

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035352**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.01

(51) Int. Cl. *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 38/27 (2006.01)

(21) Номер заявки
201490393

(22) Дата подачи заявки
2012.08.02

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФИЦИТА СОМАТОТРОПНОГО ГОРМОНА**

(31) **13/195,931**

(32) **2011.08.02**

(33) **US**

(43) **2015.01.30**

(86) **PCT/IL2012/050288**

(87) **WO 2013/018098 2013.02.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОПКО БАЙОЛОДЖИКС ЛТД (IL)

(72) Изобретатель:
Фарес Фуад, Фима Уди Эйял (IL)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A-5597797**
US-A1-20100081614
FARES et al. Development of a Long-Acting Erythropoietin by Fusing the Carboxyl-Terminal Peptide of Human Chorionic Gonadotropin b-Subunit to the Coding Sequence of Human Erythropoietin. *Endocrinology*. 2007, Vol. 148(10), p. 5081-7. Entire Documentation, especially Abstract

(57) Изобретение относится к способам лечения дефицита гормона роста у взрослого человека путем поддержания уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в пределах нормального терапевтического диапазона.

B1

035352

035352

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет заявки США, серийный номер 13/195931, поданной 2 августа 2011 года, которая является частичным продолжением патентной заявки США, серийный номер 12/509188, поданной 24 июля 2009 года, которая является частичным продолжением патентной заявки США, серийный номер 12/476916, поданной 2 июня 2009 года, которая является частичным продолжением патентной заявки США, серийный номер 12/401746, поданной 11 марта 2009 года, которая является продолжением патентной заявки США, серийный номер 11/700911, поданной 1 февраля 2007 года, которая заявляет преимущества предварительной патентной заявки США, серийный номер 60/764761, поданной 3 февраля 2006 года. Все эти заявки включены в описание в качестве ссылки в полном объеме.

Область изобретения, к которой относится изобретение

Описано применение белка соматотропного гормона и полинуклеотидов, кодирующих его, который содержит аминоконцевой и карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина и два карбоксиконцевых СТР хорионического гонадотропина, которые присоединены к соматотропному гормону, к способу стимуляции потери веса или снижения телесного жира, к способу повышения уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) и к способу снижения частоты приема соматотропного гормона у человека. Также описаны фармацевтические композиции, содержащие соматотропный гормон и полинуклеотиды, кодирующие соматотропный гормон, по изобретению, и способы его применения.

Уровень техники

Полипептиды чувствительны к денатурации или ферментной деградации в крови, печени или почке. Соответственно полипептиды обычно имеют короткий полупериод жизни в кровотоке, составляющий несколько часов. Из-за своей низкой стабильности пептидные лекарственные средства обычно вводят с постоянной частотой для поддержания эффективной концентрации активного пептида в плазме. Помимо этого, поскольку пептидные лекарственные средства обычно вводятся путем инфузии, частые инъекции пептидных лекарственных средств вызывают значительный дискомфорт у индивида. Таким образом, существует потребность в технологиях, которые продлевают полупериоды жизни терапевтических полипептидов, при этом сохраняя их высокую фармакологическую эффективность. Такие желаемые пептидные лекарственные средства также должны соответствовать требованиям, касающихся повышенной стабильности в сыворотке, высокой активности и низкой вероятности вызвать нежелательный иммунный ответ путем введения инъекции индивиду.

Нежелательные параметры фармакокинетики, такие как короткий полупериод жизни в сыворотке, могут препятствовать фармацевтической разработке большого числа многообещающих кандидатных лекарственных средств. Полупериод жизни в сыворотке является эмпирической характеристикой молекулы, и его следует определять экспериментально для каждого нового кандидатного лекарственного средства. Например, в отношении полипептидных лекарственных средств с более низким молекулярным весом механизмы физиологического клиренса, такие как фильтрация почками, могут сделать поддержание терапевтических уровней лекарственного средства неосуществимым из-за стоимости или частоты необходимого режима дозирования. С другой стороны, долгий полупериод жизни в сыворотке нежелателен в тех случаях, когда лекарственное средство или его метаболиты обладают токсическими побочными эффектами.

Сущность изобретения

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения дефицита соматотропного гормона у взрослого человека путем поддержания уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в пределах нормального терапевтического диапазона, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного соматотропного гормона, где аминокислотная последовательность указанного модифицированного полипептида соответствует SEQ ID NO: 11, и где указанный полипептид вводят в количестве 1,2-4 мг/неделя.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения дефицита соматотропного гормона у взрослого человека путем поддержания уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в пределах нормального терапевтического диапазона, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного соматотропного гормона, где аминокислотная последовательность указанного модифицированного полипептида соответствует аминокислотам 27-301 последовательности SEQ ID NO: 11, и где указанный полипептид вводят в количестве 1,2-4 мг/неделя.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способам, как указано выше, в которых указанный модифицированный полипептид вводят в количестве 1,2, 1,8, 2, 4 мг один раз в неделю, необязательно, где в которых указанный модифицированный полипептид вводят подкожно.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к варианту способов, как указано выше, в которых по меньшей мере один СТР гликозилирован.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к варианту способов, как указано выше, в котором указанный модифицированный полипептид кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 16.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой вестерн-блоттинг, иллюстрирующий молекулярный вес и идентичность hGH (SEQ ID NO: 5), hGH-СТР (SEQ ID NO: 9), hGH-СТР-СТР (SEQ ID NO: 10), СТР-hGH-СТР-СТР (SEQ ID NO :11) и tСТР-hGH-СТР-СТР (SEQ ID NO: 12).

Проводили блоттинг PAGE SDS геля и окрашивали моноклональными антителами против hGH. Фотография демонстрирует, что, как и в случае с коммерческим hGH и hGH дикого типа, hGH-варианты, модифицированные СТР, распознаются антителами против hGH.

Фиг. 2 представляет собой столбчатую диаграмму, иллюстрирующую набор массы у крыс с удаленным гипофизом после введения полипептидов GH-СТР (различные модификации) по настоящему изобретению.

Фиг. 3 включает две схемы: (1) карту плазмиды СТР-hGH-СТР-СТР pCI-dhfr и (2) структурную формулу белка СТР-hGH-СТР-СТР.

Фиг. 4 представляет собой графики, демонстрирующие средние концентрации в плазме СТР-hGH-СТР-СТР или GH (пг/мл) после однократной внутривенной или подкожной дозы СТР-hGH-СТР-СТР или GH у крыс (n=3-6 на дозу/способ введения).

Фиг. 5 представляет собой графики, демонстрирующие средний возрастающий набор массы после однократных подкожных доз СТР-hGH-СТР-СТР (0,4, 0,8 и 4 мг/кг) у крыс с удаленным гипофизом по сравнению с ежедневными инъекциями GH (0,1 мг/кг/день) (n=10 на дозу).

Фиг. 6 представляет собой график, демонстрирующий, что площадь под кривой после однократной инъекции СТР-hGH-СТР-СТР коррелирует с набором массы тела у крыс.

Фиг. 7 представляет собой график, демонстрирующий постепенно возрастающий набор массы после подкожных доз СТР-hGH-СТР-СТР (0,4, 0,8 и 4 мг/кг) один раз в 4 дня у крыс с удаленным гипофизом по сравнению с ежедневными инъекциями GH (0,1 мг/кг/день) (n=10 на дозу).

Фиг. 8 представляет собой график, демонстрирующий концентрацию hGH в сыворотке у крыс с удаленным гипофизом после подкожной инъекции СТР-hGH-СТР-СТР и коммерческого hGH. Однократные дозы СТР-hGH-СТР-СТР 0,6 или 1,8 мг/кг и биотропина 0,35 или 1,05 мг/кг вводили подкожно крысам с удаленным гипофизом для определения профиля фармакокинетики/фармакодинамики. Сывороточный hGH после инъекции измеряли с использованием специальных наборов для твердофазного иммуноферментного анализа ELISA.

Фиг. 9 представляет собой график, демонстрирующий уровни IGF-1 в сыворотке у крыс с удаленным гипофизом после подкожной инъекции СТР-hGH-СТР-СТР и коммерческого hGH. Однократные дозы СТР-hGH-СТР-СТР 0,6 или 1,8 мг/кг и биотропина 0,35 или 1,05 мг/кг вводили подкожно крысам с удаленным гипофизом для определения профиля фармакокинетики/фармакодинамики. Сывороточный IGF-I после инъекции измеряли с использованием специальных наборов для твердофазного иммуноферментного анализа ELISA (Roche Diagnostics).

Подробное описание изобретения

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к соматотропным гормонам пролонгированного действия и к способам их получения и применения. В другом варианте осуществления изобретения соматотропные гормоны пролонгированного действия содержат карбоксиконцевой пептид (СТР, также упоминаемый как СТР-единица). В другом варианте осуществления изобретения полипептиды пролонгированного действия содержат карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина человека (hCG). В другом варианте осуществления изобретения СТР действует как защитное средство против деградации соматотропного гормона или искомым полипептидов. В другом варианте осуществления изобретения СТР увеличивает C_{max} соматотропных гормонов или искомым полипептидов. В другом варианте осуществления изобретения СТР увеличивает T_{max} соматотропных гормонов или искомым полипептидов. В другом варианте осуществления изобретения СТР увеличивает полупериоды жизни в кровотоке соматотропных гормонов или искомым полипептидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения СТР усиливает активность соматотропных гормонов или искомым полипептидов.

В других вариантах осуществления изобретения сконструированные соматотропные гормоны или искомые полипептиды изобретения, содержащие единичный СТР, присоединенный к аминоконцу, и два СТР пептида, присоединенных последовательно к карбоксильному концу, по меньшей мере эквивалентны соматотропным гормонам с немодифицированным СТР или искомым полипептидам в отношении биологической активности. В других вариантах осуществления изобретения сконструированные соматотропные гормоны или искомые полипептиды изобретения, содержащие единичный СТР, присоединенный к аминоконцу, и два СТР пептида, присоединенных последовательно к карбоксильному концу, по меньшей мере эквивалентны соматотропным гормонам с немодифицированным СТР или искомым полипептидам относительно фармакологических показателей, таких как фармакокинетика и фармакодинамика.

ка.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему соматотропный гормон и по меньшей мере один СТР пептид, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона, и по меньшей мере два карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему один карбоксиконцевой пептид хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона, и два карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона.

В другом варианте осуществления изобретения термины "СТР пептид", "карбоксиконцевой пептид" и "последовательность СТР" в настоящем описании используются взаимозаменяемо. В другом варианте осуществления изобретения карбоксиконцевой пептид представляет собой полноразмерный СТР. В другом варианте осуществления изобретения карбоксиконцевой пептид представляет собой усеченный СТР. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения "сигнальная последовательность" и "сигнальный пептид" в настоящем описании используются взаимозаменяемо. В другом варианте осуществления изобретения "последовательность" в применении к полинуклеотиду может относиться к кодирующей области. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления изобретение относится к полипептиду, состоящему из соматотропного гормона, единичного карбоксиконцевого пептида хорионического гонадотропина, присоединенного к аминоконцу соматотропного гормона, и двух карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона. В другом варианте осуществления изобретение относится к полипептиду, состоящему из соматотропного гормона, единичного карбоксиконцевого пептида хорионического гонадотропина, присоединенного к аминоконцу соматотропного гормона, двух карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона, и сигнального пептида, присоединенного к аминоконцу одного карбоксиконцевого пептида хорионического гонадотропина.

В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон, содержащий СТР, как описано в настоящем описании, обладает повышенной биологической активностью *in vivo* по сравнению с таким же соматотропным гормоном без СТР. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон, содержащий по меньшей мере один СТР, присоединенный к своему аминоконцу, и по меньшей мере два СТР, присоединенных к его карбоксильному концу, обладает повышенной биологической активностью *in vivo* по сравнению с таким же соматотропным гормоном без СТР. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон, содержащий один СТР, присоединенный к своему аминоконцу, и два СТР, присоединенных к своему карбоксильному концу, обладает повышенной биологической активностью *in vivo* по сравнению с таким же соматотропным гормоном без СТР.

В другом варианте осуществления изобретения индивид является человеком. В другом варианте осуществления изобретения индивид является домашним животным. В другом варианте осуществления изобретения индивид является сельскохозяйственным животным. В другом варианте осуществления изобретения индивид является обезьяной. В другом варианте осуществления изобретения индивид является лошадью. В другом варианте осуществления изобретения индивид является коровой. В другом варианте осуществления изобретения индивид является мышью. В другом варианте осуществления изобретения индивид является крысой. В одном из вариантов осуществления изобретения индивид является мужчиной. В другом варианте осуществления изобретения индивид является женщиной.

В другом варианте осуществления изобретения конфигурация СТР-соматотропный гормон-СТР-СТР, как описано в настоящем описании, содержит соматотропный гормон или активный его фрагмент, соединенный через пептидную связь по меньшей мере с одной единицей СТР. В другом варианте осуществления изобретения СТР-соматотропный гормон-СТР-СТР, как описано в настоящем описании, содержит соматотропный гормон или активный его фрагмент, соединенный через пептидную связь по меньшей мере с одной единицей СТР, которая соединена с дополнительной единицей СТР через пептидную связь. В другом варианте осуществления изобретения полипептид, как описано в настоящем описании, содержащий соматотропный гормон и/или его фрагменты, и единицы СТР и/или их фрагменты, взаимно связаны через пептидную связь. В другом варианте осуществления изобретения одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, описываемый в настоящем описании, содержащий соматотропный гормон и/или его фрагменты и единицы СТР и/или их фрагменты.

В другом варианте осуществления изобретения карбоксиконцевой пептид (СТР) присоединен к соматотропному гормону через линкер. В другом варианте осуществления изобретения линкер, который соединяет последовательность СТР с соматотропным гормоном, представляет собой ковалентную связь. В другом варианте осуществления изобретения линкер, который соединяет последовательность СТР с соматотропным гормоном, представляет собой пептидную связь. В другом варианте осуществления изобретения линкер, который соединяет последовательность СТР с соматотропным гормоном, представляет

собой замещенную пептидную связь. В другом варианте осуществления изобретения последовательность карбоксиконцевого пептида (СТР) содержит аминокислотную последовательность, отобранную из последовательностей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления изобретения SEQ ID NO: 1 содержит следующую аминокислотную (АК) последовательность: DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILQ (SEQ ID NO: 1). В другом варианте осуществления изобретения SEQ ID NO: 2 содержит следующую аминокислотную (АК) последовательность: SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 2).

В другом варианте осуществления изобретения последовательность карбоксиконцевого пептида (СТР) является усеченной. В другом варианте осуществления изобретения усеченный СТР содержит следующую аминокислотную последовательность: SSSSKAPPPSLP (SEQ ID NO: 4).

В другом варианте осуществления изобретения карбоксиконцевой пептид (СТР) по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность от аминокислоты 112 до положения 145 пептида нативного хорионического гонадотропина человека. В другом варианте осуществления изобретения последовательность СТР по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность от аминокислоты 118 до положения 145 пептида нативного хорионического гонадотропина человека. В другом варианте осуществления изобретения последовательность СТР также начинается от любого положения между положениями 112-118 и заканчивается в положении 145 пептида нативного хорионического гонадотропина человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина пептида последовательности СТР составляет 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34 аминокислот и начинается в положении 112, 113, 114, 115, 116, 117 или 118 библиотеки генов, в которой хранится аминокислотная последовательность СТР.

В другом варианте осуществления изобретения пептид СТР представляет собой пептид СТР, как это описано в патенте США, который включен в настоящую заявку в качестве ссылки в полном объеме. В другом варианте осуществления изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР заменами 1-5 консервативных аминокислот, как это описано в патенте США № 5712122, который включен в настоящую заявку в качестве ссылки в полном объеме. В другом варианте осуществления изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР заменой 1 консервативной аминокислоты. В другом варианте осуществления изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР заменой 2-х консервативных аминокислот. В другом варианте осуществления изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР заменой 3 консервативных аминокислот. В другом варианте осуществления изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР заменой 4 консервативных аминокислот. В другом варианте осуществления изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР заменой 5 консервативных аминокислот. В другом варианте осуществления изобретения аминокислотная последовательность пептида СТР по настоящему изобретению по меньшей мере на 70% гомологична аминокислотной последовательности нативного СТР или его пептиду. В другом варианте осуществления изобретения аминокислотная последовательность пептида СТР по настоящему изобретению по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности нативного СТР или его пептиду. В другом варианте осуществления изобретения аминокислотная последовательность пептида СТР по настоящему изобретению по меньшей мере на 90% гомологична аминокислотной последовательности нативного СТР или его пептиду. В другом варианте осуществления изобретения аминокислотная последовательность пептида СТР по настоящему изобретению по меньшей мере на 95% гомологична аминокислотной последовательности нативного СТР или его пептиду.

В другом варианте осуществления изобретения ДНК последовательность пептида СТР по настоящему изобретению по меньшей мере на 70% гомологична ДНК последовательности нативного СТР человека или его пептиду. В другом варианте осуществления изобретения ДНК последовательность пептида СТР по настоящему изобретению по меньшей мере на 80% гомологична ДНК последовательности нативного СТР человека или его пептиду. В другом варианте осуществления изобретения ДНК последовательность пептида СТР по настоящему изобретению по меньшей мере на 90% гомологична ДНК последовательности нативного СТР человека или его пептиду. В другом варианте осуществления изобретения ДНК последовательность пептида СТР по настоящему изобретению по меньшей мере на 95% гомологична ДНК последовательности нативного СТР человека или его пептиду.

В одном из вариантов осуществления изобретения усеченный СТР содержит первые 11 аминокислот SEQ ID NO: 4. В одном из вариантов осуществления изобретения усеченный СТР содержит первые 8 аминокислот SEQ ID NO: 4. В одном из вариантов осуществления изобретения усеченный СТР содержит первые 13 аминокислот SEQ ID NO: 4. В одном из вариантов осуществления изобретения усеченный СТР содержит первые 6 аминокислот SEQ ID NO: 4. В одном из вариантов осуществления изобретения усеченный СТР содержит первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 4.

В одном из вариантов осуществления изобретения по меньшей мере одна из аминокислотных по-

следовательностей СТР хорионического гонадотропина гликозилирована. В другом варианте осуществления изобретения обе аминокислотные последовательности СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте осуществления изобретения 2 аминокислотные последовательности СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте осуществления изобретения 2 или более аминокислотные последовательности СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте осуществления изобретения все аминокислотные последовательности СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В одном из вариантов осуществления изобретения последовательность СТР по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один участок гликозилирования. В одном из вариантов осуществления изобретения последовательность СТР по настоящему изобретению содержит 2 участка гликозилирования. В одном из вариантов осуществления изобретения последовательность СТР по настоящему изобретению содержит 3 участка гликозилирования. В одном из вариантов осуществления изобретения последовательность СТР по настоящему изобретению содержит 4 участка гликозилирования.

В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна последовательность карбоксиконцевого пептида (СТР) содержит аминокислотную последовательность, отобранную из последовательностей SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере один карбоксиконцевой пептид (СТР) усеченный.

В одном из вариантов осуществления изобретения термины "концы", "концевой" и "конец" в применении к карбоксильному концу или аминоконцу белка или пептида, или их фрагмента, приводимого в настоящем описании, используются в настоящем описании взаимозаменяемо. В другом варианте осуществления изобретения термины "С-концевой", "карбоксиконцевой" или "карбоксильный конец" используются в настоящем описании взаимозаменяемо. В другом варианте осуществления изобретения термины "N-концевой" и "аминоконцевой" в настоящем описании используются взаимозаменяемо. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант осуществления настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения последовательности СТР как на аминоконце соматотропного гормона, так и на карбоксиконце соматотропного гормона обеспечивают повышенную защиту от деградации соматотропного гормона. В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминоконце соматотропного гормона и две единицы СТР на карбоксиконце соматотропного гормона обеспечивают повышенную защиту от клиренса. В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминоконце соматотропного гормона и две единицы СТР на карбоксиконце соматотропного гормона обеспечивают продление времени клиренса. В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминоконце соматотропного гормона и две единицы СТР на карбоксиконце соматотропного гормона увеличивают C_{max} соматотропного гормона. В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминоконце соматотропного гормона и две единицы СТР на карбоксиконце соматотропного гормона увеличивают T_{max} соматотропного гормона. В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминоконце соматотропного гормона и две единицы СТР на карбоксиконце соматотропного гормона увеличивают $T_{1/2}$ (полупериод жизни) соматотропного гормона.

