiento normal, mostrando más de 1,5 veces de la actividad biológica de la hormona del crecimiento normal, y se muestra en la investigación farmacocinética en el macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) que tiene un promedio de vida media metabólica de medicamento en el suero más de 20 veces más largo que la de la hormona del crecimiento normal, y así tiene efectos a largo plazo.

[0030] En una forma de realización de la invención, la reacción de modificación de la hormona del crecimiento con el PEG-NHS bicatenario se realiza a pH 8,0, se utiliza electroforesis SDS-PAGE para el ensayo de los productos de la reacción, y coloración de plata se usa para visualización. Es sorprendente que, el producto de hormona del crecimiento modificado por PEG en un único sitio muestra dos bandas principales, lo cual es diferente de informes precedentes (Ross Clark, Kenneth Olson, et al. Long-acting growth hormones produced by conjugation with polyethylene glycol. J. Biol. Chem., 271:21969-21977, 1996. Li, Weihua, Dong Jian et al., Long-term effective growth hormone and the pharmacological composition, China Patent Pub. n.º: CN1477126A). En experimentos posteriores, las modificaciones de la hormona del crecimiento por PEG-NHS bicatenario realizadas en un rango de pH 6,0-10,5 han sido estudiadas, y se ha encontrado por SDS-PAGE que todos los productos modificados en un único sitio muestran dos bandas principales. Conforme el pH aumenta, el contenido de la banda de peso molecular aparente inferior también aumenta. A pH \geq 10,0, el producto modificado en un único sitio muestra sustancialmente una banda de peso molecular aparente inferior.

[0031] En una forma de realización preferida de la invención, algunas técnicas de purificación de cromatografía de gel apropiadas se utilizan para preparar la hormona de crecimiento humana recombinante purificada modificada por PEG en un único sitio a pH 10,5 y pH 6,0 respectivamente. SDS-PAGE con 12% de gel de separación se usa para la detección, y coloración de plata se usa para visualización. La hormona de crecimiento humana recombinante purificada modificada por PEG en un único sitio a pH 6,0 claramente muestra dos bandas. La hormona de crecimiento humana recombinante purificada modificada por PEG en un único sitio a pH 10,5 muestra principalmente la banda de peso molecular aparente inferior, el contenido de SDS-PAGE del cual no es inferior al 80%. Sólo cantidades traza de la proteína de sustrato se detecta en ambos casos (no más del 0,5%). MALDI-TOF MS confirma que los productos modificados en las dos condiciones de pH son sustancialmente los productos de hormona del crecimiento modificados por PEG en un único sitio. El ensayo de actividad celular indica que el producto modificado en un único sitio a pH 10,5 tiene una actividad celular significativamente más alta que el producto modificado en un único sitio a pH 6,0, la actividad específica celular del anterior es alrededor de dos veces la de este último.

[0032] En una forma de realización preferida de la invención, el producto de modificación purificado de la hormona de crecimiento humana recombinante, que se modifica por PEG en un único sitio a pH 6,0 y tiene un peso molecular aparente más alto, se prepara por purificación por cromatografía Q Sepharose FF o purificación por cromatografía MacroCap SP etc. La detección MALDI-TOF MS confirma que la hormona de crecimiento humana recombinante modificada por PEG es un producto modificado por PEG en un único sitio, y el ensayo de actividad celular ha demostrado que su actividad específica celular es significativamente inferior la de la hormona de crecimiento humana recombinante purificada modificada en un único sitio (con un peso molecular aparente inferior) a pH 10,5. La actividad específica celular del último es hasta 3 veces la del anterior.

[0033] En otra forma de realización de la invención, según el bioensayo para hormona del crecimiento como se describe en Pharmacopoeia of the People's Republic of China, version 2005, Volume 3, Appendix XII P, utilizando hormona de crecimiento humana recombinante como control positivo, el método que utiliza una rata con glándula pituitaria eliminada se utiliza para ensayo de la actividad biológica *in vivo* de los productos de modificación de la hormona de crecimiento humana recombinante modificada por PEG-NHS de 40kD en un único sitio a pH 10,5. La hormona de crecimiento humana recombinante se administra una vez todos los días, 6 veces en total. El producto de la hormona de crecimiento humana recombinante modificada por PEG en un único sitio se administra una vez en una dosis igual que la suma de 6 veces la administración de la hormona de crecimiento humana recombinante. La hormona de crecimiento humana recombinante modificada por PEG en un único sitio tiene una actividad biológica significativamente más alta que la hormona de crecimiento humana recombinante, y puede alcanzar hasta una actividad específica biológica superior a 1,5 veces la de la última. Su farmacología tiene un efecto a largo plazo. La investigación farmacocinética en el macaco cangrejero ha demostrado que la vida media metabólica de medicamento de la hormona de crecimiento humana recombinante modificada por PEG en un único sitio se alarga más de 20 veces la de la hormona del crecimiento recombinante normal.

[0034] La invención emplea derivados de PEG ramificado (ramificado con forma de Y y ramificado con forma de U) para modificar la hormona de crecimiento. El derivado de PEG ramificado con forma de Y empleado en la invención es un derivado de PEG ramificado nuevo, la estructura del cual es diferente de PEG lineal o PEG ramificado con forma de U, y su diferencia principal de PEG ramificado con forma de U reside en que las dos cadenas de PEG ramificado del derivado de

proporciona una composición que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de la GH pegilada de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente. El portador farmacéuticamente aceptable usado en la invención comprende poner un portador farmacéuticamente aceptable, estabilizador o excipiente que no es tóxico para la célula o mamífero en contacto con este en la dosificación usada o concentración. Normalmente un portador fisiológicamente aceptable es un tampón de pH acuoso. Ejemplos de un portador fisiológicamente aceptable comprenden un tampón tal como fosfato, citrato, y otro tampón de ácido orgánico, un antioxidante tal como ácido ascórbico, un polipéptido de peso molecular bajo (no más de 10 residuos), una proteína tal como seralbúmina, gelatina, o inmunoglobulina, un polímero hidrofílico tal como polivinilpirrolidona, un aminoácido tal como glicina, aspartato, glutamina, asparagina, arginina o lisina, un monosacárido tal como glucosa y manosa, otros sacáridos como disacárido y dextrina etc., un agente quelante tal como EDTA, un alcohol de azúcar tal como manitol y sorbitol, un contraión que forma sales tal como sodio, y/o un surfactante no iónico tal como TWEEN, PEG y PLURONICS. El excipiente es preferiblemente estéril y está normalmente libre de sustancias nocivas. La composición se puede esterilizar utilizando técnicas de esterilización de rutina. En una forma de realización de la invención, la composición comprende además manitol, un aminoácido, cloruro sódico, ácido acético y acetato sódico, donde el aminoácido es preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en lisina, aspartato, asparagina y glicina.

[0044] En otro aspecto, la invención también proporciona el uso de la GH pegilada de la invención o la composición que comprende la GH pegilada de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que necesita tratamiento con GH y para tratamiento de antienviejamiento. Preferiblemente, la enfermedad que necesita tratamiento con GH se selecciona del grupo que consiste en enanismo, quemaduras, heridas, fracturas de hueso, úlceras de sangrado, insuficiencia renal, SIDA, enanismo por deficiencia de hormona del crecimiento endógena, síndrome Turner, trastorno anabólico y deficiencia de hormona del crecimiento adulta.

Descripción de las figuras

[0045]

Fig. 1: los resultados de SDS-PAGE no reductivo de las muestras de rHuGH modificadas por YPEG-NHS 40kD o UPEG-NHS 40kD a pH 8,0. La concentración del gel de separación es 12%, y coloración de plata se usa para visualización. Línea 1: marcador, LMW, GE Healthcare; Línea 2: muestra de rHuGH modificada por YPEG-NHS a pH 8,0, cantidad de carga 2µg; Línea 3: muestra de rHuGH modificada por YPEG-NHS a pH 8,0, cantidad de carga 5µg; Línea 4: muestra rHuGH modificada por UPEG-NHS a pH 8,0, cantidad de carga 5µg.

Fig. 2: los resultados de SDS-PAGE no reductivo de muestras de rHuGH modificadas por YPEG-NHS 40kD a pH diferentes. La concentración del gel de separación es 12%, y coloración de plata se usa para visualización. Línea 1: muestra de rHuGH modificada por YPEG-NHS a pH 6,0; Línea 2: muestra de rHuGH modificada por YPEG-NHS a pH 7,0; línea 3: muestra de rHuGH modificada por YPEG-NHS a pH 8,0; línea 4: muestra de rHuGH modificada por YPEG-NHS a pH 9,0; línea 5: muestra rHuGH modificada por YPEG-NHS a pH 9,5; línea 6: muestra de rHuGH modificada por YPEG-NHS a pH 10,0; línea 7: muestra de rHuGH modificada por YPEG-NHS a pH 10,5; línea 8: marcador, LMW, GE Healthcare. La cantidad de carga de todas muestras es 5µg.

Fig. 3: los resultados de SDS-PAGE no reductivo de las muestras de rHuGH modificada por UPEG-NHS a diferentes pH. La concentración del gel de separación es 12%, y coloración de plata se usa para visualización. Línea 1: muestra de rHuGH modificada por UPEG-NHS a pH 6,0; línea 2: muestra rHuGH modificada por UPEG-NHS a pH 7,0; línea 3: muestra de rHuGH modificada por UPEG-NHS a pH 8,0; línea 4: muestra de rHuGH modificada por UPEG-NHS a pH 9,0; línea 5: muestra de rHuGH modificada por UPEG-NHS a pH 9,5; línea 6: muestra de rHuGH modificada por UPEG-NHS a pH 10,0; línea 7: muestra de rHuGH modificada por UPEG-NHS a pH 10,5; línea 8: marcador, LMW, GE Healthcare. La cantidad de carga de todas muestras es 5µg.

Fig. 4: los resultados de SDS-PAGE no reductivo de los productos de modificación purificados de rHuGH modificados por YPEG-NHS 40kD O UPEG-NHS 40kD en un único sitio a pH 6,0 o pH 10,5. La concentración del gel de separación es 12%, y coloración de plata se usa para visualización. Línea 1: UPEG-rHuGH U10,5, cantidad de carga 10µg; Línea 2: UPEG-rHuGH U10,5, cantidad de carga 2µg; Línea 3: UPEG-rHuGH U6,0, cantidad de carga 10µg; Línea 4: UPEG-rHuGH U6,0, cantidad de carga 2µg; Línea 5: marcador, LMW, GE Healthcare; línea 6: YPEG-rHuGH Y10,5, cantidad de carga 10µg; línea 7: YPEG-rHuGH Y10,5, cantidad de carga 2µg; línea 8: YPEG-rHuGH Y6,0, cantidad de carga 10µg; línea 9: YPEG-rHuGH Y6,0, cantidad de carga 2µg; línea 10: rHuGH, cantidad de carga 100ng; línea 11: rHuGH, cantidad de carga 50ng.

Fig. 5: los resultados del ensayo de la actividad celular de los productos de modificación de rHuGH purificados modificados por UPEG-NHS 40kD en un único sitio a pH 6,0 o pH 10,5, placas de duplicado.

Fig. 6: los resultados del ensayo de la actividad celular de los productos de modificación de rHuGH purificados modificados por YPEG-NHS 40kD en un único sitio a pH 6,0 o pH 10,5, placas de duplicado.

