

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090577** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.03.31

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

(22) Дата подачи заявки
2012.08.02

(54) **СОМАТОТРОПНЫЙ ГОРМОН ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ И СПОСОБЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) 13/195,931

(32) 2011.08.02

(33) US

(62) 201490393; 2012.08.02

(71) Заявитель:
ОПКО БАЙОЛОДЖИКС ЛТД (PL)

(72) Изобретатель:

Фарес Фуад, Фима Уди Эйял (PL)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрывается использование белка соматотропного гормона и полинуклеотидов, кодирующих его, что включает аминоконцевой и карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина и два карбоксиконцевых СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к соматотропному гормону, в способах стимулирования потери веса или снижения телесного жира, способах увеличения уровней инсулиноподобного ростового фактора (IGF-1) и способах снижения частоты приема соматотропного гормона у человека. Также раскрываются фармацевтические композиции, содержащие соматотропный гормон и полинуклеотиды, кодирующие соматотропный гормон изобретения, и способы их применения.

202090577

A2

A2

202090577

СОМАТОТРОПНЫЙ ГОРМОН ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ И СПОСОБЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 [001] Данная заявка претендует на приоритет относительно заявки Соединенных Штатов, серийный номер 13/195931, поданной 2 августа 2011 года, которая является частичным продолжением патентной заявки Соединенных Штатов, серийный номер 12/509188, поданной 24 июля 2009 года, которая является частичным продолжением патентной заявки Соединенных Штатов, серийный номер 12/476916, поданной 2 июня 10 2009 года, которая является частичным продолжением патентной заявки Соединенных Штатов, серийный номер 12/401746, поданной 11 марта 2009 года, которая является продолжением патентной заявки Соединенных Штатов, серийный номер 11/700911, поданной 1 февраля 2007 года, которая заявляет преимущества предварительной патентной заявки Соединенных Штатов, серийный номер 60/764761, поданной 3 февраля 15 2006 года. Все эти заявки настоящим документом полностью включены сюда посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[002] Раскрывается использование белка соматотропного гормона и полинуклеотидов, кодирующих его, которое включает аминоконцевой и карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина и два карбоксиконцевых СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к соматотропному гормону, в способах стимулирования потери веса или снижения телесного жира, способе увеличения уровней инсулиноподобного ростового фактора (IGF-1) и способах снижения частоты приема 20 соматотропного гормона у человека. Также раскрываются фармацевтические композиции, содержащие соматотропный гормон и полинуклеотиды, кодирующие соматотропный гормон, изобретения, и способы его применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

30 [003] Полипептиды чувствительны к денатурации или ферментной деградации в крови, печени или почке. Соответственно, полипептиды обычно имеют короткий полупериод жизни в кровообращении, составляющий несколько часов. Из-за своей низкой стабильности пептидные препараты обычно доставляются с постоянной частотой с тем, чтобы поддерживать эффективную концентрацию активного пептида в плазме. Помимо 35 этого, поскольку пептидные препараты обычно вводятся путем инфузии, частые инъекции

пептидных препаратов вызывают значительный дискомфорт у субъекта. Таким образом, существует потребность в технологиях, которые продлят полупериоды жизни терапевтических полипептидов, при этом сохраняя их высокую фармакологическую эффективность. Такие желаемые пептидные препараты также должны соответствовать

5 требованиям повышенной стабильности в сыворотке, высокой активности и низкой вероятности индукции нежелательного иммунного ответа при инъекировании субъекта.

[004] Нежелательные фармакокинетики, такие как короткий полупериод жизни в сыворотке, могут препятствовать фармацевтической разработке многих, в других обстоятельствах многообещающих, потенциальных лекарств. Полупериод жизни в

10 сыворотке представляет собой эмпирическую характеристику молекулы, и ее следует определять экспериментально для каждого нового потенциального лекарства. Например, в отношении полипептидных препаратов с более низким молекулярным весом, механизмы физиологического клиренса, такие как почечная фильтрация, могут сделать поддержание терапевтических уровней препарата неосуществимым из-за стоимости или частоты

15 необходимого режима дозирования. С другой стороны, длинный полупериод жизни в сыворотке нежелателен в тех случаях, когда препарат или его метаболиты имеют токсические побочные эффекты.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[005] В одном варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ стимуляции потери веса или снижения телесного жира у человека, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона, и два СТР

25 хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона, таким образом стимулируя потерю веса или убывание телесного жира у указанного субъекта.

[006] В другом варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ увеличения уровней инсулиноподобного ростового фактора (IGF-1) у человека, включающий введение субъекту 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 субъекта.

30

[007] В одном варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ поддержания уровней инсулиноподобного ростового фактора (IGF-1) в нормальном терапевтическом диапазоне у субъекта, способ, включающий введение субъекту 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 поддерживая IGF-I в нормальном терапевтическом диапазоне у субъекта.

10 [008] В другом варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ снижения частоты приема соматотропного гормона человеком, содержащий этап присоединения одного карбоксиконцевого пептида (СТР) хорионического гонадотропина к аминоконцу указанного соматотропного гормона, и двух СТР хорионического гонадотропина к карбоксильному концу соматотропного гормона, таким образом снижая частоту приема соматотропного гормона.

[009] В одном варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ стимулирования роста или прибавки веса у человека, включающий введение указанному субъекту 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, в котором субъект является ребенком или подростком, таким образом стимулируя рост или прибавку веса у указанного субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[010] 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). Были получены реплики геля после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (PAGE SDS гель) и окрашены с помощью моноклональных анти-hGH антител. Фотография демонстрирует, что, как и в случае с коммерческим hGH и hGH дикого типа, hGH-варианты, модифицированные СТР, распознаются антителами анти-hGH.

[011] ФИГ. 2 представляет собой столбчатую диаграмму, иллюстрирующую прибавку веса у крыс с удаленным гипофизом после введения полипептидов ГН-СТР (различные модификации) настоящего изобретения.

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

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

[014] ФИГ. 5 представляет собой графики, демонстрирующие среднюю возрастающую прибавку веса 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 ГН (0,1 мг/кг/день) (n=10 на дозу).

[015] ФИГ. 6 представляет собой график, демонстрирующий, что Площадь Под Кривой после однократной инъекции СТР-hGH-СТР-СТР коррелирует с прибавкой веса тела у крыс.

[016] ФИГ. 7 представляет собой график, демонстрирующий постепенно возрастающую прибавку веса 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 ГН (0,1 мг/кг/день) (n=10 на дозу).

[017] 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.

[018] 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).

[019] В одном варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет соматотропные гормоны пролонгированного действия и способы их получения и применения. В другом варианте воплощения изобретения соматотропные гормоны пролонгированного действия содержат карбоксиконцевой пептид (СТР, также упоминаемый как СТР-единица). В другом варианте воплощения изобретения полипептиды пролонгированного действия содержат карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина человека (hCG). В другом варианте воплощения изобретения СТР действует как протективный агент против деградации соматотропного гормона или искомым полипептидов. В другом варианте воплощения изобретения СТР увеличивает S_{max} соматотропных гормонов или искомым полипептидов. В другом варианте воплощения изобретения СТР увеличивает T_{max} соматотропных гормонов или искомым полипептидов. В другом варианте воплощения изобретения СТР увеличивает полупериоды жизни в кровообращении соматотропных гормонов или искомым полипептидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения СТР усиливает активность соматотропных гормонов или искомым полипептидов.

[020] В других вариантах воплощения 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 воплощения 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.

[021] В другом варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет полипептид, содержащий 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 воплощения настоящее изобретение предоставляет полипептид, содержащий один карбоксиконцевой пептид хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу соматотропного

гормона, и два карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона.

[022] В другом варианте воплощения изобретения термины “СТР пептид”, “карбоксиконцевой пептид” и “последовательность СТР” здесь применяются взаимозаменяемо. В другом варианте воплощения изобретения карбоксиконцевой пептид представляет собой первичный полноразмерный СТР. В другом варианте воплощения изобретения карбоксиконцевой пептид представляет собой процессированный СТР. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант воплощения настоящего изобретения.

[023] В другом варианте воплощения изобретения “сигнальная последовательность” и “сигнальный пептид” здесь используются взаимозаменяемо. В другом варианте воплощения изобретения “последовательность” в применении к полинуклеотиду может относиться к кодирующей области. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант воплощения настоящего изобретения.

[024] В другом варианте воплощения изобретение предоставляет полипептид, состоящий 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 воплощения изобретение предоставляет полипептид, состоящий 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.

[025] В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон, содержащий СТР, как описано здесь, имеет усиленную биологическую активность *in vivo* по сравнению с таким же соматотропным гормоном без СТР. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон, содержащий по меньшей мере один СТР, присоединенный к своему аминоконцу, и по меньшей мере два СТР, присоединенных к его карбоксильному концу, имеет усиленную биологическую активность *in vivo* по сравнению с таким же соматотропным гормоном без СТР. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон, содержащий один СТР, присоединенный к своему аминоконцу, и два СТР, присоединенных к своему карбоксильному концу, имеет

усиленную биологическую активность *in vivo* по сравнению с таким же соматотропным гормоном без СТР.

[026] В другом варианте воплощения изобретения субъект является человеком. В другом варианте воплощения изобретения субъект является домашним животным. В другом варианте воплощения изобретения субъект является млекопитающим. В другом варианте воплощения изобретения субъект является сельскохозяйственным животным. В другом варианте воплощения изобретения субъект является обезьяной. В другом варианте воплощения изобретения субъект является лошастью. В другом варианте воплощения изобретения субъект является коровой. В другом варианте воплощения изобретения субъект является мышью. В другом варианте воплощения изобретения субъект является крысой. В одном варианте воплощения изобретения субъект является мужчиной. В другом варианте воплощения изобретения субъект является женщиной.

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

[028] В другом варианте воплощения изобретения карбоксиконцевой пептид (СТР) присоединен к соматотропному гормону через линкер. В другом варианте воплощения изобретения линкер, который соединяет последовательность СТР с соматотропным гормоном, представляет собой ковалентную связь. В другом варианте воплощения изобретения линкер, который соединяет последовательность СТР с соматотропным гормоном, представляет собой пептидную связь. В другом варианте воплощения изобретения линкер, который соединяет последовательность СТР с соматотропным гормоном, представляет собой замещенную пептидную связь. В другом варианте воплощения изобретения последовательность карбоксиконцевого пептида (СТР) содержит аминокислотную последовательность, отобранную из последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

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

[030] В другом варианте воплощения изобретения последовательность карбоксиконцевого пептида (СТР) является процессированной. В другом варианте воплощения изобретения процессированный СТР содержит следующую аминокислотную последовательность: SSSSKAPPPSLP (SEQ ID NO: 4).

[031] В другом варианте воплощения изобретения карбоксиконцевой пептид (СТР) настоящего изобретения содержит аминокислотную последовательность от аминокислоты 112 до положения 145 пептида нативного хорионического гонадотропина человека. В другом варианте воплощения изобретения последовательность СТР настоящего изобретения содержит аминокислотную последовательность от аминокислоты 118 до положения 145 пептида нативного хорионического гонадотропина человека. В другом варианте воплощения 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 воплощения изобретения пептид последовательности СТР имеет длину в 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.

[032] В другом варианте воплощения изобретения пептид СТР представляет собой пептид СТР, как это описано в Патенте США №, который включен в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. В другом варианте воплощения изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР замещениями 1-5 консервативных аминокислот, как это описано в Патенте США No. 5712122, который включен в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки. В другом варианте воплощения изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР замещением 1 консервативной аминокислоты. В другом варианте воплощения изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР замещениями 2 консервативных аминокислот. В другом варианте воплощения изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР замещениями 3 консервативных аминокислот. В другом варианте воплощения

изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР замещениями 4 консервативных аминокислот. В другом варианте воплощения изобретения пептид СТР представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР замещениями 5 консервативных аминокислот. В другом варианте воплощения изобретения аминокислотная последовательность пептида СТР настоящего изобретения по меньшей мере на 70% гомологична аминокислотной последовательности нативного СТР или его пептиду. В другом варианте воплощения изобретения аминокислотная последовательность пептида СТР настоящего изобретения по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности нативного СТР или его пептиду. В другом варианте воплощения изобретения аминокислотная последовательность пептида СТР настоящего изобретения по меньшей мере на 90% гомологична аминокислотной последовательности нативного СТР или его пептиду. В другом варианте воплощения изобретения аминокислотная последовательность пептида СТР настоящего изобретения по меньшей мере на 95% гомологична аминокислотной последовательности нативного СТР или его пептиду.

[033] В другом варианте воплощения изобретения ДНК последовательность пептида СТР настоящего изобретения по меньшей мере на 70% гомологична ДНК последовательности нативного СТР человека или его пептиду. В другом варианте воплощения изобретения ДНК последовательность пептида СТР настоящего изобретения по меньшей мере на 80% гомологична ДНК последовательности нативного СТР человека или его пептиду. В другом варианте воплощения изобретения ДНК последовательность пептида СТР настоящего изобретения по меньшей мере на 90% гомологична ДНК последовательности нативного СТР человека или его пептиду. В другом варианте воплощения изобретения ДНК последовательность пептида СТР настоящего изобретения по меньшей мере на 95% гомологична ДНК последовательности нативного СТР человека или его пептиду.

[034] В одном варианте воплощения изобретения процессированный СТР содержит первые 11 аминокислот SEQ ID NO: 4. В одном варианте воплощения изобретения процессированный СТР содержит первые 8 аминокислот SEQ ID NO: 4. В одном варианте воплощения изобретения процессированный СТР содержит первые 13 аминокислот SEQ ID NO: 4. В одном варианте воплощения изобретения процессированный СТР содержит первые 6 аминокислот SEQ ID NO: 4. В одном варианте воплощения изобретения процессированный СТР содержит первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 4.

[035] В одном варианте воплощения изобретения по меньшей мере одна из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина

гликозилирована. В другом варианте воплощения изобретения обе аминокислотные последовательности СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте воплощения изобретения 2 аминокислотные последовательности СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте воплощения изобретения 2 или более аминокислотные последовательности СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В другом варианте воплощения изобретения все аминокислотные последовательности СТР хорионического гонадотропина гликозилированы. В одном варианте воплощения изобретения последовательность СТР настоящего изобретения содержит по меньшей мере один участок гликозилирования. В одном варианте воплощения изобретения последовательность СТР настоящего изобретения содержит 2 участка гликозилирования. В одном варианте воплощения изобретения последовательность СТР настоящего изобретения содержит 3 участка гликозилирования. В одном варианте воплощения изобретения последовательность СТР настоящего изобретения содержит 4 участка гликозилирования.