В другом варианте осуществления изобретения последовательности СТР на обоих концах - аминоконце соматотропного гормона и карбоксиконце соматотропного гормона - продлевают полупериод жизни модифицированного соматотропного гормона. В другом варианте осуществления изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминоконце соматотропного гормона и по меньшей мере две последовательности СТР на карбоксиконце соматотропного гормона обеспечивают продленный полупериод жизни модифицированному соматотропному гормону. В другом варианте осуществления изобретения одна последовательность СТР на аминоконце соматотропного гормона и две последовательности СТР на карбоксиконце соматотропного гормона обеспечивают продленный полупериод жизни присоединенному соматотропному гормону. В другом варианте осуществления изобретения одна последовательность СТР на аминоконце соматотропного гормона и две последовательности СТР, расположенные последовательно на карбоксиконце соматотропного гормона, обеспечивают продленный полупериод жизни модифицированному соматотропному гормону.

В другом варианте осуществления изобретения последовательность СТР на аминоконце полипептида, последовательность СТР на карбоксиконце соматотропного гормона и по меньшей мере одна дополнительная последовательность СТР, присоединенная последовательно к последовательности СТР на карбоксильном конце, обеспечивают повышенную защиту от деградации соматотропному гормону. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность СТР на аминоконце соматотропного гормона, последовательность СТР на карбоксиконце соматотропного гормона и по меньшей мере одна дополнительная последовательность СТР, присоединенная последовательно к последовательности СТР на карбоксильном конце, продлевают полупериод жизни соматотропного гормона. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности СТР на аминоконце соматотропного гормона, последовательность СТР на карбоксиконце соматотропного гормона и по меньшей мере одна дополнительная последовательность СТР, присоединенная последовательно к последовательности СТР на кар-

боксильном конце, усиливают биологическую активность соматотропного гормона.

В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения сигнальные последовательности включают, но ими не ограничиваются, эндогенную сигнальную последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения сигнальные последовательности включают, но ими не ограничиваются, эндогенную сигнальную последовательность любого известного соматотропного гормона или соматотропных гормонов. В еще одном варианте осуществления изобретения полипептиды по настоящему изобретению представляют собой, а способы по настоящему изобретению предоставляют соматотропный гормон, имеющий дополнительно сигнальный пептид, содержащий следующую аминокислотную последовательность: MATGSRSTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA (SEQ ID NO:3).

В другом варианте осуществления изобретения конъюгированные соматотропные гормоны по настоящему изобретению используются тем же методом, что и немодифицированные соматотропные гормоны. В другом варианте осуществления изобретения конъюгированные соматотропные гормоны по настоящему изобретению имеют повышенный полупериод жизни в кровотоке и время пребывания в плазме, сниженный клиренс и повышенную клиническую активность *in vivo*. В другом варианте осуществления изобретения благодаря улучшенным свойствам конъюгированных соматотропных гормонов, описываемых в настоящем описании, эти конъюгаты вводятся менее часто по сравнению с немодифицированными соматотропными гормонами. В другом варианте осуществления изобретения конъюгированные соматотропные гормоны, описываемые в настоящем описании, вводятся с частотой от одного раза в одну неделю до одного раза в две недели. В другом варианте осуществления изобретения конъюгированные соматотропные гормоны, описываемые в настоящем описании, вводятся с частотой от одного раза каждые две недели до одного раза каждые три недели. В другом варианте осуществления изобретения конъюгированные соматотропные гормоны, описываемые в настоящем описании, вводятся с частотой от одного раза в день до трех раз в неделю. В другом варианте осуществления изобретения сниженная частота введения приведет в результате к улучшенному соблюдению пациентом режима и схемы лечения, что приводит к улучшенным результатам лечения наряду с улучшенным качеством жизни пациента. В другом варианте осуществления изобретения по сравнению с традиционными конъюгатами соматотропных гормонов, связанными с поли(этиленгликолем), было выявлено, что СТР конъюгаты соматотропного гормона, имеющие молекулярный вес и структуру линкера конъюгатов по настоящему изобретению, имеют улучшенную активность, улучшенную стабильность, повышенные уровни AUC, повышенный полупериод жизни в кровотоке. В другом варианте осуществления изобретения по сравнению с традиционными конъюгатами соматотропных гормонов, связанными с поли(этиленгликолем), было выявлено, что соматотропные гормоны, имеющие молекулярный вес и структуру линкера конъюгатов по настоящему изобретению, имеют улучшенную активность, улучшенную стабильность, повышенные уровни AUC, повышенный полупериод жизни в кровотоке. В другом варианте осуществления изобретения терапевтически эффективным количеством конъюгированного соматотропного гормона является количество конъюгата, необходимое для ожидаемой биологической активности, измеряемой *in vivo*. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон, используемый согласно идеям настоящего изобретения, проявляет повышенную активность. В другом варианте осуществления изобретения присоединение последовательности СТР как к аминоконцу, так и к карбоксильному концу соматотропного гормона приводит в результате к продленной активности *in vivo*.

В другом варианте осуществления изобретения терапевтически эффективное количество конъюгированного соматотропного гормона определяется в соответствии с такими факторами как конкретный тип состояния, которое подвергается лечению, состояние пациента, который подвергается лечению, наряду с другими компонентами в композиции. В другом варианте осуществления изобретения терапевтически эффективное количество конъюгированного соматотропного гормона составляет от 0,01 до 10 мкг на кг веса тела, вводимое один раз в неделю. В другом варианте осуществления изобретения терапевтически эффективное количество конъюгированного соматотропного гормона составляет от 0,1 до 1 мкг на кг веса тела, вводимое один раз в неделю. В другом варианте осуществления изобретения состав фармацевтической композиции, содержащей конъюгированный соматотропный гормон, разрабатывается с активностью, эффективной для введения различными способами пациенту-человеку.

В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон является любым соматотропным гормоном, известным специалисту в данной области. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон представляет собой соматотропный гормон человека. В другом варианте осуществления изобретения нуклеотидная последовательность и/или аминокислотная последовательность соматотропного гормона доступны в базе данных геномного банка. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон является гомологом. В другом варианте осуществления изобретения гомолог также относится к варианту делеции, вставки или замены, включая замены его аминокислот и его фрагментов биологически активного полипептида.

В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон представляет собой вариант hGH с отсутствующими экзонами 2, 3, 4 или любую комбинацию такового. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон содержит сигнальный пептид. В другом варианте осуществ-

ления изобретения соматотропный гормон содержит сигнальный участок рестрикции. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие GH, модифицированный СТР по настоящему изобретению, содержат рекомбинантный GH.

В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон, описываемый в настоящем описании, является членом суперсемейства цитокинов, подобных соматотропному гормону (GH). В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон, описываемый в настоящем описании, представляет собой соматотропный гормон человека (hGH). В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон человека содержит следующую аминокислотную последовательность (Genbank, номер доступа P01241):

```
MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIP
KEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANS
LVYGASDSNVYDLLKDLLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLL
YCFRKDMDKVVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO:5).
```

В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон человека содержит следующую аминокислотную последовательность:

```
MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPS
NREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEEGIQTLM
GRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVVETFLRIVQCRSVEGS
CGF (SEQ ID NO:6).
```

В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон человека содержит следующую аминокислотную последовательность: MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLA (SEQ ID NO:7). В другом варианте осуществления изобретения hGH содержит следующую аминокислотную последовательность:

```
MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIP
KVQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANS
LVYGASDSNVYDLLKDLLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLL
YCFRKDMDKVVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO:8).
```

В другом варианте осуществления изобретения hGH представляет собой вариант замены, в котором глутамин в положении 65 в hGH заменен валином.

В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа AAA72260. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа AAK69708. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа САА01435. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа САА01329. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа САА00380. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа ААА72555. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NP_000506.2. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NP_072053.1. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NP_072054.1. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NP_072055.1. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NP_072056.1.

В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, описываемый в настоящем описании, кодирует любую аминокислотную последовательность соматотропного гормона, известную специалисту в данной области. В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, описываемый в настоящем описании, кодирует hGH. В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NM_000515.3. В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NM_022559.2. В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, коди-

рующая соматотропный гормон, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NM_022560.2. В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NM_022561.2. В другом варианте осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NM_022562.2.

В другом варианте осуществления изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон по настоящему изобретению, содержит один СТР, присоединенный к карбоксильному концу соматотропного гормона (hGH-СТР) и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

```
MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFTDYQEFEEAYIP
KEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANS
LVYGASDSNVYDLLKDLLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDNNSHNDALLKNYGLL
YCFRKMDKQVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ
ID NO:9).
```

В другом варианте осуществления изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон по настоящему изобретению, содержит два СТР, последовательно присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона (hGH-СТР-СТР) и имеющих следующую аминокислотную последовательность:

```
MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFTDYQEFEEAYIP
KEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANS
LVYGASDSNVYDLLKDLLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDNNSHNDALLKNYGLL
YCFRKMDKQVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAP
PPSLPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:10).
```

В другом варианте осуществления изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон по настоящему изобретению, содержит два СТР, присоединенных последовательно к карбоксильному концу соматотропного гормона, и один СТР, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона (СТР-hGH-СТР-СТР) и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

```
MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRL
FDNAMLRAHRLHQLAFTDYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSN
LELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEEGIQTLMGRLEDGSPRT
GQIFKQTYSKFDNNSHNDALLKNYGLLYCFRKMDKQVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAP
PPSLPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID
NO:11).
```

В другом варианте осуществления изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон по настоящему изобретению, содержит два СТР, последовательно присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона, в котором один СТР из двух СТР усечен, и один дополнительный СТР, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона (tСТР-hGH-СТР-СТР) и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

```
MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPSLPPFTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLA
FTDYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLE
PVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDNNSH
NDDALLKNYGLLYCFRKMDKQVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPSLPSRLPGPSDT
PILPQSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:12).
```

В другом варианте осуществления изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон по настоящему изобретению, содержит один СТР, присоединенный к карбоксильному концу соматотропного гормона, и один СТР, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона (СТР-hGH-СТР) и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

```
MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRL
FDNAMLRAHRLHQLAFTDYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSN
LELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEEGIQTLMGRLEDGSPRT
GQIFKQTYSKFDNNSHNDALLKNYGLLYCFRKMDKQVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAP
PPSLPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:13).
```

В другом варианте осуществления изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон и один СТР, содержит следующую аминокислотную последовательность:

```
MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRL
FDNAMLRAHRLHQLAFTDYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSN
LELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLLEEGIQTLMGRLEDGSPRT
GQIFKQTYSKFDNNSHNDALLKNYGLLYCFRKMDKQVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ
ID NO:14).
```

В другом варианте осуществления изобретения молекула полинуклеотида, кодирующего полипептид, имеющий СТР-hGH-СТР, содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcct
gccatggctgcaggagggcagcgcagcctcttcttctaaggtccacccccatctctgcccag
ccccagcagactgcccggccccagcgcacacccattctgcccagttccccaccatccccct
gagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggctcacaggctgcaccagctggcctttgacac
ctaccaggagtctgaggaagcctacatcccccaaggagcagaagtacagcttctctgcagaacc
ccagacctccctgtgcttcagcgcagagcatccccacccccagcaacagagaggagaccagca
gaagagcaacctggagctgctgaggatctccctgctgctgatccagagctggctggagcccgt
gcagttcttgagaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgcagcaacctgta
cgacctgctgaaggacctggaggaggcatccagaccctgatgggcccggctggaggacggcag
ccccaggaccggccagatcttcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagccacaacga
cgacgcccctgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaaggacatggacaaggtgga
gaccttctgaggatcgtgcagtcagaagcgtggaggcagctgaggcttcagctccagcag
caaggccccctccccgagcctgcccctcccccaagcaggctgctgggcccctccgacacaccaat
cctgctcagtgatgaaggtctggatcgggccgc (SEQ ID NO: 15).

В другом варианте осуществления изобретения молекула полинуклеотида, кодирующего полипептид, имеющий СТР-hGH-СТР-СТР, содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcct
gccatggctgcaggagggcagcgcagcctcttcttctaaggtccacccccatctctgcccag
ccccagcagactgcccggccccagcgcacacccattctgcccagttccccaccatccccct
gagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggctcacaggctgcaccagctggcctttgacac
ctaccaggagtctgaggaagcctacatcccccaaggagcagaagtacagcttctctgcagaacc
ccagacctccctgtgcttcagcgcagagcatccccacccccagcaacagagaggagaccagca
gaagagcaacctggagctgctgaggatctccctgctgctgatccagagctggctggagcccgt
gcagttcttgagaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgcagcaacctgta
cgacctgctgaaggacctggaggaggcatccagaccctgatgggcccggctggaggacggcag
ccccaggaccggccagatcttcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagccacaacga
cgacgcccctgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaaggacatggacaaggtgga
gaccttctgaggatcgtgcagtcagaagcgtggaggcagctgaggcttcagctccagcag
caaggccccctccccgagcctgcccctcccccaagcaggctgctgggcccctccgacacaccaat
cctgccacagagcagctcctctaaggccccctcctccatccctgccatccccctccccgctgcc
tggcccctctgacacccccatcctgctcagtgatgaaggtctggatcgggccgc (SEQ ID
NO:16).

В другом варианте осуществления изобретения молекула полинуклеотида, кодирующего полипептид, имеющий СТР-hGH-СТР-СТР, содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcct
gccatggctgcaggagggcagcgcagcctcttcttctaaggtccacccccagcctgcccct
ccccaccatccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggctcacaggctgcacca
gctggcctttgacacctaccaggagtctgaggaagcctacatcccccaaggagcagaagtacag
cttctctgcagaacccccagacctccctgtgcttcagcgcagagcatccccacccccagcaacag
agaggagaccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatctccctgctgctgatccagag
ctggctggagcccgtgcagttcttgagaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccag
cgacagcaacctgtacgacctgctgaaggacctggaggaggcatccagaccctgatggccc
gctggaggacggcagccccaggaccggccagatcttcaagcagacctacagcaagttcgacac
caacagccacaacgacgacgccctgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaagga
catggacaaggtggagaccttctgaggatcgtgcagtcagaagcgtggaggcagctgagg
cttcagctccagcagcaaggccccctccccgagcctgcccctcccccaagcaggctgctggccc
ctccgacacaccaatcctgccacagcagctcctctaaggccccctcctccatccctgccatc
cccctccccgctgctggcccctctgacacccccatcctgctcagtgatgaaggtctggatg
cgggccgc (SEQ ID NO:17).

В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению гомологичен известной последовательности соматотропного гормона. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон по настоящему изобретению гомологичен последовательности соматотропного гормона, как раскрывается в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения гомология в соответствии с настоящим изобретением также охватывает варианты делеции, вставки или замены, включая замены их аминокислот и фрагментов биологически активного полипептида таковых. В одном из вариантов осуществления изобретения вариант замены является таковым, в котором глутамин в положении 65 hGH заменен валином [Gellerfors et al., J Pharm Biomed Anal 1989, 7:173-83].

В одном из вариантов осуществления изобретения фраза "соматотропный гормон человека" (hGH)

относится к полипептиду, такому как представленный в Genbank под номером доступа P01241, проявляющему активность hGH (т.е. стимуляцию роста).

В одном из вариантов осуществления изобретения "соматотропный гормон человека" (hGH) относится к полипептиду, такому как представленный в Genbank под номером доступа P01241, проявляющему активность hGH (т.е. стимуляцию роста). В одном из вариантов осуществления изобретения hGH по настоящему изобретению также относится к гомологам. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность hGH по настоящему изобретению по меньшей мере на 50% гомологична последовательности hGH, представленной в Genbank под номером доступа P01241, как это определяется путем использования программного обеспечения BlastP Национального Центра Биотехнологической Информации (National Center of Biotechnology Information - NCBI), используя параметры по умолчанию. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность hGH по настоящему изобретению по меньшей мере на 60% гомологична последовательности hGH, представленной в Genbank под номером доступа P01241, как определяется путем использования программного обеспечения BlastP Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI), используя параметры по умолчанию. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность hGH по настоящему изобретению по меньшей мере на 70% гомологична последовательности hGH, представленной в Genbank под номером доступа P01241, как определяется путем использования программного обеспечения BlastP Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI), используя параметры по умолчанию. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность hGH по настоящему изобретению по меньшей мере на 80% гомологична последовательности hGH, представленной в Genbank под номером доступа P01241, как определяется путем использования программного обеспечения BlastP Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI), используя параметры по умолчанию. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность hGH по настоящему изобретению по меньшей мере на 90% гомологична последовательности hGH, представленной в Genbank под номером доступа P01241, как определяется путем использования программного обеспечения BlastP Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI), используя параметры по умолчанию. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная последовательность hGH по настоящему изобретению по меньшей мере на 95% гомологична последовательности hGH, представленной в Genbank под номером доступа P01241, как определяется путем использования программного обеспечения BlastP Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI), используя параметры по умолчанию.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, связывают адипоциты и стимулируют их к расщеплению триглицерида и повышают их способность захватывать и накапливать циркулирующие липиды. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, оказывают не прямое действие, опосредованное, в первую очередь, инсулиноподобным фактором роста-I (IGF-I) (как показано в разделе примеров).

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют рост организма путем стимуляции ткани печени и других тканей к выделению IGF-I. В другом варианте осуществления изобретения IGF-I стимулирует пролиферацию хондроцитов, приводящую в результате к росту костей. В другом варианте осуществления изобретения IGF-I стимулирует пролиферацию клеток скелетной мускулатуры, что в результате приводит к росту мышц.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, индуцируют метаболическое действие на белковый, липидный и углеводный метаболизм. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, обладают прямым действием. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, обладают непрямым действием путем индукции IGF-I. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, дополнительно содержат лидерный пептид. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, включают усеченные конструкторы СТР.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют анаболизм белка в ткани. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют поглощение аминокислот, повышенный белковый синтез и сниженное окисление белков.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют жировой метаболизм. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют расщепление жира путем стимуляции распада триглицерида и окисления в адипоците. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, уменьшают жир в организме.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют углеводный метаболизм. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, поддерживают глюкозу в крови в пределах нормального диапазона. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, включают антиинсулиновую активность. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, подавляют способность инсулина стимулировать усвоение глюкозы в периферических тканях и повышают синтез глюкозы в печени. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют секрецию инсулина, приводящую к гиперинсулинемии.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, используются для компенсации ограниченной выработки или отсутствия выработки соматотропного гормона у индивида. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, компенсируют ограниченную выработку или отсутствие выработки соматотропин-рилизинг-гормона (GHRH). В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, компенсируют повышенную активность соматостатина. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, компенсируют ограниченную выработку или отсутствие выработки грелина.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, используются для лечения заболеваний, связанных с повреждениями в гипоталамусе, гипофизе или в клетках-мишенях. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, используются для лечения заболеваний, связанных со сниженным ответом клеток-мишеней на гормон.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, используются для лечения детей со значительной задержкой роста. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, используются для лечения детей с патологически низким ростом. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР используются для повышения спортивных способностей. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР используются для лечения симптомов старения. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР используются для лечения косметических симптомов старения.

В другом варианте осуществления изобретения лечение соматотропным гормоном детей, дефицитных по соматотропному гормону, приводит в результате к усилению роста, в то время как лечение соматотропным гормоном взрослых, дефицитных по соматотропному гормону, приводит в результате к увеличению безжировой массы тела и снижению или сокращению жира в организме. В другом варианте осуществления изобретения лечение посредством форм GH, модифицированных СТР, приводит в результате к усилению этих эффектов у детей и взрослых. В другом варианте осуществления изобретения лечение посредством hGH, модифицированного СТР, у детей, дефицитных по соматотропному гормону, приводит в результате к усилению роста по сравнению с детьми, дефицитными по соматотропному гормону, получающими такую же дозу ежедневно коммерческого немодифицированного соматотропного гормона. В другом варианте осуществления изобретения лечение посредством hGH, модифицированным СТР, у детей приводит в результате к усилению роста по сравнению с детьми, получающими такую же дозу ежедневно коммерческого немодифицированного соматотропного гормона. В другом варианте осуществления изобретения лечение посредством hGH, модифицированного СТР, у взрослых, дефицитных по соматотропному гормону, приводит в результате к увеличению безжировой массы тела и сокращению жира в организме по сравнению со взрослыми, получающими такую же дозу ежедневно коммерческого немодифицированного соматотропного гормона. В другом варианте осуществления изобретения лечение посредством hGH, модифицированного СТР, у взрослых приводит в результате к увеличению безжировой массы тела и сокращению жира в организме по сравнению со взрослыми, получающими такую же дозу ежедневно коммерческого немодифицированного соматотропного гормона.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР используются для усиления образования молока у женщины. В другом варианте осуществления изобретения конъюгаты по настоящему изобретению СТР/коровий соматотропный гормон используются для усиления выработки молока у молочного скота. В другом варианте осуществления изобретения конструкторы по настоящему изобретению СТР/соматотропный гормон животного используются в технологии животноводства. В другом варианте осуществления изобретения конструкторы по настоящему изобретению СТР/соматотропный гормон сельскохозяйственного животного используются для усиления роста сельскохозяйственного животного, такого как свиньи, однако не ограничиваясь ими.