Fig. 7: los pesos moleculares de los productos de modificación de rHuGH purificados modificados por YPEG-NHS 40kD o UPEG-NHS 40kD en un único sitio a pH 6,0, pH 9,0 o pH 10,5, detectado por MALDI-TOF MS. a: YPEG-rHuGH, Y6; b: YPEG-rHuGH, Y9; c: YPEG-rHuGH, Y10,5; d: YPEG-rHuGH, Y6-1; e: UPEG-rHuGH, U6; f: UPEG-rHuGH, U9; g: UPEG-rHuGH, U10,5; h: UPEG-rHuGH, U6-1; i: YPEG-NHS, 40kD; J: UPEG-NHS, 40kD; K: estándar calibrado de proteína II,

BRUKER; 1: rHuGH; m: estándar calibrado de proteína I, BRUKER.

Fig. 8: los resultados de SDS-PAGE no reductivo del producto de modificación de rHuGH purificado de peso molecular aparente más alto modificado por PEG-NHS 40kD en un único sitio a pH 6,0, y del producto de modificación de rHuGH purificado modificado por PEG-NHS 40kD en un único sitio a pH10,5. La concentración del gel de separación es 12%, y coloración de plata se usa para visualización. Línea 1: YPEG-rHuGH Y10,5, cantidad de carga 2µg; Línea 2: YPEG-rHuGH Y6,0-1, cantidad de carga 2µg; Línea 3: UPEG-rHuGH U10,5, cantidad de carga 2µg; Línea 4: UPEG-rHuGH U6,0-1, cantidad de carga 2µg; línea 5: rHuGH, cantidad de carga 50ng; línea 6: rHuGH, cantidad de carga 100ng; línea 7: marcador, LMW, GE Healthcare; línea 8: YPEG-rHuGH Y10,5, cantidad de carga 10µg; línea 9: YPEG-rHuGH Y6,0-1, cantidad de carga 10µg; línea 10: UPEG-rHuGH U10,5, cantidad de carga 10µg; línea 11: UPEG-rHuGH U6,0-1, cantidad de carga 10µg.

Fig. 9: los pesos moleculares aparentes detectados por SDS-PAGE no reductivo de los productos de modificación de rHuGH purificados (Y6-1; U6-1) de peso molecular aparente más alto modificados por PEG-NHS 40kD en un único sitio a pH 6,0, y de los productos de modificación de rHuGH purificados (Y10,5; U10,5) modificados por PEG-NHS 40kD en un único sitio a pH10,5. Línea 1: YPEG-rHuGH Y6-1+YPEG-rHuGH Y10,5, cada 25ng; línea 2: YPEG-rHuGH Y6-1,50ng de Y6-1,50ng; línea 3: YPEG-rHuGH Y10,5, 50ng; línea 4,6: blanco; línea 5: marcador, HMW, GE Healthcare; línea 7: UPEG-rHuGH U6-1+UPEG-rHuGH U10,5, cada 25ng; línea 8: UPEG-rHuGH U6-1,50ng de U6-1,50ng; línea 9: UPEG-rHuGH U10,5, 50ng.

Fig. 10: la curva de concentración de medicamento de suero medio vs. tiempo de inyección subcutánea única en el macaco cangrejero de 300µg·kg⁻¹ de rHuGH y YPEG-rHuGH (Y10,5) respectivamente.

20 Formas de realización concretas para llevar a cabo la invención

[0046] La presente invención será adicionalmente descrita a través de los ejemplos siguientes, pero cualquier ejemplo o combinación de los mismos no debería ser considerado como limitación del alcance y formas de realización de esta invención. El alcance de esta invención sólo se limita por las reivindicaciones anexas. Combinando esta descripción y estado de la técnica en la técnica, un experto en la técnica puede claramente entender el alcance limitado por las reivindicaciones.

Ejemplo 1

30 La modificación de la GH humana recombinante por PEG ramificado con forma de Y o con forma de U

[0047] 200 mg de cada de UPEG-NHS y YPEG-NHS (P.M. medio 40kD, brazos iguales; lot. n.º ZZ004P182 y ZZ004P167, respectivamente) (Beijing JenKem Technology Co., Ltd.) fueron pesados y disueltos en 2ml de HCl 2mM (Guangdong Guanghua Chemical Factory Co., Ltd.) respectivamente. 50mg de rHuGH (Xiamen Amoytop Biotech Co., Ltd.) y 50mM de tampón de ácido bórico-bórax, pH 8,0 (Sinopharm Shanghai Chemical Reagent Co., Ltd.) fueron adicionados respectivamente a un volumen de reacción de total final de 10 ml. En el sistema de reacción, la concentración de reacción final de rHuGH fue 5mg/ml, y la proporción molar de reacción de rHuGH respecto a PEG-NHS fue aproximadamente 1: 2. La incubación fue hecha a <10 °C durante 2h con agitación, y ácido acético glacial (Shantou Xilong Chemical Co., Ltd.) se añadió para conseguir pH<4,0 para parar la reacción. Una muestra fue tomada para SDS-PAGE, y coloración de plata fue usada para visualización. Los resultados del SDS-PAGE se muestran en la fig. 1. De los resultados de SDS-PAGE en fig. 1, los productos de modificación a pH 8.0 muestran dos bandas principales, y las muestras modificadas por UPEG-NHS y YPEG-NHS muestran las mismas características SDS-PAGE de electroforesis.

Ejemplo 2

45 Las modificaciones de la GH humana recombinante por PEG ramificado con forma de Y y con forma de U a diferentes pH

[0048] 200 mg de cada UPEG-NHS y YPEG-NHS (P.M. medio 40kD, brazos iguales; lot. Nos. ZZ004P182 y ZZ004P167 respectivamente) (Beijing JenKem Technology Co., Ltd.) fueron pesados y disueltos en 2ml de HCl 2mM (Guangdong Guanghua Chemical Factory Co., Ltd.) respectivamente. 50mg de rHuGH (Xiamen Amoytop Biotech Co., Ltd.) y el tampón correspondiente fueron adicionados respectivamente a un volumen de reacción total final de 10ml. 10mM de tampón PBNA (Sinopharm Shanghai Chemical Reagent Co., Ltd.) del correspondiente pH para la reacción a pH 6,0, 7,0 o 8,0 fueron usados, y 50mM tampón de bórax (Sinopharm Shanghai Chemical Reagent Co., Ltd.) del correspondiente pH para la reacción a pH 9,0, 9,5, 10,0 o 10.5 fue usado. En el sistema de reacción, la concentración de reacción final de rHuGH fue 5mg/ml, y la proporción molar de reacción de rHuGH a PEG-NHS fue aproximadamente 1: 2. La incubación se realizó a <10 °C durante 2h con agitación, y ácido acético glacial (Shantou Xilong Chemical Co., Ltd.) se añadió para conseguir pH<4,0 para parar la reacción. Una muestra fue tomada para SDS-PAGE, y coloración de plata fue usada para visualización. El sistema de visualización de gel (modelo n.º: FR-200, Shanghai FURI Science & Technology Co., Ltd.) fue usado para analizar los resultados de electroforesis. Los resultados de electroforesis SDS-PAGE se muestran en la fig. 2 y fig. 3, y los resultados del análisis por el sistema de visualización de gel se muestran en la tabla 1. De los resultados de electroforesis, los productos modificados a pH 6,0-9,5 muestran claramente dos bandas principales, y conforme el pH de la reacción

aumenta, el contenido de la banda de peso molecular aparente inferior también aumenta correspondientemente. Los productos modificados a pH 10,0 y 10,5 son sustancialmente la banda de peso molecular aparente inferior. Las muestras modificadas UPEG-NHS y YPEG-NHS muestran las mismas características de electroforesis SDS-PAGE.

- 5 Tabla 1. El análisis del sistema de visualización de gel en los resultados SDS-PAGE de las GH humanas recombinantes modificadas por PEG ramificado con forma de Y y con forma de U a diferentes pH

Reacción de modificación pH		6,0	7,0	8,0	9,0	9,5	10,0	10,5
YPEG	Contenido de banda 1 (%)	53,9	48,6	27,7	25,7	6,9	5,6	7,9
	Contenido de banda 2 (%)	46,1	51,4	72,3	74,3	93,1	94,4	92,1
UPEG	Contenido de banda 1 (%)	47,5	41,8	30,1	27,4	24,4	18,9	7,5
	Contenido de banda 2 (%)	52,5	58,2	69,9	72,6	75,6	81,1	92,5

Nota: "contenido" se refiere al contenido en porcentaje relativo de la banda 1 (P.M. aparente más alto) respecto a la banda 2 (P.M. aparente inferior) de los productos de rHuGH modificados por PEG en un único sitio.

10

Ejemplo 3

[0049] La preparación, actividad celular y P.M. de la GH humana recombinante modificada por PEG ramificado con forma de Y o con forma de U en un único sitio a pH 6,0, pH 9,0 o 10,5

15

1 Modificación

[0050] Tres muestras de 1200 mg de cada UPEG-NHS y YPEG-NHS (P.M. medio 40kD, brazos iguales; lot. n.º ZZ004P182 y ZZ004P167 respectivamente) (Beijing JenKem Technology Co., Ltd.) fueron pesados y disueltos en 12 ml de HCl 2mM (Guangdong Guanghua Chemical Factory Co., Ltd.) respectivamente. 300 mg de rHuGH (Xiamen Amoytop Biotech Co., Ltd.) y 50 mM de tampón bórax (pH 10,5) o 50 mM tampón de ácido bórico/bórax (pH 9,0) o 10mM PBNa (pH6,0) (Sinopharm Shanghai Chemical Reagent Co., Ltd.) fueron adicionados respectivamente a un volumen de reacción total final de 60 ml. En el sistema de reacción, la concentración de reacción final de rHuGH fue 5mg/ml, la proporción molar de reacción entre el rHuGH y el PEG- NHS fue aproximadamente 1:2, y los pH de reacción fueron 10,5, 9,0, 6,0 respectivamente. La incubación fue realizada a <10 °C durante 2h con agitación, y ácido acético glacial (Shantou Xilong Chemical Co., Ltd.) se añadió para conseguir pH<4,0 para parar la reacción. Una muestra fue tomada para SDS-PAGE, y coloración de plata fue usado para visualización.

20

25

2 Purificación

30

2.1 Purificación por cromatografía Q Sepharose FF

[0051] La muestra de modificación PEG de rHuGH fue diluida 3 veces utilizando agua ultrapura, y el pH de la muestra diluida fue ajustado a 9,0 con NaOH o HCl.

35

2.1.1 La purificación por cromatografía Q Sepharose FF de las muestras de modificación de rHuGH con PEG (pH 6,0)

[0052] La columna de cromatografía (Shanghai Jinhua Chromatography Equipment Factory) fue Φ 18mmX400mm, la especificación de embalaje del material para embalaje Q Sepharose FF (GE GE Healthcare) fue Φ 18mmX240mm, y el volumen del lecho de columna (CV) fue 61ml. La columna de cromatografía Q Sepharose FF se limpió en el lugar utilizando NaOH 0,5M a 5ml/min durante 30min, eluido con 3 CV de ddH₂O a 5ml/min, regenerado con 3CV de 1M NaCl a 5ml/min, y eluido con 5CV de 20mM ácido bórico/borax-17mM NaCl (pH 9,0, solución A) a 5ml/min. Las muestras diluidas con agua ultrapura del rHuGH modificado con PEG fueron cargadas a una velocidad de flujo de 3ml/min, y el eluyente fue detectado a 280nm (AKTA Basic100, GE Healthcare). La elución fue hecha utilizando una solución A a 5ml/min hasta que el primer valor máximo fue completamente detectado; y 20mM de ácido bórico/borax-100mM NaCl (pH 9,0, solución B) fue luego usada para eluir a 5ml/min hasta que el segundo valor máximo fue completamente detectado. 20 mM ácido bórico/borax-200 mM

40

45

NaCl (pH 9,0, solución C) fue luego usada para eluir a 5 ml/min hasta que el tercer valor máximo fue completamente detectado. La muestra del segundo valor máximo fue recogida como la muestra objetivo. El sistema de tampón de la muestra objetivo fue cambiado a 20 mM ácido bórico/bórax (pH 9,0) a través de ultrafiltración con ultrafiltro 5K (filtro millipore, material de polietersulfona).