[036] В другом варианте воплощения изобретения по меньшей мере одна последовательность карбоксиконцевого пептида (СТР) содержит аминокислотную последовательность, отобранную из последовательностей, изложенных в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2. В другом варианте воплощения изобретения по меньшей мере один карбоксиконцевой пептид (СТР) процессированный.

[037] В одном варианте воплощения изобретения термины “концы”, “концевой”, “терминальный конец” и “конец” в применении к карбоксильному концу или аминоконцу белка или пептида, или их фрагмента, приводимого здесь, используются здесь взаимозаменяемо. В другом варианте воплощения изобретения термины “С-концевой”, “карбоксиконцевой” или “карбоксильный конец” используются здесь взаимозаменяемо. В другом варианте воплощения изобретения термины “N-концевой” и “аминоконцевой” используются здесь взаимозаменяемо. Каждый вариант представляет собой отдельный вариант воплощения настоящего изобретения.

[038] В другом варианте воплощения изобретения последовательности СТР как на аминотерминальном конце соматотропного гормона, так и на карбокситерминальном конце соматотропного гормона предоставляют усиленную защиту от деградации соматотропного гормона. В другом варианте воплощения изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминотерминальном конце соматотропного гормона и две единицы СТР на карбокситерминальном конце соматотропного гормона предоставляют усиленную защиту от клиренса. В другом варианте воплощения изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминотерминальном

конец соматотропного гормона и две единицы СТР на карбокситерминальном конце соматотропного гормона предоставляют продление времени клиренса. В другом варианте воплощения изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминотерминальном конце соматотропного гормона и две единицы СТР на карбокситерминальном конце соматотропного гормона увеличивают C_{\max} соматотропного гормона. В другом варианте воплощения изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминотерминальном конце соматотропного гормона и две единицы СТР на карбокситерминальном конце соматотропного гормона увеличивают T_{\max} соматотропного гормона. В другом варианте воплощения изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминотерминальном конце соматотропного гормона и две единицы СТР на карбокситерминальном конце соматотропного гормона увеличивают $T_{1/2}$ (полупериод жизни) соматотропного гормона.

[039] В другом варианте воплощения изобретения последовательности СТР на обоих концах - аминотерминальном конце соматотропного гормона и карбокситерминальном конце соматотропного гормона - продлевают полупериод жизни модифицированного соматотропного гормона. В другом варианте воплощения изобретения по меньшей мере одна последовательность СТР на аминотерминальном конце соматотропного гормона и по меньшей мере две последовательности СТР на карбокситерминальном конце соматотропного гормона предоставляют продленный полупериод жизни модифицированному соматотропному гормону. В другом варианте воплощения изобретения одна последовательность СТР на аминотерминальном конце соматотропного гормона и две последовательности СТР на карбокситерминальном конце соматотропного гормона предоставляют продленный полупериод жизни присоединенному соматотропному гормону. В другом варианте воплощения изобретения одна последовательность СТР на аминотерминальном конце соматотропного гормона и две последовательности СТР, расположенные последовательно на карбокситерминальном конце соматотропного гормона, предоставляют продленный полупериод жизни модифицированному соматотропному гормону.

[040] В другом варианте воплощения изобретения последовательность СТР на аминотерминальном конце полипептида, последовательность СТР на карбокситерминальном конце соматотропного гормона и по меньшей мере одна дополнительная последовательность СТР, присоединенная последовательно к последовательности СТР на карбоксильном конце, предоставляют усиленную защиту от деградации соматотропному гормону. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность СТР на аминотерминальном конце соматотропного гормона,

последовательность СТР на карбокситерминальном конце 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 воплощения изобретения последовательность СТР на аминотерминальном конце соматотропного гормона, последовательность СТР на карбокситерминальном конце соматотропного гормона и по меньшей мере одна дополнительная последовательность СТР, присоединенная последовательно к последовательности СТР на карбоксильном конце, усиливают биологическую активность соматотропного гормона.

5 [041] В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах воплощения изобретения сигнальные последовательности включают, но не ограничиваются этим, эндогенную сигнальную последовательность. В некоторых вариантах воплощения изобретения сигнальные последовательности включают, но не ограничиваются этим, эндогенную сигнальную последовательность любого известного соматотропного гормона или соматотропных гормонов. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды и способы настоящего изобретения предоставляют соматотропный гормон, имеющий дополнительно сигнальный пептид, содержащий следующую аминокислотную последовательность: MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA (SEQ ID NO: 3).

15 [042] В другом варианте воплощения изобретения конъюгированные соматотропные гормоны данного изобретения используются тем же методом, что и немодифицированные соматотропные гормоны. В другом варианте воплощения изобретения конъюгированные соматотропные гормоны данного изобретения имеют повышенный полупериод жизни в кровотоке и время пребывания в плазме, сниженный клиренс и повышенную клиническую активность *in vivo*. В другом варианте воплощения изобретения, благодаря улучшенным свойствам конъюгированных соматотропных гормонов, описываемых здесь, эти конъюгаты вводятся менее часто по сравнению с немодифицированными соматотропными гормонами. В другом варианте воплощения изобретения конъюгированные соматотропные гормоны, описываемые здесь, вводятся с частотой от одного раза в одну неделю до одного раза в две недели. В другом варианте воплощения изобретения конъюгированные соматотропные гормоны, описываемые здесь, вводятся с частотой от одного раза каждые две недели до одного раза каждые три недели. В другом варианте воплощения изобретения конъюгированные соматотропные гормоны, описываемые здесь, вводятся с частотой от одного раза в день до трех раз в неделю. В другом варианте воплощения 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 воплощения 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 данного изобретения, имеют улучшенную активность, улучшенную стабильность, повышенные уровни АUC, повышенный полупериод жизни в кровообращении. В другом варианте воплощения изобретения, по сравнению с традиционными конъюгатами соматотропных гормонов, связанными с поли(этиленгликолем), было выявлено, что соматотропные гормоны, имеющие молекулярный вес и структуру линкера конъюгатов данного изобретения, имеют улучшенную активность, улучшенную стабильность, повышенные уровни АUC, повышенный полупериод жизни в кровообращении. В другом варианте воплощения изобретения терапевтически эффективным количеством конъюгированного соматотропного гормона является количество конъюгата, необходимое для ожидаемой биологической активности, измеряемой *in vivo*. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон, используемый согласно идеям настоящего изобретения, проявляет повышенную активность. В другом варианте воплощения изобретения присоединение последовательности СТР как к аминоконцу, так и к карбоксильному концу соматотропного гормона приводит в результате к продленной активности *in vivo*.

[043] В другом варианте воплощения 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 воплощения 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 воплощения 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 воплощения изобретения рецептура фармацевтической композиции, содержащей конъюгированный соматотропный гормон, разрабатывается с активностью, эффективной для введения различными способами пациенту-человеку.

[044] В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон является любым соматотропным гормоном, известным специалисту в области техники. В другом

варианте воплощения изобретения соматотропный гормон представляет собой соматотропный гормон человека. В другом варианте воплощения изобретения нуклеотидная последовательность и/или аминокислотная последовательность соматотропного гормона доступна в базе данных генного банка. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон является гомологом. В другом варианте воплощения изобретения гомолог также относится к варианту делеции, вставки или замещения, включая замещение его аминокислот и его фрагментов биологически активного полипептида.

[045] В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон представляет собой вариант hGH с отсутствующими экзонами 2, 3, 4 или любая комбинация такового. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон содержит сигнальный пептид. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон содержит сигнальный участок рестрикции. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, содержащие GH, модифицированный СТР настоящего изобретения, содержат рекомбинантный GH.

[046] В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон, описываемый здесь, является членом суперсемейства цитокинов, подобных соматотропному гормону (GH). В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон, описываемый здесь, представляет собой соматотропный гормон человека (hGH). В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон человека содержит следующую аминокислотную последовательность (Genbank, номер доступа P01241):

MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEE
 AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRS
 VFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDD
 ALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 5). В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон человека содержит следующую аминокислотную последовательность:

MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPT
 PSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGI
 QTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRI
 VQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 6). В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон человека содержит следующую аминокислотную последовательность: MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLA (SEQ ID NO: 7). В другом варианте воплощения изобретения hGH содержит следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEE
AYIPKVQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRS
VFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDD
ALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 8). В другом

5 варианте воплощения изобретения hGH представляет собой вариант замещения, в котором глутамин в положении 65 в hGH замещен валином.

[047] В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа AAA72260. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа ААК69708. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа САА01435. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа САА01329. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа САА00380. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа ААА72555. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NP_000506.2. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NP_072053.1. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NP_072054.1. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NP_072055.1. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения содержит аминокислотную последовательность, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NP_072056.1.

[048] В другом варианте воплощения изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, описываемый здесь, кодирует любую аминокислотную последовательность соматотропного гормона, известную специалисту в данной области техники. В другом варианте воплощения изобретения молекула

нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, описываемый здесь, кодирует hGH. В другом варианте воплощения изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NM_000515.3. В другом варианте воплощения изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NM_022559.2. В другом варианте воплощения изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NM_022560.2. В другом варианте воплощения изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NM_022561.2. В другом варианте воплощения изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая соматотропный гормон, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, хранящуюся в геномном банке под номером доступа NM_022562.2.

[049] В другом варианте воплощения изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон изобретения, содержит один СТР, присоединенный к карбоксильному концу соматотропного гормона (hGH-СТР) и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEE
 AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRS
 VFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDD
 ALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTP
 ILPQ (SEQ ID NO: 9).

[050] В другом варианте воплощения изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон изобретения, содержит два СТР, последовательно присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона (hGH-СТР-СТР) и имеющих следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEE
 AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRS
 VFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDD
 ALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTP
 ILPQSSSSKAPPPSLSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 10).

[051] В другом варианте воплощения изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон изобретения, 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:
 MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRL
 FDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQ
 KSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLE
 DGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGS
 CGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID
 NO: 11).

[052] В другом варианте воплощения изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон изобретения, содержит два СТР, последовательно присоединенных к карбоксильному концу соматотропного гормона, в котором один СТР из двух СТР процессирован, и один дополнительный СТР, присоединенный к аминоконцу соматотропного гормона (tСТР-hGH-СТР-СТР) и имеющий следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQL
 AFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSW
 LEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSK
 FDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPS
 PSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 12).

[053] В другом варианте воплощения изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон изобретения, 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:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRL
 FDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQ
 KSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLE
 DGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGS
 CGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 13).

[054] В другом варианте воплощения изобретения полипептид, содержащий соматотропный гормон и один СТР, содержит следующую аминокислотную последовательность:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRL
 FDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQ

KSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLE
DGSVRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGS
CGF (SEQ ID NO: 14).

[055] В другом варианте воплощения изобретения молекула полинуклеотида, кодирующего полипептид, имеющий СТР-hGH-СТР, содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccatggctgcaggagggcagcgcca
gctcttcttaaggctccacccccatctctgcccagccccagcagactgccgggccccagcgacacaccattctgccccagttcccccac
catccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggtcacaggctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgagga
agcctacatccccaaggagcagaagtacagcttctgcagaacccccagacctcctgtgcttcagcgagagcatccccacccccagcaa
cagagaggagaccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatctccctgctgctgatccagagctggctggagcccgtgcagttcc
tgagaagcgtgttcgcaacagcctggtgtacggcgccagcgacagcaacgtgtacgacctgctgaaggacctggaggagggcatcca
gacctgatgggcccggctggaggacggcagccccaggaccggccagatctcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagcca
caacgacgacgccctgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaaggacatggacaaggtggagaccttctgaggatcgtgca
gtgcagaagcgtggagggcagctgcggttcagctccagcagcaaggccccctccccgagcctgccctccccaaagcaggctgcctggg
ccctccgacacaccaatcctgcctcagtgatgaaggctggtgatgcgccgc (SEQ ID NO: 15).

[056] В другом варианте воплощения изобретения молекула полинуклеотида, кодирующего полипептид, имеющий СТР-hGH-СТР-СТР, содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccatggctgcaggagggcagcgcca
gctcttcttaaggctccacccccatctctgcccagccccagcagactgccgggccccagcgacacaccattctgccccagttcccccac
catccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggtcacaggctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgagga
agcctacatccccaaggagcagaagtacagcttctgcagaacccccagacctcctgtgcttcagcgagagcatccccacccccagcaa
cagagaggagaccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatctccctgctgctgatccagagctggctggagcccgtgcagttcc
tgagaagcgtgttcgcaacagcctggtgtacggcgccagcgacagcaacgtgtacgacctgctgaaggacctggaggagggcatcca
gacctgatgggcccggctggaggacggcagccccaggaccggccagatctcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagcca
caacgacgacgccctgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaaggacatggacaaggtggagaccttctgaggatcgtgca
gtgcagaagcgtggagggcagctgcggttcagctccagcagcaaggccccctccccgagcctgccctccccaaagcaggctgcctggg
ccctccgacacaccaatcctgccacagcagctccttaaggccccctcctccatccctgccatccccctccggctgctggccccctctg
acaccctatcctgcctcagtgatgaaggctggtgatgcgccgc (SEQ ID NO: 16).

[057] В другом варианте воплощения изобретения молекула полинуклеотида, кодирующего полипептид, имеющий СТР-hGH-СТР-СТР, содержит следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccatggctgcaggagggcagcgcca
gctcttcttaaggctccacccccagcctgccctccccaccatccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggtcacag

gctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgaggaagcctacatccccaaggagcagaagtacagcttctgcagaaccccca
gacctccctgtgcttcagcgagagcatccccacccccagcaacagagaggagaccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatc
tcctgctgctgatccagagctggctggagcccgtgcagttcctgagaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgacagc
aacgtgtacgacctgctgaaggacctggaggagggcatccagaccctgatgggccggctggaggacggcagccccaggaccggcca
gatcttcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagccacaacgacgacgcctgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcag
aaaggacatggacaaggtggagaccttctgaggatcgtgcagtcagagaagcgtggagggcagctgcggcttcagctccagcagcaag
gccccccccgagcctgccctccccaaagcaggctgcctgggccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctcctctaaggcccc
tcctccatccctgccatccccctcccggctgcctggccccctctgacaccctatcctgcctcagtgatgaaggtctggatgcggccgc
(SEQ ID NO: 17).

[058] В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения гомологичен известной последовательности соматотропного гормона. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон изобретения гомологичен последовательности соматотропного гормона, как раскрывается здесь. В некоторых вариантах воплощения изобретения гомология, в соответствии с настоящим изобретением, также охватывает варианты делеции, вставки или замещения, включая замещение их аминокислот и фрагментов биологически активного полипептида таковых. В одном варианте воплощения изобретения вариант замещения является таковым, в котором глутамин в положении 65 hGH замещен валином [Gellerfors et al., J Pharm Biomed Anal 1989, 7:173-83].