В другом варианте осуществления изобретения способы по настоящему изобретению предоставляют полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, для стимуляции мышечного роста, повышения сердечной функции, стимуляции костного роста, поддержания целостности мышц, уравнивания мышечного метаболизма, стимуляции наращивания мышц, стимуляции наращивания мышц *de novo*, усиления костной нагрузки, лечения симптомов, связанных с остеопорозом, лечения вастинг-болезни, усиления липолиза, улучшения жидкостного баланса, лечения остеопороза, улучшения легочной функции, усиления иммунитета, повторного наращивания витального органа, увеличения ощущения благополучия, восстановление "быстрого" сна или любой комбинации такового. В другом варианте осуществления изобретения способы по настоящему изобретению предоставляют полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, для стимуляции мышечного роста, повышения сердечной функции, стимуляции костного роста, поддержания целостности мышц, уравнивания мышечного метаболизма, стимуляции наращивания мышц, стимуляции наращивания мышц *de novo*, усиления костной нагрузки, лечения симптомов, связанных с остеопорозом, лечения вастинг-болезни, усиления липолиза, улучшения жидкостного баланса, лечения остеопороза, улучшения легочной функции, усиления иммунитета, повторного наращивания витального органа, увеличения ощущения благополучия, восстановление "быстрого" сна или любой комбинации такового.

В другом варианте осуществления изобретения способы по настоящему изобретению предоставляют hGH, имеющий дополнительно по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на N-конце и по меньшей мере один аминокислотный пептид СТР на C-конце, для лечения вастинг-болезни, СПИДа, кахексии или hGH-дефицита. В другом варианте осуществления изобретения способы по настоящему изобретению предоставляют полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, для лечения вастинг-болезни, СПИДа, кахексии или hGH-дефицита.

В некотором варианте осуществления изобретения полипептиды соматотропного гормона человека по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения индивида, пораженного состояниями, связанными с ростом и весом, такими как расстройство дефицита роста, вастинг-болезнь при СПИДе, старение, нарушенная функция иммунитета индивидов, инфицированных ВИЧ, катаболическая болезнь, восстановление после операции, застойная кардиомиопатия, пересадка печени, регенерация печени после гепатэктомии, хроническая почечная недостаточность, почечная остеодистрофия, остеопороз, ахондроплазия/гипохондроплазия, скелетная дисплазия, хроническое воспалительное заболевание или нарушение питания, такое как болезнь Крона, синдром короткого кишечника, ювенильный хронический артрит, кистозный фиброз, мужское бесплодие, гипофосфатемический рахит, связанный с X-хромосомой, синдром Дауна, вырожденная спинномозговая грыжа, синдром Нунан, ожирение, нарушение мышечной силы и фибромиалгия.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды соматотропного гормона человека по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения индивида с множественным склерозом. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды соматотропного гормона человека по настоящему изобретению могут быть использованы для усиления потери веса у индивидов с ожирением. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды соматотропного гормона человека по настоящему изобретению могут быть использованы для снижения жира тела у пациентов с ожирением. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды соматотропного гормона человека по настоящему изобретению могут быть использованы для повышения безжировой массы тела у индивида. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды соматотропного гормона человека по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения индивида, страдающего сердечной недостаточностью, язвенным колитом и ожогами. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды соматотропного гормона человека по настоящему изобретению могут быть использованы для наращивания мышечной массы.

В другом варианте осуществления изобретения способы по настоящему изобретению предоставляют последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок соматотропного гормона, как описывается в настоящем описании. В другом варианте осуществления изобретения способы по настоящему изобретению предоставляют последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий hGH, модифицированный СТР, для стимуляции мышечного роста, повышения сердечной функции, стимуляции костного роста, поддержания целостности мышц, уравнивания мышечного метаболизма, стимуляции наращивания мышц, стимуляции наращивания мышц *de novo*, усиления костной нагрузки, лечения симптомов, связанных с остеопорозом, лечения вастинг-болезни, усиления липолиза, улучшения жидкостного баланса, лечения остеопороза, улучшения легочной функции, усиления иммунитета, повторного наращивания витального органа, увеличения ощущения благополучия, восстановление "быстрого" сна или любой комбинации такового.

В некоторых вариантах осуществления изобретения соматотропный гормон человека (hGH) используется в соответствии с идеями настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления изобретения присоединение последовательности СТР как к аминоконцу, так и к карбоксильному концу белка hGH приводит в результате к повышенной активности (фиг. 2). В некоторых вариантах осуществления изобретения присоединение последовательности СТР как к аминоконцу, так и к карбоксильному

концу белка hGH приводит в результате к продлению активности *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения "полипептид" или "белок", как используется в настоящем описании, охватывает нативные полипептиды (как продукты деградации, так и синтетически синтезированные полипептиды или рекомбинантные полипептиды) и пептидомиметики (в основном синтетически синтезированные полипептиды) наряду с пептоидами и семипептоидами, которые являются аналогами полипептидов, имеющими в некоторых вариантах осуществления изобретения модификации, делающие полипептиды даже более стабильными в организме или более способными к проникновению в клетки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модификации включают, но не ограничиваются этим, модификации N-конца, модификации C-конца, модификации полипептидной связи, включая, но не ограничиваясь этим, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-S=O}$, O=C-NH , $\text{CH}_2\text{-O}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, S=C-NH , CH=CH или CF=CH , модификации каркаса и модификации остатка. Способы получения пептидомиметических соединений хорошо известны в данной области и указаны, например, в работе Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), которая включена в настоящую заявку в качестве ссылки, как если бы полностью изложена в настоящем описании. Дальнейшие детали в этом отношении приводятся в настоящем описании ниже.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные связи (-CO-NH-) в полипептиде замещены. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные связи замещены N-метилированными связями ($\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные связи замещены сложноэфирными связями ($\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные связи замещены кетометиленовыми связями ($\text{-CO-CH}_2\text{-}$). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные связи замещены α -аза связями (-NH-N(R)-CO-), в которых R представляет собой любой алкил, например метил, углеродными связями ($\text{-CH}_2\text{-NH-}$). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные связи замещены гидроксипропиленовыми связями ($\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные связи замещены тиоамидными связями (-CS-NH-). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные связи замещены олефиновыми двойными связями (-CH=CH-). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные связи замещены ретроамидными связями (-NH-CO-). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные связи замещены производными полипептида ($\text{-N(R)-CH}_2\text{-CO-}$), в которых R является "нормальной" боковой цепью, в естественном виде представленной на атоме углерода. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти модификации имеют место в любой из связей вдоль полипептидной цепи и даже в нескольких (2-3) связях в одно и то же время.

В некоторых вариантах осуществления изобретения природные ароматические аминокислоты полипептида, такие как Trp, Tug и Phe, замещены синтетическими неприродными кислотами, такими как фенилглицин, TIS, нафтилаланин (Nol), метилированные в ядро производные фенилаланина, галогенизированные производные фенилаланина или о-метил-тирозин. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды по настоящему изобретению включают одну или более модифицированных аминокислот или один или более мономеров, не относящихся к аминокислотам (например, жирная кислота, сложные углеводы и т.п.).

В одном из вариантов осуществления изобретения "аминокислота" или "аминокислота", как подразумевается, включает 20 природных аминокислот, эти аминокислоты часто модифицированы посттрансляционно *in vivo*, включая, например, гидроксипролин, фосфосерин и фосфотреонин, и другую необычную аминокислоту, включая, но не ограничиваясь этим, 2-аминоадипиновую кислоту, гидроксизин, изодесмозин, норвалин, норлейцин и орнитин. В одном из вариантов осуществления изобретения "аминокислота" включает как D-, так и L-аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды по настоящему изобретению используются в терапевтических средствах, которые требуют, чтобы полипептиды были в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды по настоящему изобретению включают одну или более неприродных или природных полярных аминокислот, включая, но не ограничиваясь этим, серин и треонин, которые способны увеличивать растворимость полипептидов благодаря их гидроксилсодержащей боковой цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР по настоящему изобретению, используются в линейной форме, хотя специалисту в данной области ясно, что в случаях, когда циклизация не оказывает значительного интерферирующего влияния на характеристики hGH, модифицированного посредством СТР, циклические формы соматотропных гормонов также могут быть использованы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения hGH, модифицированный посредством СТР по настоящему изобретению, биохимически синтезируются, например, путем использования стандартных твердофазных методик. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти биохимические способы включают эксклюзивный твердофазный синтез, частичный твердофазный синтез, конденсацию фрагментов или классическое решение синтеза. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти способы

используются, когда соматотропные гормоны относительно коротки (приблизительно 5-15 кДа) и/или когда они не могут быть получены при помощи рекомбинантных техник (то есть не кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты) и поэтому затрагивают другую химию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения методики твердофазного синтеза hGH, модифицированного посредством СТР, хорошо известны специалисту в данной области и дополнительно описываются John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, *Solid Phase Polypeptide Syntheses* (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984). В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетические полипептиды очищаются посредством препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии [Creighton T. (1983) *Proteins, structures and molecular principles*. WH Freeman and Co. N.Y.], композиция которых может быть подтверждена путем секвенирования аминокислот способами, известными специалисту в данной области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используются рекомбинантные белковые методики для создания hGH, модифицированного посредством СТР по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные белковые методики используются для создания относительно длинных полипептидов (например, длинее чем 18-25 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные белковые методики используются для создания больших количеств hGH, модифицированного посредством СТР по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантные методики описаны Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 and Brogli et al., (1984) *Science* 224:838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 и Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463.

В другом варианте осуществления изобретения hGH, модифицированные посредством СТР по настоящему изобретению, синтезируются с использованием полинуклеотида, кодирующего полипептид по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления изобретения полинуклеотид, кодирующий hGH, модифицированный посредством СТР по настоящему изобретению, лигирован в вектор экспрессии, содержащий транскрипционный контроль цис-регуляторной последовательности (например, промоторной последовательности). В другом варианте осуществления изобретения цис-регуляторная последовательность применима для направления конститутивной экспрессии соматотропных гормонов по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления изобретения цис-регуляторная последовательность применима для направления тканеспецифической экспрессии hGH, модифицированного посредством СТР по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления изобретения цис-регуляторная последовательность применима для направления индуцибельной экспрессии hGH, модифицированного посредством СТР по настоящему изобретению.

В другом варианте осуществления изобретения тканеспецифические промоторы, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают последовательности, которые являются функциональными в специфических клеточных популяциях, пример включает, но не ограничивается этим, промоторы, например альбумин, который специфичен для печени [Pinkert et al., (1987) *Genes Dev.* 1:268-277], лимфоидспецифические промоторы [Calame et al., (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275]; в частности промоторы Т-клеточных рецепторов [Winoto et al., (1989) *EMBO J.* 8:729-733] и иммуноглобулинов; [Banerji et al. (1983) *Cell* 33729-740], нейронспецифические промоторы, например промотор нейрофиламентов [Burne et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477], промоторы, специфические для поджелудочной железы [Edlunch et al. (1985) *Science* 230:912-916], или промоторы, специфические для молочной железы, например промотор молочной сыворотки (U.S. Pat. № 4873316 и European Application Publication № 264166). Индуцибельные промоторы, которые могут использоваться в настоящем изобретении, включают, например, тетрациклиндуцибельный промотор (Srouf, M.A., et al., 2003. *Thromb. Haemost.* 90: 398-405).

В одном из вариантов осуществления изобретения термин "полинуклеотид" относится к однострочной или двустрочной последовательности нуклеиновой кислоты, которая изолируется и предоставляется в форме РНК последовательности, комплементарной полинуклеотидной последовательности (кДНК), геномной полинуклеотидной последовательности и/или многокомпонентных полинуклеотидных последовательностей (например, комбинация вышеуказанных).

В одном из вариантов осуществления изобретения "комплементарная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, которая является результатом обратной транскрипции информационной РНК с использованием обратной транскриптазы или любой другой РНК-зависимой ДНК-полимеразы. В одном из вариантов осуществления изобретения последовательность может быть впоследствии амплифицирована *in vivo* или *in vitro* с использованием ДНК-полимеразы.

В одном из вариантов осуществления изобретения "геномная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, происходящей (изолированной) из хромосомы, и, таким образом, она представляет собой непрерывную часть хромосомы.

В одном из вариантов осуществления изобретения "многокомпонентная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, которая, по меньшей мере, частично комплементарна и,

по меньшей мере, частично является геномной. В одном из вариантов осуществления изобретения многокомпонентная последовательность может включать некоторые экзонные последовательности, необходимые для кодирования полипептида по настоящему изобретению, наряду с некоторыми вклинивающимися интронными последовательностями. В одном из вариантов осуществления изобретения интронные последовательности могут быть из любого источника, включая другие гены, и в основном будут включать консервативные сплайсинговые сигнальные последовательности. В одном из вариантов осуществления изобретения интронные последовательности включают цис-действующие регуляторные элементы экспрессии.

В другом варианте осуществления изобретения полинуклеотиды по настоящему изобретению получают с использованием методик ПЦР, как описано в примере 1, или любым другим способом, известным специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения методика включает лигирование двух различных ДНК последовательностей (см., например, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

В одном из вариантов осуществления изобретения полинуклеотиды по настоящему изобретению вставлены в векторы экспрессии (т.е. в конструктор нуклеиновой кислоты) для обеспечения возможности экспрессии рекомбинантного полипептида. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор экспрессии по настоящему изобретению содержит дополнительные последовательности, которые делают этот вектор подходящим для репликации и интегрирования в прокариоты. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор экспрессии по настоящему изобретению дополнительно содержит последовательности, которые делают этот вектор подходящим для репликации и интегрирования в эукариоты. В одном из вариантов осуществления изобретения вектор экспрессии по настоящему изобретению содержит шаттл-вектор, который делает этот вектор подходящим для репликации и интегрирования как в прокариоты, так и в эукариоты. В другом варианте осуществления изобретения клонирующие векторы содержат последовательности для инициации транскрипции и трансляции (например, промоторы, энхансеры) и терминаторы транскрипции и трансляции (например, сигналы полиаденилирования).

В одном из вариантов осуществления изобретения могут использоваться разнообразные прокариотические или эукариотические клетки в качестве экспрессионных систем хозяина для экспрессии hGH, модифицированного посредством СТР по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения они включают, но не ограничиваются этим, микроорганизмы, например бактерию, трансформированную рекомбинантной ДНК бактериофага, вектор экспрессии плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащий последовательность, кодирующую полипептид, дрожжи, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми векторами экспрессии, содержащими последовательность полипептида системы растительных клеток, инфицированных рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты (cauliflower mosaic virus, CaMV); вирусом табачной мозаики (tobacco mosaic virus, TMV)) или трансформированных рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии, такими как T1-плазида, содержащая последовательность, кодирующая полипептид.

В другом варианте осуществления изобретения используются небактериальные экспрессионные системы (например, экспрессионные системы млекопитающих, например, клетки CHO) для экспрессии соматотропных гормонов по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления изобретения вектором экспрессии, используемым для экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению в клетках млекопитающих, является вектор pCI-DHFR, содержащий промотор CMV и ген устойчивости к неомицину. Конструкция вектора pCI-dhfr описана в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения в примере 1.

В другом варианте осуществления изобретения в бактериальных системах по настоящему изобретению ряд векторов экспрессии может быть предпочтительно отобран в зависимости от предусмотренного применения экспрессируемого полипептида. В одном из вариантов осуществления изобретения желательными являются большие количества полипептида. В одном из вариантов осуществления изобретения желательными являются векторы, направляющие экспрессию высоких уровней белкового продукта, возможно, в слиянии с гидрофобной сигнальной последовательностью, направляющей экспрессируемый продукт в периплазму бактерии или культуральную среду, где белковый продукт легко очищается. В одном из вариантов осуществления изобретения конструируется определенный слитый белок со специфическим участком рестрикции для помощи в выделении полипептида. В одном из вариантов осуществления изобретения векторы, адаптируемые к таким манипуляциям, включают, но ими не ограничиваются, векторы экспрессии серии pET E. coli [Studier et al., *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990)].

В одном из вариантов осуществления изобретения используются экспрессионные системы дрожжей. В одном из вариантов осуществления изобретения ряд векторов, содержащих конститутивные или индуцибельные промоторы, могут быть использованы на дрожжах, как это раскрыто в заявке на патент США № 5932447. В другом варианте осуществления изобретения используются векторы, которые способствуют интеграции чужеродных последовательностей ДНК в хромосому дрожжей.

В одном из вариантов осуществления изобретения вектор экспрессии по настоящему изобретению дополнительно может содержать дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые

обеспечивают, например, трансляцию нескольких белков из единичной мРНК, таких как участок внутренней посадки рибосомы (internal ribosome entry site - IRES), и последовательности для интеграции генома промотор-химерного полипептида.

В другом варианте осуществления изобретения векторы экспрессии млекопитающих включают, но они не ограничиваются, pDNA3, pDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, которые доступны от Invitrogen, pCI, который доступен от Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV и pBK-CMV, которые доступны от Stratagene, pTRES, который доступен от Clontech, и их производные.

В другом варианте осуществления изобретения в настоящем изобретении используются векторы экспрессии, содержащие регуляторные элементы от эукариотических вирусов, например ретровирусы. Векторы SV40 включают pSVT7 и pMT2. В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы, полученные от вируса папилломы крупного рогатого скота, включают pBV-1MTNA, и векторы, полученные от вируса Эпштейна-Барр, включают pHEBO и p205. Другие примеры векторов включают pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, бакуловирусный pDSVE и любой другой вектор, обеспечивающий экспрессию белков под направлением раннего промотора SV-40, позднего промотора SV-40, металлотионеинового промотора, промотора вируса опухоли молочных желез мыши, промотора вируса саркомы Рауса, полиэдринового промотора или других промоторов, у которых была продемонстрирована эффективность экспрессии в эукариотических клетках.

В другом варианте осуществления изобретения рекомбинантные вирусные векторы могут использоваться для экспрессии *in vivo* ГН, модифицированного посредством СТР по настоящему изобретению, благодаря своим преимуществам, таким как латеральная инфекция или специфичность таргетинга. В одном из вариантов осуществления изобретения латеральная инфекция присуща жизненному циклу, например ретровируса, и является процессом, посредством которого единичная инфицированная клетка продуцирует много вирионов потомства, которые отпочковываются и инфицируют окружающие клетки. В другом варианте осуществления изобретения результатом является большая зона, которая быстро становится инфицированной, большая часть которой не была изначально инфицирована первоначальными вирусными частицами. В одном из вариантов осуществления изобретения получают вирусные векторы, которые не способны распространяться латерально. В другом варианте осуществления изобретения эта характеристика может быть полезной, если желаемой целью является введение специфического гена только в локализованное число клеток-мишеней.

В другом варианте осуществления изобретения могут использоваться различные способы для введения в клетки вектора экспрессии по настоящему изобретению. Такие способы повсеместно описаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), в Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) и Gilboa et al. [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986], и включают, например, стабильную или временную трансфекцию, липофекцию, электропорацию и инфекцию рекомбинантными вирусными векторами. В дополнение см. патенты США №№ 5464764 и 5487992 в отношении способов позитивной-негативной селекции.

В другом варианте осуществления изобретения введение нуклеиновой кислоты посредством вирусной инфекции дает несколько преимуществ над другими способами, например липофекцией и электропорацией, так как благодаря инфекционной природе вирусов может быть достигнута более высокая эффективность трансфекции.

В одном из вариантов осуществления изобретения следует понимать, что ГН, модифицированный посредством СТР по настоящему изобретению, также может быть экспрессирован из конструкта нуклеиновой кислоты, введенного индивидууму с использованием любого подходящего способа введения, описанного в настоящем описании выше (т.е. генной терапии *in vivo*). В одном из вариантов осуществления изобретения конструкт нуклеиновой кислоты вводится в подходящую клетку посредством соответствующего носителя/способа доставки гена (трансфекция, трансдукция, гомологичная рекомбинация и так далее) и необходимой экспрессионной системы, и затем модифицированные клетки размножаются в культуре и возвращаются индивидууму (т.е. генная терапия *ex vivo*).

В одном из вариантов осуществления изобретения генная терапия *in vivo* с использованием соматотропного гормона была проведена на моделях у животных.