5

2.1.2 La purificación por cromatografía Q Sepharose FF de muestras de modificación de rHuGH

[0053] La columna de cromatografía (Shanghai Jinhua Chromatography Equipment Factory) fue Φ 18mmX400mm, la especificación de embalaje del material para embalaje Q Sepharose FF (GE Healthcare) fue Φ 18mmX240mm, y el volumen del lecho de columna (CV) fue 61ml. La columna de cromatografía Q Sepharose FF se limpió en el sitio utilizando 0,5M NaOH a 5 ml/min durante 30 min, eluido con 3 CV de ddH₂O a 5ml/min, regenerado con 3CV de 1M NaCl a 5ml/min, y eluido con 5CV de 20mM ácido bórico/borax-17mM NaCl (pH 9,0, solución A) a 5 ml/min. La muestra diluida con agua ultrapura de rHuGH modificado con PEG fue cargada a una velocidad de flujo de 3 ml/min, y el eluyente fue detectado a 280 nm (AKTA Basic100, GE Healthcare). La elución se realizó utilizando una solución A a 5 ml/min hasta que el primer valor máximo fue completamente detectado, y 20 mM ácido bórico/borax-40 mM NaCl (pH 9,0, solución B) fue usada para eluir a 5ml/min hasta que el segundo valor máximo fue completamente detectado. 20 mM ácido bórico/borax-100 mM NaCl (pH 9,0, solución C) fue luego usada para eluir a 5ml/min hasta que el tercer valor máximo fue completamente detectado, y 20 mM de ácido bórico/borax-200 mM NaCl (pH 9,0, solución D) fue usada para eluir a 5ml/min hasta que el cuarto valor máximo fue completamente detectado. La muestra del tercer valor máximo fue recogida como la muestra objetivo. El sistema de tampón de la muestra objetivo fue cambiado a 20 mM ácido bórico/bórax (pH 9,0) a través de ultrafiltración con ultrafiltro 5K (filtro millipore, material de polietersulfona).

10

15

20

2.2 Purificación por cromatografía DEAE Sepharose FF

[0054] La columna de cromatografía (Shanghai Jinhua Chromatography Equipment Factory) fue Φ 18mmX400mm, la especificación de embalaje del material para embalaje de la DEAE Sepharose FF (GE Healthcare) fue Φ 18mmX235mm, 1CV=60 ml.

25

30

35

[0055] La columna de cromatografía DEAE Sepharose FF se limpió en el lugar utilizando 0,5 M NaOH a 5 ml/min durante 30 min, eluido con 3 CV de ddH₂O a 5 ml/min, regenerado con 3 CV de 1 M NaCl a 5 ml/min, y eluido con 3 CV de 20 mM ácido bórico/bórax (pH 9,0, solución A) a 5 ml/min. La muestra de PEG-rHuGH purificada por Q Sheparose FF fue cargada a una velocidad de flujo de 3 ml/min, eluido con 3 CV de solución A a 5ml/min, y eluido con 6 CV de 20 mM ácido bórico/borax-30 mM NaCl (pH 9,0, solución B) a 5ml/min. 20 mM ácido bórico/bórax-100 mM NaCl (pH 9,0, solución C) fue usada para eluir a 5 ml/min hasta que los primeros y segundos picos fueron completamente detectados. El eluyente fue detectado a 280 nm (AKTA Basic100, GE Healthcare). La muestra del segundo valor máximo fue recogida como la muestra objetivo. El sistema de tampón de la muestra objetivo fue cambiado a 5 mM PBNa (pH 8,5) y apropiadamente concentrado a través de ultrafiltración con ultrafiltro 5K (filtro millipore, material de polietersulfona).

40

2.3 Purificación refinada utilizando cromatografía Q Sepharose FF

[0056] La columna de cromatografía (Shanghai Jinhua Chromatography Equipment Factory) fue Φ 25mmX400mm, la especificación de embalaje del material para embalaje Q Sepharose FF (GE Healthcare) fue Φ 25mmX200mm, 1 CV=98 ml.

45

50

55

[0057] La columna de cromatografía Q Sepharose FF se limpió en el lugar utilizando 0,5 M NaOH a 10 ml/min durante 30 min, eluido con 3 CV de ddH₂O a 10 ml/min, regenerado con 3 CV de 1 M NaCl a 10 ml/min, y eluido con 3 CV de 5 mM PBNa (pH 8,5, solución A) a 10 ml/min. La DEAE Sepharose FF purificada PEG-rHuGH muestra fue cargada a una velocidad de flujo de 6 ml/min, y eluido con 3 CV de solución A a 10ml/min. 5 mM PBNa-90 mM NaCl (pH 8,5, solución B) fue usada para eluir a 10 ml/min hasta que el primer valor máximo fue completamente detectado, y 5 mM PBNa-300 mM NaCl (pH 8,5, solución C) fue usada para eluir a 10 ml/min hasta que el segundo valor máximo fue completamente detectado. El eluyente fue detectado a 280 nm (AKTA Basic100, GE Healthcare). La muestra desde el primer valor máximo fue recogida como la muestra objetivo. El sistema de tampón de la muestra objetivo fue cambiado a 3 mM NaAc/HAc-7 mM NaCl-5 mM Lys (pH 5,0) a través de ultrafiltración utilizando ultrafiltro 5K (filtro millipore, material de polietersulfona), y manitol fue suplementado a la concentración final de 45 mg/ml. La muestra fue esterilizada a través de filtración 0,2 μ m. Una muestra fue tomada para electroforesis SDS-PAGE, y coloración de plata fue usado para visualización. La muestra restante fue almacenada a -70 °C. El producto de modificación modificado a pH 6,0 fue designado como Y6 o U6, donde la banda de P.M. aparente más alto fue designada como Y6-1 o U6-1, mientras que la banda de P.M. aparente inferior fue designada como Y6-2 o U6-2., El producto de modificación a pH 9,0 fue designado como Y9 o U9, y el producto de modificación a 10,5 fue designado como Y10,5 o U10,5.

60

[0058] Los resultados de SDS-PAGE se muestran en la fig. 4. De los resultados de electroforesis, los productos de modificación a pH 6,0 muestran claramente dos bandas, pero los productos de modificación a pH 10,5 fueron principalmente

la banda de P.M. aparente inferior con un contenido SDS-PAGE no inferior al 80%.

3 Actividad celular

5 [0059] Utilizando estándar nacional de GH como control, una línea celular Nb2-11 de linfoma de rata dependiente de HuGH fue empleada para el ensayo de la actividad celular de cada muestra de PEG-rHuGH.

10 [0060] Células Nb2-11 fueron diluidas a la concentración final de 5×10^4 células/ml. Estándar nacional de GH (lot. n.º: 35-20002, 1 mg/ml/tubo, 3IU/tubo; comprado de National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products) fueron pre-diluidos a 100ng/ml (0,0003 IU/ml), y cada muestra de PEG-rHuGH que debía ser evaluada fue pre-diluida a 0,0003 IU/ml según los resultados de pre-experimentos. En base a la pre-dilución, cada muestra fue evaluada después de una vez y media de dilución de gradiente. La actividad de la muestra fue calculada según la siguiente ecuación:

$$\text{Actividades de las muestras de examen} = \text{Actividades de los estándares} \times \frac{C_1}{C_2} \times \frac{D_1}{D_2}$$

15 donde: C_1 es el número de veces de dilución de la muestra que debe ser evaluada equivalente a la cantidad de semi-efecto del estándar

20 C_2 Es el número de veces de dilución del estándar de semi-efecto

D_1 Es el número de veces de pre-dilución de la muestra que debe ser evaluada

D_2 Es el número de veces de pre-dilución del estándar

25 [0061] Método de ensayo:

(1) las células en la fase de crecimiento logarítmico fueron tomadas, reiteradamente pipetadas, centrifugadas y lavadas. Las células fueron resuspendidas en el diluyente, y fueron ajustadas a una concentración de 5×10^4 células/ml.

30 (2) cada muestra pre-diluida que debe ser evaluada fue diluida a doble gradiente respectivamente en la placa celular (placa de 96 pocillos, Coming), 10 gradientes en total, y duplicados de pocillos fueron hechos para cada gradiente, 50 μ l/pocillo. El control positivo fue hecho en 8 gradientes de la misma manera. El diluyente fue usado como control negativo.

35 (3) las células fueron adicionadas en una densidad de 100 μ l/pocillo, colocadas en un incubador de CO_2 e incubadas a 37 °C durante aproximadamente 70 horas. Solución AlamarBlue™ (BioSource) fue añadida a 30 μ l/pocillo, mezclada con agitación durante 1 min. La incubación se realizó en un incubador de CO_2 a 37 °C durante 5 horas. Después de agitar a temperatura ambiente durante 5 min, la placa fue leída (longitud de onda de luz excitada 530 nm; longitud de onda de luz de emisión 590nm).

40 (4) un método de regresión de cuatro parámetros fue usado para representar el estándar y la muestra que debe ser evaluada. Los títulos de cada muestra que debe ser evaluada fueron calculados según la ecuación de los gráficos del estándar y las muestras que deben ser evaluadas.

45 [0062] Los resultados de la actividad celular se muestran en la tabla 2 y fig. 5 también fig. 6. Muestras de duplicado se estudiaron para cada muestra. La actividad específica celular de rHuGH modificado con YPEG-NHS a pH 6,0 (Y6) es $1,08 \times 10^{-1}$ IU/mg, la actividad específica celular del producto modificado a pH 9,0 (Y9) es $1,66 \times 10^{-1}$ IU/mg, y la actividad específica celular del producto modificado a pH 10,5 (Y10,5) es $2,09 \times 10^{-1}$ IU/mg, donde la actividad específica celular de Y10,5 es aproximadamente 2 veces la de Y6. La actividad específica celular de rHuGH modificado con UPEG-NHS a pH 6,0 (U6) es $8,85 \times 10^{-2}$ IU/mg, la actividad específica celular del producto modificado a pH 9,0 (U9) es $1,42 \times 10^{-1}$ IU/mg; y la actividad específica celular del producto modificado a pH 10,5 (U10,5) es $1,82 \times 10^{-1}$ IU/mg, donde la actividad específica celular de U10,5 es alrededor de dos veces la de U6. Conforme el pH de la reacción de modificación aumenta, la actividad celular del producto modificado por PEG en un único sitio (2 bandas principales) también aumenta correspondientemente.

Tabla 2. La actividad celular de cada muestra de YPEG-rHuGH y UPEG-rHuGH *

Muestra	Tipo PEG	PEG P.M. (kD)	Actividad específica celular ($\times 10^{-1}$ IU/mg)		
			Placa 1	Placa 2	promedio
YPEG-rHuGH, Y6	ramificado Y	40	1,04	1,12	1,08
YPEG-rHuGH, Y9	ramificado Y	40	1,58	1,74	1,66
YPEG-rHuGH, Y10,5	ramificado Y	40	2,06	2,12	2,09

UPEG-rHuGH, U6	ramificado U	40	0,88	0,89	0,88
UPEG-rHuGH, U9	ramificado U	40	1,38	1,46	1,42
UPEG-rHuGH, U10,5	ramificado U	40	1,84	1,80	1,82
Nota: * estándar nacional de GH fue usado como o estándar. Lot. n.º del estándar: 35-20002, LMG/ml/tubo, 3IU/tubo, comprado de National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products.					