[059] В одном варианте воплощения 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).

[060] В одном варианте воплощения 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 варианте воплощения изобретения hGH настоящего изобретения также относится к гомологам. В одном варианте воплощения изобретения аминокислотная последовательность hGH настоящего изобретения 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 варианте воплощения изобретения аминокислотная последовательность hGH настоящего изобретения 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 варианте воплощения изобретения аминокислотная последовательность hGH настоящего изобретения по меньшей мере на 70% гомологична последовательности hGH, представленной в Genbank под номером доступа P01241, как

5 определяется путем использования программного обеспечения BlastP Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI), используя параметры по умолчанию. В одном варианте воплощения изобретения аминокислотная последовательность hGH настоящего изобретения по меньшей мере на 80% гомологична последовательности hGH,

10 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 варианте воплощения изобретения аминокислотная последовательность hGH настоящего изобретения по меньшей мере на 90% гомологична последовательности hGH,

15 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 варианте воплощения изобретения аминокислотная последовательность hGH настоящего изобретения по меньшей мере на 95% гомологична последовательности hGH,

20 представленной в Genbank под номером доступа P01241, как определяется путем использования программного обеспечения BlastP Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI), используя параметры по умолчанию.

[061] В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, связывают адипоциты и стимулируют их к

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

30 [062] В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют рост организма путем стимулирования ткани печени и других тканей к выделению IGF-I. В другом варианте воплощения изобретения IGF-I стимулирует пролиферацию хондроцитов, приводящую в результате к росту костей. В другом варианте воплощения изобретения IGF-I

стимулирует пролиферацию клеток скелетной мускулатуры, что в результате приводит к росту мышц.

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

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

[065] В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют жировой метаболизм. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют расходование жира путем стимулирования распада триглицерида и окисления в адипоците. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, сокращают жир в организме.

[066] В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют углеводный метаболизм. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, поддерживают глюкозу в крови в нормальном диапазоне. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, включают антиинсулиновую активность. В другом варианте воплощения 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

воплощения изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, стимулируют секрецию инсулина, приводящую к гиперинсулинемии.

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

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

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

[070] В другом варианте воплощения 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 воплощения изобретения лечение посредством форм GH, модифицированных СТР, приводит в

результате к усилению этих эффектов у детей и взрослых. В другом варианте воплощения 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 воплощения 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 воплощения 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 воплощения 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.

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

[072] В другом варианте воплощения изобретения способы настоящего изобретения предоставляют полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, для стимулирования мышечного роста, повышения сердечной функции, стимулирования костного роста, поддержания целостности мышц, уравнивания мышечного метаболизма, стимулирования наращивания мышц, стимулирования наращивания мышц *de novo*, усиления костной нагрузки, лечения симптомов, ассоциированных с остеопорозом, лечения вастинг-болезни, усиления липолиза, улучшения жидкостного баланса, лечения остеопороза, улучшения легочной функции, усиления иммунитета,

повторного наращивания витального органа, увеличения ощущения благополучия, восстановления «быстрого» сна или любой комбинации такового. В другом варианте воплощения изобретения способы настоящего изобретения предоставляют полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, для стимулирования мышечного роста, повышения сердечной функции, стимулирования костного роста, поддержания целостности мышц, уравнивания мышечного метаболизма, стимулирования наращивания мышц, стимулирования наращивания мышц de novo, усиления костной нагрузки, лечения симптомов, ассоциированных с остеопорозом, лечения вастинг-болезни, усиления липолиза, улучшения жидкостного баланса, лечения остеопороза, улучшения легочной функции, усиления иммунитета, повторного наращивания витального органа, увеличения ощущения благополучия, восстановления «быстрого» сна или любой комбинации такового.

[073] В другом варианте воплощения изобретения способы настоящего изобретения 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 воплощения изобретения способы настоящего изобретения предоставляют полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР, для лечения вастинг-болезни, СПИДа, кахексии или hGH-дефицита.

[074] В некотором варианте воплощения изобретения полипептиды соматотропного гормона человека настоящего изобретения могут быть использованы для лечения субъекта, пораженного состояниями, связанными с ростом и весом, такими как расстройство дефицита роста, вастинг-болезнь при СПИДе, старение, нарушенная функция иммунитета субъектов, 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.

[075] В другом варианте воплощения изобретения полипептиды соматотропного гормона человека настоящего изобретения могут быть использованы для лечения субъекта с множественным склерозом. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды

соматотропного гормона человека настоящего изобретения могут быть использованы для усиления потери веса у субъектов с ожирением. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды соматотропного гормона человека настоящего изобретения могут быть использованы для снижения жира тела у пациентов с ожирением. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды соматотропного гормона человека настоящего изобретения могут быть использованы для повышения безжировой массы тела у субъекта. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды соматотропного гормона человека настоящего изобретения могут быть использованы для лечения субъекта, страдающего сердечной недостаточностью, язвенным колитом и ожогами. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды соматотропного гормона человека настоящего изобретения могут быть использованы для наращивания мышечной массы.

[076] В другом варианте воплощения изобретения способы настоящего изобретения предоставляют последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок соматотропного гормона, как описывается здесь. В другом варианте воплощения изобретения способы настоящего изобретения предоставляют последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, содержащий hGH, модифицированный СТР, для стимулирования мышечного роста, повышения сердечной функции, стимулирования костного роста, поддержания целостности мышц, уравнивания мышечного метаболизма, стимулирования наращивания мышц, стимулирования наращивания мышц *de novo*, усиления костной нагрузки, лечения симптомов, ассоциированных 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.

[077] В некоторых вариантах воплощения изобретения соматотропный гормон человека (hGH) используется в соответствии с идеями настоящего изобретения. В некоторых вариантах воплощения изобретения присоединение последовательности СТР как к аминоконцу, так и к карбоксильному концу белка hGH приводит в результате к повышенной активности (Фигура 2). В некоторых вариантах воплощения изобретения присоединение последовательности СТР как к аминоконцу, так и к карбоксильному концу белка hGH приводит в результате к продлению активности *in vivo*.

[078] В некоторых вариантах воплощения изобретения "полипептид" или "белок", как это используется здесь, 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 воплощения изобретения, модификации, делающие полипептиды даже более стабильными в организме или более способными к проникновению в клетки.

[079] В некоторых вариантах воплощения 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 приготовления пептидомиметических соединений хорошо известны в данной области техники 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 посредством ссылки, как если бы полностью изложена здесь. Дальнейшие детали в этом отношении приводятся здесь ниже.

[080] В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептидные связи (-CO-NH-) в полипептиде замещены. В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептидные связи замещены N-метилированными связями ($\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$). В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептидные связи замещены сложнэфирными связями ($\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$). В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептидные связи замещены кетометиленовыми связями ($\text{-CO-CH}_2\text{-}$). В некоторых вариантах воплощения 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 воплощения изобретения полипептидные связи замещены гидроксметиленовыми связями ($\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$). В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептидные связи замещены тиоамидными связями (-CS-NH-). В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептидные связи замещены олефиновыми двойными связями (-CH=CH-). В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептидные связи замещены ретроамидными связями (-NH-CO-). В некоторых вариантах воплощения 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 воплощения 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.

[081] В некоторых вариантах воплощения изобретения природные ароматические аминокислоты полипептида, такие как Trp, Tyr 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 воплощения изобретения полипептиды настоящего изобретения включают одну или более модифицированных аминокислот или один или более мономеров, не относящихся к аминокислотам (например, жирная кислота, сложные углеводы и т.п.).

[082] В одном варианте воплощения изобретения "аминокислота" или "аминокислота", как подразумевается, включает 20 встречающихся в природе 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 варианте воплощения изобретения "аминокислота" включает как D-, так и L-аминокислоту.

[083] В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептиды настоящего изобретения используются в терапевтических средствах, которые требуют, чтобы полипептиды были в растворимой форме. В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептиды настоящего изобретения включают одну или более неприродных или природных полярных аминокислот, включая, но не ограничиваясь этим, серин и треонин, которые способны увеличивать растворимость полипептидов благодаря их гидроксил-содержащей боковой цепи.

[084] В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептиды, содержащие hGH, модифицированный посредством СТР настоящего изобретения, используются в линейной форме, хотя специалисту в данной области техники 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.

[085] В некоторых вариантах воплощения изобретения hGH, модифицированный посредством СТР настоящего изобретения, биохимически синтезируются, например, путем использования стандартных твердофазных методик. В некоторых вариантах воплощения изобретения эти биохимические способы включают эксклюзивный твердофазный синтез, частичный твердофазный синтез, конденсацию фрагментов или классическое решение синтеза. В некоторых вариантах воплощения 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.

[086] В некоторых вариантах воплощения изобретения методики твердофазного синтеза hGH, модифицированного посредством СТР, хорошо известны специалисту в данной области техники и дополнительно описываются John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, *Solid Phase Polypeptide Syntheses* (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984). В некоторых вариантах воплощения 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 техники.

[087] В некоторых вариантах воплощения изобретения используются рекомбинантные белковые методики для создания hGH, модифицированного посредством СТР настоящего изобретения. В некоторых вариантах воплощения изобретения рекомбинантные белковые методики используются для создания относительно длинных полипептидов (например, длиннее чем 18-25 аминокислот). В некоторых вариантах воплощения изобретения рекомбинантные белковые методики используются для создания больших количеств hGH, модифицированного посредством СТР настоящего изобретения. В некоторых вариантах воплощения 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.

[088] В другом варианте воплощения изобретения hGH, модифицированные посредством СТР настоящего изобретения, синтезируются с использованием полинуклеотида, кодирующего полипептид настоящего изобретения. В другом варианте воплощения изобретения полинуклеотид, кодирующий hGH, модифицированный посредством СТР настоящего изобретения, лигирован в экспрессионный вектор, содержащий транскрипционный контроль цис-регуляторной последовательности (например, промоторной последовательности). В другом варианте воплощения изобретения цис-регуляторная последовательность применима для направления конститутивной экспрессии соматотропных гормонов настоящего изобретения. В другом варианте воплощения изобретения цис-регуляторная последовательность применима для

направления тканеспецифической экспрессии hGH, модифицированного посредством СТР настоящего изобретения. В другом варианте воплощения изобретения цис-регуляторная последовательность применима для направления индуцибельной экспрессии hGH, модифицированного посредством СТР настоящего изобретения.

5 [089] В другом варианте воплощения изобретения тканеспецифические промоторы, пригодные для использования с настоящим изобретением, 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], лимфоид-
10 специфические 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* 33:729-740], нейрон-специфические промоторы, например, промотор нейрофиламентов [Byrne et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477], промоторы, специфические для поджелудочной железы [Edlunch
15 et al. (1985) *Science* 230:912-916], или промоторы, специфические для молочной железы, например, промотор молочной сыворотки (U.S. Pat. No. 4873316 и European Application Publication No. 264166). Индуцибельные промоторы, пригодные для использования в настоящем изобретении, включают, например, тетрациклин-индуцибельный промотор (Strour, M.A., et al., 2003. *Thromb. Haemost.* 90: 398-405).

20 [090] В одном варианте воплощения 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
25 (например, комбинация вышеуказанных).

[091] В одном варианте воплощения 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 варианте воплощения
30 изобретения последовательность может быть впоследствии амплифицирована *in vivo* или *in vitro* с использованием ДНК-полимеразы.

[092] В одном варианте воплощения изобретения "геномная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, происходящей (изолированной) из хромосомы, и, таким образом, она представляет собой непрерывную часть хромосомы.

[093] В одном варианте воплощения изобретения "многокомпонентная полинуклеотидная последовательность" относится к последовательности, которая, по меньшей мере частично, комплементарна и, по меньшей мере частично, является геномной. В одном варианте воплощения изобретения многокомпонентная последовательность может включать некоторые экзонные последовательности, 5 необходимые для кодирования полипептида настоящего изобретения, наряду с некоторыми вклинивающимися интронными последовательностями. В одном варианте воплощения изобретения интронные последовательности могут быть из любого источника, включая другие гены, и, в основном, будут включать консервативные сплайсинговые сигнальные последовательности. В одном варианте воплощения 10 изобретения интронные последовательности включают цис-действующие регуляторные элементы экспрессии.

[094] В другом варианте воплощения изобретения полинуклеотиды настоящего изобретения получают с использованием методик ПЦР, как описано в Примере 1, или 15 любым другим способом, известным специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах воплощения изобретения методика включает лигирование двух различных ДНК последовательностей (см., например, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

[095] В одном варианте воплощения изобретения полинуклеотиды настоящего изобретения вставлены в экспрессионные векторы (т.е. в конструкт нуклеиновой кислоты) 20 для обеспечения возможности экспрессии рекомбинантного полипептида. В одном варианте воплощения изобретения экспрессионный вектор настоящего изобретения включает дополнительные последовательности, которые делают этот вектор подходящим для репликации и интегрирования в прокариоты. В одном варианте воплощения изобретения экспрессионный вектор настоящего изобретения включает дополнительные 25 последовательности, которые делают этот вектор подходящим для репликации и интегрирования в эукариоты. В одном варианте воплощения изобретения экспрессионный вектор настоящего изобретения включает шаттл-вектор, который делает этот вектор подходящим для репликации и интегрирования как в прокариоты, так и в эукариоты. В 30 другом варианте воплощения изобретения клонирующие векторы содержат последовательности для инициации транскрипции и трансляции (например, промоторы, энхансеры) и терминаторы транскрипции и трансляции (например, сигналы полиаденилирования).

[096] В одном варианте воплощения изобретения могут использоваться разнообразные 35 прокариотические и эукариотические клетки в качестве экспрессионных систем хозяина

для экспрессии hGH, модифицированного посредством СТР настоящего изобретения. В некоторых вариантах воплощения изобретения они включают, но не ограничиваются этим, микроорганизмы, например, бактерию, трансформированную рекомбинантной ДНК бактериофага, экспрессионный вектор плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащий последовательность, кодирующую полипептид, дрожжи, трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессионными векторами, содержащими последовательность полипептид системы растительных клеток, инфицированных рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты (cauliflower mosaic virus, CaMV); вирусом табачной мозаики (tobacco mosaic virus, TMV)) или трансформированных рекомбинантными плазмидными экспрессионными векторами, такими как Ti-плазида, содержащая последовательность, кодирующая полипептид.