В одном из вариантов осуществления изобретения используются векторы экспрессии растений. В одном из вариантов осуществления изобретения экспрессия последовательности, кодирующей полипептид, запускается рядом промоторов. В некоторых вариантах осуществления изобретения используются вирусные промоторы, например промоторы 35S РНК и 19S РНК CaMV [Brisson et al., *Nature* 310:511-514 (1984)] или промоторы козьего белка к TMV [Takamatsu et al., *EMBO J.* 6:307-311 (1987)]. В другом варианте осуществления изобретения используются растительные промоторы, например малая субединица RUBISCO [Coruzzi et al., *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); и Brogli et al., *Science* 224:838-843 (1984)], или промоторы теплового шока, например соевый hsp17.5-E или hsp17.3-B [Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:559-

565 (1986)]. В одном из вариантов осуществления изобретения конструируются и вводятся в клетки растений путем использования Ti-плазмиды, Ri-плазмиды, векторов вирусов растений, прямой трансформации ДНК, микроинъекции, электропорации и другими методами, хорошо известными специалисту в данной области (см., например, Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 (1988)]). Другие экспрессионные системы, например системы клеток-хозяина насекомых и млекопитающих, которые хорошо известны в данной области, также могут быть использованы настоящим изобретением.

Следует понимать, что экспрессионные конструируемые по настоящему изобретению, отличные от содержащих необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности (кодирующей полипептид), также могут включать последовательности, сконструированные, чтобы оптимизировать стабильность, получение, очистку, выход или активность экспрессируемого полипептида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения могут использоваться различные методы для введения вектора экспрессии по настоящему изобретению в систему клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие методы в целом описаны в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) и Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] и включают, например, стабильную или временную трансфекцию, липофекцию, электропорацию и инфекцию рекомбинантными вирусными векторами. В дополнение см. патенты США №№ 5464764 и 5487992 в отношении методов позитивной-негативной селекции.

В одном из вариантов осуществления изобретения трансформированные клетки культивируются в эффективных условиях, которые обеспечивают экспрессию больших количеств рекомбинантного полипептида. В другом варианте осуществления изобретения эффективные условия культивирования включают, но не ограничиваются этим, эффективные среды, биореактор, температуру, pH и условия кислорода, позволяющие вырабатывать белок. В одном из вариантов осуществления изобретения эффективная среда относится к любой среде, на которой культивируются клетки для получения рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления изобретения среда обычно включает водный раствор, имеющий усвояемые источники углерода, азота и фосфата, а также соответствующие соли, минералы, металлы и другие питательные вещества, такие как витамины. В другом варианте осуществления изобретения клетки по настоящему изобретению могут культивироваться в традиционных ферментационных биореакторах, флаконах со встряхиванием, тестовых пробирках, микротитровальных планшетах и чашках Петри. В другом варианте осуществления изобретения культивирование производится при температуре, pH и содержании кислорода, подходящих для рекомбинантных клеток. В другом варианте осуществления изобретения условия культивирования находятся в компетенции обычного специалиста в данной области.

В другом варианте осуществления изобретения в зависимости от вектора и системы-хозяина, используемых для продуцирования, получаемые в результате соматотропные гормоны по настоящему изобретению либо остаются в рекомбинантной клетке, секретируются в ферментационную среду, секретируются в пространство между двумя клеточными мембранами, такое как периплазматическое пространство в *E. coli*; либо удерживаются на внешней поверхности клетки или вирусной мембраны.

В одном из вариантов осуществления изобретения после заранее определенного времени в культуре осуществляется высвобождение рекомбинантного полипептида.

В одном из вариантов осуществления изобретения фраза "высвобождение рекомбинантного полипептида", используемая в настоящем описании, относится к сбору всей ферментационной среды, содержащей полипептид и необязательно подразумевает дополнительные стадии сепарации или очистки.

В одном из вариантов осуществления изобретения соматотропные гормоны по настоящему изобретению очищаются с использованием разнообразных стандартных методик очистки белка, таких как аффинная хроматография, ионно-обменная хроматография, фильтрация, электрофорез, хроматография с гидрофобными взаимодействиями, гель-фильтрационная хроматография, обращенно-фазовая хроматография, хроматография с конканавалином А, хроматофокусирование и дифференциальная солюбилизация.

В одном из вариантов осуществления изобретения для содействия выходу может быть сконструирована экспрессируемая кодирующая последовательность, кодирующая полипептид по настоящему изобретению и полученная путем слияния расщепляемой функциональной группы. В одном из вариантов осуществления изобретения слитый белок может быть сконструирован таким образом, что полипептид может быть легко изолирован методом аффинной хроматографии, например путем иммобилизации на колонке, специфической для расщепляемой функциональной группы. В одном из вариантов осуществления изобретения участок расщепления сконструирован между полипептидом и расщепляемой функциональной группой, и полипептид может быть выделен из хроматографической колонки путем обработки соответствующим ферментом или средством, которое специфически расщепляет слитый белок в этом

участке [например, см. Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988) и Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].

В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид по настоящему изобретению извлекается в "по существу, чистой" форме.

В одном из вариантов осуществления изобретения фраза "по существу, чистый" относится к чистоте, которая позволяет эффективно использовать белок в применениях, описываемых в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления изобретения полипептид по настоящему изобретению также может быть синтезирован с использованием экспрессионных систем *in vitro*. В одном из вариантов осуществления изобретения методы синтеза *in vitro* хорошо известны в данной области, а компоненты системы являются коммерчески доступными.

В одном из вариантов осуществления изобретения продуцирование hGH, модифицированного посредством СТР, выполняется с использованием технологии рекомбинантной ДНК.

В другом варианте осуществления изобретения рекомбинантные полипептиды синтезируются и очищаются, их терапевтическая активность может быть протестирована как *in vivo*, так и *in vitro*. В одном из вариантов осуществления изобретения связывающие активности рекомбинантного hGH, модифицированного посредством СТР по настоящему изобретению, могут быть подтверждены с использованием разнообразных тестов.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение содержит полипептиды СТР-hGH-СТР-СТР. В одном из вариантов осуществления изобретения используются методы технологии рекомбинантной ДНК для получения полипептидов СТР-hGH-СТР-СТР, как проиллюстрировано в примере 1. В одном из вариантов осуществления изобретения терапевтическая эффективность полипептидов СТР-hGH-СТР-СТР по настоящему изобретению тестируется *in vivo*. В одном из вариантов осуществления изобретения терапевтическая эффективность полипептидов СТР-hGH-СТР-СТР по настоящему изобретению тестируется *in vitro*. В одном из вариантов осуществления изобретения связывающие активности рекомбинантных полипептидов hGH по настоящему изобретению измеряются с использованием Nb2 (пролактинзависимая клеточная линия лимфомы крыс (ECACC Cell Bank) или мышинной клеточной линии FCD-P1, предварительно трансфицированной рецептором соматотропного гормона человека. В одном из вариантов осуществления изобретения связывание hGH с этими рецепторами индуцирует клеточную пролиферацию, которая в одном из вариантов осуществления изобретения измеряется по уровням клеточного окрашивания МТТ как функции активности hGH. В одном из вариантов осуществления изобретения активность *in vivo* выводится путем измерения набора массы в течение времени у леченных животных, дефицитных по соматотропному гормону.

В одном из вариантов осуществления изобретения настоящее изобретение относится к способу стимуляции роста или набора массы у индивида, включающему введение индивиду терапевтически эффективного количества полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона, таким образом стимулируя рост или набор массы у индивида.

В другом варианте осуществления изобретения настоящее изобретение относится к способу стимуляции роста у человека, включающему введение указанному индивиду терапевтически эффективного количества полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного соматотропного гормона, таким образом стимулируя рост у указанного индивида. В одном из вариантов осуществления изобретения указанным человеком является подросток. В другом варианте осуществления изобретения человеком является ребенок. В другом варианте осуществления изобретения человеком является ребенок, дефицитный по соматотропному гормону.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимуляции набора массы у человека, включающему введение указанному индивиду терапевтически эффективного количества полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного соматотропного гормона, таким образом стимулируя набор массы у указанного индивида. В одном из вариантов осуществления изобретения указанным человеком является подросток. В другом варианте осуществления изобретения человеком является ребенок. В другом варианте осуществления изобретения человеком является ребенок, дефицитный по соматотропному гормону.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимуляции потери веса или снижения телесного жира у человека, включающему введение указанному индивиду терапевтически эффективного количества полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу

указанного соматотропного гормона, таким образом стимулируя потерю веса или снижение телесного жира у указанного индивида. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный индивид страдает ожирением. В другом варианте осуществления изобретения индивид страдает избыточным весом. В другом варианте осуществления изобретения человеком является взрослый. В другом варианте осуществления изобретения человеком является взрослый, дефицитный по соматотропному гормону.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу снижения отложенного жира у индивида. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу увеличения мышечной массы у индивида. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимуляции мышечного роста у индивида. В другом варианте осуществления изобретения человеком является взрослый. В другом варианте осуществления изобретения человеком является взрослый, дефицитный по соматотропному гормону. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу повышения соотношения мышц к жиру. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу снижения индекса массы тела (ИМТ) или индекса Кетле.

В другом варианте осуществления изобретения относится к способу стимуляции роста у индивида, включающему введение индивиду соматотропного гормона, модифицированного посредством СТР, как описано в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления изобретения соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, напрямую вводится индивиду, в то время как в другом варианте осуществления изобретения индивиду вводится полинуклеотид, кодирующий указанный соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР. В другом варианте осуществления изобретения настоящее изобретение относится к способу стимуляции роста у индивида, включающему введение индивиду композиции, состоящей из известных вспомогательных веществ, известных носителей и полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона. В другом варианте осуществления изобретения настоящее изобретение относится к способу стимуляции роста у индивида, включающему введение индивиду композиции, состоящей из известных вспомогательных веществ, известных носителей и полипептида, состоящего из соматотропного гормона, одного карбоксиконцевого пептида (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенного к аминоконцу соматотропного гормона, и двух СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона.

В другом варианте осуществления изобретения рост измеряется набором массы. В другом варианте осуществления изобретения рост измеряется прибавкой роста. В другом варианте осуществления изобретения рост измеряется набором массы. В другом варианте осуществления изобретения рост измеряется прибавкой мышечной массы. В другом варианте осуществления изобретения рост измеряется набором массы. В другом варианте осуществления изобретения рост измеряется прибавкой костной массы. В другом варианте осуществления изобретения рост измеряется набором массы. В другом варианте осуществления изобретения рост измеряется прибавкой жира. В другом варианте осуществления изобретения рост измеряется любой известной мерой, известной специалисту в данной области. В другом варианте осуществления изобретения индивидом, у которого измеряется рост, является ребенок. В другом варианте осуществления изобретения индивидом, у которого измеряется рост, является ребенок, дефицитный по соматотропному гормону.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие ГН, модифицированный посредством СТР по настоящему изобретению, вводятся в дозе 1-90 мкг в 0,1-5 мл раствора. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие ГН, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-50 мкг в 0,1-5 мл раствора. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие ГН, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-25 мкг в 0,1-5 мл раствора. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие ГН, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 50-90 мкг в 0,1-5 мл раствора. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие ГН, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 10-50 мкг в 0,1-5 мл раствора.

В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие ГН, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 мкг в 0,1-5 мл раствора путем внутримышечной (ВМ) инъекции, подкожной (ПК) инъекции или внутривенной (ВВ) инъекции один раз в неделю. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие ГН, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 мкг в 0,1-5 мл раствора путем внутримышечной (ВМ) инъекции, подкожной (ПК) инъекции или внутривенной (ВВ) инъекции два раза в неделю. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие ГН, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 мкг в 0,1-5 мл раствора путем внутримышечной (ВМ) инъекции, подкожной (ПК) инъекции или внутривенной (ВВ) инъекции три раза в неделю. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие ГН, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 мкг в 0,1-5 мл раствора путем внутримышечной (ВМ) инъекции, подкожной (ПК) инъекции или внутривенной (ВВ) инъекции один раз в две недели. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие ГН, модифицирован-

ный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 мкг в 0,1-5 мл раствора путем внутримышечной (ВМ) инъекции, подкожной (ПК) инъекции или внутривенной (ВВ) инъекции один раз в 17 дней. В другом варианте осуществления изобретения полипептиды, содержащие ГН, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 мкг в 0,1-5 мл раствора путем внутримышечной (ВМ) инъекции, подкожной (ПК) инъекции или внутривенной (ВВ) инъекции один раз в 19 дней.

В другом варианте осуществления изобретения белковые лекарственные средства с молекулярным весом менее 50000 Да, такие как ГН, модифицированный посредством СТР по настоящему изобретению, в основном являются короткоживущими *in vivo* видами, имеющими короткий полупериод жизни в кровотоке, составляющий несколько часов. В другом варианте осуществления изобретения подкожный способ введения в основном предоставляет более медленное высвобождение в кровотоке. В другом варианте осуществления изобретения полипептид изобретения, модифицированный СТР, продлевает полупериод жизни белковых лекарственных средств с молекулярным весом ниже 50000 Да, таких как ГН. В другом варианте осуществления изобретения полипептид изобретения, модифицированный СТР, обеспечивает возможность ГН оказывать свое благотворное влияние в течение более длительного периода времени.

В другом варианте осуществления изобретения иммуногенность полипептида, модифицированного СТР, содержащего ГН, модифицированный посредством СТР, равна иммуногенности изолированного ГН. В другом варианте осуществления изобретения иммуногенность полипептида, модифицированного СТР, содержащего ГН, модифицированный посредством СТР, сопоставима с иммуногенностью изолированного ГН. В другом варианте осуществления изобретения модификация ГН, как описано в настоящем описании, посредством СТР пептидов снижает иммуногенность ГН. В другом варианте осуществления изобретения полипептид, модифицированный СТР, содержащий ГН, такой же активный, как и изолированный белок ГН. В другом варианте осуществления изобретения полипептид, модифицированный СТР, содержащий ГН, более активный, чем изолированный ГН. В другом варианте осуществления изобретения полипептид, модифицированный СТР, содержащий ГН, максимизирует защитное свойство соматотропных гормонов в отношении деградации, при этом минимизируя снижения биологической активности.

В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР по настоящему изобретению, предоставляется индивидууму *per se*. В одном из вариантов осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР по настоящему изобретению, предоставляется индивидууму как часть фармацевтической композиции, где он смешан с фармацевтически приемлемым носителем.

В другом варианте осуществления изобретения "фармацевтическая композиция" относится к препарату из одного или более активных ингредиентов, описываемых в настоящем описании, с другими компонентами, такими как физиологически подходящие носители и вспомогательные вещества. Цель фармацевтической композиции состоит в том, чтобы способствовать введению соединения в организм.

В другом варианте осуществления изобретения "активный ингредиент" относится к полипептидной целевой последовательности, которая отвечает за биологический эффект.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к комбинированным препаратам. В одном из вариантов осуществления изобретения "комбинированный препарат" определяет, главным образом, "набор частей" в том смысле, что партнеры комбинации, как это определено выше, могут дозироваться независимо или путем использования различных фиксированных комбинаций с выделенным количеством партнеров комбинации, то есть совместно, одновременно, отдельно или последовательно. В другом варианте осуществления изобретения части набора частей могут затем, например, быть введенными совместно или разнесенными во времени, то есть в различные временные точки и с равными или различными временными интервалами для любой части набора частей. Соотношение общих количеств партнеров комбинации может быть введено в комбинированном препарате. Комбинированный препарат может изменяться, например, с целью покрыть потребности субпопуляции пациентов, которых предстоит лечить, или с целью покрыть потребности одного пациента, различные потребности которого могут быть связаны с конкретным заболеванием, тяжестью заболевания, возрастом, полом или весом тела, как это легко может быть сделано специалистом в данной области.

В другом варианте осуществления изобретения фразы "физиологически приемлемый носитель" и "фармацевтически приемлемый носитель", которые используются в настоящем описании взаимозаменяемо, относятся к носителю или разбавителю, который не вызывает значительного раздражения в организме и не отменяет биологической активности или свойств вводимого соединения. Под этими фразами включен адьювант. В одном из вариантов осуществления изобретения один из ингредиентов, включенных в фармацевтически приемлемый носитель, может быть, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ), биосовместимым полимером с широким диапазоном растворимости как в органических, так и в водных средах (Mutter et al. (1979).

В другом варианте осуществления изобретения "вспомогательное вещество" относится к инертной субстанции, добавленной к фармацевтической композиции, чтобы дополнительно способствовать введению активного ингредиента. В одном из вариантов осуществления изобретения вспомогательные вещества включают карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и типы крахмала, производные цел-

люлозы, желатин, растительные масла и полиэтиленгликоли.

Методики для составления рецептуры и введения препаратов находятся в "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, последнее издание, которое включено в настоящее описание в качестве ссылки.

В другом варианте осуществления изобретения подходящие пути введения, например, включают пероральную, ректальную, трансмукозальную, трансназальную, кишечную или парентеральную доставку, включая внутримышечные, подкожные или внутримозговые инъекции, наряду с интратекальными, прямыми интравентрикулярными, внутривенными, внутрибрюшинными, интраназальными или интраокулярными инъекциями.

В другом варианте осуществления изобретения препарат вводится скорее локальным, чем системным образом, например через инъекцию препарата напрямую в конкретный участок тела пациента.

Настоящее изобретение относится к различным вариантам осуществления диапазонов дозировки. Дозировка GH, модифицированного посредством СТР по настоящему изобретению, в одном из вариантов осуществления изобретения находится в диапазоне 0,005-100 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,005-5 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,01-50 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,1-20 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,1-10 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,01-5 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,001-0,01 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,001-0,1 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,1-5 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,5-50 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,2-15 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,8-65 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 1-50 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 5-10 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 8-15 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 10-20 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 20-40 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 60-120 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 12-40 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 40-60 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 50-100 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 1-60 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 15-25 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 5-10 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 55-65 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 1-5 мг/день.

Дозировка GH, модифицированного посредством СТР по настоящему изобретению, в одном из вариантов осуществления изобретения находится в диапазоне 0,005-100 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,005-5 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,01-50 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,05-7,2 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,1-20 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,1-10 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,01-5 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,001-0,01 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,001-0,1 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,1-5 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,5-50 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,2-15 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,26-10,7 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 0,8-65 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 1-50 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 5-10 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 8-15 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 10-20 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 20-40 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 60-120 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 12-40 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 40-60 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 50-100 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 1-60

мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 15-25 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 5-10 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 55-65 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 1-5 мг/неделю.

В другом варианте осуществления изобретения дозировка ГН, вводимая индивиду, составляет 50% стандартной дозировки, вводимой эталонному индивиду одной и той же популяции индивидов (например, дети, пожилые люди, мужчины, женщины, индивидуумы, дефицитные по соматотропному гормону, конкретной национальности и т.п.). В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 30% дозировки, вводимой индивиду из специфической популяции индивидов. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 45% дозировки, вводимой индивиду из специфической популяции индивидов. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 100% от дозировки, вводимой индивиду из специфической популяции индивидов.

В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-5 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 2 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 4 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1,2 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1,8 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет приблизительно дозировки, описываемые в настоящем описании.

В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-5 мг/введение. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 2 мг/введение. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 4 мг/введение. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1,2 мг/введение. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1,8 мг/введение. В одном из вариантов осуществления изобретения композиция вводится один раз в неделю. В другом варианте осуществления изобретения композиция вводится один раз в две недели. В другом варианте осуществления изобретения композиция вводится один раз в месяц. В другом варианте осуществления изобретения композиция вводится ежедневно.

В другом варианте осуществления изобретения состав ГН, модифицированного посредством СТР, создается в интраназальной лекарственной форме. В другом варианте осуществления изобретения состав ГН, модифицированного посредством СТР, создается в инъекционной лекарственной форме. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне от 0,0001 до 0,6 мг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне от 0,001 до 0,005 мг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне от 0,005 до 0,01 мг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне от 0,01 до 0,3 мг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне от 0,2 до 0,6 мг.

В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне 1-100 мкг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне 10-80 мкг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне 20-60 мкг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне 10-50 мкг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне 40-80 мкг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне 10-30 мкг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне 30-60 мкг.

В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне от 0,2 до 2 мг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне от 2 до 6 мг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне от 4 до 10 мг. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду в дозовом диапазоне от 5 до 15 мг.

В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, инъектируется в мышцу (внутримышечная инъекция). В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится под кожу (подкожная инъекция). В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, инъектируется в мышцу. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится под кожу.

В другом варианте осуществления изобретения способы по изобретению включают повышение удобства применения терапии соматотропным гормоном, включающие предоставление нуждающемуся в этом индивиду ГН, модифицированного посредством СТР, таким образом повышая удобство примене-

ния терапии соматотропным гормоном.