4 El peso molecular determinado por MALDI-TOF MS

- 5 [0063] Utilizando el espectroscopio de masas Autoflex TOF/TOF (BRUKER; Alemania), el método MALDI-TOF MS fue empleado para determinar el peso molecular de cada muestra de PEG-rHuGH. Ácido sinapínico (SA, C₁₁H₁₂O₅, P.M. 224,22, número de lote: 2006 236870 002, BRUKER) fue usado como matriz, patrón de calibración de proteína I (Part n.º 206355) y patrón de calibración de proteína II (parte n.º 207234) de BRUKER fueron usados como estándares de peso molecular de proteína, y el software de análisis fue flexAnalysis Ver.3.0.54.0. Los resultados se muestran en la Fig. 7.
- 10 [0064] El rHuGHs modificado con YPEG-NHS a pH 6,0 (Y6), pH 9,0 (Y9) y pH 10,5 (Y10,5) todos tienen un peso molecular MS en un rango de 62012 Dalton ± 10%, que es consistente con el peso molecular teórico del rHuGH modificado por YPEG en un único sitio (el peso molecular de YPEG-NHS es 40kD±10 %), indicando que Y6, Y9 y Y10,5 son el producto de modificación de rHuGH modificado por YPEG en un único sitio. El rHuGHs modificado con UPEG-NHS a pH 6,0 (U6), pH 9,0 (U9) y pH 10,5 (U10,5) todos tienen un peso molecular MS en un rango de 62012 Dalton ± 10%, que es consistente con el peso molecular teórico de los productos de modificación de rHuGH modificados por UPEG en un único sitio (el peso molecular de UPEG-NHS es 40kD ± 10%), indicando que U6, U9 y U10,5 son el producto de modificación de rHuGH modificado por UPEG en un único sitio.

Ejemplo 4

- 20 La preparación también el ensayo de la actividad celular y P.M. del producto de modificación de GH humana recombinante de peso molecular aparente más alto modificada por PEG ramificado con forma de Y o con forma de U en un único sitio a pH 6,0 (Y6-1; U6-1)

25 1 Modificación

- 30 [0065] Dos muestras de 1200 mg de cada UPEG-NHS y YPEG-NHS (P.M. medio 40kD, brazos iguales; n.º de lot. son ZZ004P182; ZZ004P167 respectivamente) (Beijing JenKem Technology Co., Ltd.) fueron pesados y disueltos en 12 ml de 2 mM HCl (Guangdong Guanghua Chemical Factory Co., Ltd.) respectivamente. 300 mg de rHuGH (Xiamen Amoytop Biotech Co., Ltd.) y 10 mM PBNa (pH 6,0)(Sinopharm Shanghai Chemical Reagent Co., Ltd.) fueron adicionados respectivamente a un volumen de reacción de total final de 60 ml. En el sistema de reacción, la concentración de reacción final de rHuGH fue 5 mg/ml, la proporción molar de reacción del rHuGH respecto a PEG-NHS fue aproximadamente 1: 2, y el pH de la reacción fue 6,0. La incubación fue hecha a <10 °C durante 2 h con agitación, y ácido acético glacial (Shantou Xilong Chemical Co., Ltd.) se añadió conseguir pH<4,0 para parar la reacción.

- 35 2 La purificación del producto de peso molecular aparente más alto modificado por PEG en un único sitio (Y6-1; U6-1)

2.1 Purificación por cromatografía Q Sepharose FF

- 40 [0066] La muestra de rHuGH modificada por PEG (pH 6,0) fue diluida 3 veces utilizando agua ultrapura, y el pH fue ajustado a 9,0 utilizando NaOH.

- 45 [0067] La columna de cromatografía (Shanghai Jinhua Chromatography Equipment Factory) fue Φ25mmX500mm, y la especificación de embalaje del material para embalaje Q Sepharose FF (GE Healthcare) fue Φ25mmX310mm, 1 CV=152 ml. La columna de cromatografía Q Sepharose FF se limpió en el lugar utilizando 0,5 M NaOH a 10 ml/min durante 30min, eluido con 3 CV de ddH₂O a 10 ml/min, regenerado con 3 CV de 1 M NaCl a 10 ml/min, y eluido con 5 CV de 20 mM ácido bórico/borax-17 mM NaCl (pH 9,0, solución A) a 10 ml/min. La muestra diluida de agua ultrapura del rHuGH modificada con PEG fue cargada a una velocidad de flujo de 6 ml/min, y eluido utilizando una solución A a 10 ml/min hasta que el primer valor máximo fue completamente detectado. 20 mM ácido bórico/borax-100 mM NaCl (pH 9,0, solución B) fue luego usada para eluir a 10 ml/min hasta que el segundo valor máximo fue completamente detectado, y 20 mM ácido bórico/borax-200 mM NaCl (pH 9,0, solución C) fue usado para eluir a 10 ml/min hasta que el tercer valor máximo fue completamente detectado. El eluyente fue detectado a 280 nm (AKTA Basic100, GE Healthcare). La muestra del segundo valor máximo fue recogida como la muestra objetivo. El sistema de tampón de la muestra de objetivo fue cambiado a 5 mM NaAc/HAc (pH 4,5) a través de ultrafiltración con ultrafiltro 5K (filtro millipore, material de polietersulfona).

- 55 2.2 Purificación por cromatografía MacroCap SP

[0068] La columna de cromatografía (Shanghai Jinhua Chromatography Equipment Factory) fue $\Phi 12\text{mm} \times 300\text{mm}$, y la especificación de embalaje para el material de embalaje Macro Cap SP (GE Healthcare) fue $\Phi 12\text{mm} \times 180\text{mm}$, 1 CV=20 ml. La columna de cromatografía MacroCap SP se limpió en el lugar utilizando 0,5 M NaOH a 1 ml/min durante 30 min, eluido con 3 CV de ddH₂O a 1 ml/min, regenerado con 3 CV de 1 M NaCl a 1 ml/min, y eluido con 5 CV de 5 mM NaAc/HAc (pH 4,5, solución A) a 1 ml/min. La muestra de PEG-rHuGH purificada por Q Sepharose FF fue cargada a una velocidad de flujo de 1 ml/min, y eluido con 3 CV de solución A a 1 ml/min. 5 mM NaAc/HAc-100 mM NaCl (pH 4,5, solución B) fue usada para eluir con 5 CV en un gradiente de 0 % - 30 % solución B a 1 ml/min, eluido con 10CV en un gradiente de 30 % - 45 % B, y luego eluido con 5 mM NaAc/HAc-1M NaCl (pH 4,5, solución C) a 1 ml/min hasta que el primer y los segundos picos fueron completamente detectados. El eluyente fue detectado a 280 nm (AKTA Basic100, GE Healthcare). El eluyente entre el quinto y el octavo CV durante la elución con un gradiente de 30 % - 45 % solución B fue recogido como muestra objetivo. El sistema tampón de la muestra objetivo fue cambiado a 3 mM NaAc/HAc - 7 mM NaCl - 5 mM Lys (pH 5,0) a través de ultrafiltración con ultrafiltro 5K (filtro millipore, material de polietersulfona), y manitol fue complementado a una concentración final de 45 mg/ml. La muestra fue esterilizada a través de filtración 0,2 μm . Una muestra fue tomada para electroforesis SDS-PAGE, y coloración de plata fue usada para visualización. La muestra restante fue almacenada a -70 °C. Los números de muestra fueron: U6-1; Y6-1. Los resultados de la electroforesis SDS- PAGE se muestran en la fig. 8, y los resultados de peso molecular aparente de la electroforesis SDS-PAGE se muestran en la fig. 9.

[0069] En el caso de cargar 10 μg de muestra PEG-rHuGH, una pequeña cantidad del producto modificada en más de un sitio fue detectada en cada muestra de PEG-rHuGH, y el contenido de la proteína de sustrato (rHuGH) en cada muestra no era más del 0,5% (fig. 8), donde el contenido de la banda mayor no es inferior al 80%. El peso molecular aparente de cada muestra de PEG-rHuGH determinado por electroforesis SDS-PAGE muestra una banda principal, donde el peso molecular aparente de Y6-1 es claramente superior al de Y10,5, y el peso molecular aparente de U6-1 es claramente superior al de U10,5 (fig. 9).

3 El peso molecular detectado por MALDI-TOF MS

[0070] Utilizando un espectroscopio de masas autoflex TOF/TOF (BRUKER; Alemania), el método MALDI-TOF MS fue usado para el ensayo del peso molecular de cada muestra de PEG-rHuGH. El método de detección fue el mismo que en el ejemplo 3. Los resultados se muestran en la fig. 7.

[0071] Los pesos moleculares MS de Y6-1 y U6-1 están ambos en un rango de 62012 Dalton $\pm 10\%$, que es consistente con el peso molecular teórico del rHuGH modificado por PEG en un único sitio (los pesos moleculares de YPEG-NHS y UPEG-NHS son 40 kD $\pm 10\%$), indicando que ambos son los productos modificados por PEG en un único sitio.

4 Ensayo de actividad celular

[0072] Utilizando el estándar nacional de GH como control, la línea celular de linfoma de rata Nb2-11 dependiente de HuGH fue usada para el ensayo de la actividad celular de cada muestra de PEG-rHuGH, comparando la diferencia de actividad celular entre Y6-1 y Y10,5, U6-1 y U10,5. El método de ensayo fue el mismo que en el ejemplo 3. Los resultados se muestran en la tabla 3, por triplicado para cada muestra.

[0073] La actividad específica celular media de Y10,5 es $2,08 \times 10^{-1}$ IU/mg, la actividad específica celular media de Y6-1 es $5,50 \times 10^{-2}$ IU/mg; la actividad específica celular media de U10,5 es $2,28 \times 10^{-1}$ IU/mg, y la actividad específica celular media de U6-1 es $5,00 \times 10^{-2}$ IU/mg. La actividad específica celular media de Y10,5/U10,5 es claramente superior que la de Y6-1/U6-1, y pueden alcanzar hasta 3 veces la última.

Tabla 3. La actividad celular de cada muestra de YPEG-rHuGH o UPEG-rHuGH ¹

Muestra	Tipo de PEG	P.M. de PEG (kD)	Número de sitios de modificación PEG	Actividad celular específica ($\times 10^{-1}$ IU/mg) ²
YPEG-rHuGH, Y10,5	ramificado Y	40	único	2,08 \pm 0,10
YPEG-rHuGH, Y6-1	ramificado Y	40	único	0,55 \pm 0,06
UPEG-rHuGH, U10,5	ramificado U	40	único	2,28 \pm 0,14
UPEG-rHuGH, U6-1	ramificado U	40	único	0,50 \pm 0,06

Nota: 1 utilizando estándar nacional de GH como estándar n.º Lot. del estándar: 35-20002, LMG/ml/tubo, 3IU/tubo, comprado de National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products.
2 Promedio de muestras triplicadas.

Ejemplo 5

El ensayo de actividad biológica *in vivo* de YPEG-rHuGH (Y10,5) y UPEG-rHuGH (U10,5)

5 [0074] Utilizando ratas con la glándula pituitaria eliminada como modelos animales, la actividad biológica de promoción de crecimiento de animal *in vivo* de YPEG-rHuGH (Y10,5) y UPEG-rHuGH (U10,5) fueron evaluadas según el bioensayo de la hormona de crecimiento como se describe en Pharmacopoeia of the People's Republic of China, version 2005, Volume 3, Appendix XII P, es decir observando el efecto en el crecimiento y desarrollo de ratas con la glándula pituitaria quitada (sin GH endógena) una semana después de una administración única.