[097] В другом варианте воплощения изобретения используются небактериальные экспрессионные системы (например, экспрессионные системы млекопитающих, например, клетки CHO) для экспрессии соматотропных гормонов настоящего изобретения. В одном варианте воплощения изобретения экспрессионным вектором, используемым для экспрессии полинуклеотидов настоящего изобретения в клетках млекопитающих, является вектор pCI-DHFR, содержащий промотор CMV и ген устойчивости к неомицину. Конструкция вектора pCI-dhfr описана, в соответствии с одним вариантом воплощения изобретения, в Примере 1.

[098] В другом варианте воплощения изобретения в бактериальных системах настоящего изобретения ряд экспрессионных векторов может быть предпочтительно отобран в зависимости от предусмотренного применения экспрессируемого полипептида. В одном варианте воплощения изобретения желательными являются большие количества полипептида. В одном варианте воплощения 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 варианте воплощения изобретения конструируется определенный белок слияния со специфическим участком рестрикции для помощи в выделении полипептида. В одном варианте воплощения изобретения векторы, адаптируемые к таким манипуляциям, включают, но не ограничиваются этим, экспрессионные векторы серии pET *E. coli* [Studier *et al.*, Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)].

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

[0100] В одном варианте воплощения изобретения экспрессионный вектор настоящего изобретения дополнительно может включать 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-гибридного полипептида.

[0101] В другом варианте воплощения изобретения экспрессионные векторы млекопитающих включают, но не ограничиваются этим, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), 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 Strategene, pTRES, который доступен от Clontech, и их производные.

[0102] В другом варианте воплощения изобретения в настоящем изобретении используются экспрессионные векторы, содержащие регуляторные элементы от эукариотических вирусов, например, ретровирусы. Векторы SV40 включают pSVT7 и pMT2. В некоторых вариантах воплощения изобретения векторы, полученные от вируса папилломы крупного рогатого скота, включают pBV-1MTHA, и векторы, полученные из вируса Эпштейна-Барр, включают pHEBO и p2O5. Другие примерные векторы 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 мышинового вируса опухоли молочных желез, промотора вируса саркомы Рауса, полиэдринового промотора или других промоторов, у которых была продемонстрирована эффективность экспрессии в эукариотических клетках.

[0103] В другом варианте воплощения изобретения рекомбинантные вирусные векторы пригодны для экспрессии *in vivo* GH, модифицированного посредством СТР настоящего изобретения, так как они предоставляют преимущества, такие как латеральная инфекция или специфичность таргетинга. В одном варианте воплощения изобретения латеральная инфекция присуща жизненному циклу, например, ретровируса, и является процессом,

5 посредством которого единичная инфицированная клетка продуцирует много вирионов потомства, которые отпочковываются и инфицируют окружающие клетки. В другом варианте воплощения изобретения результатом является большая зона, которая быстро становится инфицированной, большая часть которой не была изначально инфицирована первоначальными вирусными частицами. В одном варианте воплощения изобретения получают вирусные векторы, которые не способны распространяться латерально. В другом варианте воплощения изобретения эта характеристика может быть полезной, если желаемой целью является введение специфического гена только в локализованное число клеток–мишеней.

10 [0104] В другом варианте воплощения изобретения могут использоваться различные способы для введения в клетки экспрессионного вектора настоящего изобретения. 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 под номерами 5464764 и 5487992 в отношении способов позитивной–негативной селекции.

25 [0105] В другом варианте воплощения 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.

30 [0106] В одном варианте воплощения изобретения следует понимать, что ГН, модифицированный посредством СТР настоящего изобретения, также может быть экспрессирован из конструкта нуклеиновой кислоты, введенного индивидууму с использованием любого подходящего способа введения, описанного здесь выше (т.е. генной терапии *in vivo*). В одном варианте воплощения 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*).

[0107] В одном варианте воплощения изобретения генная терапия *in vivo* с использованием соматотропного гормона была проведена на моделях у животных.

[0108] В одном варианте воплощения изобретения используются экспрессионные векторы растений. В одном варианте воплощения изобретения экспрессия последовательности, кодирующей полипептид, запускается рядом промоторов. В некоторых вариантах воплощения 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 воплощения изобретения используются растительные промоторы, например, малая субъединица 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 варианте воплощения изобретения конструкции 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 техники. 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 техники, также могут быть использованы настоящим изобретением.

[0109] Следует понимать, что экспрессионные конструкции настоящего изобретения, 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.

[0110] В некоторых вариантах воплощения изобретения могут использоваться различные методы для введения экспрессионного вектора настоящего изобретения в систему клетки-хозяина. В некоторых вариантах воплощения 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 под номерами 5464764 и 5487992 в отношении методов позитивной–негативной селекции.

[0111] В одном варианте воплощения изобретения трансформированные клетки культивируются в эффективных условиях, которые обеспечивают экспрессию больших количеств рекомбинантного полипептида. В другом варианте воплощения эффективные условия культивирования включают, но не ограничиваются этим, эффективные среды, биореактор, температуру, pH и условия кислорода, позволяющие вырабатывать белок. В одном варианте воплощения изобретения эффективная среда относится к любой среде, на которой культивируются клетки для получения рекомбинантного полипептида настоящего изобретения. В другом варианте воплощения 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 воплощения изобретения клетки настоящего изобретения могут культивироваться в традиционных ферментационных биореакторах, флаконах со встряхиванием, тестовых пробирках, микротитровальных планшетах и чашках Петри. В другом варианте воплощения изобретения культивирование производится при температуре, pH и содержании кислорода, подходящих для рекомбинантных клеток. В другом варианте воплощения изобретения условия культивирования находятся в компетенции обычного специалиста в данной области техники.

[0112] В другом варианте воплощения изобретения, в зависимости от вектора и системы-хозяина, используемых для продуцирования, получаемые в результате соматотропные гормоны настоящего изобретения 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.

[0113] В одном варианте воплощения изобретения после заранее определенного времени в культуре осуществляется высвобождение рекомбинантного полипептида.

[0114] В одном варианте воплощения изобретения фраза "высвобождение рекомбинантного полипептида", используемая здесь, относится к сбору всей ферментационной среды, содержащей полипептид и не обязательно подразумевает дополнительные этапы сепарации или очистки.

[0115] В одном варианте воплощения изобретения соматотропные гормоны настоящего изобретения 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.

5 [0116] В одном варианте воплощения изобретения для содействия выходу может быть сконструирована экспрессируемая кодирующая последовательность, кодирующая полипептид настоящего изобретения и полученную путем слияния расщепляемую функциональную группу. В одном варианте воплощения изобретения белок слияния может быть сконструирован таким образом, что полипептид может быть легко изолирован методом аффинной хроматографии, например, путем иммобилизации на колонке, 10 специфической для расщепляемой функциональной группы. В одном варианте воплощения изобретения участок расщепления сконструирован между полипептидом и расщепляемой функциональной группой, и полипептид может быть выделен из хроматографической колонки путем обработки соответствующим ферментом или агентом, который специфически расщепляет белок слияния в этом участке [например, см. 15 Booth *et al.*, Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); и Gardella *et al.*, J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].

[0117] В одном варианте воплощения изобретения полипептид настоящего изобретения извлекается в "по существу чистой" форме.

20 [0118] В одном варианте воплощения изобретения фраза "по существу чистый" относится к чистоте, которая позволяет эффективно использовать белок в применениях, описываемых здесь.

[0119] В одном варианте воплощения изобретения полипептид настоящего изобретения также может быть синтезирован с использованием экспрессионных систем *in vitro*. В одном варианте воплощения изобретения методы синтеза *in vitro* хорошо известны в 25 данной области техники, а компоненты системы являются коммерчески доступными.

[0120] В одном варианте воплощения изобретения продуцирование ГН, модифицированного посредством СТР, выполняется с использованием технологии рекомбинантной ДНК.

30 [0121] В другом варианте воплощения изобретения рекомбинантные полипептиды синтезируются и очищаются, их терапевтическая активность может быть протестирована как *in vivo*, так и *in vitro*. В одном варианте воплощения изобретения связывающие активности рекомбинантного ГН, модифицированного посредством СТР настоящего изобретения, могут быть подтверждены с использованием разнообразных тестов.

35 [0122] В одном варианте воплощения настоящее изобретение содержит полипептиды СТР-hGH-СТР-СТР. В одном варианте воплощения изобретения используются методы

технологии рекомбинантной ДНК для получения полипептидов СТР-hGH-СТР-СТР, как проиллюстрировано в Примере 1. В одном варианте воплощения изобретения терапевтическая эффективность полипептидов СТР-hGH-СТР-СТР настоящего изобретения тестируется *in vivo*. В одном варианте воплощения изобретения терапевтическая эффективность полипептидов СТР-hGH-СТР-СТР настоящего изобретения тестируется *in vitro*. В одном варианте воплощения изобретения связывающие активности рекомбинантных полипептидов hGH настоящего изобретения измеряются с использованием Nb2 (пролактин-зависимая клеточная линия лимфомы крыс (ECACC Cell Bank) или мышинной клеточной линии FCD-P1, предварительно трансфицированной рецептором соматотропного гормона человека. В одном варианте воплощения изобретения связывание hGH с этими рецепторами индуцирует клеточную пролиферацию, которая, в одном варианте воплощения изобретения, измеряется по уровням клеточного окрашивания МТТ как функции активности hGH. В одном варианте воплощения изобретения активность *in vivo* выводится путем измерения прибавки веса в течение времени у леченных животных, дефицитных по соматотропному гормону.

[0123] В одном варианте воплощения изобретения настоящее изобретение предоставляет способ стимулирования роста или прибавки веса у субъекта, включающий введение субъекту 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 прибавку веса у субъекта.

[0124] В другом варианте воплощения изобретения настоящее изобретение предоставляет способ стимулирования роста у человека, включающий введение указанному субъекту 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 субъекта. В одном варианте воплощения изобретения указанным человеком является подросток. В другом варианте воплощения изобретения человеком является ребенок. В другом варианте воплощения изобретения человеком является ребенок, дефицитный по соматотропному гормону.

[0125] В другом варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ стимулирования прибавки веса у человека, включающий введение указанному субъекту

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 прибавку веса у указанного субъекта. В одном варианте воплощения изобретения указанным человеком является подросток. В другом варианте воплощения изобретения человеком является ребенок. В другом варианте воплощения изобретения человеком является ребенок, дефицитный по соматотропному гормону.

10 [0126] В другом варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ стимулирования потери веса или снижения телесного жира у человека, включающий введение указанному субъекту 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 субъекта. В одном варианте воплощения изобретения указанный субъект страдает ожирением. В другом варианте воплощения изобретения субъект страдает избыточным весом. В другом варианте воплощения изобретения человеком является взрослый. В другом варианте воплощения изобретения человеком является взрослый, дефицитный по соматотропному гормону.

[0127] В другом варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ снижения отложений жира у субъекта. В другом варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ увеличения мышечной массы у субъекта. В другом варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ стимулирования мышечного роста у субъекта. В другом варианте воплощения изобретения человеком является взрослый. В другом варианте воплощения изобретения человеком является взрослый, дефицитный по соматотропному гормону. В другом варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ увеличения соотношения мышц к жиру. В другом варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ снижения индекса массы тела (ИМТ) или индекса Кетле.

[0128] В другом варианте воплощения изобретения здесь предоставляется способ стимулирования роста у субъекта, включающий введение субъекту соматотропного гормона, модифицированного посредством СТР, как описано здесь. В одном варианте воплощения изобретения соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР,

напрямую вводится субъекту, в то время как в другом варианте воплощения изобретения субъекту вводится полинуклеотид, кодирующий указанный соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР. В другом варианте воплощения изобретения здесь предоставляется способ стимулирования роста у субъекта, включающий введение субъекту 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 воплощения изобретения здесь предоставляется способ стимулирования роста у субъекта, включающий введение субъекту 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.

[0129] В другом варианте воплощения изобретения рост измеряется прибавкой веса. В другом варианте воплощения изобретения рост измеряется прибавкой роста. В другом варианте воплощения изобретения рост измеряется прибавкой веса. В другом варианте воплощения изобретения рост измеряется прибавкой мышечной массы. В другом варианте воплощения изобретения рост измеряется прибавкой веса. В другом варианте воплощения изобретения рост измеряется прибавкой костной массы. В другом варианте воплощения изобретения рост измеряется прибавкой веса. В другом варианте воплощения изобретения рост измеряется прибавкой жира. В другом варианте воплощения изобретения рост измеряется любой известной мерой, известной специалисту в данной области техники. В другом варианте воплощения изобретения субъектом, у которого измеряется рост, является ребенок. В другом варианте воплощения изобретения субъектом, у которого измеряется рост, является ребенок, дефицитный по соматотропному гормону.

[0130] В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, включающие GH, модифицированный посредством СТР настоящего изобретения, вводятся в дозе 1-90 микрограмм в 0,1-5 мл раствора. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, включающие GH, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-50 микрограмм в 0,1-5 мл раствора. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, включающие GH, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-25 микрограмм в 0,1-5 мл раствора. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, включающие GH, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе

50-90 микрограмм в 0,1-5 мл раствора. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, включающие GH, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 10-50 микрограмм в 0,1-5 мл раствора.

[0131] В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, включающие GH, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 микрограмм в 0,1-5 мл раствора путем внутримышечной (ВМ) инъекции, подкожной (ПК) инъекции или внутривенной (ВВ) инъекции один раз в неделю. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, включающие GH, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 микрограмм в 0,1-5 мл раствора путем внутримышечной (ВМ) инъекции, подкожной (ПК) инъекции или внутривенной (ВВ) инъекции два раза в неделю. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, включающие GH, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 микрограмм в 0,1-5 мл раствора путем внутримышечной (ВМ) инъекции, подкожной (ПК) инъекции или внутривенной (ВВ) инъекции три раза в неделю. В другом варианте воплощения изобретения полипептиды, включающие GH, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 микрограмм 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 воплощения изобретения полипептиды, включающие GH, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 микрограмм 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 воплощения изобретения полипептиды, включающие GH, модифицированный посредством СТР, вводятся в дозе 1-90 микрограмм в 0,1-5 мл раствора путем внутримышечной (ВМ) инъекции, подкожной (ПК) инъекции или внутривенной (ВВ) инъекции один раз в 19 дней .

[0132] В другом варианте воплощения изобретения белковые препараты с молекулярным весом менее 50000 дальтон, такие как GH, модифицированный посредством СТР настоящего изобретения, в основном, являются короткоживущими *in vivo* видами, имеющими короткий полупериод жизни в кровообращении, составляющий несколько часов. В другом варианте воплощения изобретения, подкожный способ введения, в основном, предоставляет более медленное высвобождение в кровообращение. В другом варианте воплощения изобретения полипептид изобретения, модифицированный СТР, продлевает полупериод жизни белковых препаратов с молекулярным весом ниже 50000 дальтон, таких как GH. В другом варианте воплощения изобретения полипептид

изобретения, модифицированный СТР, обеспечивает возможность ГН оказывать свое благотворное влияние в течение более длительного периода времени.