В другом варианте осуществления изобретения способы по изобретению включают повышение удобства для лечения пациентов, пораженных хроническими заболеваниями, которые нуждаются в терапии соматотропным гормоном. В другом варианте осуществления изобретения способы по изобретению обеспечивают возможность снижения частоты дозирования ГН путем модификации ГН посредством СТР, как описано в настоящем описании выше. В другом варианте осуществления изобретения термин "удобства для лечения" включает соблюдение предписанного режима терапии. В другом варианте осуществления изобретения способы по настоящему изобретению включают повышение удобства для лечения пациентов, нуждающихся в терапии соматотропным гормоном, путем снижения частоты введения ГН. В другом варианте осуществления изобретения снижение частоты введения ГН достигается благодаря модификациям СТР, которые делают ГН, модифицированный посредством СТР, более стабильным. В другом варианте осуществления изобретения снижение частоты введения ГН достигается в результате повышения $T_{1/2}$ соматотропного гормона. В другом варианте осуществления изобретения снижение частоты введения ГН достигается в результате повышения времени клиренса ГН. В другом варианте осуществления изобретения снижение частоты введения соматотропного гормона достигается в результате повышения величины AUC соматотропного гормона.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к способу улучшения "площади под кривой" (AUC) соматотропного гормона, включающему стадию присоединения одного карбоксиконцевого пептида хорионического гонадотропина к аминоконцу соматотропного гормона и двух карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина к карбоксильному концу соматотропного гормона, таким образом улучшая "площадь под кривой" (AUC) соматотропного гормона.

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение дополнительно относится к способу снижения частоты дозирования соматотропного гормона, включающему стадию присоединения одного карбоксиконцевого пептида хорионического гонадотропина к аминоконцу соматотропного гормона и двух карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина к карбоксильному концу соматотропного гормона, таким образом снижая частоту дозирования соматотропного гормона.

Таким образом, в другом варианте осуществления изобретения настоящее изобретение относится к способу повышения удобства использования терапии соматотропным гормоном у нуждающихся в ней индивидов, включающему предоставление указанному индивиду полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона, и два карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона, таким образом увеличивая удобство использования терапии соматотропным гормоном. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный индивид является человеком.

В другом варианте осуществления изобретения настоящее изобретение относится к способу повышения уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) у человека, включающему введение указанному индивиду терапевтически эффективного количества полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона, таким образом увеличивая уровни IGF-1 у указанного индивида. В другом варианте осуществления изобретения способы повышения уровней IGF-1 предоставлены в примере 6, как указано ниже.

В другом варианте осуществления изобретения настоящее изобретение относится к способу повышения уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) до желаемого терапевтического диапазона у человека, включающему введение указанному индивиду терапевтически эффективного количества полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного соматотропного гормона, таким образом увеличивая уровни IGF-1 до желаемого терапевтического диапазона у индивида. В другом варианте осуществления изобретения человеком является взрослый. В другом варианте осуществления изобретения человеком является взрослый, дефицитный по соматотропному гормону. В другом варианте осуществления изобретения человеком является нормальный взрослый. В другом варианте осуществления изобретения способы повышения уровней IGF-1 до желаемого терапевтического уровня представлены в примере 9, как указано ниже.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к способу поддержания уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в пределах нормального терапевтического диапазона у индивида, где способ включает введение индивиду терапевтически эффективного количества полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного соматотропного гормона, таким образом поддерживая уровни IGF-1 в пределах нормального терапевтического диапазона у индивида. В другом

варианте осуществления изобретения способы поддержания уровней IGF-1 в пределах нормального терапевтического уровня представлены в примере 9, как указано ниже.

В одном из вариантов осуществления изобретения повышение уровней IGF-1 у человека может быть эффективным в лечении, профилактике или подавлении диабета 1-го типа, диабета 2-го типа, амиотрофического бокового склероза (АБС, известный также под именем "болезнь Лу Герига"), тяжелого ожогового повреждения и миотонической мышечной дистрофии (ММД). В другом варианте осуществления изобретения поддержание уровней IGF-1 в пределах нормального терапевтического диапазона у человека может быть эффективным в лечении, профилактике или подавлении диабета 1-го типа, диабета 2-го типа, амиотрофического бокового склероза (АБС, известный также под именем "болезнь Лу Герига"), тяжелого ожогового повреждения и миотонической мышечной дистрофии (ММД).

В одном из вариантов осуществления изобретения желаемый терапевтический диапазон определяется как находящийся в пределах ± 2 стандартные отклонения вплоть до минус 2 стандартных отклонений от средних уровней IGF-1, рассчитанных в нормальной популяции, стратифицированной на группы по возрасту и полу, как дополнительно в настоящем описании представлено ниже (см. пример 9). В дополнение клиническое исследование измеряло уровни IGF-1 в более узком диапазоне, составляющем $\pm 1,5$ стандартных отклонений, с целью наблюдения разброса у пациентов в пределах нормального диапазона (см. пример 9, как указано ниже).

В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду один раз в день. В другом варианте осуществления изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду один раз в два дня. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду один раз в три дня. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду один раз в четыре дня. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду один раз в пять дней. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду один раз в шесть дней. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду один раз в неделю. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду один раз в 7-14 дней. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду один раз в 10-20 дней. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду один раз в 5-15 дней. В другом варианте осуществления изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится индивиду один раз в 15-30 дней.

В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 50-500 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 50-150 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 100-200 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 150-250 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 200-300 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 250-400 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 300-500 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка находится в диапазоне 350-500 мг/день.

В одном из вариантов осуществления изобретения дозировка составляет 20 мг/день. В одном из вариантов осуществления изобретения дозировка составляет 30 мг/день. В одном из вариантов осуществления изобретения дозировка составляет 40 мг/день. В одном из вариантов осуществления изобретения дозировка составляет 50 мг/день. В одном из вариантов осуществления изобретения дозировка составляет 0,01 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 0,1 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 0,530 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 0,05 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 50 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 10 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 20-70 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 5 мг/день.

В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-90 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-90 мг/2 дня. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-90 мг/3 дня. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-90 мг/4 дня. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-90 мг/5 дня. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-90 мг/6 дней. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-90 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-90 мг/9 дней. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-90 мг/11 дней. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 1-90 мг/14 дней.

В другом варианте осуществления изобретения дозировка соматотропного гормона составляет 10-50 мг/день. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 10-50 мг/2 дня. В дру-

гом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 10-50 мг/3 дня. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 10-50 мг/4 дня. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 10-50 мг/5 дней. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 10-50 мг/6 дней. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 10-50 мг/неделю. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 10-50 мг/9 дней. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 10-50 мг/11 дней. В другом варианте осуществления изобретения дозировка составляет 10-50 мг/14 дней.

Пероральное введение в одном из вариантов осуществления изобретения включает стандартную лекарственную форму, включающую таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания, жевательные таблетки, суспензии, эмульсии и подобное. Такие стандартные лекарственные формы содержат безопасное и эффективное количество желаемого соматотропного гормона согласно изобретению, каждое из которых в одном из вариантов осуществления изобретения составляет приблизительно от 0,7 или 3,5 мг до приблизительно 280 мг/70 кг или, в другом варианте осуществления изобретения приблизительно от 0,5 или 10 мг до приблизительно 210 мг/70 кг. Фармацевтически приемлемые носители, подходящие для получения стандартных лекарственных форм для перорального введения, хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения таблетки обычно содержат традиционные фармацевтически совместимые адьюванты, такие как инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат натрия, маннитол, лактоза и целлюлоза; связывающие вещества, такие как крахмал, желатин и сахароза; разрыхлители, такие как крахмал, альгиновая кислота и кроскармеллоза; лубриканты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота и тальк. В одном из вариантов осуществления изобретения могут использоваться скользящие вещества, такие как двуокись кремния, для улучшения свойств сыпучести порошковых смесей. В одном из вариантов осуществления изобретения для внешнего вида могут добавляться красящие вещества, такие как красители, подпадающие под Федеральный закон о пищевых продуктах, медикаментах и косметических средствах (Federal Drug, Food and Cosmetics Act - FD&C). Подслащающие добавки и ароматизаторы, такие как аспартам, сахарин, ментол, мята перечная и фруктовые ароматизаторы, являются подходящими адьювантами для жевательных таблеток. Капсулы обычно содержат один или более твердых разбавителей, раскрываемых выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения отбор компонентов-носителей зависит от вторичных соображений, таких как вкус, стоимость и стабильность при хранении, которые не являются критическими для целей настоящего изобретения, и их отбор может быть легко выполнен специалистом в данной области.

В одном из вариантов осуществления изобретения пероральная лекарственная форма включает predetermined профиль высвобождения. В одном из вариантов осуществления изобретения пероральная лекарственная форма по настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки пролонгированного действия. В одном из вариантов осуществления изобретения пероральная лекарственная форма по настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки с медленным высвобождением. В одном из вариантов осуществления изобретения пероральная лекарственная форма по настоящему изобретению включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки с немедленным высвобождением. В одном из вариантов осуществления изобретения состав пероральной лекарственной формы составлен в соответствии с желаемым профилем высвобождения фармацевтически активного ингредиента, как это известно специалисту в данной области.

Пероральные композиции в некоторых вариантах осуществления изобретения включают жидкие растворы, эмульсии, суспензии и подобное. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтически приемлемые носители, подходящие для получения таких композиций, хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения жидкие пероральные композиции содержат от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,933% желаемого соединения или соединений или в другом варианте осуществления изобретения от приблизительно 0,01 до приблизительно 10%.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции для использования в способах по настоящему изобретению включают растворы или эмульсии, которые в некоторых вариантах осуществления изобретения являются водными растворами или эмульсиями, содержащими безопасное и эффективное количество соединений по настоящему изобретению и, необязательно, другие соединения, предназначенные для местного интраназального введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции содержат от приблизительно 0,001 до приблизительно 10,0% вес./об. соматотропного гормона, модифицированного посредством СТР, более предпочтительно от приблизительно 0,01% до приблизительно 2,0% вес./об., который используется для системной доставки соединений интраназальным путем.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтические композиции вводятся путем внутривенной, внутриартериальной или внутримышечной инъекции жидкого препарата. В некоторых вариантах осуществления изобретения жидкие составы включают растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии, масла и подобное. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтические композиции вводятся внутривенно, и, таким образом, состав создается в форме, подходящей для внутривенного введения. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтические композиции вводятся

внутриартериально, и, таким образом, состав создается в форме, подходящей для внутриартериального введения. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтические композиции вводятся внутримышечно, и, таким образом, состав создается в форме, подходящей для внутримышечного введения.

Дополнительно в другом варианте осуществления изобретения фармацевтические композиции вводятся местно на поверхности тела, и, таким образом, состав создается в форме, подходящей для местного введения. Подходящие составы для местного введения включают гели, мази, кремы, лосьоны, капли и подобное. Для местного введения соединения по настоящему изобретению комбинируются с дополнительным подходящим терапевтическим средством или средствами, которые готовятся и наносятся как растворы, суспензии или эмульсии в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем или без него.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтические композиции по настоящему изобретению получают способами, хорошо известными в данной области, например традиционными способами смешивания, растворения, гранулирования, дражирования, растирания в порошок, эмульсификации, инкапсулирования, улавливания или лиофилизации.

В одном из вариантов осуществления изобретения состав фармацевтических композиций для использования в соответствии с настоящим изобретением создается традиционным способом с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, включающих вспомогательные вещества и дополнительные вещества, которые способствуют переработке активных ингредиентов в препараты, которые могут быть использованы фармацевтически. В одном из вариантов осуществления изобретения состав зависит от избранного пути введения.

В одном из вариантов осуществления изобретения состав инъекционных препаратов изобретения получают в водных растворах. В одном из вариантов осуществления изобретения состав инъекционных препаратов по изобретению создается в физиологически приемлемых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой раствор. В некоторых вариантах осуществления изобретения для трансмукозального введения в составе используются пенетранты, подходящие для проникаемого барьера. Такие пенетранты, в общем, известны в данной области.

В одном из вариантов осуществления изобретения состав препаратов, описываемых в настоящем описании, составляется для парентерального введения, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. В некоторых вариантах осуществления изобретения составы для инъекций представлены в стандартной лекарственной форме, например в ампулах или в многодозовых контейнерах с необязательно добавленным консервантом. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции являются суспензиями, растворами или эмульсиями в масляных или водных носителях и содержат вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства.

Композиции также включают в некоторых вариантах осуществления изобретения консерванты, такие как бензалкония хлорид и тимеросал, и подобное; хелатирующие средства, такие как эдетат натрия и другие; буферы, такие как фосфатный, цитратный и ацетатный; средства тоничности, такие как хлорид натрия, хлорид калия, глицерин, маннитол и другие; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, ацетилцистин, метабисульфат натрия и другие; ароматизаторы; регуляторы вязкости, такие как полимеры, включая целлюлозу и ее производные; и поливиниловый спирт, и кислоту, и основание для регулирования, по необходимости, pH этих водных композиций. Композиции также содержат в некоторых вариантах осуществления изобретения местные анестетики или другие активные вещества. Композиции могут быть использованы в спреях, аэрозолях, каплях и подобное.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы активного препарата в водорастворимой форме. В дополнение суспензии активных ингредиентов в некоторых вариантах осуществления изобретения получают как соответствующие инъекционные суспензии на масле или воде. Подходящие липофильные растворители или носители включают в некоторых вариантах осуществления изобретения жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирной кислоты, такие как этил олеат, триглицериды или липосомы. Водные инъекционные суспензии содержат в некоторых вариантах осуществления изобретения субстанции, повышающие вязкость суспензии, такие как натрия карбоксиметилцеллюлоза, сорбитол или декстран. В другом варианте осуществления изобретения суспензия также содержит подходящие стабилизаторы или средства, повышающие растворимость активных ингредиентов для обеспечения получения высококонцентрированных растворов.

В другом варианте осуществления изобретения активное соединение может быть доставлено в везикуле, в частности в липосоме (см. Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, там же, pp. 317-327; см., в общем, там же).

В другом варианте осуществления изобретения состав фармацевтической композиции, доставленной в системе контролируемого высвобождения, составляется для внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. В одном из вариантов осуществления изобретения используется насос (см. Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.*

321:574 (1989). В другом варианте осуществления изобретения могут использоваться полимерные материалы. В еще другом варианте осуществления изобретения система контролируемого высвобождения может быть размещена в непосредственной близости от терапевтической мишени, то есть мозга, таким образом, требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984). Другие системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990).

В некоторых вариантах осуществления изобретения активный ингредиент находится перед употреблением в форме порошка для разбавления подходящим носителем, например стерильным апирогенным раствором на водной основе. Состав композиций в некоторых вариантах осуществления изобретения составляется для распыления и ингаляционного введения. В другом варианте осуществления изобретения композиции содержатся в контейнере с прилагаемыми средствами распыления.

В одном из вариантов осуществления изобретения состав препарата по настоящему изобретению составляется в ректальные композиции, такие как суппозитории или удерживающие клизмы, с использованием, например, традиционных основ суппозиториев, таких как масло какао или другие глицериды.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтические композиции, подходящие для использования в контексте настоящего изобретения, включают композиции, в которых активные ингредиенты содержатся в количестве, эффективном для достижения намеченной цели. В другом варианте осуществления изобретения терапевтически эффективное количество означает количество активных ингредиентов, эффективное для предотвращения, облегчения или улучшения симптомов заболевания или продления выживаемости индивида, получающего лечение.

В одном из вариантов осуществления изобретения определение терапевтически эффективного количества в существенной мере находится в рамках возможностей специалиста в данной области.

Некоторые примеры веществ, способных служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей или их компонентов, составляют сахара, такие как лактоза, глюкозы и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как натрия карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и метилцеллюлоза; порошковый трагакант; солод; желатин; тальк; твердые лубриканты, такие как стеариновая кислота и стеарат магния; сульфат кальция; растительные масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао; полиолы, такие как пропиленгликоль, глицерин, сорбитол, маннитол и полиэтиленгликоль; альгиновая кислота; эмульсификаторы, такие как эмульсификаторы марки Tween™; увлажняющие средства, такие как лаурилсульфат натрия; красители; ароматизаторы; средства таблетирования, стабилизаторы; антиоксиданты; консерванты; апирогенная вода; изотонический физраствор и растворы фосфатного буфера. Выбор фармацевтически приемлемого носителя, который будет использован совместно с соединением, в основном определяется способом, которым будет вводиться данное соединение. Если заявленное соединение будет вводиться путем инъекции, в одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтически приемлемым носителем является стерильный физиологический раствор с суспендирующим средством, совместимым с кровью, рН которого доведено до приблизительно 7,4.

Кроме того, композиции дополнительно включают связующие вещества (например, гуммиарабик, кукурузный крахмал, желатин, карбомер, этилцеллюлозу, гуаровую камедь, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, повидон), разрыхлители (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту, силикона двуокись, кроскармеллозу натрия, кросповидон, гуаровую камедь, натрия крахмал гликолят), буферы (например, Tris-HCl, ацетатный, фосфатный) различной рН и ионной силы, аддитивы, такие как альбумин или желатин, для предотвращения абсорбции к поверхностям, детергенты (например, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, соли желчных кислот), ингибиторы протеазы, сурфактанты (например, натрия лаурил сульфат), усилители проникновения, солюбилизующие средства (например, глицерин, полиэтиленглицерин), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, натрия метабисульфит, бутилированный гидроксианизол), стабилизаторы (например, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза), средства, повышающие вязкость (например, карбомер, коллоидная кремния двуокись, этилцеллюлоза, гуаровая камедь), подслащивающие добавки (например, аспартам, лимонная кислота), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), лубриканты (например, стеариновая кислота, магния стеарат, пропиленгликоль, лаурилсульфат натрия), средства для повышения текучести (например, коллоидная двуокись кремния), пластификаторы (например, диэтилфталат, триэтилцитрат), эмульсификаторы (например, карбомер, гидроксипропилцеллюлоза, лаурилсульфат натрия), полимерное покрытие (например, полуксамеры или полуксаминны), покровные вещества и пленкообразователи (например, этилцеллюлоза, акрилаты, полиметакрилаты) и/или адъюванты.

Типичные компоненты носителей для сиропов, эликсиров, эмульсий и суспензий включают этанол, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, жидкую сахарозу, сорбитол и воду. Для суспензии типичные суспендирующие средства включают метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, целлюлозу (например, Avicel™, RC-591), трагакант и натрия альгинат; типичные смачивающие средства включают лецитин и полиэтиленоксид сорбитан (например, полисорбат 80). Типичные консерванты включа-

ют метилпарабен и бензоат натрия. В другом варианте осуществления изобретения пероральные жидкие композиции также содержат один или более компонентов, таких как подслащивающие добавки и красители, раскрытые выше.

Композиции также включают введение активного материала в или на препараты частиц полимерных соединений, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, гидрогели и т.п., или в липосомы, микроэмульсии, мицеллы, однослойные или многослойные везикулы, тени эритроцитов или сферобласты. Такие композиции будут оказывать влияние на физическое состояние, растворимость, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo*.

Также изобретение относится к композициям из частиц, покрытых полимерами (например, полксамерами или полксаминами), и соединениям, связанным с антителами, направленными против тканеспецифических рецепторов, лигандов или антигенов, или связанным с лигандами тканеспецифических рецепторов.

В другом варианте осуществления изобретения соединения модифицируются путем ковалентного присоединения водорастворимых полимеров, таких как полиэтиленгликоль, сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон или полипролин. В другом варианте осуществления изобретения модифицированные соединения проявляют, по существу, более длительные полупериоды жизни в крови после внутривенной инъекции по сравнению с соответствующими немодифицированными соединениями. В одном из вариантов осуществления изобретения модификация также повышает растворимость соединений в водном растворе, устраняют агрегацию, увеличивают физическую и химическую стабильность соединения и в значительной степени снижают иммуногенность и реактивность соединения. В другом варианте осуществления изобретения желаемая биологическая активность *in vivo* достигается путем введения такого аддукта полимер-соединения с меньшей частотой или в меньших дозах по сравнению с немодифицированным соединением.

В другом варианте осуществления изобретения получение эффективного количества или дозы может быть первоначально установлено из тестов *in vitro*. В одном из вариантов осуществления изобретения состав дозы может быть составлен на моделях у животных, и такая информация может быть использована для более точного определения полезных доз у людей.