10 [0075] Ratas Wistar, nivel SPF, macho, nacidas 26-28d, peso corporal de 60-80g, proporcionadas por el centro de experimentos animales de National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products (certificación animal n.º: SCXK(Jing)2005- 0004), fueron usadas. 2-3 semanas antes el experimento, las glándulas pituitarias de las ratas fueron eliminadas asépticamente por cirugía, y las ratas fueron luego normalmente criadas en un laboratorio S-2 para la recuperación para otro experimento. Las ratas cualificadas con glándula pituitaria eliminada fueron seleccionadas, y divididas uniformemente en 10 grupos de 10 ratas según el peso corporal, en concreto: grupo de control negativo (solvente de blanco); grupos de control positivo rHuGH (estándar nacional de GH, preparado por National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Product, 3IU·mg⁻¹·tubo⁻¹), dosis baja (2,7 IU·kg⁻¹), dosis media (5,3 IU·kg⁻¹) y dosis alta (10,7 IU·kg⁻¹), administrado en 6 veces, una vez al día, 6 administraciones consecutivas; grupos de baja dosis (2,7 IU·kg⁻¹), dosis media (5,3 IU·kg⁻¹) y dosis alta (10,7 IU·kg⁻¹) de la muestra de prueba Y10,5, grupos de dosis baja (2,7 IU·kg⁻¹), dosis media (5,3 IU·kg⁻¹) y dosis alta (10,7 IU·kg⁻¹) de la muestra de prueba U10,5, administración en una única una vez en el primer día cuando el estándar fue administrado. Y10,5 Y U10,5 fueron formulados según el título estimado de 3 IU/mg. La administración fue realizada por inyección subcutánea de 0,5 ml al cuello del animal. Al grupo de control negativo sólo le fue administrado el solvente, una vez al día, 6 veces en total. Las ratas fueron sacrificadas 24 h después de la última administración en el grupo de control positivo, y los pesos del cuerpo y la anchura de las placas de crecimiento tibial fueron medidas. Los datos fueron procesados según el ensayo de hormona de crecimiento en el apéndice XII P y el método estadístico para el ensayo biológico en el apéndice XIV de Pharmacopoeia of the People's Republic of China, version 2005.

20 [0076] El título biológico de YPEG-rHuGH (Y10,5) es 5,0 IU·mg⁻¹, el título biológico de UPEG-rHuGH (U10,5) es 5,2 IU·mg⁻¹, ambos más de 1,5 veces el rHuGH normal. Administración única de YPEG-rHuGH (Y10,5) o UPEG-rHuGH (U10,5) tiene una actividad biológica más alta para la promoción del crecimiento del cuerpo en el animal y un efecto farmacéutico más largo que la suma de rHuGH inyectado diario.

Ejemplo 6

35 La vida media metabólica de medicamento de suero de YPEG-rHuGH (Y10,5) en el macaco cangrejero

40 [0077] 6 macacos cangrejeros fueron seleccionados, 3 hembras y 3 machos, peso corporal de 3,24-5,48 kg (Guangxi Beihai Yu Qi Experiment Animal technology co. Ltd., certificado n.º: SCXK(Gui)2005-0005). El experimento ha incluido dos grupos de 3 macacos cangrejeros: un grupo con inyección subcutánea de YPEG-rHuGH (Y10,5) a 300µg·kg⁻¹ (2♂, 1♀) y el otro grupo con inyección subcutánea de rHuGH (Saizen, Laboratoires Serono S.A. Suiza) a 300µg·kg⁻¹ (1♂, 2♀), administración única. Después de la administración, la sangre venosa fue tomada regularmente de la extremidad posterior opuesta al lado inyectado, y el suero fue separado. Un kit ELISA para la hormona del crecimiento humana de R&D fue usado para el ensayo de la concentración de medicamento sanguíneo a través de ELISA, y la curva de concentración de medicamento sanguíneo fue representada para calcular la vida media metabólica del medicamento. Los resultados se muestran en la fig. 10.

50 [0078] Después de la inyección subcutánea de YPEG-rHuGH (Y10,5) a 300 µg·kg⁻¹ en macacos cangrejeros, el tiempo para alcanzar el valor máximo de concentración de medicamento en el suero es 8-24h. El medicamento fue eliminado lentamente. La vida media metabólica de medicamento en promedio en el suero es 41,33h. Después de la inyección subcutánea de rHuGH (Saizen) a 300 µg·kg⁻¹ en macacos cangrejeros, el tiempo para alcanzar el valor máximo de concentración de medicamento en el suero es 1-2h, y a las 24 h la concentración se reduce al nivel anterior a la administración. La eliminación es claramente más rápida que YPEG-rHuGH (Y10,5). La vida media metabólica del medicamento en promedio en el suero es 1,80 h. La vida media metabólica de medicamento promedio en el suero de YPEG-rHuGH (Y10,5) es más de 20 veces la de rHuGH.

55 Listado de secuencias

[0079]

60 <110> Biosteel Gene Expression Tech. Co., Ltd.

ES 2 453 946 T3

<120> Hormona del crecimiento modificada con polietilenglicol bicatenario, método de preparación y aplicación de esta

<130> P2007466c

5 <160> 1

<170> PatentIn Versión 3.3

<210> 1

10 <211> 191

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

15

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

20

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 Phe 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

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

REIVINDICACIONES

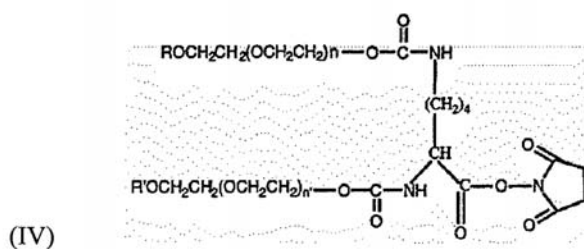
1. Método de preparación de una hormona de crecimiento humana polietilenglicolada (pegilada) o una preparación de hormona de crecimiento humana polietilenglicolada (pegilada), que comprende:

(a) en una solución con pH no inferior a 6,0, poner el polietilenglicol (PEG) bicatenario ramificado con forma de U o con forma de Y en contacto con la hormona de crecimiento humana;

(b) evaluar el producto modificado por el PEG bicatenario en un único sitio obtenido en el paso a) en SDS-PAGE de concentración apropiada, donde el producto muestra dos bandas;

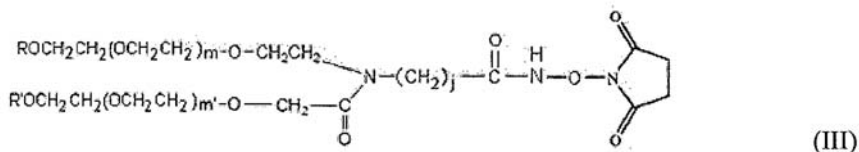
(c) separar y recuperar el producto de peso molecular aparente inferior en las dos bandas modificado por el PEG bicatenario en un único sitio,

donde el polietilenglicol bicatenario ramificado con forma de U presenta la siguiente fórmula (IV),



donde, R y R' son independientemente alquilo de bajo peso molecular; n y n' indican el grado de polimerización y pueden ser cualquier número entero; n+n' está entre 600 y 1500; el peso molecular medio del PEG ramificado con forma de U es aproximadamente desde 26kD hasta 66kD, o

donde el polietilenglicol bicatenario ramificado con forma de Y presenta la siguiente fórmula (III):



donde, R y R' son independientemente alquilo de bajo peso molecular, m y m' indican el grado de polimerización y pueden ser cualquier número entero, j es un número entero de 1 a 12, y el peso molecular total medio del PEG ramificado con forma de Y es de aproximadamente 26kD a 60kD.

2. Método según la reivindicación 1, donde el pH de (a) no es inferior a 7,0.

3. Método según la reivindicación 1, donde el pH de (a) no es inferior a 8,0.

4. Método según la reivindicación 1, donde el pH de (a) no es inferior a 9,0.

5. Método según la reivindicación 1, donde el pH de (a) es 10,5.

6. Método según la reivindicación 1, donde la proporción molar de la hormona del crecimiento respecto al PEG bicatenario es aproximadamente 1: 2.

7. Método según la reivindicación 1, donde el SDS-PAGE en (b) es 12% SDS-PAGE.

8. Método según la reivindicación 1, que comprende además purificar el producto recuperado.

9. Método según la reivindicación 8, donde la purificación del producto se realiza usando cromatografía de gel.

10. Método según la reivindicación 9, donde la cromatografía de gel comprende Cromatografía Q Sepharose FF, cromatografía DEAE Sepharose FF y cromatografía MacroCap SP.

11. Método según la reivindicación 1, este método es para preparar una preparación de hormona de crecimiento humana pegilada, en dicho método en el paso (a) una solución se usa con un pH no inferior a 8,0, y donde el producto recuperado en el paso (c) es una mezcla predominantemente que contiene el producto de peso molecular aparente inferior modificado por el PEG bicatenario en un único sitio, donde el contenido del producto de peso molecular aparente inferior modificado por el PEG bicatenario en un único sitio no es inferior al 70%.

12. Método según la reivindicación 11, donde el pH no es inferior a 9,0.

13. Método según la reivindicación 11, donde el pH es 10,5.

14. Método según la reivindicación 11, donde el contenido del producto de peso molecular aparente inferior modificado por el PEG bicatenario en un único sitio no es inferior al 80 %.

15. Método según la reivindicación 11, donde el contenido del producto de peso molecular aparente inferior modificado por el PEG bicatenario en un único sitio no es inferior al 90 %.

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde R y R' independientemente son alquilo C₁-C₄.

17. Método según la reivindicación 16, donde R y R' independientemente son metilo.

18. Método según la reivindicación 1, donde m+m' está entre 600 y 1500.

19. Método según la reivindicación 18, donde m+m' es 910.

20. Método según la reivindicación 1, donde el peso molecular total medio del polietilenglicol bicatenario ramificado con forma de Y es 40kD.

21. Método según la reivindicación 1 o 20, donde el polietilenglicol bicatenario ramificado con forma de Y es de brazos iguales.

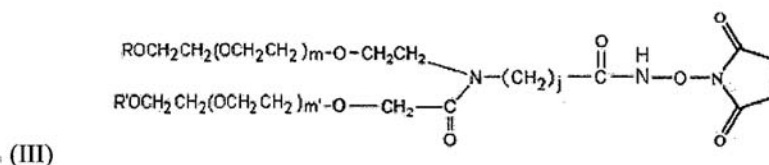
22. Método según la reivindicación 1, donde n+n' es 910.

23. Método según la reivindicación 1, donde el peso molecular medio del polietilenglicol bicatenario ramificado con forma de U es aproximadamente 40 kD.

24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 22 o 23, donde el polietilenglicol bicatenario ramificado con forma de U es de brazos iguales.

25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 20 o 21, que comprende los pasos siguientes:

(a) en una solución con pH 9,0 o 10,5, poner un PEG bicatenario de la siguiente fórmula (III) en contacto con la hormona de crecimiento humana, donde la proporción molar de la hormona del crecimiento respecto al PEG bicatenario es aproximadamente 1: 2.



donde m+m' es 910, el peso molecular total medio del PEG bicatenario es aproximadamente 40kD;

(b) evaluar el producto modificado por el PEG bicatenario en un único sitio obtenido en el paso a) en 12% SDS- PAGE, donde el producto es principalmente una banda de peso molecular aparente inferior;

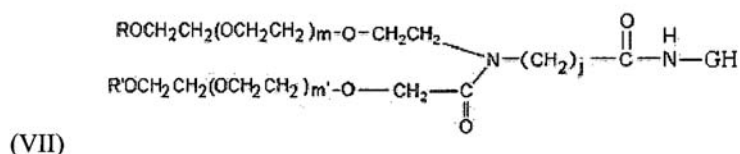
(c) separar y recuperar el producto de peso molecular aparente inferior modificado por el PEG bicatenario en un único sitio utilizando cromatografía de gel seleccionada de Cromatografía Q Sepharose FF, cromatografía DEAE Sepharose FF o cromatografía MacroCap SP.