[0133] В другом варианте воплощения изобретения иммуногенность полипептида, модифицированного СТР, содержащего ГН, модифицированный посредством СТР, равна иммуногенности изолированного ГН. В другом варианте воплощения изобретения иммуногенность полипептида, модифицированного СТР, содержащего ГН, модифицированный посредством СТР, сопоставима с иммуногенностью изолированного ГН. В другом варианте воплощения изобретения модификация ГН, как описано здесь, посредством СТР пептидов снижает иммуногенность ГН. В другом варианте воплощения изобретения полипептид, модифицированный СТР, содержащий ГН, такой же активный, как и изолированный белок ГН. В другом варианте воплощения изобретения полипептид, модифицированный СТР, содержащий ГН, более активный, чем изолированный ГН. В другом варианте воплощения изобретения полипептид, модифицированный СТР, содержащий ГН, максимизирует протективное свойство соматотропных гормонов в отношении деградации, при этом минимизируя снижения биологической активности.

[0134] В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР настоящего изобретения, предоставляется индивидууму *per se*. В одном варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР настоящего изобретения, предоставляется индивидууму как часть фармацевтической композиции, где он смешан с фармацевтически приемлемым носителем.

[0135] В другом варианте воплощения изобретения "фармацевтическая композиция" относится к препарату из одного или более активных ингредиентов, описываемых здесь, с другими компонентами, такими как физиологически подходящие носители и вспомогательные вещества. Цель фармацевтической композиции состоит в том, чтобы способствовать введению соединения в организм.

[0136] В другом варианте воплощения изобретения "активный ингредиент" относится к полипептидной целевой последовательности, которая отвечает за биологический эффект.

[0137] В одном варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет комбинированные препараты. В одном варианте воплощения 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, раздельно или последовательно. В другом варианте воплощения 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 5 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 техники.

[0138] В другом варианте воплощения изобретения фразы "физиологически приемлемый носитель" и "фармацевтически приемлемый носитель", которые используются здесь 10 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 адъювант. В одном варианте воплощения изобретения один из ингредиентов, включенных в фармацевтически приемлемый носитель, может быть, например, полиэтилен гликолем (ПЭГ), 15 биосовместимым полимером с широким диапазоном растворимости как в органических, так и в водных средах (Mutter et al. (1979).

[0139] В другом варианте воплощения изобретения "вспомогательное вещество" относится к инертной субстанции, добавленной к фармацевтической композиции, чтобы дополнительно способствовать введению активного ингредиента. В одном варианте 20 воплощения изобретения вспомогательные вещества включают кальция карбонат, кальция фосфат, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла и полиэтилен гликоли.

[0140] Методики для составления рецептуры и введения препаратов находятся в "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, последнее издание, 25 которое включено сюда посредством ссылки.

[0141] В другом варианте воплощения изобретения подходящие пути введения, например, включают оральную, ректальную, трансмукозальную, трансназальную, кишечную или парентеральную доставку, включая внутримышечные, подкожные или внутримозговые инъекции, наряду с интратекальными, прямыми интравентрикулярными, 30 внутривенными, внутрибрюшинными, интраназальными или интраокулярными инъекциями.

[0142] В другом варианте воплощения изобретения препарат вводится скорее локальным, чем системным образом, например, через инъекцию препарата напрямую в конкретный участок тела пациента.

[0143] Данным изобретением рассматриваются различные варианты воплощения 35 диапазонов дозировки. Дозировка GH, модифицированного посредством СТР настоящего

дозировка находится в диапазоне 0,05-7,2 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 0,1-20 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 0,1-10 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 0,01-5 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 0,001-0,01 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 0,001-0,1 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 0,1-5 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 0,5-50 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 0,2-15 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 0,26-10,7 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 0,8-65 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 1-50 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 5-10 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 8-15 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 10-20 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 20-40 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 60-120 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 12-40 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 40-60 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 50-100 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 1-60 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 15-25 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 5-10 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 55-65 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 1-5 мг/неделю.

[0145] В другом варианте воплощения изобретения дозировка GH, предоставляемая субъекту, составляет 50% стандартной дозировки, предоставляемой референтному субъекту из одной и той же популяции субъектов (например, дети, пожилые люди, мужчины, женщины, индивидуумы, дефицитные по соматотропному гормону, конкретной национальности и т.п.). В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 30% дозировки, предоставляемой субъекту из специфической популяции субъектов. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 45% дозировки,

предоставляемой субъекту из специфической популяции субъектов. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 100% от дозировки, предоставляемой субъекту из специфической популяции субъектов.

5 [0146] В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 1-5 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 2 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 4 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 1,2 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 1,8 мг/неделю. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет приблизительно дозировки, описываемые
10 здесь.

[0147] В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 1-5 мг/введение. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 2 мг/введение. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 4 мг/введение. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 1,2 мг/введение. В другом варианте
15 воплощения изобретения дозировка составляет 1,8 мг/введение. В одном варианте воплощения изобретения композиция вводится один раз в неделю. В другом варианте воплощения изобретения композиция вводится один раз в две недели. В другом варианте воплощения изобретения композиция вводится один раз в месяц. В другом варианте воплощения изобретения композиция вводится ежедневно.

20 [0148] В другом варианте воплощения изобретения рецептура ГН, модифицированного посредством СТР, разрабатывается в интраназальной лекарственной форме. В другом варианте воплощения изобретения рецептура ГН, модифицированного посредством СТР, разрабатывается в инъекционной лекарственной форме. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом
25 диапазоне от 0,0001 мг до 0,6 мг. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне от 0,001 мг до 0,005 мг. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне от 0,005 мг до 0,01 мг. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР,
30 вводится субъекту в дозовом диапазоне от 0,01 мг до 0,3 мг. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне от 0,2 мг до 0,6 мг.

[0149] В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне 1-100 микрограмм. В другом варианте
35 воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в

дозовом диапазоне 10-80 микрограмм. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне 20-60 микрограмм. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне 10-50 микрограмм. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне 40-80 микрограмм. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне 10-30 микрограмм. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне 30-60 микрограмм.

[0150] В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне от 0,2 мг до 2 мг. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне от 2 мг до 6 мг. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне от 4 мг до 10 мг. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту в дозовом диапазоне от 5 мг до 15 мг.

[0151] В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, инъецируется в мышцу (внутримышечная инъекция). В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится под кожу (подкожная инъекция). В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, инъецируется в мышцу. В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится под кожу.

[0152] В другом варианте воплощения изобретения способы изобретения включают повышение приверженности к использованию терапии соматотропным гормоном, включающие предоставление нуждающемуся в этом субъекту ГН, модифицированного посредством СТР, таким образом повышая приверженность к использованию терапии соматотропным гормоном.

[0153] В другом варианте воплощения изобретения способы изобретения включают повышение приверженности к лечению пациентов, пораженных хроническими заболеваниями, которые нуждаются в терапии соматотропным гормоном. В другом варианте воплощения изобретения способы изобретения обеспечивают возможность снижения частоты дозирования ГН путем модификации ГН посредством СТР, как описано здесь выше. В другом варианте воплощения изобретения термин приверженность к лечению включает соблюдение предписанного режима терапии. В другом варианте

воплощения изобретения способы изобретения включают повышение приверженности к лечению пациентов, нуждающихся в терапии соматотропным гормоном, путем снижения частоты введения ГН. В другом варианте воплощения изобретения снижение частоты введения ГН достигается благодаря модификациям СТР, которые делают ГН, модифицированный посредством СТР, более стабильным. В другом варианте воплощения изобретения снижение частоты введения ГН достигается в результате повышения T1/2 соматотропного гормона. В другом варианте воплощения изобретения снижение частоты введения ГН достигается в результате повышения времени клиренса ГН. В другом варианте воплощения изобретения снижение частоты введения соматотропного гормона достигается в результате повышения величины AUC соматотропного гормона.

[0154] Таким образом, в другом варианте воплощения настоящее изобретение дополнительно предоставляет способ улучшения «площади под кривой» (AUC) соматотропного гормона, включающий этап 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.

[0155] Таким образом, в другом варианте воплощения настоящее изобретение дополнительно предоставляет способ снижения частоты дозирования соматотропного гормона, включающий этап 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.

[0156] Таким образом, в другом варианте воплощения изобретения настоящее изобретение предоставляет способ повышения приверженности в использовании терапии соматотропным гормоном у нуждающихся в ней субъектов, включающий предоставление указанному субъекту 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 приверженность в использовании терапии соматотропным гормоном. В одном варианте воплощения изобретения указанный субъект является человеком.

[0157] В другом варианте воплощения изобретения настоящее изобретение предоставляет способ повышения уровней инсулиноподобного ростового фактора (IGF-1) у человека,

включающий введение указанному субъекту 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 субъекта. В другом варианте воплощения изобретения способы повышения уровней IGF-1 предоставлены в Примере 6, как указано ниже.

[0158] В другом варианте воплощения изобретения настоящее изобретение предоставляет способ повышения уровней инсулиноподобного ростового фактора (IGF-1) до желаемого терапевтического диапазона у человека, включающий введение указанному субъекту 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 субъекта. В другом варианте воплощения изобретения человеком является взрослый. В другом варианте воплощения изобретения человеком является взрослый, дефицитный по соматотропному гормону. В другом варианте воплощения изобретения человеком является нормальный взрослый. В другом варианте воплощения изобретения способы повышения уровней IGF-1 до желаемого терапевтического уровня представлены в Примере 9, как указано ниже.

[0159] В одном варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет способ поддержания уровней инсулиноподобного ростового фактора (IGF-1) в нормальном терапевтическом диапазоне у субъекта, способ, включающий введение субъекту 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-I в нормальном терапевтическом диапазоне у субъекта. В другом варианте воплощения изобретения способы поддержания уровней IGF-1 на нормальном терапевтическом уровне предоставлены в Примере 9, как указано ниже.

[0160] В одном варианте воплощения 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 воплощения изобретения поддержание уровней IGF-1 в нормальном терапевтическом диапазоне 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).

[0161] В одном варианте воплощения 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 здесь предоставляется 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).

[0162] В другом варианте воплощения изобретения GH, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту один раз в день. В другом варианте воплощения изобретения полипептид, включающий соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту один раз в два дня. В другом варианте воплощения изобретения GH, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту один раз в три дня. В другом варианте воплощения изобретения GH, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту один раз в четыре дня. В другом варианте воплощения изобретения GH, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту один раз в пять дней. В другом варианте воплощения изобретения GH, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту один раз в шесть дней. В другом варианте воплощения изобретения GH, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту один раз в неделю. В другом варианте воплощения изобретения GH, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту один раз в 7-14 дней. В другом варианте воплощения изобретения GH, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту один раз в 10-20 дней. В другом варианте воплощения изобретения GH, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту один раз в 5-15 дней. В другом варианте воплощения изобретения GH, модифицированный посредством СТР, вводится субъекту один раз в 15-30 дней.

[0163] В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 50-500 мг/день. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне 50-150 мг/день. В другом варианте воплощения изобретения дозировка находится в диапазоне

воплощения изобретения дозировка составляет 10-50 мг/9 дней. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 10-50 мг/11 дней. В другом варианте воплощения изобретения дозировка составляет 10-50 мг/14 дней.

[0167] Оральное введение в одном варианте воплощения 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 варианте воплощения изобретения, составляет приблизительно от 0,7 или 3,5 мг до приблизительно 280 мг/70 кг или, в другом варианте воплощения изобретения, приблизительно от 0,5 или 10 мг до приблизительно 210 мг/70 кг. Фармацевтически приемлемые носители, пригодные для приготовления стандартных лекарственных форм для перорального введения, хорошо известны в данной области техники. В некоторых вариантах воплощения изобретения таблетки обычно содержат традиционные фармацевтически совместимые адъюванты, такие как инертные разбавители, такие как кальция карбонат, натрия карбонат, маннитол, лактоза и целлюлоза; связывающие вещества, такие как крахмал, желатин и сахароза; разрыхлители, такие как крахмал, альгиновая кислота и кроскармеллоза; лубриканты, такие как магния стеарат, стеариновая кислота и тальк. В одном варианте воплощения изобретения могут использоваться скользящие вещества, такие как кремния двуокись, для улучшения свойств сыпучести порошковых смесей. В одном варианте воплощения 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). Подслащивающие добавки и ароматизаторы, такие как аспартам, сахарин, ментол, мята перечная и фруктовые ароматизаторы, являются пригодными адъювантами для жевательных таблеток. Капсулы обычно содержат один или более твердых разбавителей, раскрываемых выше. В некоторых вариантах воплощения изобретения отбор компонентов-носителей зависит от вторичных соображений, таких как вкус, стоимость и стабильность при хранении, которые не являются критическими для целей данного изобретения, и их отбор может быть легко выполнен специалистом в данной области техники.

[0168] В одном варианте воплощения изобретения оральная лекарственная форма включает predetermined profile of release. В одном варианте воплощения изобретения оральная лекарственная форма настоящего изобретения включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки пролонгированного действия. В одном варианте воплощения изобретения оральная лекарственная форма настоящего

изобретения включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки с медленным высвобождением. В одном варианте воплощения изобретения оральная лекарственная форма настоящего изобретения включает таблетки, капсулы, пастилки для рассасывания или жевательные таблетки с немедленным высвобождением. В одном варианте воплощения изобретения рецептура оральной лекарственной формы составлена в соответствии с желаемым профилем высвобождения фармацевтически активного ингредиента, как это известно специалисту в данной области техники.

[0169] Пероральные композиции в некоторых вариантах воплощения изобретения включают жидкие растворы, эмульсии, суспензии и подобное. В некоторых вариантах воплощения изобретения фармацевтически приемлемые носители, пригодные для приготовления таких композиций, хорошо известны в данной области техники. В некоторых вариантах воплощения изобретения жидкие оральные композиции содержат от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,933% желаемого соединения или соединений или, в другом варианте воплощения изобретения, от приблизительно 0,01% до приблизительно 10%.

[0170] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиции для использования в способах данного изобретения включают растворы или эмульсии, которые в некоторых вариантах воплощения изобретения являются водными растворами или эмульсиями, включающими безопасное и эффективное количество соединений настоящего изобретения и, необязательно, другие соединения, предназначенные для местного интраназального введения. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиции содержат от приблизительно 0,001% до приблизительно 10,0% вес/объем соматотропного гормона, модифицированного посредством СТР, более предпочтительно от приблизительно 00,1% до приблизительно 2,0 % вес/объем, который используется для системной доставки соединений интраназальным путем.