В одном из вариантов осуществления изобретения токсичность и терапевтическая эффективность описываемых в настоящем описании активных ингредиентов может быть определена путем стандартных фармацевтических процедур *in vitro* в культурах клеток или у экспериментальных животных. В одном из вариантов осуществления изобретения данные, полученные от этих тестов *in vitro* и в культуре клеток, и в исследованиях у животных, могут быть использованы для создания состава диапазона доз для применения у человека. В одном из вариантов осуществления изобретения дозировка варьирует в зависимости от примененной лекарственной формы и использованного пути введения. В одном из вариантов осуществления изобретения точный состав, путь введения и дозировка могут быть выбраны конкретным врачом, принимающая во внимание состояние пациента [см., например, Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1].

В одном из вариантов осуществления изобретения в зависимости от восприимчивости и тяжести состояния, которое предстоит лечить, дозировка может состоять в однократном или в многократных введениях, с курсом лечения, продолжающимся от нескольких дней до нескольких недель, или до тех пор, пока лечение не подействует или не будет достигнуто уменьшения болезненного состояния.

В одном из вариантов осуществления изобретения количество композиции, которое будет введено, разумеется, будет зависеть от индивида, получающего лечение, тяжести недуга, способа введения, суждения врача, предписывающего лечение, и т.п.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиции, включая препарат по настоящему изобретению с составом, составленным в совместимом фармацевтическом носителе, также готовят, помещают в соответствующий контейнер и маркируют для лечения указанного состояния.

В другом варианте осуществления изобретения GH, модифицированный посредством СТР, вводится путем системного введения. В другом варианте осуществления изобретения соматотропный гормон, как описано в настоящем описании, вводится путем внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции. В другом варианте осуществления изобретения GH, модифицированный посредством СТР, является лиофилизированным (т.е. высушенным в замороженном состоянии) препаратом в комбинации со сложными органическими вспомогательными веществами и стабилизаторами, такими как неионные поверхностно-активные средства (т.е. сурфактанты), различные сахара, органические полиолы и/или сывороточный альбумин человека. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный GH, модифицированный посредством СТР, как описано, в стерильной воде для инъекции. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный соматотропный гормон, как описано, в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе для инъекции. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный соматотропный гормон, как описано, в стерильном 0,9% NaCl для инъекции.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция включает соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, и комплексные носители, такие как сывороточный альбумин человека, полиолы, сахара и анионные поверхностно-активные стабилизирующие средства (см., например, WO 89/10756 (Nara et al. - содержащий полиол и п-гидроксibenзоат)). В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит соматотропный гормон, как описано в настоящем описании, лактобионовую кислоту и ацетатный/глициновый буфер. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, и аминокислоты, такие как аргинин или глутамат, которые повышают растворимость композиций интерферона в воде. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный ГН, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, и глицин или сывороточный альбумин человека (HSA), буфер (например, ацетатный) и изотоническое средство (например, NaCl). В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный ГН, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, и фосфатный буфер, глицин и HSA.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, стабилизируется при помещении в буферные растворы, имеющие pH между приблизительно 4 и 7,2. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, стабилизируется при помощи аминокислоты в качестве стабилизирующего средства и, в некоторых случаях, солью (если аминокислота не содержит заряженной боковой цепи).

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, является жидкой композицией, содержащей стабилизирующее средство от приблизительно 0,3 до 5 вес.%, которое является аминокислотой.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, предоставляет точность дозирования и безопасность продукта. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, предоставляет биологически активный стабильный жидкий состав для использования в инъекируемых применениях. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит нелиофилизированный ГН, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, предоставляет жидкий состав, позволяющий проводить долговременное хранение в жидком состоянии, способствуя хранению и транспортировке перед введением.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, содержит твердые липиды в качестве матричного материала. В другом варианте осуществления изобретения инъекируемая фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, содержит твердые липиды в качестве матричного материала. В другом варианте осуществления изобретения получение липидных микрочастиц путем распылительного отверждения было описано Speiser (Speiser and al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54) с последующими липидными нанопеллетами для перорального введения (Speiser EP 0167825 (1990)). В другом варианте осуществления изобретения используемые липиды хорошо переносятся организмом (например, глицериды, состоящие из жирных кислот, которые присутствуют в эмульсиях для парентерального питания).

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, находится в форме липосом (J.E. Diederichs and al., Pharm./nd. 56 (1994) 267-275).

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, содержит полимерные микрочастицы. В другом варианте осуществления инъекируемая фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, содержит полимерные микрочастицы. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, содержит наночастицы. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, содержит липосомы. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон,

модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, содержит липидную эмульсию. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, содержит микросферы. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, содержит липидные наночастицы. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, содержит липидные наночастицы, содержащие амфифильные липиды. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция, содержащая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано в настоящем описании, содержит липидные наночастицы, содержащие лекарственное средство, липидный матрикс и сурфактант. В другом варианте осуществления изобретения липидный матрикс имеет содержание моноглицерида, которое составляет по меньшей мере 50% вес/вес.

В одном из вариантов осуществления изобретения композиции по настоящему изобретению представлены в упаковке или приспособлении для дозирования, таких как те, что были утверждены в наборе, одобренном FDA (Food and Drug Administration - Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США), которые содержат одну или более единиц лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. В одном из вариантов осуществления изобретения упаковка, например, содержит металлическую или пластиковую фольгу, такая как блистерная упаковка. В одном из вариантов осуществления изобретения упаковка или приспособление для дозирования сопровождается инструкциями для введения. В одном из вариантов осуществления изобретения упаковка или приспособление для дозирования сопровождается сообщением, связанным с контейнером, в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов, сообщение которого отражает утверждение агентством формы композиций или введение человеку или животному. Таким сообщением, в одном из вариантов осуществления изобретения является маркировка, утвержденная Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США для рецептурных препаратов, или утвержденный вкладыш продукта.

В одном из вариантов осуществления изобретения следует понимать, что соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР по настоящему изобретению, может предоставляться индивидууму с дополнительными активными средствами для достижения улучшенного терапевтического эффекта по сравнению с лечением каждым средством самим по себе. В другом варианте осуществления изобретения принимаются меры (например, дозировка и выбор дополняющего средства) в отношении нежелательных побочных эффектов, связанных с комбинированными терапиями.

Дополнительные объекты, преимущества и новые признаки настоящего изобретения будут явными для обычного специалиста в данной области после изучения следующих примеров, которые не предназначены для того, чтобы быть ограничивающими. В дополнение каждый из различных вариантов осуществления изобретения и аспекты настоящего изобретения, как это описано в настоящем описании выше и как заявлено в разделе пунктов формулы изобретения ниже, находят экспериментальную поддержку в следующих примерах.

Примеры

В общем, номенклатура, используемая в настоящем описании, и лабораторные процедуры, задействованные в настоящем изобретении, включают молекулярные, биохимические, микробиологические способы и способы рекомбинантной ДНК. Такие способы тщательно описаны в литературе (см., например, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); методики, описанные в патентах США №№ 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 и 5272057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York (1980); имеющиеся в наличии иммунотесты широко описаны в патентах и научной литературе (см., например, патенты США №№ 3791932; 3839153; 3850752; 3850578; 3853987; 3867517; 3879262; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; 4098876; 4879219; 5011771 и 5281521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M.J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D. and Higgins S.J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D. and Higgins S.J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) и "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996);

которые включены в настоящее описание в качестве ссылки. Другие общие ссылки предоставлены по тексту этого документа.

Пример 1. Создание конструкторов hGH.

Материалы и способы.

Было синтезировано четыре клон hGH (варианты белка 20 кДа). Фрагменты Xba I-Not I, содержащие последовательности hGH из четырех вариантов, были лигированы в эукариотический вектор экспрессии pCI-dhfr, который предварительно выдерживали с XbaI-NotI. Была получена ДНК из 4 клонов (401-0, 1, 2, 3 и 4). Также был синтезирован другой частичный клон hGH (пары оснований 1-242) из белка 22 кДа (0606114). Праймеры заказывали у Sigma-Genosys.

Последовательности праймеров, которые были использованы для создания полипептидов hGH, модифицированных посредством СТР по настоящему изобретению, суммированы в табл. 1, как указано ниже.

Таблица 1

Номер праймера	SEQ ID NO	Последовательность	Сайт рестрикции (подчеркнут в последовательности)
25	18	5' <u>CTCTAGAGGACATGGCCAC</u> 3'	XbaI
32 ^R	19	5' ACAGGGAGGTCTGGGGTTCTGCA 3'	
33	20	5' TGCAGAACCCAGACCTCCSTGTGC 3'	
4 ^R	21	5' CCAAACATCAATGTATCTTA 3'	
25	22	5' <u>CTCTAGAGGACATGGCCAC</u> 3'	XbaI
35 ^R	23	5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3'	
34	24	5' GCSTTTGACACCTACCAGGAGTTCG 3'	
37 ^R	25	5' <u>ACGCGCCCGCATCCAGACSTTCATCACTGA</u> GGC 3'	NotI
39 ^R	26	5' <u>GCGGCCCGGACTCATCAGAAGCCGAGCTGC</u> CC 3'	

Конструкция 402-0-p69-1 (hGH) (SEQ ID NO: 5).

hGH представляет собой рекомбинантный соматотропный гормон человека дикого типа (без СТР), который был получен для использования в качестве контроля в экспериментах, описанных ниже.

Были проведены три реакции ПЦР. Первая реакция была проведена с праймером 25 и праймером 32^R и плазмидной ДНК 0606114 (частичный клон пар оснований 1-242 hGH) в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР был сформирован продукт, состоящий из 245 пар оснований.

Вторая реакция была проведена с праймером 33 и праймером 4^R и плазмидной ДНК 401-0-p57-2 в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР был сформирован продукт, состоящий из 542 пар оснований.

Последняя реакция проводилась с праймерами 25 и 4^R и смесью продуктов предыдущих двух реакций в качестве матрицы; в результате ПЦР амплификации был образован продукт из 705 пар оснований и лигирован в клонирующий вектор TA (Invitrogen, каталог K2000-01). Фрагмент XbaI-NotI, содержащий последовательность hGH-0, был лигирован в эукариотический вектор экспрессии pCI-dhfr. Вектор был трансфицирован в клетки DG-44 CHO. Клетки выращивались в среде, не содержащей белка.

Конструкция 402-1-p83-5 (hGH-СТР) - SEQ ID NO: 9 и 402-2-p72-3(hGH-СТР×2) - SEQ ID NO: 10: hGH-СТР представляет собой рекомбинантный соматотропный гормон человека, который был присоединен путем слияния к 1 копии С-концевого пептида бета цепи хорионического гонадотропина человека (СТР). СТР кассета hGH-СТР была присоединена к С-концу (одна кассета). hGH-СТР-СТР представляет собой рекомбинантный соматотропный гормон человека, который присоединен путем слияния к 2 копиям С-концевого пептида бета цепи хорионического гонадотропина человека (СТР). Две кассеты СТР hGH-СТР-СТР были присоединены к С-концу (две кассеты).

Конструкция из hGH-СТР и hGH-СТР-СТР выполнялась тем же способом, что и конструкция hGH-0. Во второй реакции ПЦР в качестве матрицы использовались pCI-dhfr-401-1-p20-1 (hGH*-ctp) и pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH*-ctp ×2).

hGH-СТР и hGH-СТР-СТР были экспрессированы в клетках DG-44 CHO. Клетки выращивались в среде, не содержащей белка. Молекулярный вес hGH-СТР составляет ~30,5 кДа, поскольку hGH имеет молекулярный вес 22 кДа, в то время как каждая "СТР кассета" вносит 8,5 кДа в общий молекулярный вес (см. фиг. 1). Молекулярный вес hGH-СТР-СТР составляет ~39 кДа (см. фиг. 1).

Конструкция 402-3-p81-4 (СТР-hGH-СТР-СТР) - SEQ ID NO: 11 и 402-4-p82-9 (СТР*hGH-СТР-СТР) - SEQ ID NO: 12: СТР-hGH-СТР-СТР представляет собой рекомбинантный соматотропный гормон человека, который был присоединен путем слияния к 3 копиям С-концевого пептида бета цепи хорионического гонадотропина человека (СТР). Три СТР кассеты СТР-hGH-СТР-СТР были присоединены как N-концу (одна кассета), так и к С-концу (две кассеты). tСТР-hGH-СТР-СТР представляет собой рекомби-

нантный соматотропный гормон человека, который присоединен путем слияния к 1 процессированной и к 2 полным копиям С-концевого пептида бета цепи хорионического гонадотропина человека (СТР). Усе-ченная СТР кассета tСТР-hGH-СТР-СТР была присоединена к N-концу, и две СТР кассеты были присоеди-нены к С-концу (две кассеты).

Были проведены три реакции ПЦР. Первая реакция была проведена с праймером 25 и праймером 35^R и плазмидной ДНК р401-3-р12-5 или 401-4-р22-1 в качестве матрицы; в результате амплификации ПЦР был сформирован продукт, состоящий из 265 или 220 пар оснований. Вторая реакция была прове-дена с праймером 34 и праймером 37^R и плазмидной ДНК TA-hGH-2-q65-1 в качестве матрицы; в резуль-тате ПЦР амплификации был образован продукт из 695 пар оснований. Последняя реакция была прове-дена с праймерами 25 и 37^R и смесью продуктов двух предыдущих реакций в качестве матрицы; в резуль-тате ПЦР амплификации был образован продукт из 938 или 891 пар оснований и лигирован в клониру-ющий вектор TA (Invitrogen, каталог K2000-01). Фрагмент Xba I-Not I, содержащий последователь-ность hGH, был лигирован в созданный авторами эукариотический вектор экспрессии pCI-dhfr.

СТР-hGH-СТР-СТР и tСТР-hGH-СТР-СТР были экспрессированы в клетках DG-44 CHO. Клетки выращивались в среде, не содержащей белка. Молекулярный вес СТР-hGH-СТР-СТР составляет ~47,5 кДа (см. фиг. 1), и молекулярный вес tСТР-hGH-СТР-СТР составляет ~43,25 кДа (см. фиг. 1).

Конструкция 402-6-р95а-8 (СТР-hGH-СТР) - SEQ ID NO:13: конструкция hGH-6 выполнялась тем же способом, что и конструкция hGH-3. В качестве матрицы во второй ПЦР реакции был использован pCI-dhfr-402-1-р83-5 (hGH-ctp).

Конструкция 402-5-р96-4 (СТР-hGH) - SEQ ID NO:14: реакция ПЦР выполнялась с использованием праймера 25 и праймера 39^R, и плазмидной ДНК pCI-dhfr-ctp-EPO-ctp (402-6-р95а-8) в качестве матрицы; в результате ПЦР амплификации был образован продукт из 763 пар оснований и лигирован в клониру-ющий вектор TA (Invitrogen, каталог K2000-01). Фрагмент Xba I-Not I, содержащий последователь-ность стр-hGH, был лигирован в созданный авторами эукариотический вектор экспрессии pCI-dhfr для получе-ния клона 402-5-р96-4.

Пример 2. Тесты биоактивности in vivo полипептидов hGH-СТР по настоящему изобретению.

Следующий эксперимент был проведен с целью тестирования потенциальной пролонгированной биологической активности полипептидов hGH-СТР по сравнению с коммерческим рекомбинантным со-матотропным гормоном человека и hGH.

Материалы и способы.

Крысы-самки с удаленным гипофизом (60-100 г) получали один раз в неделю подкожную инъекцию 21,7 мкг полипептидов hGH-СТР или один раз в день подкожную инъекцию 5 мкг контрольного коммер-ческого rhGH.

Вес измеряли у всех животных перед началом лечения, через 24 ч после первой инъекции и каждые два дня до конца исследования в день 21. Каждая точка представляет средний процент набора массы группы ((день взвешивания 0 взвешивание в последний день)/день взвешивания 0). Средний набор массы нормализовали по отношению к инъекции один раз в день коммерческого hGH. График лечения поды-тожен в табл. 2.

Таблица 2

№	Препарат	N	Способ введения	График лечения	Эквивалентная доза (мкг/крысу)	Кумулятивная доза (мкг/крысу)	Объем дозы (мл)
1	Носитель	7	подкожный	дни 1, 7 и 13; 1/неделю	не применяется	не применяется	0,25
2	Имитатор	7	подкожный	дни 1, 7 и 13; 1/неделю	не применяется	не применяется	0,25
3	hGH SEQ ID NO:5	7	подкожный	дни 1, 7 и 13; 1/неделю	21,7	65	0,25
4	hGH-СТР SEQ ID NO:9	7	подкожный	дни 1, 7 и 13; 1/неделю	21,7	65	0,25
5	hGH-СТР-СТР SEQ ID NO:10	7	подкожный	дни 1, 7 и 13; 1/неделю	21,7	65	0,25
6	СТР-hGH-СТР-СТР SEQ ID NO:11	7	подкожный	дни 1, 7 и 13; 1/неделю	21,7	65	0,25
7	tСТР-hGH-СТР-СТР SEQ ID NO:12	7	подкожный	дни 1, 7 и 13; 1/неделю	21,7	65	0,25
8	Коммерческий hGH v.1	7	подкожный	дни 1, 7 и 13; 1/неделю	21,7	65	0,25
9	Коммерческий hGH v.1	7	подкожный	дни 1-13; ежедневно/ недели	5	65	0,25

Результаты.

Результаты подытожены на фиг. 2. Эти результаты демонстрируют, что СТР-hGH-СТР-СТР (SEQ ID NO: 11) и tСТР-hGH-СТР-СТР (SEQ ID NO: 12) стимулируют набор массы свыше 120% по сравнению с коммерческим rhGH, который стимулировал 100% набор массы.

Вывод.

Три дозы один раз в неделю (дни инъекций: 1, 7 и 13) 21,7 мкг СТР-hGH-СТР-СТР (SEQ ID NO: 11) и tСТР-hGH-СТР-СТР (SEQ ID NO: 12) стимулировали повышение веса свыше 30% у крыс с удаленным гипофизом по сравнению с коммерческим rhGH, который был инъецирован в той же кумулятивной дозе, которая вводилась один раз в день в дозе 5 мкг на протяжении 13 дней.

Пример 3. Фармакокинетические исследования соматотропного гормона, модифицированного посредством СТР.

Фармакокинетические исследования однократной дозы были проведены на крысах Sprague-Dawley. Все исследования на животных были проведены в соответствии с Законом о благополучии животных Руководством по уходу и использованию лабораторных животных и под надзором и одобрением Учрежденческой комиссии по уходу и использованию животных Modigene, Biotechnology General Ltd. Крыс размещали либо по отдельности, либо по две в клетке с 12-ти часовым циклом свет/темнота. Доступ к воде (городское снабжение) и к несертифицированным кормам для грызунов предоставлялся ad libitum.

Для сравнения фармакокинетики СТР-hGH-СТР-СТР и GH крыс использовали четыре группы крыс Sprague-Dawley (270-290 г), от трех до шести самцов на группу. Крыс случайным образом распределяли в четыре группы лечения (см. табл. 3). Крысам вводили однократную подкожную или внутривенную инъекцию соматотропного гормона (50 мкг/кг внутривенно или подкожно) или СТР-hGH-СТР-СТР (108 мкг/кг внутривенно или подкожно). За исключением образца перед введением, который был получен под изофлурановым наркозом, отбор крови проводили у животных без наркоза. Образцы крови (приблизительно 0,25 мл) собирали в микроконтейнеры с покрытием ЭДТА для твердофазных иммуоферментных анализов ELISA концентраций в плазме СТР-hGH-СТР-СТР в периоды времени, указанные в табл. 3. После каждого взятия образца объем крови замещался равным объемом стерильного 0,9% физраствора. Образцы плазмы хранили на льду в течение до 1 ч до центрифугирования и сбора плазмы. Образцы плазмы до анализа хранили при приблизительно минус 20°C.

Таблица 3

Экспериментальный дизайн фармакокинетического исследования у крыс

Группа лечения	Тестируемый продукт	Кол-во животных/ группу/ временную точку	Способ введения	Пол	Уровень дозы (мкг/кг)	Инъецированный объем (мкл)	Концентрация (мкг/мл) / общий объем (мл)	Временные точки * (часы после дозы)
1	Биотропин	6#	подкожный	Самцы	50	500	20/5	0 (перед дозой) 0,5, 2, 4, 8, 24, 48
2	СТР-hGH-СТР-СТР	6#	подкожный	Самцы	108	500	43,2/5	0,5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
3	Биотропин	6#	внутривенный	Самцы	50	300	20/3	0, 0,12, 2, 4, 8, 24
4	СТР-hGH-СТР-СТР	6#	внутривенный	Самцы	108	300	43,2/3	0,12, 2, 4, 8, 24, 48, 72
Объем образца крови/временную точку - 500 мкл								Конечные образцы крови

- по 3 крысы на временную точку.