26. Hormona de crecimiento humana pegilada de peso molecular aparente inferior o preparación de hormona de crecimiento

humana pegilada de peso molecular aparente inferior obtenida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, donde la hormona del crecimiento es extraída de una fuente natural u obtenida por biotecnología recombinante.

27. Hormona de crecimiento humana pegilada según la reivindicación 26, donde la hormona de crecimiento humana tiene la secuencia de SEC ID n.º:1.

28. Hormona del crecimiento humana pegilada según la reivindicación 26, que tiene un peso molecular 62kD, como se muestra en la siguiente fórmula (VII):



donde R y R' son independientemente alquilo de bajo peso molecular; m+m' es 910; j es un número entero de 1 a 12.

29. Hormona de crecimiento humana pegilada según la reivindicación 28, donde R y R' son alquilo C₁-C₄.

30. Hormona de crecimiento humana pegilada según la reivindicación 28, donde R y R' son metilo.

31. Hormona de crecimiento humana pegilada o preparación de hormona de crecimiento humana pegilada de cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, donde la hormona de crecimiento humana recombinante es artificialmente sintetizada o expresada por un sistema de expresión seleccionado del grupo que consiste en: un sistema procariótico tal como *E. coli.*; un sistema eucariota tal como *Pichia*; un sistema celular de insecto; y un sistema celular mamífero tal como célula CHO.

32. Composición que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de la hormona de crecimiento humana pegilada o la preparación de hormona de crecimiento humana pegilada de cualquiera de las reivindicaciones 26-31, y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente.

33. Composición según la reivindicación 32, que comprende manitol, un aminoácido, cloruro sódico, ácido acético y acetato sódico.

34. Composición según la reivindicación 33, donde el aminoácido es seleccionado del grupo que consiste en aspartato, asparagina, lisina y glicina.

35. Hormona de crecimiento humana pegilada o preparación de hormona de crecimiento humana pegilada de cualquiera de las reivindicaciones 26-31 o composición de cualquiera de las reivindicaciones 32-34 para uso como un medicamento.

36. Hormona de crecimiento humana pegilada o preparación de hormona de crecimiento humana pegilada de cualquiera de las reivindicaciones 26-31 o composición de cualquiera de las reivindicaciones 32-34, para uso en el tratamiento de una enfermedad que necesita tratamiento de hormona del crecimiento o para tratamiento antienvjecimiento.

37. Hormona de crecimiento humana pegilada o preparación de hormona de crecimiento humana pegilada de cualquiera de las reivindicaciones 26-31 o composición de cualquiera de las reivindicaciones 32-34 para uso en el tratamiento de una enfermedad que necesita tratamiento con hormona del crecimiento o para tratamiento antienvjecimiento, donde la enfermedad que necesita tratamiento con hormona del crecimiento se selecciona del grupo que consiste en enanismo, quemaduras, heridas, fracturas de hueso, úlceras de sangrado, insuficiencia renal, SIDA, enanismo por deficiencia de hormona del crecimiento endógena, síndrome Turner, trastorno anabólico y deficiencia de hormona del crecimiento adulta.

Fig 1

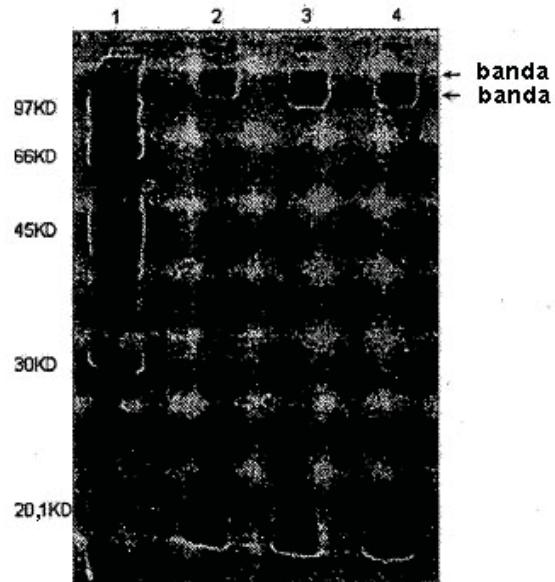


Fig 2

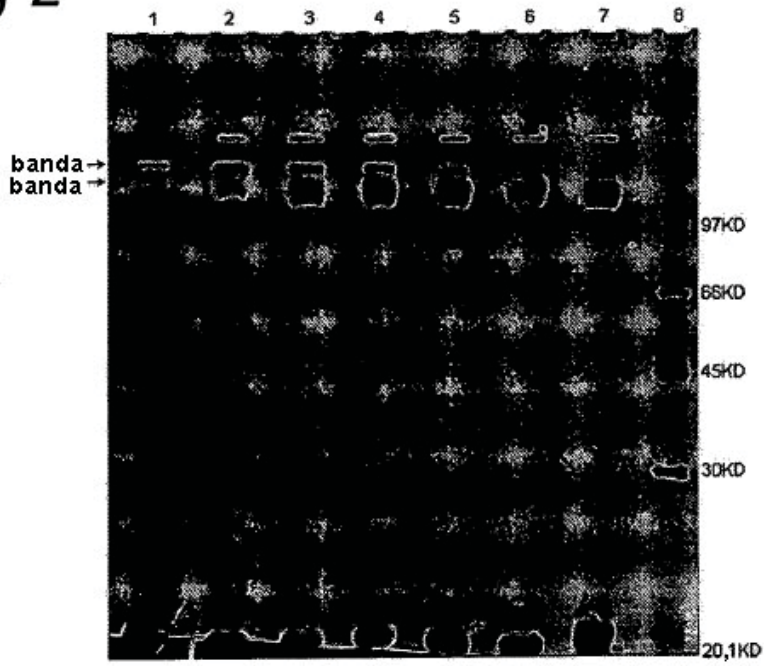


Fig 3

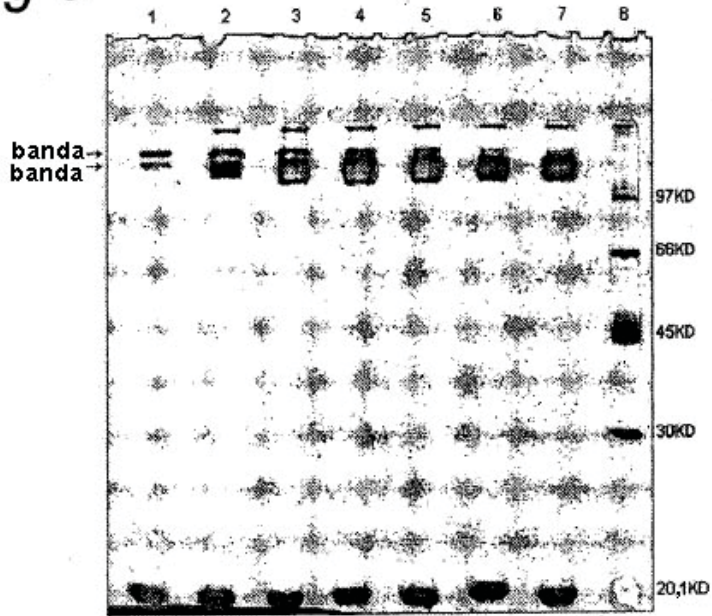


Fig 4

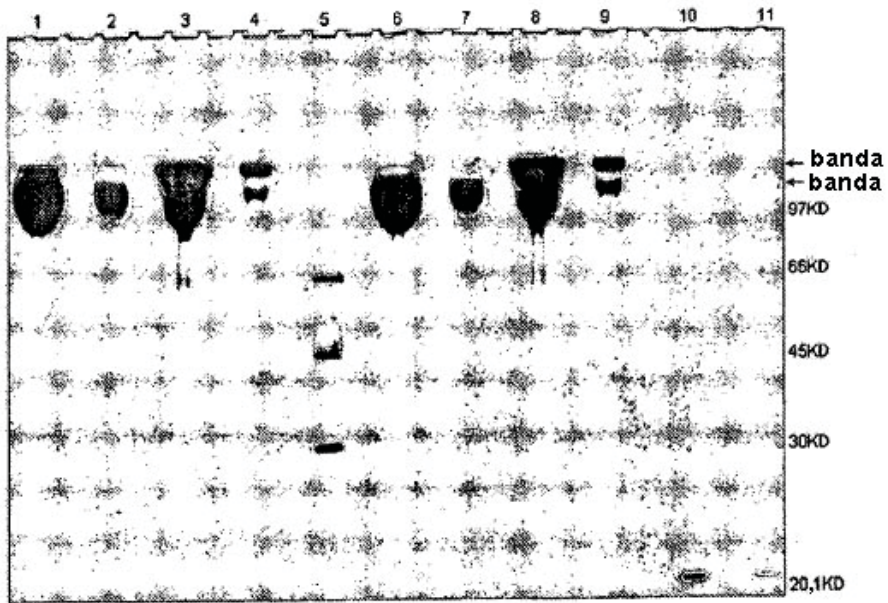
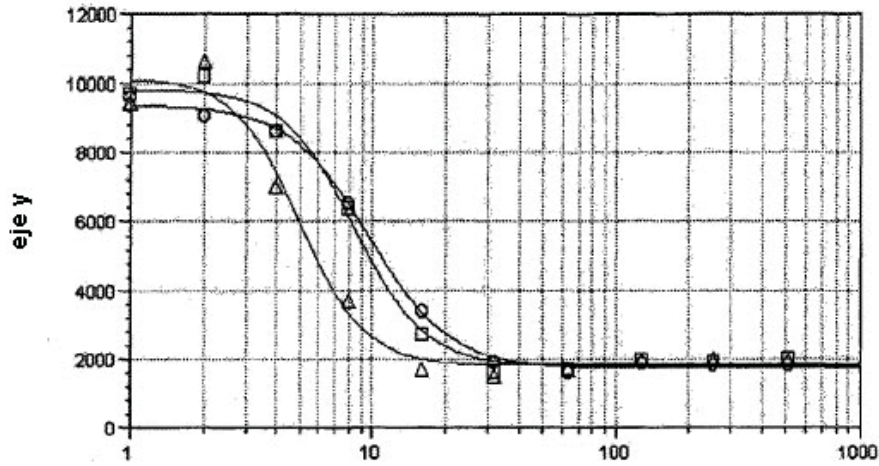


Fig 5

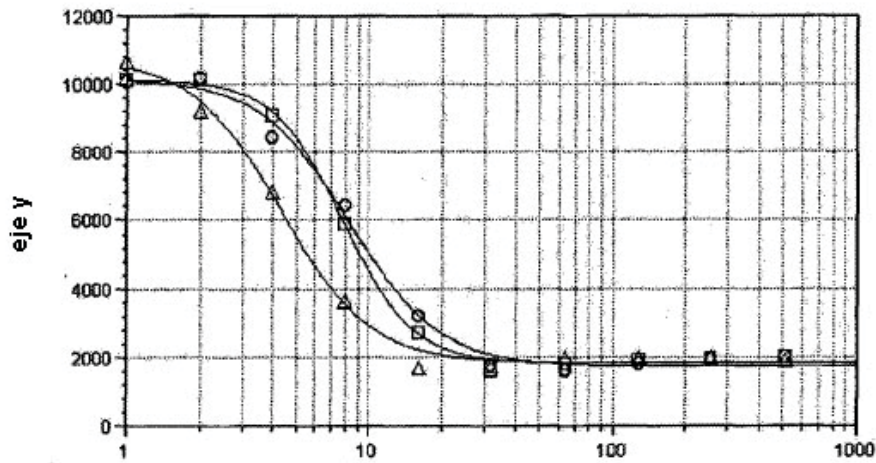


eje x

$$y = ((A - D) / (1 + (x/C)^B)) + D$$

	A	B	C	D	R ²
○ std (STD: Concentración vs Valor Medio)	9391.963	2.593	9.699	1712.295	0.998
□ b (U10,5: Concentración vs Valor Medio)	9855.903	2.965	8.425	1777.698	0.994
△ c (U6: Concentración vs Valor Medio)	10185.31	3.181	4.994	1793.196	0.984