[0171] В другом варианте воплощения изобретения фармацевтические композиции вводятся путем внутривенной, внутриартериальной или внутримышечной инъекции жидкого препарата. В некоторых вариантах воплощения изобретения жидкие составы включают растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии, масла и подобное. В одном варианте воплощения изобретения фармацевтические композиции вводятся внутривенно, и, таким образом, рецептура создается в форме, подходящей для внутривенного введения. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтические композиции вводятся внутриартериально, и, таким образом, рецептура создается в форме, подходящей для внутриартериального введения. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтические композиции вводятся внутримышечно, и, таким образом, рецептура создается в форме, подходящей для внутримышечного введения.

[0172] Дополнительно в другом варианте воплощения изобретения фармацевтические композиции вводятся местно на поверхности тела, и, таким образом, рецептура создается в форме, подходящей для местного введения. Подходящие составы для местного введения включают гели, мази, кремы, лосьоны, капли и подобное. Для местного введения соединения настоящего изобретения комбинируются с дополнительным подходящим терапевтическим агентом или агентами, которые готовятся и наносятся как растворы, суспензии или эмульсии в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем или без него.

[0173] В одном варианте воплощения изобретения фармацевтические композиции настоящего изобретения производятся способами, хорошо известными в данной области техники, например, традиционными способами смешивания, растворения, гранулирования, дражирования, растирания в порошок, эмульсификации, инкапсулирования, улавливания или лиофилизации.

[0174] В одном варианте воплощения изобретения рецептура 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 варианте воплощения изобретения состав зависит от избранного пути введения.

[0175] В одном варианте воплощения изобретения рецептура инъекционных препаратов изобретения создается в водных растворах. В одном варианте воплощения изобретения рецептура инъекционных препаратов изобретения создается в физиологически приемлемых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой раствор. В некоторых вариантах воплощения изобретения для трансмукозального введения в составе используются пенетранты, подходящие для проникаемого барьера. Такие пенетранты, в общем, известны в данной области техники.

[0176] В одном варианте воплощения изобретения рецептура препаратов, описываемых здесь, составляется для парентерального введения, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. В некоторых вариантах воплощения изобретения составы для инъекций представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах с, необязательно, добавленным консервантом. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиции являются суспензиями, растворами или эмульсиями в масляных или водных носителях и содержат вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

[0177] Композиции также включают, в некоторых вариантах воплощения изобретения, консерванты, такие как бензалкония хлорид и тимеросал, и подобное; хелирующие агенты, такие как эдетат натрия и другие; буферы, такие как фосфатный, цитратный и ацетатный; агенты тоничности, такие как натрия хлорид, калий хлорид, глицерин, маннитол и другие; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, ацетилцистин, натрия метабисульфат и другие; ароматизаторы; регуляторы вязкости, такие как полимеры, включая целлюлозу и ее производные; и поливиниловый спирт, и кислоту, и основание для регулирования, по необходимости, рН этих водных композиций. Композиции также содержат, в некоторых вариантах воплощения изобретения, местные анестетики или другие активные вещества. Композиции могут быть использованы в спреях, аэрозолях, каплях и подобное.

[0178] В некоторых вариантах воплощения изобретения фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы активного препарата в водорастворимой форме. В дополнение суспензии активных ингредиентов в некоторых вариантах воплощения изобретения готовятся как соответствующие инъекционные суспензии на масле или воде. Подходящие липофильные растворители или носители включают, в некоторых вариантах воплощения 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 воплощения изобретения, субстанции, повышающие вязкость суспензии, такие как натрия карбоксиметил целлюлоза, сорбитол или декстран. В другом варианте воплощения изобретения суспензия также содержит подходящие стабилизаторы или агенты, повышающие растворимость активных ингредиентов для обеспечения получения высококонцентрированных растворов.

[0179] В другом варианте воплощения 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).

[0180] В другом варианте воплощения изобретения рецептура фармацевтической композиции, доставленной в системе контролируемого высвобождения, составляется для внутривенной инфузии, имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. В одном варианте воплощения 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 воплощения изобретения могут использоваться полимерные материалы. В

еще другом варианте воплощения 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).

[0181] В некоторых вариантах воплощения изобретения активный ингредиент находится перед употреблением в форме порошка для разбавления подходящим носителем, например, стерильным апиrogenным раствором на водной основе. Рецептuru композиций в некоторых вариантах воплощения изобретения составляется для распыливания и ингаляционного введения. В другом варианте воплощения изобретения композиции содержатся в контейнере с прилагаемыми средствами распыления.

[0182] В одном варианте воплощения изобретения рецептuru препарата настоящего изобретения составляется в ректальные композиции, такие как суппозитории или удерживающие клизмы, с использованием, например, традиционных основ суппозиториев, таких как масло какао или другие глицериды.

[0183] В другом варианте воплощения 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 воплощения изобретения терапевтически эффективное количество означает количество активных ингредиентов, эффективное для предотвращения, облегчения или улучшения симптомов заболевания или продления выживаемости субъекта, получающего лечение.

[0184] В одном варианте воплощения изобретения определение терапевтически эффективного количества в существенной мере находится в рамках возможностей специалиста в данной области техники.

[0185] 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 карбоксиметил целлюлоза, этил целлюлоза и метил целлюлоза; порошковый трагакант; солод; желатин; тальк; твердые лубриканты, такие как стеариновая кислота и магния стеарат; кальция сульфат; растительные масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао; полиолы, такие как пропилен гликоль, глицерин, сорбитол, маннитол и полиэтилен гликоль; альгиновая кислота; эмульсификаторы, такие как эмульсификаторы

марки Tween™; увлажняющие агенты, такие как натрия лаурил сульфат; красители; ароматизаторы; агенты 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 варианте воплощения изобретения, фармацевтически приемлемым носителем является стерильный физиологический раствор с суспендирующим агентом, совместимым с кровью, pH которого доведено до приблизительно 7,4.

[0186] Кроме того, композиции дополнительно включают связующие вещества (например, гуммиарабик, кукурузный крахмал, желатин, карбомер, этил целлюлозу, гуаровую камедь, гидроксипропил целлюлозу, гидроксипропил метил целлюлозу, повидон), разрыхлители (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту, силикона двуокись, натрия кроскармеллозу, кросповидон, гуаровую камедь, натрия крахмал гликолят), буферы (например, Tris-HCl, ацетатный, фосфатный) различной pH 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 агенты (например, глицерин, полиэтилен глицерин), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, натрия метабисульфит, бутилированный гидроксианизол), стабилизаторы (например, гидроксипропил целлюлоза, гидроксипропилметил целлюлоза), агенты, повышающие вязкость (например, карбомер, коллоидная кремния двуокись, этил целлюлоза, гуаровая камедь), подслащивающие добавки (например, аспартам, лимонная кислота), консерванты (например, Тимеросал, бензиловый спирт, парабены), лубриканты (например, стеариновая кислота, магния стеарат, полиэтилен гликоль, натрия лаурил сульфат), агенты для повышения текучести (например, коллоидная кремния двуокись), пластификаторы (например, диэтил фталат, триэтил цитрат), эмульсификаторы (например, карбомер, гидроксипропил целлюлоза, натрия лаурил сульфат), полимерное покрытие (например, полуксамеры или полуксамины), покровные вещества и пленкообразователи (например, этил целлюлоза, акрилаты, полиметакрилаты) и/или адьюванты.

[0187] Типичные компоненты носителей для сиропов, эликсиров, эмульсий и суспензий включают этанол, глицерин, пропилен гликоль, полиэтилен гликоль, жидкую сахарозу, сорбитол и воду. Для суспензии типичные суспендирующие агенты включают метил целлюлозу, натрия карбоксиметил целлюлозу, целлюлозу (например, Avicel™, RC-591), трагакант и натрия альгинат; типичные смачивающие агенты включают лецитин и

полиэтилен оксид сорбитан (например, полисорбат 80). Типичные консерванты включают метил парабен и натрия бензоат. В другом варианте воплощения изобретения пероральные жидкие композиции также содержат один или более компонентов, таких как подслащающие добавки и красители, раскрытые выше.

5 [0188] 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
10 высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo*.

[0189] Также изобретением охватываются композиции из частиц, покрытых полимерами (например, полуксамерами или полуксаминами), и соединение, связанное с антителами, направленными против тканеспецифических рецепторов, лигандов или антигенов, или связанное с лигандами тканеспецифических рецепторов.

15 [0190] В другом варианте воплощения изобретения соединения модифицируются путем ковалентного присоединения водорастворимых полимеров, таких как полиэтилен гликоль, сополимеры полиэтилен гликоля и полипропилен гликоля, карбоксиметил целлюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон или полипролин. В другом варианте воплощения изобретения модифицированные соединения проявляют, по существу, более
20 длительные полупериоды жизни в крови после внутривенной инъекции по сравнению с соответствующими немодифицированными соединениями. В одном варианте воплощения изобретения модификации также повышают растворимость соединений в водном растворе, устраняют агрегацию, увеличивают физическую и химическую стабильность соединения и в значительной степени снижают иммуногенность и реактивность соединения. В другом
25 варианте воплощения 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.

[0191] В другом варианте воплощения изобретения получение эффективного количества или дозы может быть первоначально установлено из тестов *in vitro*. В одном варианте
30 воплощения изобретения рецептура дозы может быть составлена на моделях у животных, и такая информация может быть использована для более точного определения полезных доз у людей.

[0192] В одном варианте воплощения изобретения токсичность и терапевтическая эффективность описываемых здесь активных ингредиентов может быть определена путем
35 стандартных фармацевтических процедур *in vitro* в культурах клеток или у

экспериментальных животных. В одном варианте воплощения изобретения данные, полученные от этих тестов *in vitro* и в культуре клеток, и в исследованиях у животных, могут быть использованы для создания рецептуры диапазона доз для применения у человека. В одном варианте воплощения изобретения дозировки варьируют в зависимости от примененной лекарственной формы и использованного пути введения. В одном варианте воплощения изобретения точный состав, путь введения и дозировка могут быть выбраны конкретным врачом, принимая во внимание состояние пациента. [См., например, Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1].

[0193] В одном варианте воплощения 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.

[0194] В одном варианте воплощения изобретения количество композиции, которое будет введено, разумеется, будет зависеть от субъекта, получающего лечение, тяжести недуга, способа введения, суждения врача, предписывающего лечение, и т.п.

[0195] В одном варианте воплощения изобретения композиции, включая препарат настоящего изобретения с рецептурой, составленной в совместимом фармацевтическом носителе, также готовятся, помещаются в соответствующий контейнер и маркируются для лечения указанного состояния.

[0196] В другом варианте воплощения изобретения ГН, модифицированный посредством СТР, вводится путем системного введения. В другом варианте воплощения изобретения соматотропный гормон, как описано здесь, вводится путем внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции. В другом варианте воплощения изобретения ГН, 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 агенты (т.е. сурфактанты), различные сахара, органические полиолы и/или сывороточный альбумин человека. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный ГН, модифицированный посредством СТР, как описано, в стерильной воде для инъекции. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный соматотропный гормон, как описано, в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе для инъекции. В другом варианте воплощения изобретения

фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный соматотропный гормон, как описано, в стерильном 0,9% NaCl для инъекции.

[0197] В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция включает соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, и комплексные носители, такие как сывороточный альбумин человека, полиолы, сахара и анионные поверхностно-активные стабилизирующие агенты. См, например, WO 89/10756 (Naga et al.- содержащий полиол и п-гидроксibenзоат). В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция включает соматотропный гормон, как описано здесь, и лактобионовую кислоту, и ацетатный/глициновый буфер. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, и аминокислоты, такие как аргинин или глутамат, которые повышают растворимость композиций интерферона в воде. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный ГН, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, и глицин или сывороточный альбумин человека (HSA), буфер (например, ацетатный) и изотонический агент (например, NaCl). В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный ГН, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, и фосфатный буфер, глицин и HSA.

[0198] В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, стабилизируется при помещении в буферные растворы, имеющие рН между приблизительно 4 и 7,2. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, стабилизируется при помощи аминокислоты в качестве стабилизирующего агента и, в некоторых случаях, солью (если аминокислота не содержит заряженной боковой цепи).

[0199] В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, является жидкой композицией, включающей стабилизирующий агент по весу от приблизительно 0,3% до 5%, который является аминокислотой.

[0200] В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, предоставляет точность дозирования и безопасность продукта. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный

гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, предоставляет биологически активный, стабильный жидкий состав для использования в инъекируемый применениях. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция содержит нелиофилизированный ГН, модифицированный посредством СТР, как описано
5 здесь.

[0201] В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, предоставляет жидкий состав, позволяющий проводить долговременное хранение в жидком состоянии, способствуя хранению и транспортировке перед введением.

10 [0202] В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, содержит твердые липиды в качестве матричного материала. В другом варианте воплощения изобретения инъекируемая фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь,
15 содержит твердые липиды в качестве матричного материала. В другом варианте воплощения 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 воплощения изобретения используемые липиды
20 хорошо переносятся организмом (например, глицериды, состоящие из жирных кислот, которые присутствуют в эмульсиях для парентерального питания).

[0203] В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, находится в форме липосом (J. E. Diederichs and al., Pharm./nd. 56 (1994) 267- 275).

25 [0204] В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, содержит полимерные микрочастицы. В другом варианте воплощения изобретения инъекируемая фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, содержит полимерные
30 микрочастицы. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, содержит наночастицы. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, содержит липосомы. В другом варианте воплощения
35 изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон,

модифицированный посредством СТР, как описано здесь, содержит липидную эмульсию. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, содержит микросферы. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, содержит липидные наночастицы. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, содержит липидные наночастицы, содержащие амфифильные липиды. В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, включающая соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР, как описано здесь, содержит липидные наночастицы, содержащие препарат, липидный матрикс и сурфактант. В другом варианте воплощения изобретения липидный матрикс имеет содержание моноглицерида, которое составляет по меньшей мере 50% вес/вес.

[0205] В одном варианте воплощения изобретения композиции настоящего изобретения 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 варианте воплощения изобретения упаковка, например, содержит металлическую или пластиковую фольгу, такая как блистерная упаковка. В одном варианте воплощения изобретения упаковка или приспособление для дозирования сопровождается инструкциями для введения. В одном варианте воплощения 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 варианте воплощения изобретения, является маркировка, утвержденная Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США для рецептурных препаратов, или утвержденный вкладыш продукта.