Для оценки образцов плазмы крыс был использован коммерческий набор для сэндвичевого твердофазного иммуоферментного анализа ELISA, специфический для обнаружения соматотропного гормона человека (Roche Diagnostics). Данный набор обнаруживает соматотропный гормон человека в плазме с помощью антительной сэндвич-структуры ELISA. Данный набор первоначально использовался для измерения концентрации СТР-hGH-СТР-СТР в плазме крыс. Для этих образцов плазмы была использована стандартная кривая СТР-hGH-СТР-СТР (1,2-100 нг/мл) и концентрации СТР-hGH-СТР-СТР в плазме крыс были интерполированы из этой кривой.

Стандартные фармакокинетические параметры, включая клиренс (CL (клиренс) или CL/F (кажущийся клиренс)), объем распределения (Vd (объем распределения) или Vd/F (кажущийся объем распределения)), полупериод жизни ($t_{1/2}$), площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени (AUC), максимальная наблюдаемая концентрация в плазме (C_{max}) и время до максимальной наблюдаемой концентрации в плазме (T_{max}) были получены из кривых зависимости альбутропина или соматотропного гормона плазмы от времени путем некомпартментного анализа с использованием программы моделирования WinNonlin (Pharsight, версия 3.1). Для этого анализа данные концентрации в плазме СТР-hGH-СТР-СТР или соматотропного гормона были равномерно взвешены. AUC была рассчитана с использованием логарифмически линейного трапецидального анализа для внутривенных данных и линейно-логарифмического метода трапеций для подкожных данных. Профили концентрации в плазме для каж-

дой крысы (за исключением данных подкожного абутропина) или обезьяны анализировались индивидуально, и данные значений $\text{среднее} \pm \text{стандартная ошибка среднего (S.E.M.)}$ для фармакокинетических параметров представлены в табл. 4 и на фиг. 4.

СТР-hGH-СТР-СТР представляет собой одноцепочечный белок из 275 аминокислот и до двенадцати O-связанных углеводов. Структура состоит из модифицированного соматотропного гормона человека (Somatropin), присоединенного к трем копиям C-концевого пептида (СТР) бета цепи хорионического гонадотропина человека (hCG); одной копии N-конца и двух копий (последовательных) на C-конце. Соматотропный гормон человека состоит из 191 аминокислоты. СТР состоит из 28 аминокислот и четырех O-связанных сахарных цепей.

Пример 4. Фармакокинетика соматотропного гормона, модифицированного посредством СТР, у крыс SD.

Фармакокинетику СТР-hGH-СТР-СТР оценивали и сравнивали с таковой у коммерческого hGH (биотропин).

Таблица 4
Средние фармакокинетические параметры после внутривенного и подкожного введения однократной дозы СТР-hGH-СТР-СТР и GH (биотропин) у крыс Sprague-Dawley

Фармакокинетическая статистика					
Параметры	Единицы	подкожно		внутривенно	
		Биотропин	СТР-hGH-СТР-СТР	Биотропин	СТР-hGH-СТР-СТР
Доза	мг/кг	50	50	50	50
Посл. AUC	час*нг/мл	41	680	162,7	1568,3
C _{max}	нг/мл	13	36,8	275,8	926
T _{max}	час	0,5	8	0	0
MRT	час	2,5	12,9	0,5	9,9
T _{1/2} альфа	час		1,58		0,74
T _{1/2} бета	час	1,73	9	0,5	6,9

Статистический анализ данных.

Анализ образцов сыворотки выполнялся с целью определения специфических уровней концентрации для каждого образца. Данные концентрации и временных точек обрабатывались с использованием некомпартментного анализа WinNonLin.

Определяемые параметры включали: AUC, MRT, $t_{1/2}$, C_{max} и T_{max}. Фиг. 4 демонстрирует преимущество фармакокинетического профиля концентрации в плазме СТР-hGH-СТР-СТР перед концентрациями соматотропного гормона (нг/мл) после однократной внутривенной или подкожной дозы СТР-hGH-СТР-СТР или соматотропного гормона у крыс (n=3-6 на дозу/способ введения).

После однократной подкожной инъекции 50 мкг/кг клиренс СТР-hGH-СТР-СТР из крови крыс SD был значительно более медленным, чем клиренс СТР-hGH-СТР или биотропина.

Соответствующие рассчитанные полупериоды жизни и AUC составили

Биотропин	T _{1/2} 1,7 час,	AUC 41 час*нг/мл
СТР-hGH-СТР	T _{1/2} 8,5 час,	AUC 424 час*нг/мл
СТР-hGH-СТР-СТР	T _{1/2} 9,0 час,	AUC 680 час*нг/мл

Заключение.

СТР-hGH-СТР-СТР был избран в качестве окончательного кандидата из 6 других вариантов. СТР-hGH-СТР-СТР демонстрировал превосходные характеристики в плане биологической активности и фармакокинетики.

Пример 5. Тест набора массы (ТНМ) для однократной дозы/повторной дозы соматотропного гормона, модифицированного посредством СТР.

Крысы-самцы с удаленным гипофизом (интерауральный метод), возрастом 3-4 недели были получены из CRL Laboratories. Во время 3-х недельного периода послеоперационной акклиматизации крыс исследовали и взвешивали дважды в неделю для исключения животных, которые, как представлялось, имели неполное удаление гипофиза, подтверждающееся набором массы, сходным с набором массы ложнооперированных крыс. Эти крысы с неполным удалением гипофиза были выведены из исследования. Средние показатели веса тела у крыс с удаленным гипофизом составляли на время эксперимента 70-90 г. Это является стандартом биоанализа Фармакопеи США и Европейской Фармакопеи для hGH. Крысы с удаленным гипофизом (крысы, у которых была удалена питуитарная железа) потеряли свою способность набирать вес. Инъекции hGH (и СТР-hGH-СТР-СТР) этим крысам приводят в результате к набору массы. На основе измеренного набора массы на протяжении определенного периода времени и количества инъекции hGH определяется специфическая активность hGH (и СТР-hGH-СТР-СТР). Крысам вводи-

ли подкожно либо однократные дозы 0,4, 0,8 и 4 мг/кг, либо подкожно повторные дозы 0,6 и 1,8 мг/кг с интервалом в 4 дня на протяжении 3 недель. При рандомизации перед первым введением доз определяли индивидуальные показатели веса тела у всех животных, впоследствии - раз в два дня или, в случае умерщвления, на время смерти и перед забоем.

Анализ набора массы при однократной дозе и повторной дозе.

Результаты, в которых сравнивался ответ роста всего тела после различных моделей дозировки СТР-hGH-СТР-СТР у крыс с удаленным гипофизом, продемонстрированы на фиг. 5. Результаты показывают, что однократная инъекция доз 0,4 и 0,8 мг/кг/день hGH-СТР была эквивалентной 4 ежедневным инъекциям 0,1 мг/кг/день Биотропина. Пик эффекта hGH-СТР наступал после 2 дней.

Фиг. 6 дополнительно демонстрирует, что площадь под кривой после однократной инъекции СТР-hGH-СТР-СТР коррелирует с набором массы тела у крыс. Таким образом, эти совокупные данные демонстрируют, что набор массы тела тесно коррелирует с кумулятивным показателем AUC.

Конструкт hGH-СТР, введенный с интервалом в 4 дня, стимулирует такой же набор массы, как и ежедневные инъекции биотропина, как показано на фиг. 7. Предполагаемый полупериод жизни hGH у людей в 5 раз лучше, чем у крыс, что указывает на потенциальный пик-эффект у людей через 10 дней после однократной инъекции. Эти результаты поддерживают введение у людей конструкта hGH-СТР, СТР-hGH-СТР-СТР один раз в неделю или раз в две недели.

Пример 6. Исследования фармакодинамики/фармакокинетики соматотропного гормона, модифицированного посредством СТР.

Крысы-самцы с удаленным гипофизом (интрауральный метод) возрастом 3-4 недели были получены из CRL Laboratories. Во время периода послеоперационной акклиматизации в 3 недели крыс исследовали и взвешивали дважды в неделю для исключения животных, которые, как представлялось, имели неполное удаление гипофиза, подтверждающееся набором массы, сходным с набором массы ложнопериоперированных животных. Эти крысы с неполным удалением гипофиза были выведены из исследования. Средние показатели веса тела у крыс с удаленным гипофизом и у ложнопериоперированных крыс составляли на время эксперимента соответственно 70 и 150 г.

Крысам подкожно вводили однократную инъекцию СТР-hGH-СТР-СТР, носителя, соматотропного гормона человека СТР-hGH-СТР-СТР, или соматотропный гормон человека (20 мкг/крысу) вводили подкожно инъекцией в объеме 0,2 мл/крысу. Доза соматотропного гормона составляла 0,35 и 1,05 мкг/кг, доза соматотропного гормона, которая была эквивалентна количеству соматотропного гормона в соответствующей 0,6 и 1,8 мкг/кг дозе СТР-hGH-СТР-СТР. Группы лечения подытожены в табл. 4. После инъекции были получены образцы плазмы для анализов на IGF-1 в периоды времени, описанные в табл. 5. Образцы анализировали на предмет концентрации IGF-1 с использованием коммерческого твердофазного иммуноферментного анализа ELISA (R&D systems).

Еженедельное введение hGH, модифицированного посредством СТР, было успешным в поддержании IGF-1 в пределах нормального диапазона, как и при стандартном соматотропном гормоне и, в дополнение, он также поддерживает нормальный вес тела, как и стандартный соматотропный гормон.

Таблица 5

График лечения в исследовании крыс с удаленным гипофизом

Группа лечения	Тестируемый продукт	Кол-во животных/группу/временную точку	Способ введения	Эквивалентная доза (мг/крысу)	Эквивалентная дозировка (мг/кг)	Конц. СТР-hGH-СТР-СТР мг/мл	Объем дозы (мл)	Временные точки * (часы после дозы)
M7	Биотропин	9	подкожный	0,032	0,35	0,16	0,2	0 (перед дозой) 0,5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
M8	Биотропин	9	подкожный	0,095	1,05	0,475	0,2	0 (перед дозой) 0,5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
M9	EN648-01-08-005	12	подкожный	0,032 (0,055)	0,35 (0,6)	0,275	0,2	1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
M10	EN648-01-08-005	12	подкожный	0,095 (0,165)	1,05 (1,8)	0,825	0,2	1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
Объем образца крови/временную точку - 500 мкл								Конечные образцы крови

Был проведен некомпартментный фармакокинетический анализ на кривых зависимости средних концентраций сыворотки от времени для каждой группы. C_{max} СТР-hGH-СТР-СТР была значимо выше,

чем C_{\max} биотропина. Конечный полупериод жизни СТР-hGH-СТР-СТР был в 6 раз выше, чем у биотропина.

Таблица 6
Расчеты фармакокинетических параметров СТР-hGH-СТР-СТР
и биотропина после однократной подкожной инъекции
у крыс с удаленным гипофизом

Группа	Доза мг/кг	Пол	C_{\max} нг/мл	T_{\max} час	$AUC_{0-\infty}$ нг-час/мл	AUC_{0-t} нг-час/мл	CL/F мл/час/кг	$T_{1/2}$ час
СТР- hGH- СТР- СТР								
СТР	1,8	самцы	2,150	8	37,713	37,695	0,928	6,86
	0,6	самцы	681	8	11,505	11,489	3,042	6,8
hGH	1,05	самцы	1,078	0,5	3,541	3,540	9,884	1
	0,35	самцы	439	0,5	1,279	1,279	27,36	1

AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$ были очень сходными, что предполагает, что продолжительность взятия образцов была адекватной для характеристики фармакокинетических профилей. AUC у СТР-hGH-СТР-СТР была в 10 раз выше, чем у биотропина. Более того, C_{\max} была, в целом, пропорциональна дозе и для СТР-hGH-СТР-СТР, и она была в два раза выше, чем C_{\max} биотропина. Однако, как показано на фиг. 8, T_{\max} у СТР-hGH-СТР-СТР составила 8 ч по сравнению с 0,5 ч у биотропина, и конечные полупериоды жизни, по-видимому, не варьируют с уровнем дозы. $T_{1/2}$ у СТР-hGH-СТР-СТР был в 6,8 раз длиннее, чем у биотропина.

Непрямые эффекты соматотропного гормона опосредованы в основном инсулиноподобным фактором роста-I (IGF-I), гормоном, секретируемым печенью и другими тканями в ответ на соматотропный гормон. Большинство эффектов соматотропного гормона, стимулирующих рост, фактически происходят за счет IGF-I, действующего на свои клетки-мишени. Соответственно измерялся эффект конструкта СТР-hGH, СТР-hGH-СТР-СТР, на уровне IGF-I в сыворотке крыс с удаленным гипофизом. Фиг. 9 представляет результаты уровней IGF-I в сыворотке крыс с удаленным гипофизом после подкожной инъекции СТР-hGH-СТР-СТР или коммерческого hGH.

Однократные дозы СТР-hGH-СТР-СТР в 0,6 или 1,8 мг/кг или биотропина 0,35 или 1,05 мг/кг были введены подкожно крысам с удаленным гипофизом для определения ФК/ФД профиля. Сывороточный IGF-I после инъекции измеряли с помощью наборов для специфического твердофазного иммуноферментного анализа ELISA (Roche Diagnostics).

Кумулятивные уровни IGF-I в сыворотке после инъекции СТР-hGH-СТР-СТР были значительно выше, чем после инъекции биотропина. C_{\max} была в основном пропорциональна дозе, и для СТР-hGH-СТР-СТР она была в 3-4 раза выше, чем C_{\max} у биотропина. T_{\max} у СТР-hGH-СТР-СТР составило 36-48 ч по сравнению с 20-24 ч у биотропина. Подводя итоги, более высокие уровни hGH и более продолжительное присутствие в сыворотке в результате приводит к значительному повышению уровней IGF-I.

Пример 7. Содержание углеводов и сиаловой кислоты в соматотропном гормоне, модифицированном посредством СТР.

Анализ О-гликанов основан на наборе Prozyme. О-гликаны химически и энзиматически отщепляются от белка и отделяются от пептидов с использованием хроматографии на бумаге. Секвенирование пула О-гликанов выполнялось путем последовательных энзиматических расщеплений (экзогликозидазы) с последующим анализом методом высокоэффективной жидкостной хроматографии по сравнению со стандартами.

Профилирование углеводов путем анализа последовательности.

Профилирование углеводов проводилось Ludger Ltd.

Было взято два образца (EN648 и RS0708) в течение трех выделений, и каждое выделение также анализировалось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в трех параллельных определениях. Образцы в 300 мкг от трех параллельных определений EN648 и RS0708 и единичный образец в 100 мкл цитратного/натрия хлоридного буфера плюс положительный контроль фетуин (250 мкг) и 100 мкл воды в качестве отрицательного контроля подвергались ультрафильтрации путем центрифугирования с использованием мембраны 10000 Да, отсекающей молекулярный вес, для замены буфера водой, затем подвергали гидразинолизу с использованием условий режима вывода (6 ч при 60°C). Выделенные гликаны были повторно N-ацетилированы и очищены с применением картриджей LudgerClean CEX. Аликвоты выделенных гликанов затем помечали 2-аминобензамидом (2AB), очищали с применением картриджей Ludger Clean S и анализировали путем жидкостной хроматографии, основанной на гидрофильном взаимодействии-высокоэффективной жидкостной хроматографии LudgerSep-N2 HILIC-HPLC.

Содержание моносахаридов.

Анализ нейтральных моносахаридов требует гидролиза гликанов до их структурных моносахаридных составляющих. Гидролиз выполнялся Ludger Ltd на интактных гликопротеиновых образцах. В част-

ности, проводили кислотный гидролиз 50 мкг интактного гликопротеина 2-AB (2-аминобензамид), метили и пропускали через обратно-фазовую колонку ВЭЖХ. Этот метод гидролизует все гликаны, присутствующие в гликопротеине, включая N- и O-связанные типы гликанов.

Профилирование сиаловых кислот.

Анализировали два образца (EN648 и RS0708) и контроль в виде буфера. Анализ сиаловых кислот требует мягкого кислотного высвобождения моносахаридов с последующим мечением флуорофором DMV и анализом ВЭЖХ на колонке LudgerSep-R1. Для каждого анализа проводили кислотный гидролиз 50 мкг интактного гликопротеина.

Анализ гликопротеинов СТР-hGH-СТР-СТР.

Таблица 7

Анализ гликанов.

Структурные определения и площади пиков в процентах основаны на ВЭЖХ и матрицах ферментных гидролизатов

ИН пика ^a	ГЕ ^b	Структура ^c	Название	Процент от общего количества гликанов ^d			
				Не опр.	НАН1	АБС	АБС СВЯЗЬ
1 ^f	0.92		GalNAc	0.4	0.4	0.6	53.0
2 ^f	1.02		галактоза	1.9	9.7	23.8	26.5
*	1.72			4.3	4.6	2.3	
3	1.79		Galβ1-3GalNAc	2.3	67.7	69.4	17.1 ^h
4 ^g	2.25		NeuNAcα2-3Gal	19.8	13.0 ^h		
*	2.57			1.5	1.9	1.1	1.1
5	2.90		NeuNAcα2-3Galβ1-3GalNAc	70.6			
*	3.58			0.6	0.7	0.6	
6	3.22		Galβ1-3[NeuNAcα2-6]GalNAc	0.9	2.3		
7	4.42		NeuNAcα2-3Galβ1-3[NeuNAcα2-6]GalNAc	1.8			

Моносахаридные профили указывают на то, что образцы гликопротеина СТР-hGH-СТР-СТР содержат, главным образом, тип гликанов с O-связью. Основным пиком O-гликанов является сиалированное ядро 1 (Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc). Основной сиаловой кислотой является Neu5Ac, и существует несколько минорных пиков, свидетельствующих о наличии 3-4% диацетилизованной сиаловой кислоты N-ацетил-9-O-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5, 9Ac2) и менее 1% N-гликолилнейраминовой кислоты. Также имеются небольшие количества Neu5Acα2-6 (Galβ1-3) GalNAc.

Пример 8. Фармакокинетический/токсикокинетический анализ GH, модифицированного посредством СТР у макак-резус.

Для каждого животного были построены кривые отношения концентраций в сыворотке ко времени. Был проведен некомпартментный анализ при помощи профессиональной версии WinNonlin 5.2.1 (Pharsight Corporation, Mt View CA.). Оцениваемые фармакокинетические параметры показаны в табл. 8 ниже.

Таблица 8

Оценки фармакокинетических параметров СТР-hGH-СТР-СТР (среднее±стандартное отклонение) из некомпартментного анализа после однократной подкожной инъекции у макак-резус

Параметр	1,8 мг/кг	90 мг/кг
С _{max} (мкг/мл)	2,073 ± 0,417	108,7 ± 46,0
T _{max} (час)	4 ± 0	11 ± 7
AUC _{0-t} (мкг-час/мл)	38,7 ± 7,4	2,444 ± 394
AUC _{0-∞} (мкг-час/мл)	39,0 ± 7,3	2,472 ± 388
CL/F (мл/час/кг)	47,5 ± 9,0	37,04 ± 4,78
T _{1/2} (час)	10,00 ± 1,47	9,85 ± 1,07
Vz/F (мл/кг)	701 ± 236	529 ± 104

AUC_{0-t} и AUC_{0-∞} были весьма сходными, что дает возможность предполагать, что продолжительность взятия образцов была адекватной для характеристики фармакокинетических профилей. С_{max} была пропорциональной дозе. T_{max} было более поздним при более высокой дозе. T_{max} составило 4 ч для всех животных в группе низкой дозы и составило 8 или 24 ч в группе высокой дозы. Конечные полупериоды жизни для этих двух групп доз были сходными.

AUC была приблизительно пропорциональной дозе с несколько большей, чем пропорциональной AUC при более высокой дозе, дающей слегка более низкое значение для CL/F и Vz/F по сравнению с более низкой дозой. Невозможно сказать, являются ли CL и Vz более низкими при более высокой дозе или является ли F более низким при более низкой дозе. Существовало перекрытие между группами,

так что остается под вопросом, представляет ли это значимое различие в CL/F и Vz/F.

Фармакокинетические параметры, установленные при помощи модели, были весьма схожими с теми, которые были получены при некомпартментном анализе. Полупериоды абсорбции и элиминации показаны в табл. 9 ниже.

Таблица 9
Значения полупериодов абсорбции и элиминации СТР-hGH-СТР-СТР
(среднее±стандартное отклонение) после подкожной инъекции, полученные
в результате фармакокинетического моделирования у макак-резус

Доза	T _{1/2} абс (час)	T _{1/2} эл (час)
1,8 мг/кг	1,17 ± 0,40	10,41 ± 2,36
90 мг/кг	6,49 ± 1,87	7,26 ± 1,85

Данные указывают на то, что уровни элиминации весьма схожи между группами со слегка более длительным T_{1/2} элиминации в группе с более низкой дозой. Абсорбция, однако, в более чем пять раз медленнее после подкожного введения 90 мг/кг по сравнению с абсорбцией после 1,8 мг/кг. Как и в случае некомпартментного анализа, моделирование указывает на более позднее T_{max} при высокой дозе.