Placa 1



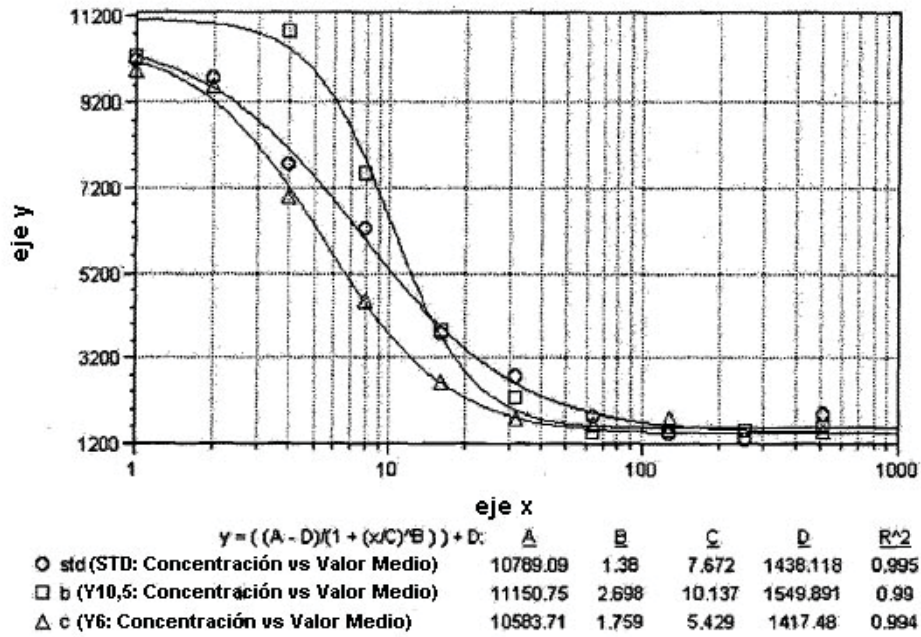
eje x

$$y = ((A - D) / (1 + (x/C)^B)) + D$$

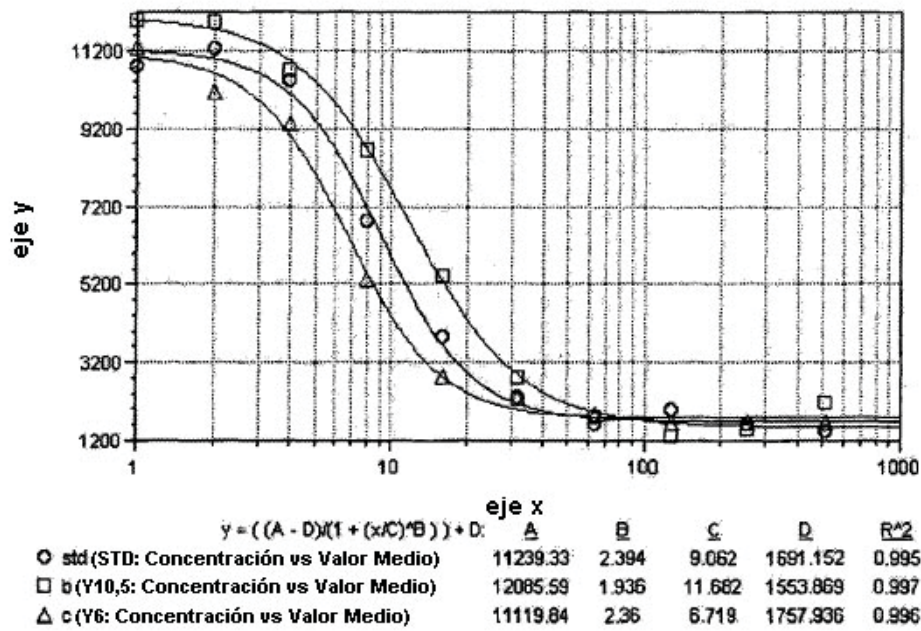
	A	B	C	D	R ²
○ std (STD: Concentración vs Valor Medio)	10158.22	2.33	8.3	1717.566	0.994
□ b (U10,5: Concentración vs Valor Medio)	10135.34	3.021	7.822	1815.743	0.996
△ c (U6: Concentración vs Valor Medio)	10742.85	2.354	4.334	1822.788	0.995

Placa 2

Fig 6



Placa 1



Placa 2

Fig 7

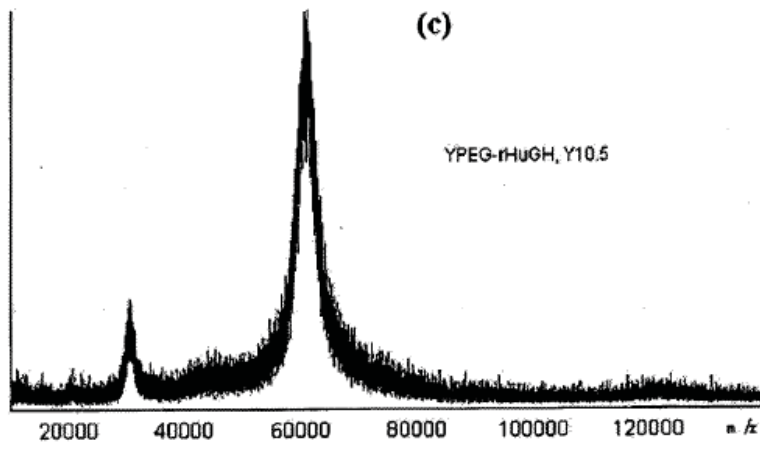
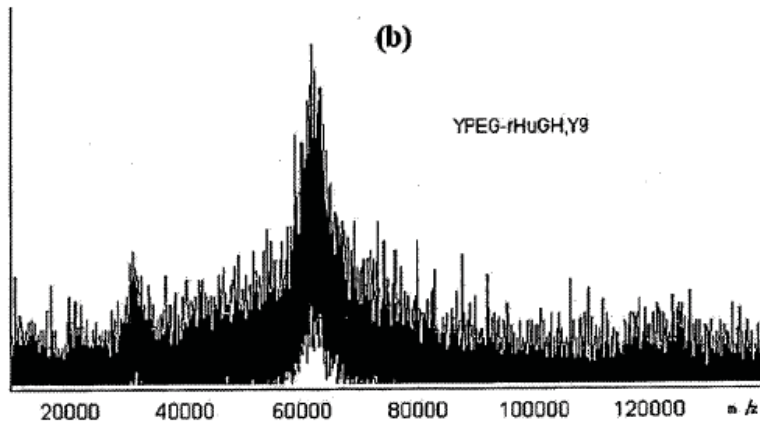
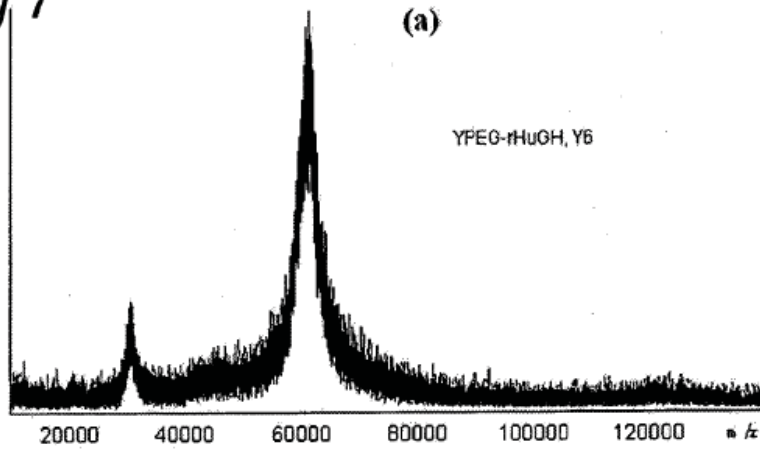


Fig 7

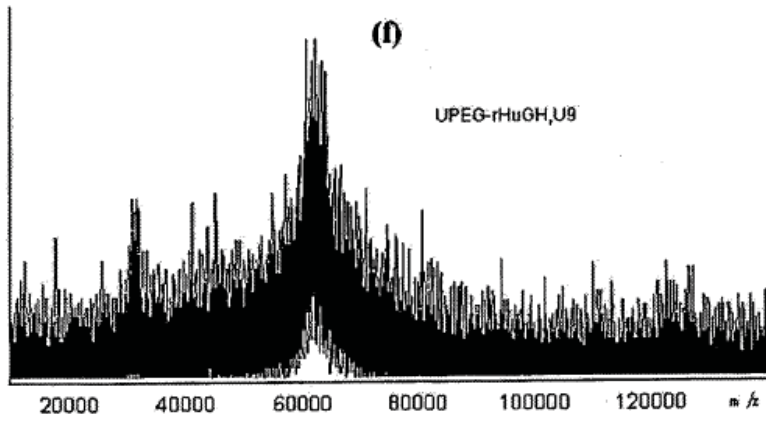
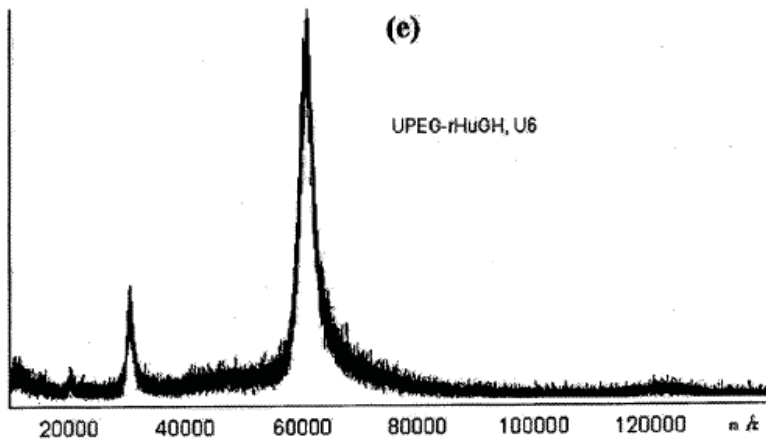
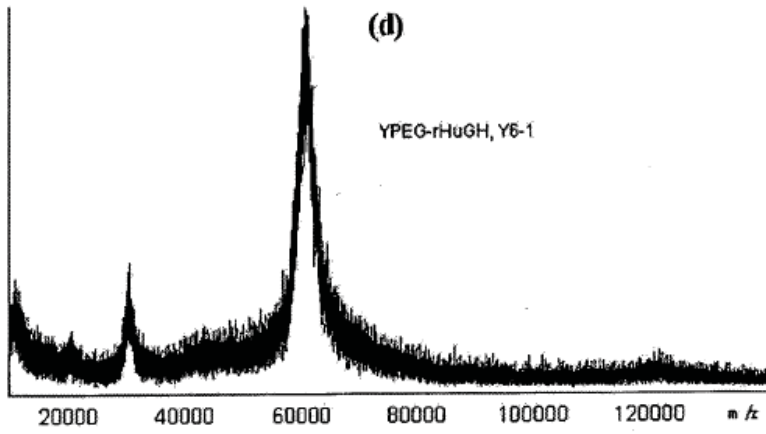