[0206] В одном варианте воплощения изобретения следует понимать, что соматотропный гормон, модифицированный посредством СТР настоящего изобретения, может предоставляться индивидууму с дополнительными активными агентами для достижения улучшенного терапевтического эффекта по сравнению с лечением каждым агентом самим

по себе. В другом варианте воплощения изобретения принимаются меры (например, дозировка и выбор дополняющего агента) в отношении нежелательных побочных эффектов, ассоциированных с комбинированными терапиями.

[0207] Дополнительные объекты, преимущества и новые признаки настоящего изобретения будут явными для обычного специалиста в данной области техники после изучения следующих примеров, которые не предназначены для того, чтобы быть ограничивающими. В дополнение каждый из различных вариантов воплощения изобретения и аспекты настоящего изобретения, как это описано здесь выше и как заявлено в разделе пунктов формулы изобретения ниже, находят экспериментальную поддержку в следующих примерах.

ПРИМЕРЫ

[0208] В общем, номенклатура используемая здесь и лабораторные процедуры задействованные в настоящем изобретении включают молекулярные, биохимические, микробиологические способы и способы рекомбинантной ДНК. Такие способы агтательно описаны в литературе. Смотри, 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 №№ 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 и 5,272,057; "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 найчной литературе, смотри, например, Патенты США №№. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 и 5,281,521; "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 все включены сюда путем ссылки. Другие общие ссылки предоставлены по тексту этого документа.

ПРИМЕР 1

Создание конструкторов hGH

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

- 10 [0209] Было синтезировано четыре клонa hGH (варианты белка 20 кДа). Фрагменты Xba I –Not I, содержащие последовательности hGH из четырех вариантов, были лигированы в эукариотический экспрессионный вектор 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).
- 15 Праймеры заказывали у Sigma-Genosys. Последовательности праймеров, которые были использованы для создания полипептидов hGH, модифицированных посредством СТР настоящего изобретения, подытожены в Таблице 1, как указано ниже.

Таблица 1

| Номер праймера | SEQ ID NO | Последовательность | Сайт рестрикции (подчеркнут в последовательности) |
|-----------------|-----------|---|---|
| 25 | 18 | 5' <u>CTCTAGAGG</u> ACATGGCCAC 3' | XbaI |
| 32 ^R | 19 | 5' ACAGGGAGGTCTGGGGGTTCTGCA 3' | |
| 33 | 20 | 5' TGCAGAACCCCCAGACCTCCCTGTGC 3' | |
| 4 ^R | 21 | 5' CCAAACATCAATGTATCTTA 3' | |
| 25 | 22 | 5' <u>CTCTAGAGG</u> ACATGGCCAC 3' | XbaI |
| 35 ^R | 23 | 5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3' | |
| 34 | 24 | 5' GCCTTTGACACCTACCAGGAGTTCG 3' | |
| 37 ^R | 25 | 5' <u>ACGCGGCCGC</u> ATCCAGACCTTCATCAC TGAGGC 3' | NotI |
| 39 ^R | 26 | 5' <u>GCGGCCGC</u> GGACTCATCAGAAGCCGCAG CTGCCC 3' | |

[0210] **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.

[0211] 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.

[0212] 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.

[0213] 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 экспрессионный вектор pCI-dhfr. Вектор был трансфицирован в клетки DG-44 CHO. Клетки выращивались в среде, не содержащей белка.

[0214] **Конструкция 402-1-p83-5 (hGH-СТР) - SEQ ID NO: 9 и 402-2-p72-3(hGH-СТРx2) – 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).

[0215] 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*-ctr) и pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH*-ctr x2).

[0216] 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. Фигуру 1). Молекулярный вес hGH-СТР-СТР составляет ~39 кДа (см. Фигуру 1).

[0217] **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

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

[0218] Были проведены три реакции ПЦР. Первая реакция были проведена с праймером

10 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 проведена с праймером 34 и праймером 37^R, и плазмидной ДНК ТА-hGH-2-q65-1 в качестве матрицы; в результате ПЦР амплификации был образован продукт из 695 пар оснований. Последняя реакция была проведена с

15 праймерами 25 и 37^R и смесью продуктов двух предыдущих реакций в качестве матрицы; в результате ПЦР амплификации был образован продукт из 938 или 891 пар оснований и лигирован в клонирующий вектор ТА (Invitrogen, каталог К2000-01). Фрагмент Xba I – Not I, содержащий последовательность hGH, был лигирован в наш эукариотический экспрессионный вектор pCI-dhfr.

20 [0219] СТР-hGH-СТР-СТР и tСТР-hGH-СТР-СТР были экспрессированы в клетках DG-44 СНО. Клетки выращивались в среде, не содержащей белка. Молекулярный вес СТР-hGH-СТР-СТР составляет ~47,5 кДа (см. Фигуру 1), и молекулярный вес tСТР-hGH-СТР-СТР составляет ~43,25 кДа (см. Фигуру 1).

[0220] **Конструкция 402-6-p95a-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

25 ПЦР реакции был использован pCI-dhfr-402-1-p83-5 (hGH-ctp).

[0221] **Конструкция 402-5-p96-4 (СТР-hGH) - SEQ ID NO: 14:** Реакция ПЦР выполнялась с использование праймера 25 и праймера 39^R, и плазмидной ДНК pCI-dhfr-ctp-EPO-ctp (402-6-p95a-8) в качестве матрицы; в результате ПЦР амплификации был образован

30 продукт из 763 пар оснований и лигирован в клонирующий вектор ТА (Invitrogen, каталог К2000-01). Фрагмент Xba I –Not I, содержащий последовательность ctp-hGH, был лигирован в наш эукариотический экспрессионный вектор pCI-dhfr для получения клона 402-5-p96-4.

ПРИМЕР 2**Тесты биоактивности *in vivo* полипептидов hGH-СТР настоящего изобретения**

[0222] Следующий эксперимент был проведен с целью тестирования потенциальной пролонгированной биологической активности полипептидов hGH-СТР по сравнению с коммерческим рекомбинантным соматотропным гормоном человека и hGH.

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

[0223] 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 коммерческого rhGH.

[0224] Вес измеряли у всех животных перед началом лечения, через 24 часа после первой инъекции и каждые два дня до конца исследования в день 21. Каждая точка представляет средний процент прибавки веса группы ((День взвешивания 0 -взвешивание в последний день)/ День взвешивания 0). Среднюю прибавку веса нормализовали по отношению к инъекции один раз в день коммерческого hGH. График лечения подытожен в Таблице 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

[0225] Результаты подытожены на Фигуре 2. Эти результаты демонстрируют, что СТР-hGH-СТР-СТР (SEQ ID NO: 11) и tСТР-hGH-СТР-СТР (SEQ ID NO: 12) стимулируют прибавку веса свыше 120% по сравнению с коммерческим rhGH, который стимулировал 100% прибавку веса.

ВЫВОД

[0226] 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.

15

ПРИМЕР 3

Фармакокинетические исследования соматотропного гормона, модифицированного посредством СТР

[0227] 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 использованием животных Modigene, Biotechnology General Ltd. Крыс размещали либо по отдельности, либо по две в клетке с 12-ти часовым циклом свет/темнота. Доступ к

20

воде (городское снабжение) и к несертифицированным кормам для грызунов предоставлялся ad libitum.

[0228] 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.

- 5 Крыс случайным образом распределяли в четыре группы лечения (см. Таблицу 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
- 10 изофлурановым наркозом, отбор крови проводили у животных без наркоза. Образцы крови (приблизительно 0,25 мл) собирали в микроконтейнеры с покрытием ЭДТА для твердофазных иммуноферментных анализов ELISA концентраций в плазме СТР-hGH-СТР-СТР в периоды времени, указанные в Таблице 3. После каждого взятия образца
- 15 объем крови замещался равным объемом стерильного 0,9% физраствора. Образцы плазмы хранили на льду в течение до 1 часа 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 | 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 | | | | | | | | Терминальные образцы крови |

- по 3 крысы на временную точку.

[0229] Для оценки образцов плазмы крыс был использован коммерческий набор для сэндвичевого твердофазного иммуноферментного 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.

[0230] 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 трапецоидального анализа для внутривенных данных и линейно-логарифмического метода трапеций для подкожных данных. Профили концентрации в плазме для каждой крысы (за исключением данных подкожного абутропина) или обезьяны анализировались индивидуально, и данные значений среднее±стандартная ошибка среднего (S.E.M.) для фармакокинетических параметров представлены в Таблице 4 и на Фигуре 4.

[0231] 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

[0232] Фармакокинетику СТР-hGH-СТР-СТР оценивали и сравнивали с таковой у коммерческого hGH (Биотропин).

[0233] *Таблица 4.* Средние фармакокинетические параметры после внутривенного и подкожного введения однократной дозы СТР-hGH-СТР-СТР и GH (Биотропин) у крыс

5 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 |
| Cmax | нг/мл | 13 | 36,8 | 275,8 | 926 |
| Tmax | час | 0,5 | 8 | 0 | 0 |
| MRT | час | 2,5 | 12,9 | 0,5 | 9,9 |
| T1/2 alpha | час | | 1,58 | | 0,74 |
| T1/2 beta | час | 1,73 | 9 | 0,5 | 6,9 |

Статистический анализ данных

[0234] Анализ образцов сыворотки выполнялся с целью определения специфических уровней концентрации для каждого образца. Данные концентрации и временных точек обрабатывались с использованием некомпартментного анализа WinNonLin.

10 [0235] Определяемые параметры включали: AUC, MRT, t1/2, Cmax и Tmax. Фигура 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

15 крыс ($n=3-6$ на дозу/способ введения).

[0236] 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 T1/2 1,7час, AUC 41 час*нг/мл

20 СТР-hGH-СТР T1/2 8,5час, AUC 424 час*нг/мл

СТР-hGH-СТР-СТР T1/2 9,0 час, AUC 680 час*нг/мл

Заключение:

[0237] 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.

5

ПРИМЕР 5***Тест прибавки веса (ТПВ) для однократной дозы/повторной дозы соматотропного гормона, модифицированного посредством СТР***

[0238] Крысы-самцы с удаленным гипофизом (интерауральный метод), возрастом 3-4
10 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 прибавкой веса, сходной с прибавкой веса ложнооперированных животных. Эти крысы с неполным удалением гипофиза были
15 выведены из исследования. Средние показатели веса тела у крыс с удаленным гипофизом составляли на время эксперимента 70-90 грамм. 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
20 набирать вес. Инъекции hGH (и СТР-hGH-СТР-СТР) этим крысам приводят в результате к прибавке веса. На основе измеренной прибавки веса на протяжении определенного периода времени и количества инъецированного hGH определяется специфическая активность hGH (и СТР-hGH-СТР-СТР). Крысам вводили 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
25 индивидуальные показатели веса тела у всех животных, впоследствии - раз в два дня или, в случае умерщвления, на время смерти и перед забоем.

Анализ прибавки веса при однократной дозе и повторной дозе

[0239] Результаты, в которых сравнивался ответ роста всего тела после различных
30 моделей дозировки СТР-hGH-СТР-СТР у крыс с удаленным гипофизом, продемонстрированы на Фигуре 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.

[0240] Фигура 6 дополнительно демонстрирует, что площадь под кривой после однократной
35 инъекции СТР-hGH-СТР-СТР коррелирует с прибавкой веса тела у крыс. Таким образом,

эти совокупные данные демонстрируют, что прибавка веса тела тесно коррелирует с кумулятивным показателем AUC.

[0241] Конструкт hGH-СТР, введенный с интервалом в 4 дня, стимулирует такую же прибавку веса, как и ежедневные инъекции Биотропина, как показано в Фигуре 7.

- 5 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.

10

ПРИМЕР 6

Исследования фармакодинамики/фармакокинетики соматотропного гормона, модифицированного посредством СТР

- [0242] Крысы-самцы с удаленным гипофизом (интерауральный 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 прибавкой веса, сходной с прибавкой веса ложнооперированных животных. Эти крысы с неполным удалением гипофиза были выведены из исследования. Средние показатели веса тела у крыс с удаленным гипофизом и у ложнооперированных крыс составляли на время эксперимента, соответственно, 70 грамм и 150 грамм.

- [0243] 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 Таблице 4. После инъекции были получены образцы плазмы для анализов на IGF-1 в периоды времени, описанные в Таблице 5. Образцы анализировали на предмет концентрации IGF-1 с использованием коммерческого твердофазного иммуноферментного анализа ELISA (R&D systems).

- [0244] Ежедневное введение hGH, модифицированного посредством СТР, было успешным в поддержании IGF-I 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 | | | | | | | | Терминальные образцы крови |

[0245] 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.

[0246] **Таблица 6:** Расчеты фармакокинетических параметров СТР-hGH-СТР-СТР и Биотропина после однократной подкожной инъекции у крыс с удаленным гипофизом

10

| Группа | Доза | Пол | C_{max} | T_{max} | $AUC_{0-\infty}$ | AUC_{0-t} | CL/F | $T_{1/2}$ |
|--------------|-------|-------|-----------|-----------|------------------|-------------|-----------|-----------|
| | мг/кг | | нг/мл | час | нг-час/мл | нг-час/мл | мл/час/кг | час |
| | | | | | | | г | |
| СТР-hGH-СТР- | 1,8 | самцы | 2,150 | 8 | 37,713 | 37,695 | 0,928 | 6,86 |

| СТР | | | | | | | | |
|-----|------|-------|-------|-----|--------|--------|-------|-----|
| | 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 |

- [0247] 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 в Фигуре 8, T_{max} у СТР-hGH-СТР-СТР составила 8 часов по сравнению с 0,5 часа у Биотропина, и терминальные 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.
- 10 [0248] Непрямые эффекты соматотропного гормона опосредованы, в основном, инсулиноподобным ростовым фактором-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
- 15 СТР-hGH, СТР-hGH-СТР-СТР, на уровне IGF-1 в сыворотке крыс с удаленным гипофизом. Фигура 9 представляет результаты уровней IGF-1 в сыворотке крыс с удаленным гипофизом после подкожной инъекции СТР-hGH-СТР-СТР или коммерческого hGH.
- [0249] Однократные дозы СТР-hGH-СТР-СТР в 0,6 или 1,8 мг/кг или Биотропина 0,35 или
- 20 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).
- [0250] Кумулятивные уровни IGF-I в сыворотке после инъекции СТР-hGH-СТР-СТР были значительно выше, чем после инъекции Биотропина. C_{max} была, в основном,
- 25 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 часов по сравнению с 20-24 часами у Биотропина. Подводя итоги, более высокие уровни hGH и более продолжительное присутствие в сыворотке в результате приводит к значительному повышению уровней IGF-1.