Хотя добавка соматотропного гормона и эффективна при лечении дефицита соматотропного гормона у детей и взрослых, неудобство ежедневных инъекций в течение продолжительных периодов времени ограничивает ее использование врачами у определенных групп пациентов наряду с повышением ошибки дозирования, количества лиц, обслуживающих пациента, стоимости лечения и/или отсутствия удобства для лечения. Необходимость удобства для лечения особенно важна в определенных популяциях, таких как дети с низким ростом, которые могут не понимать последствий несоблюдения режима дозирования соматотропного гормона для достижения оптимальной выгоды от лечения соматотропным гормоном. Вопрос поиска более подходящей альтернативы ежедневным инъекциям соматотропного гормона и последующего удобства для лечения имеет дальнейшую важность, когда дети, дефицитные по соматотропному гормону, превращаются во взрослых с продолжающейся необходимостью в лечении соматотропным гормоном. Потребность в ежедневном лечении происходит в большей степени из-за короткого полупериода жизни рекомбинантного соматотропного гормона в плазме, и она привела к разработке формы соматотропного гормона с пролонгированным действием (Reiter E.O., Attire K.M., Mashing T.J., Silverman B.L., Kemp S.F., Neolith R.B., Ford K.M. and Sanger P. A multimember study of the efficacy and safety of sustained release GH in the treatment of naive pediatric patients with GH deficiency. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86 (2001), pp. 4700-4706).

Слитый белок GH-СТР, рекомбинантного соматотропного гормона человека-СТР, как предоставляется в настоящем описании, у крысы имеет фармакокинетический профиль более длинный по продолжительности, чем таковой у соматотропного гормона. Этот уникальный фармакокинетический профиль дает возможность проводить прерывистое введение GH-СТР для достижения фармакодинамических эффектов у крысы, дефицитной по соматотропному гормону, о чем свидетельствуют соответственно рост и повышения уровней IGF-1 в плазме.

GH-СТР предлагает наилучший фармакокинетический профиль по сравнению с таковым у соматотропного гормона при подкожном введении у крысы. Существуют существенные отличия в клиренсе в плазме у GH-СТР по сравнению с соматотропным гормоном. В частности, плазма освобождается от GH-СТР в более чем 6 раз медленнее, чем от соматотропного гормона после подкожной дозировки. Конечный полупериод жизни и среднее время удержания GH-СТР были приблизительно в шесть раз длиннее, чем таковые у соматотропного гормона у крыс после подкожного введения. В дополнение Cl/F после подкожной дозировки в 10 раз ниже для GH-СТР, чем для соматотропного гормона.

В попытке исследовать, переносятся ли фармакокинетические преимущества у крысы в фармакодинамическую выгоду, возможность того, что GH-СТР может стимулировать рост у крыс с удаленным гипофизом, дефицитных по соматотропному гормону, путем режимов дозировки, менее частых, чем ежедневные, была исследована при эквивалентных уровнях доз СТР-hGH-СТР-СТР и соматотропного гормона. Однократная подкожная инъекция GH-СТР стимулировала возрастающий набор массы, которая была равной 4 ежедневным последовательным инъекциям соматотропного гормона. В дополнение каждый четвертый день графика введения GH-СТР демонстрирует повышенный набор массы по сравнению с соматотропным гормоном.

Фармакодинамически длительный период времени циркулирования GH-СТР по сравнению с соматотропным гормоном у крыс с удаленным гипофизом привел в результате к более длительному ответу IGF-1, измеренному в плазме крови после однократной подкожной инъекции. Подкожное введение однократной дозы GH-СТР повышало концентрации циркулирующего IGF-1 дозозависимым способом у крыс с удаленным гипофизом. При наивысшей дозе альбутропина концентрации IGF-1 были повышены свыше исходного уровня в течение 75 ч после однократного введения. Таким образом, повышенное время циркулирования однократной дозы GH-СТР приводило в результате к значительному фармакодинамическому улучшению по сравнению с однократной дозой соматотропного гормона, повышая возможность того, что GH-СТР может предложить подобное усиление роста и снижение жира тела с пониженной частотой дозирования по сравнению со стандартными режимами лечения соматотропным гормоном.

Однократные дозы hGH, модифицированного посредством СТР, в 90 мг/кг у макак-резус и 180 мг/кг у крыс хорошо переносились у обоих видов. Аллометрический фактор между крысами и приматами составляет приблизительно X₂, что основано на предполагаемом клиренсе белков у этих животных. В соответствии с принятыми индустрией экстраполяциями моделями для терапевтических целей полупериоды жизни белков повышаются среди видов (Руководство FDA). 90 мг/кг у приматов имеет немного лучший ФК профиль, чем 180 мг/кг hGH, модифицированного посредством СТР, у крысы. Таким образом, аллометрическая экстраполяция на людей поддерживает инъекцию раз в неделю или раз в две недели.

Настоящая методология, использующая конструкт СТР-GH, снизила частоту дозирования по сравнению с коммерческим продуктом - рекомбинантным соматотропным гормоном. Nutropin Depot® представляет собой состав соматотропного гормона с пролонгированным действием, утвержденный для использования в педиатрической популяции; однако сравнение с историческими контролями выявило, что 1- и 2-летние скорости роста значительно ($p < 0,001$) ниже у детей, принимавших Nutropin Depot® (1-летняя скорость роста $8,2 \pm 1,8$ см/год), чем у детей, получивших лечение соматотропным гормоном (однолетняя скорость роста $10,1 \pm 2,8$ см/год) (Silverman B.L., Blethen S.L., Reiter E.O., Attie K.M., Neuwirth R.B. and Ford K.M. A long-acting human growth hormone (Nutropin Depot®): efficacy and safety following two years of treatment in children with growth hormone. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 15 (2002), pp. 715-722). Местные эффекты от подкожного введения Nutropin Depot® включают узелки, эритему, боль в месте инъекции, головную боль и рвоту. Доклинические токсикологические исследования как на крысах, так и на обезьянах показали, что подкожное введение СТР-hGH-СТР-СТР не вызывает никаких местных реакций по сравнению с носителем. С учетом медицинской потребности в менее часто вводимой форме соматотропного гормона фармакологические свойства СТР-hGH-СТР-СТР в этом исследовании у крыс свидетельствуют о том, что данный продукт также благоприятен в отношении токсикологии и приверженности пациента. Продолжительная активность СТР-hGH-СТР-СТР у крысы свидетельствует о его потенциальной пользе в качестве средства, которое требует только прерывистого введения для получения терапевтической выгоды, которая в настоящее время достигается путем ежедневного дозирования.

Пример 9. Пролонгированная модифицированная посредством СТР версия соматотропного гормона человека (hGH-СТР) была высокоэффективной у взрослых, дефицитных по соматотропному гормону.

Клиническое исследование фазы II.

Было проведено рандомизированное открытое клиническое исследование фазы II для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики и фармакодинамических свойств hGH-СТР, инъекцируемого либо один раз в неделю, либо два раза в месяц у пациентов, которые в настоящее время получают ежедневные инъекции соматотропного гормона. Исследование было проведено в нескольких центрах в шести странах. Три основные когорты в исследовании получали однократную недельную дозу hGH-СТР, содержащую 30, 45 или 100% эквивалента кумулятивной дозы коммерческого hGH, которую взрослые пациенты, дефицитные по соматотропному гормону, получают в течение семидневного курса в форме ежедневных инъекций (называются соответственно как "30", "45" и "100%" когорты). Данные отражают результаты, полученные у 39 пациентов, по 13 в каждой когорте. В каждую когорту были включены по 2 женщины.

В дополнение к трем основным когортам взрослые, дефицитные по соматотропному гормону, были включены в экспериментальную четвертую когорту, которая проводилась вне формального исследования фазы II. Пациенты в экспериментальной четвертой когорте получают однократную инъекцию hGH-СТР один раз в две недели, содержащую 50% кумулятивной дозы того коммерческого препарата, который пациенты, дефицитные по соматотропному гормону, получают в двухнедельный период в форме ежедневных инъекций.

Эффективность для трех основных когорт, получавших однократную еженедельную инъекцию hGH-СТР, определяется путем измерения ежедневных уровней инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) в желательном терапевтическом диапазоне в период семи дней (в течение последней недели лечения в исследовании). Желательный терапевтический диапазон определен как находящийся в пределах от +2 стандартных отклонений вплоть до -2 стандартных отклонений от средних уровней IGF-1, рассчитанных в нормальной популяции, стратифицированной на группы по возрасту и полу. В дополнение клиническое исследование измеряло уровни IGF-1 в более узком диапазоне, составляющем $\pm 1,5$ стандартное отклонение, с целью наблюдения разброса у пациентов в пределах нормального диапазона.

Результаты.

Табл. 10 содержит средний процент дней в пределах нормального терапевтического диапазона (± 2 стандартных отклонения), средний процент дней в пределах более узкого нормального терапевтического диапазона ($\pm 1,5$ стандартное отклонение) и среднюю C_{\max} (наивысший уровень концентрации) IGF-1 для мужчин, измеренные в течение последней недели лечения, выраженные в стандартных отклонениях от средних значений уровней IGF-1 нормальной популяции.

Таблица 10

Результаты клинического исследования фазы II у человека

Когорта	% дней в пределах узкого нормального диапазона IGF-1 ($\pm 1,5$ стандартное отклонение)	% дней в пределах нормального диапазона IGF-1 (± 2 стандартных отклонения)	Средняя Cmax IGF-1 (предпочтительно, ниже $+2$ средних отклонений)
30%	57%	100%	-0,9
45%	100%	100%	0,1
100%	86%	100%	0,4

2 мг в неделю hGH-СТР, содержащего 50% кумулятивной недельной дозы hGH, которая обычно назначалась бы взрослому пациенту в качестве дозы стартовой терапии, имеет высокую вероятность быть определенной в качестве стартовой дозы для мужчин и женщин во взрослой фазе III.

Не существует данных, касающихся вопросов безопасности и/или переносимости, и никаких указаний на то, что hGH-СТР при использовании в высоких дозах вызывал чрезмерные уровни IGF-1 у пациентов или даже уровни, превышающие нормальный диапазон.

Хотя в настоящем описании были проиллюстрированы и описаны определенные характеристики изобретения, многие модификации, замены, изменения и эквиваленты сейчас станут очевидными обычному специалисту в данной области. Поэтому следует понимать, что прилагаемые пункты формулы изобретения предназначены охватить все подобные модификации и изменения как подпадающие под действие истинного характера изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения дефицита соматотропного гормона у взрослого человека путем поддержания уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в пределах нормального терапевтического диапазона, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного соматотропного гормона, где аминокислотная последовательность указанного модифицированного полипептида представлена SEQ ID NO: 11 и где указанный полипептид вводят в количестве 1,2-4 мг/в неделю.

2. Способ лечения дефицита соматотропного гормона у взрослого человека путем поддержания уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в пределах нормального терапевтического диапазона, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, и два СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного соматотропного гормона, где аминокислотная последовательность указанного модифицированного полипептида представлена аминокислотами 27-301 SEQ ID NO: 11 и где указанный полипептид вводят в количестве 1,2-4 мг/в неделю.

3. Способ по любому из пп.1 и 2, отличающийся тем, что указанный модифицированный полипептид вводят в количестве 1,2 мг один раз в неделю.

4. Способ по любому из пп.1 и 2, отличающийся тем, что указанный модифицированный полипептид вводят в количестве 1,8 мг один раз в неделю.

5. Способ по любому из пп.1 и 2, отличающийся тем, что указанный модифицированный полипептид вводят в количества 2 мг один раз в неделю.

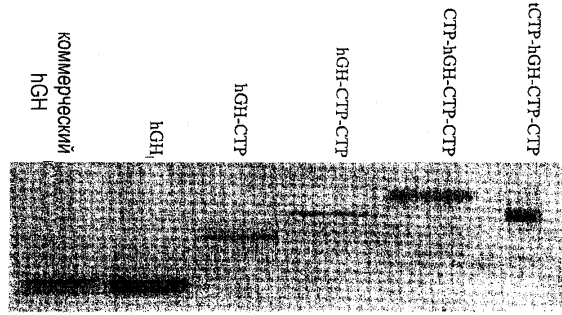
6. Способ по любому из пп.1 и 2, отличающийся тем, что указанный модифицированный полипептид вводят в количестве 4 мг один раз в неделю.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанный модифицированный полипептид вводят подкожно указанному субъекту.

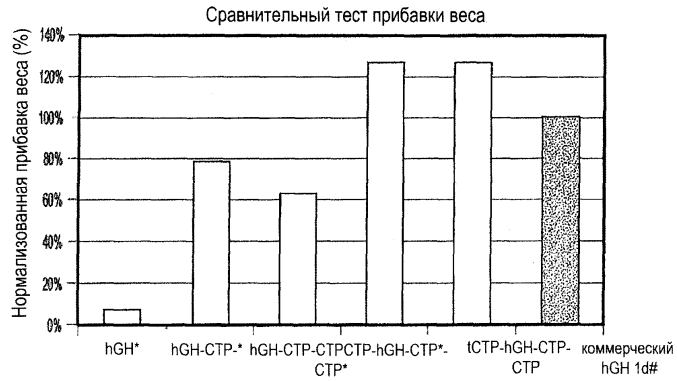
8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанный субъект является мужчиной.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что по меньшей мере один СТР гликозилирован.

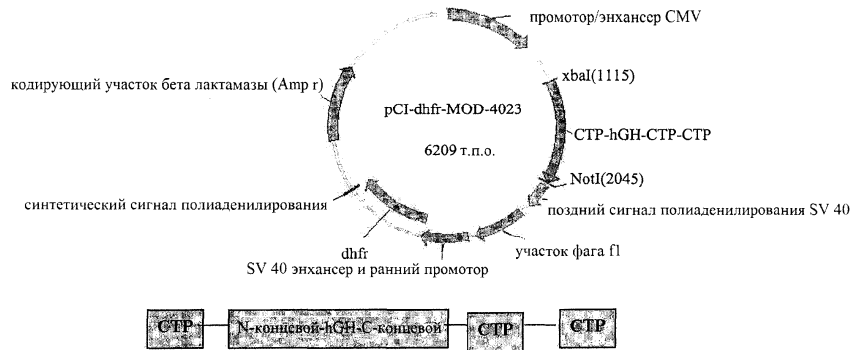
10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что указанный модифицированный полипептид кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 16.



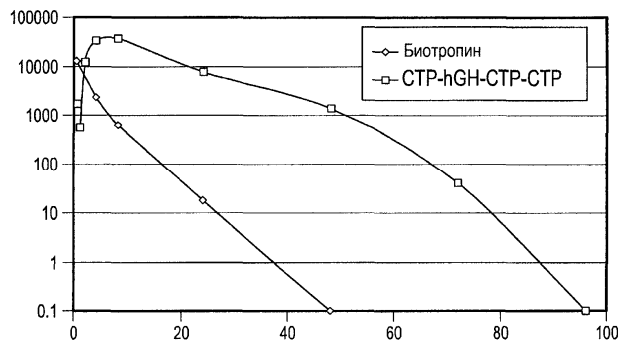
Фиг. 1



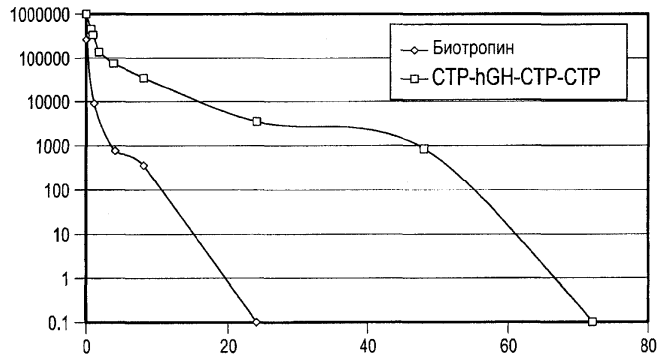
Фиг. 2



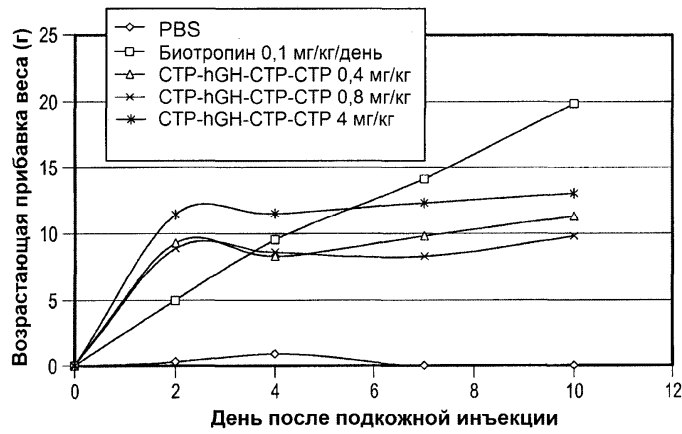
Фиг. 3



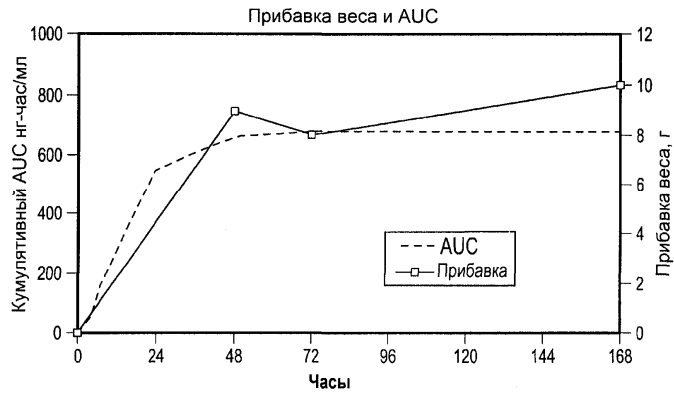
Фиг. 4А



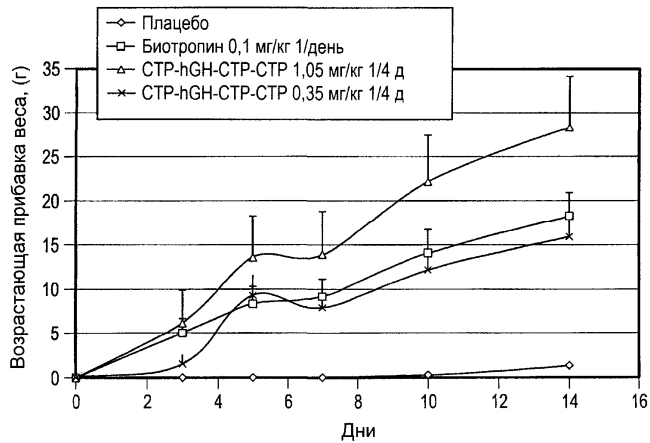
Фиг. 4В



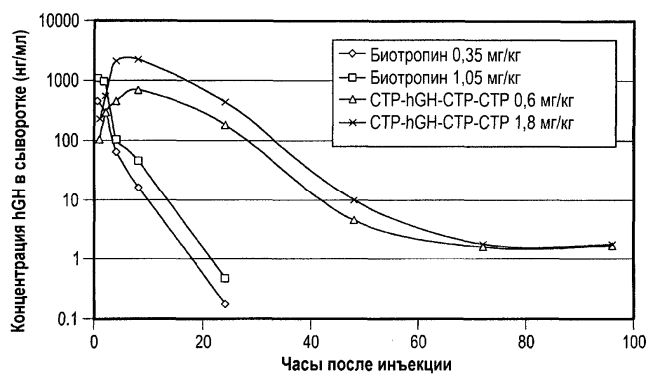
Фиг. 5



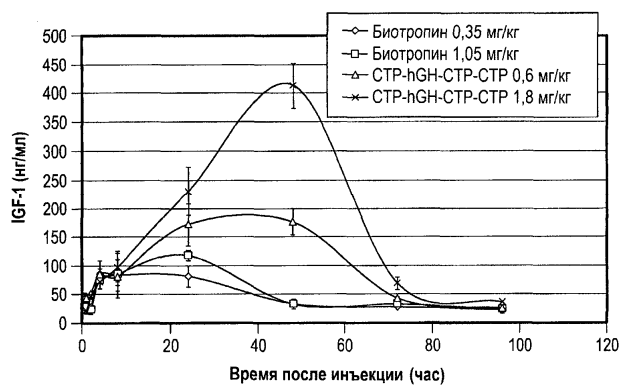
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