Fig 7

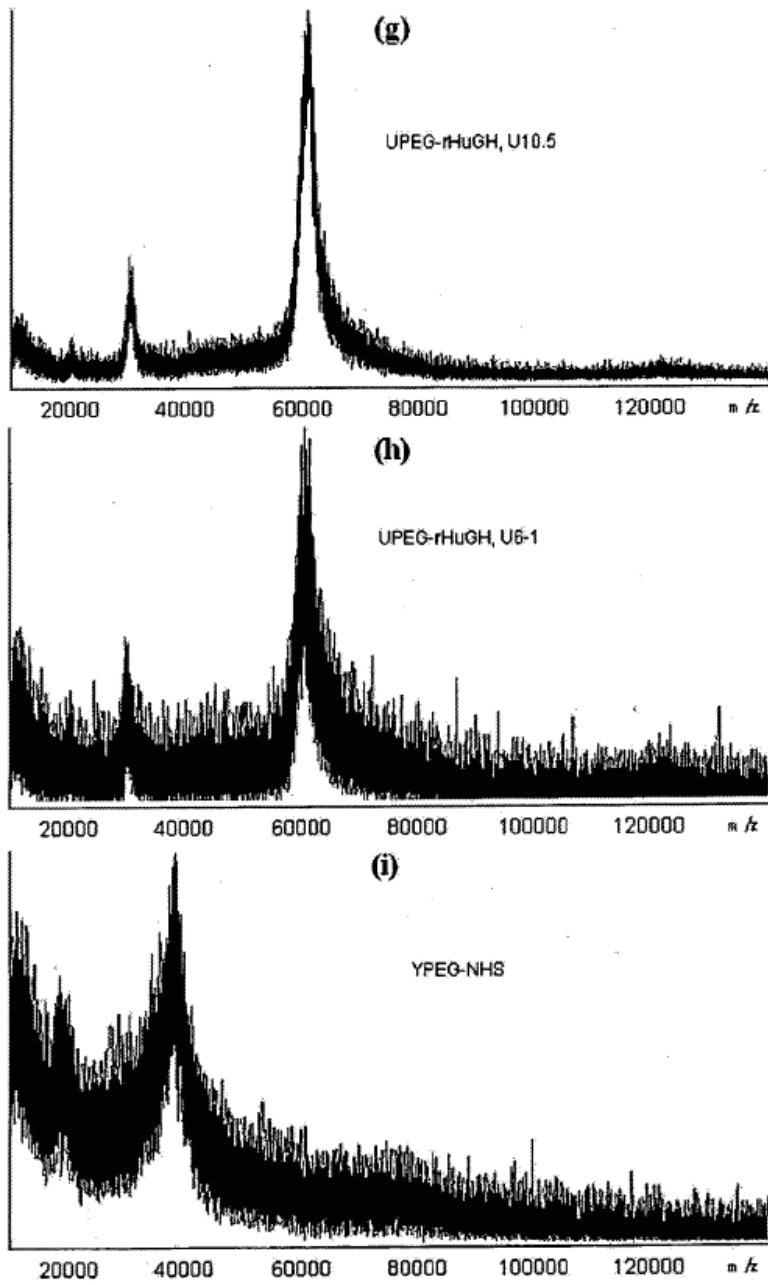


Fig 7

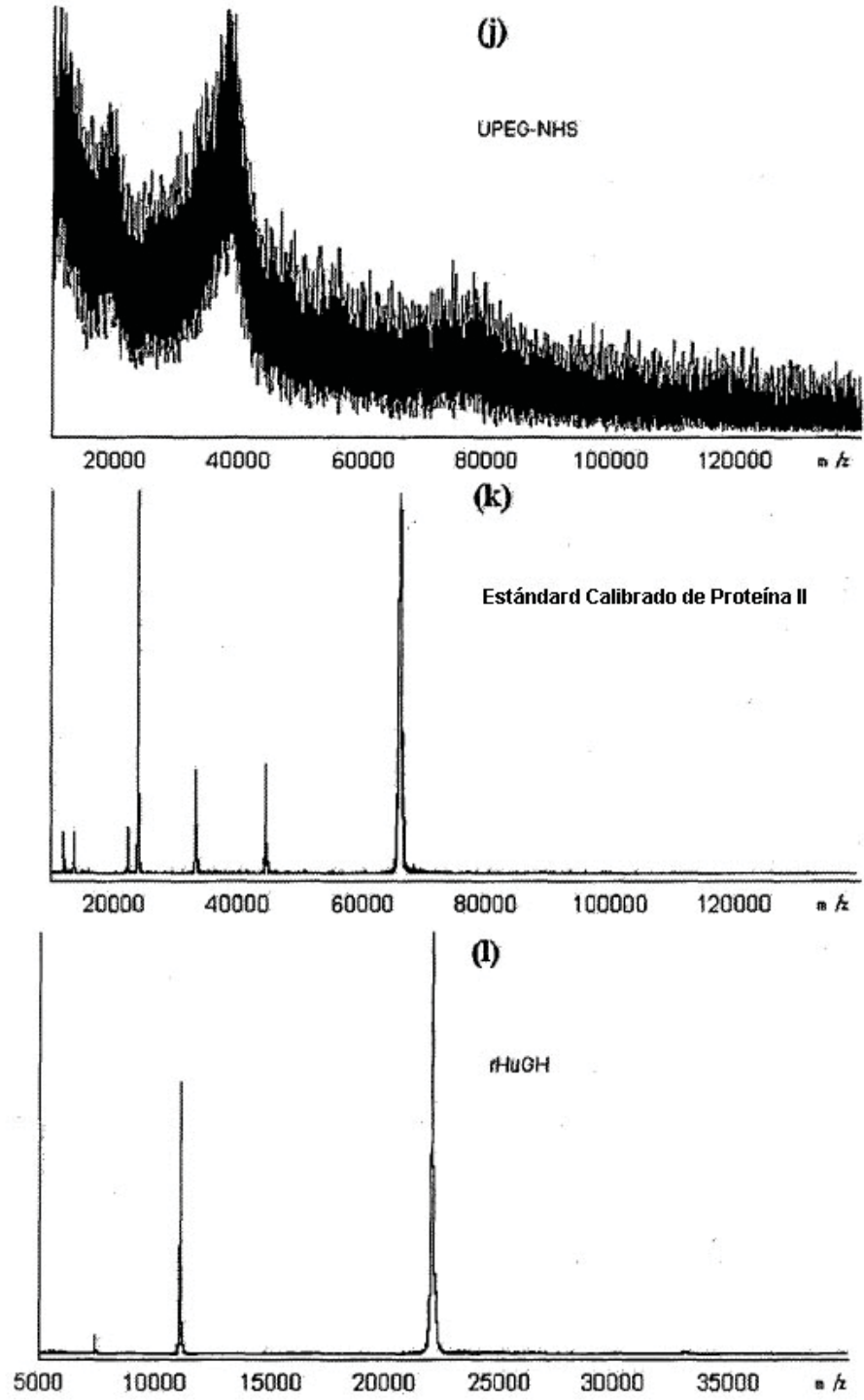


Fig 7

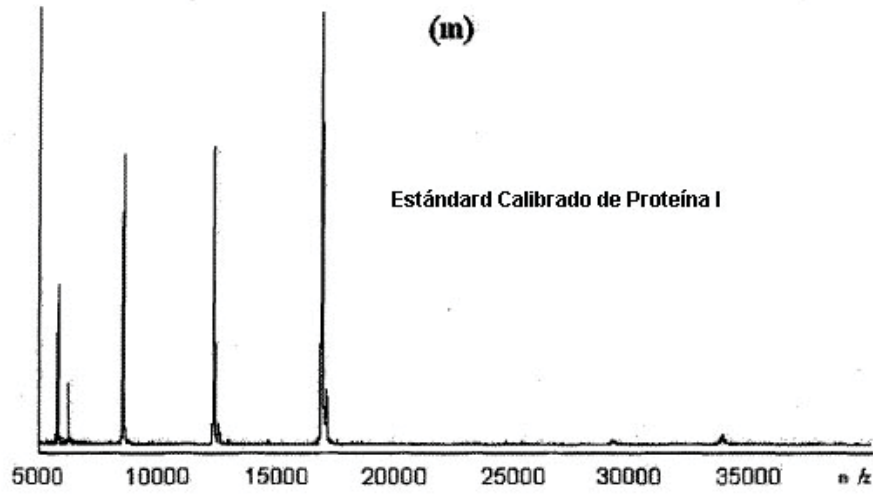


Fig 8

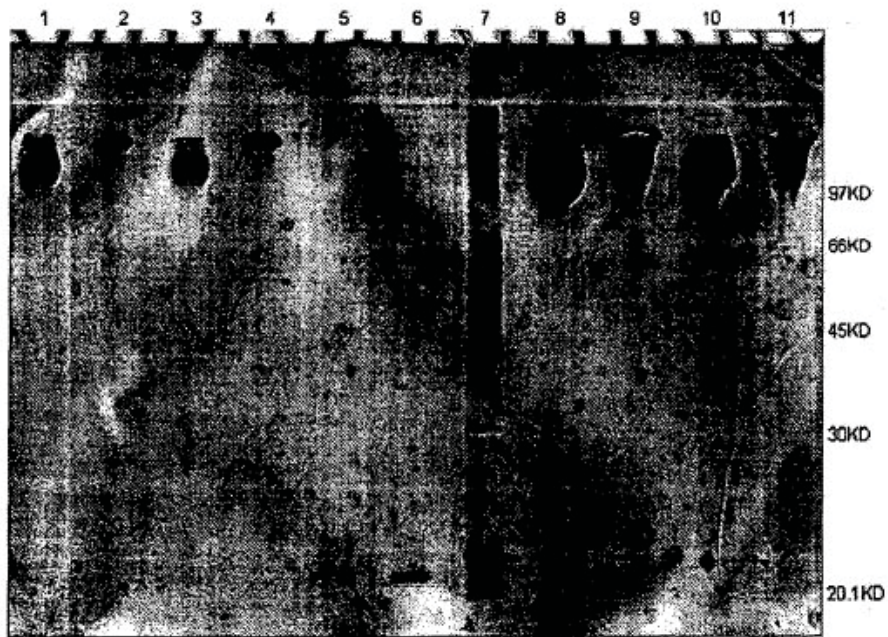


Fig 9

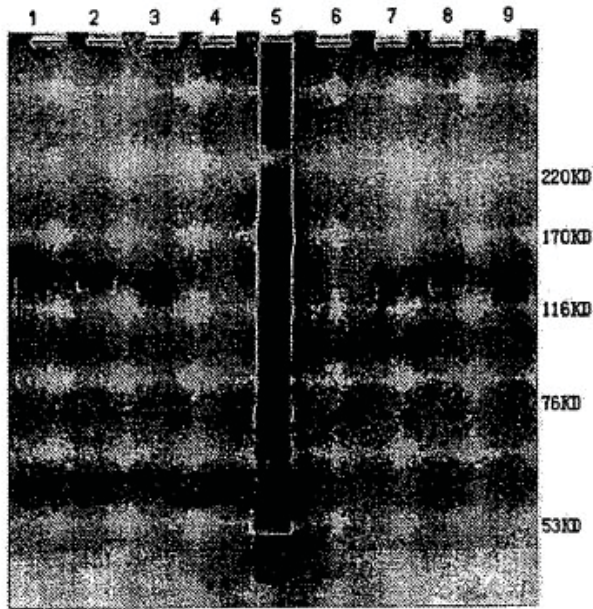


Fig 10