*Содержание углеводов и сиаловой кислоты в соматотропном гормоне,
модифицированном посредством СТР*

[0251] 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.

10 Профилирование углеводов путем анализа последовательности

[0252] 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

15 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 замещения буфера водой, затем подвергали гидролизу с использованием условий режима вывода (6 часов при 60°C).

20 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-

25 HPLC.

Содержание моносахаридов

[0253] Анализ нейтральных моносахаридов требует гидролиза гликанов до их структурных моносахаридных составляющих. Гидролиз выполнялся Ludger Ltd на интактных гликопротеиновых образцах. В частности, проводили кислотный гидролиз 50

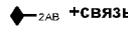
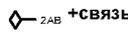
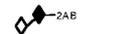
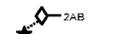
30 мкг интактного гликопротеина 2-AB (2-аминобензамид), метили и пропускали через обратно-фазовую колонку ВЭЖХ. Этот метод гидролизует все гликаны, присутствующие в гликопротеине, включая N- и O-связанные типы гликанов.

35 Профилирование сиаловых кислот

[0254] Анализировали два образца (EN648 и RS0708) и контроль в виде буфера. Анализ сиаловых кислот требует мягкого кислотного высвобождения моносахаридов с последующим мечением флуорофором DMВ и анализом ВЭЖХ на колонке LudgerSep-R1. Для каждого анализа проводили кислотный гидролиз 50 мкг интактного гликопротеина.

Анализ гликопротеинов СТР-hGH-СТР-СТР

[0255] **Таблица 7.** Анализ гликанов. Структурные определения и площади пиков в процентах основаны на ВЭЖХ и матрицах ферментных гидролизатов.

| ИН пика | ГЕ | Структура | Название | Процент от общего количества гликанов ^а | | | |
|----------------|------|---|-----------------------------------|--|-------------------|------|-------------------|
| | | | | 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 |  | NeuNAα2-3Gal | 19.8 | 13.0 ^h | | |
| * | 2.57 | | | 1.5 | 1.9 | 1.1 | 1.1 |
| 5 | 2.90 |  | NeuNAα2-3Galβ1-3GalNAc | 70.6 | | | |
| * | 3.58 | | | 0.6 | 0.7 | 0.6 | |
| 6 | 3.22 |  | Galβ1-3[NeuNAα2-6]GalNAc | 0.9 | 2.3 | | |
| 7 | 4.42 |  | NeuNAα2-3Galβ1-3[NeuNAα2-6]GalNAc | 1.8 | | | |

10

[0256] Моносахаридные профили указывают на то, что образцы гликопротеина СТР-hGH-СТР-СТР содержат, главным образом, тип гликанов с О-связью. Основным пиком О-гликанов является сиалированное ядро 1 (Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc). Основной сиаловой кислотой является Neu5Ac, и существует несколько минорных пиков, свидетельствующих о наличии 3-4% диацетилированной сиаловой кислоты *N*-ацетил-9-О-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5, 9Ac2) и менее 1% *N*-гликолилнейраминовой кислоты. Также имеются небольшие количества Neu5Acα2-6(Galβ1-3)GalNAc.

20

ПРИМЕР 8

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

[0257] 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 Таблице 8 ниже.

- 5 [0258] **Таблица 8:** Оценки фармакокинетических параметров СТР-hGH-СТР-СТР (среднее \pm 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 \pm 0,417 | 108,7 \pm 46,0 |
| T _{max} (час) | 4 \pm 0 | 11 \pm 7 |
| AUC _{0-t} (мкг-час/мл) | 38,7 \pm 7,4 | 2,444 \pm 394 |
| AUC _{0-∞} (мкг-час/мл) | 39,0 \pm 7,3 | 2,472 \pm 388 |
| CL/F (мл/час/кг) | 47,5 \pm 9,0 | 37,04 \pm 4,78 |
| T _{1/2} (час) | 10,00 \pm 1,47 | 9,85 \pm 1,07 |
| Vz/F (мл/кг) | 701 \pm 236 | 529 \pm 104 |

- 10 [0259] 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 часа для всех животных в группе низкой дозы и составило 8 или 24 часа в группе высокой дозы. Терминальные
- 15 полупериоды жизни для этих двух групп доз были сходными.

- [0260] 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
- 20 низкой дозе. Существовало перекрытие между группами, так что остается под вопросом, представляет ли это значимое различие в CL/F и Vz/F.

[0261] Фармакокинетические параметры, установленные при помощи модели, были весьма схожими с теми, которые были получены при некомпартментном анализе. Полупериоды абсорбции и элиминации показаны в Таблице 9 ниже.

[0262] **Таблица 9:** Значения полупериодов абсорбции и элиминации СТР-hGH-СТР-СТР (среднее \pm 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 \pm 0,40 | 10,41 \pm 2,36 |
| 90 мг/кг | 6,49 \pm 1,87 | 7,26 \pm 1,85 |

5

[0263] 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.

10

[0264] 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 приверженности к лечению. Необходимость приверженности к лечению 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 последующей приверженности к лечению 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 EO. Attire KM., Mashing TJ. Silverman BL. Kemp SF. Neolith RB. Ford KM. 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).

15

20

25

[0265] Гибридный белок GH-СТР, рекомбинантного соматотропного гормона человека-СТР, как предоставляется здесь, у крысы имеет фармакокинетический профиль, более длинный по продолжительности, чем таковой у соматотропного гормона. Этот

30

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.

5 [0266] 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. Терминальный полупериод
10 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.

[0267] В попытке исследовать, переносятся ли фармакокинетические преимущества у
15 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 эквимолярных уровнях доз СТР-hGH-СТР-СТР и соматотропного гормона. Однократная подкожная инъекция GH-СТР стимулировала возрастающую прибавку веса,
20 которая была равной 4 ежедневным последовательным инъекциям соматотропного гормона. В дополнение каждый четвертый день графика введения GH-СТР демонстрирует усиленную прибавку веса по сравнению с соматотропным гормоном.

[0268] Фармакодинамически длительный период времени циркулирования GH-СТР по сравнению с соматотропным гормоном у крыс с удаленным гипофизом привел в
25 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 часов после однократного введения.
30 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
35 гормоном.

- [0269] Однократные дозы hGH, модифицированного посредством СТР, в 90мг/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 экстраполяционными 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.
- [0270] 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, леченных соматотропным гормоном (однолетняя скорость роста $10,1 \pm 2,8$ см/год) (Silverman BL. Blethen SL. Reiter EO. Attie KM. Neuwirth RB. and Ford KM. 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 гомона, 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 полезности в качестве агента, который 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

[0271] Было проведено рандомизированное, открытое клиническое исследование Фазы II для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики и фармакодинамических свойств hGH-СТР, инъеклируемого 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.

[0272] 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.

[0273] Эффективность для трех основных когорт, получавших однократную еженедельную инъекцию hGH-СТР, определяется путем измерения ежедневных уровней инсулиноподобного ростового фактора 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 минус 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 +/- 1,5 стандартное отклонение, с целью наблюдения разброса у пациентов в пределах нормального диапазона.

Результаты:

[0274] Таблица 10 содержит средний процент дней в пределах нормального терапевтического диапазона (+/- 2 стандартных отклонения), средний процент дней в пределах более узкого нормального терапевтического диапазона (+/- 1,5 стандартное отклонение) и среднюю S_{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

| <u>Когорта</u> | <u>% дней в пределах узкого нормального диапазона IGF-1 (+/- 1,5 стандартное отклонение)</u> | <u>% дней в пределах нормального диапазона IGF-1 (+/- 2 стандартных отклонения)</u> | <u>Средняя S_{max} IGF-1 (предпочтительно ниже +2 средних отклонений)</u> |
|----------------|--|---|--|
| 30% | 57% | 100% | -0,9 |
| 45% | 100% | 100% | 0,1 |
| 100% | 86% | 100% | 0,4 |

[0275] Два 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.

[0276] 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.

[0277] Хотя здесь были проиллюстрированы и описаны определенные характеристики изобретения, многие модификации, замещения, изменения и эквиваленты сейчас станут очевидными обычному специалисту в данной области техники. 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 ребенка, измеряемый по поддержанию уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в пределах нормального терапевтического диапазона, включающий введение указанному индивиду терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, два СТР хорионического гонадотропина, прикрепленные к карбоксиконцу указанного соматотропного гормона, и, необязательно, сигнальный пептид, присоединенный к аминоконцу указанного аминоконцевого СТР, и где указанный модифицированный полипептид вводят один раз в неделю в количестве 1-60 мг/неделя.

2. Способ по п.1, где по меньшей мере один СТР гликозилирован.

3. Способ по любому из пп.1-2, где по меньшей мере один СТР присоединен к указанному гормону роста посредством линкера.

4. Способ по п.3, где указанный линкер представляет собой пептидную связь.

5. Способ по любому из пп.1-4, где соматотропный гормон представляет собой соматотропный гормон человека.

6. Способ по любому из пп.1-5, где аминокислотная последовательность соматотропного гормона по меньшей мере на 80% гомологична SEQ ID NO:5.

7. Способ по любому из пп.1-6, где последовательность по меньшей мере одного СТР кодируется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

8. Способ по любому из пп.1-7, где аминокислотная последовательность сигнального пептида содержит последовательность SEQ ID NO:3.

9. Способ по любому из пп.1-7, где аминокислотная последовательность указанного полипептида содержит аминокислоты 27-301 последовательности SEQ ID NO:11.

10. Способ по любому из пп.1-8, где аминокислотная последовательность указанного полипептида содержит последовательность SEQ ID NO:11.

11. Способ по п.1, где указанный полипептид кодируется нуклеотидами 11-913 последовательности SEQ ID NO:16 или нуклеотидами 89-913 последовательностями SEQ ID NO:16.

12. Способ по любому из пп.1-11, где способ включает введение индивиду терапевтически эффективного количества СТР-модифицированного полипептида, содержащего разовую еженедельную дозу от 1,2 мг до 4 мг.

13. Способ по любому из пп.1-11, где способ включает введение индивиду терапевтически эффективного количества СТР-модифицированного полипептида, содержащего однократную еженедельную дозу 1,2 мг, 1,8 мг, 2 мг или 4 мг.

14. Способ по любому из пп.1-13, где индивидуом является мальчик.

15. Способ по любому из пп.1-14, где указанный СТР-модифицированный полипептид вводят указанному индивиду подкожно.

16. Способ лечения дефицита соматотропного гормона у ребенка, измеряемый путем поддержания уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в пределах нормального терапевтического диапазона, включающий введение указанному индивиду терапевтически эффективного количества модифицированного полипептида, содержащего соматотропный гормон, один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, два СТР хорионического гонадотропина, прикрепленные к карбоксиконцу указанного соматотропного гормона, где аминокислотная последовательность указанного СТР-модифицированного полипептида содержит аминокислотные 27-301 последовательности SEQ ID NO:11, и где указанный модифицированный полипептид вводят один раз в неделю в количестве 1-60 мг/неделя.

17. Применение полипептида, модифицированного карбоксиконцевым пептидом хорионического гонадотропина (СТР), содержащего соматотропный гормон, для получения лекарственного средства для лечения дефицита соматотропного гормона у ребенка,

измеряемого путем поддержания уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в пределах нормального терапевтического диапазона, где указанный СТР-модифицированный полипептид содержит один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, два хорионического гонадотропина (СТР), прикрепленные к карбоксиконцу указанного соматотропного гормона, и, необязательно, сигнальный пептид, присоединенный к аминоконцу указанного аминоконцевого СТР, и где СТР-модифицированный полипептид получают для введения один раз в неделю в количестве 1-60 мг/неделя.

18. Применение по п.17, где по меньшей мере один СТР гликозилирован.

19. Применение по любому из пп.17-18, где по меньшей мере один СТР присоединен к указанному гормону роста посредством линкера.

20. Применение по п.19, где указанный линкер представляет собой пептидную связь.

21. Применение по любому из пп.17-20, где соматотропный гормон представляет собой соматотропный гормон человека.

22. Применение по любому из пп.17-21, где аминокислотная последовательность соматотропного гормона по меньшей мере на 80% гомологична SEQ ID NO:5.

23. Применение по любому из пп.17-22, где последовательность по меньшей мере одного СТР кодируется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

24. Применение по любому из пп.17-23, где аминокислотная последовательность сигнального пептида содержит последовательность SEQ ID NO:3.

25. Применение по любому из пп.17-23, где аминокислотная последовательность указанного полипептида содержит аминокислоты 27-301 последовательности SEQ ID NO:11.

26. Применение по любому из пп.17-24, где аминокислотная последовательность указанного полипептида содержит последовательность SEQ ID NO:11.

27. Применение по п.17, где указанный полипептид кодируется нуклеотидами 11-913 последовательности SEQ ID NO: 16 или нуклеотидами 89-913 последовательности SEQ ID NO: 16.

28. Применение по любому из пп.17-27, где способ включает введение индивиду терапевтически эффективного количества СТР-модифицированного полипептида, содержащего разовую еженедельную дозу от 1,2 мг до 4 мг.

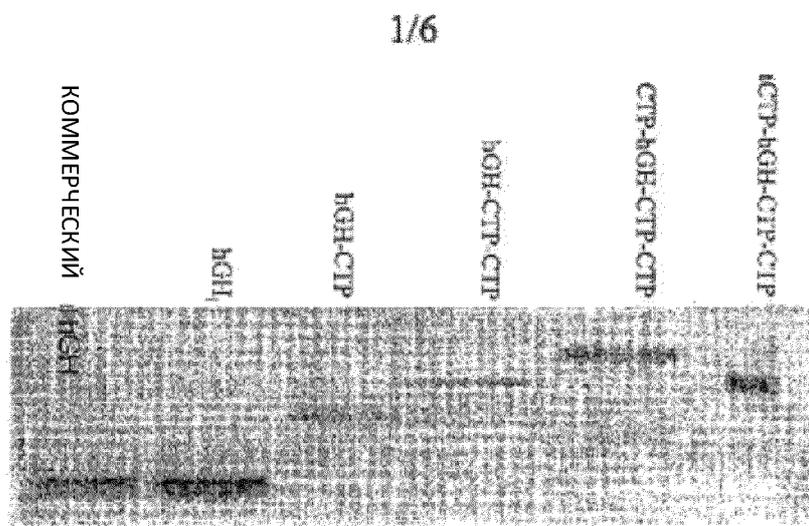
29. Применение по любому из пп.17-27, где способ включает введение индивиду терапевтически эффективного количества СТР-модифицированного полипептида, содержащего однократную еженедельную дозу 1,2 мг, 1,8 мг, 2 мг или 4 мг.

30. Применение по любому из пп.17-29, где индивидуум является мальчик.

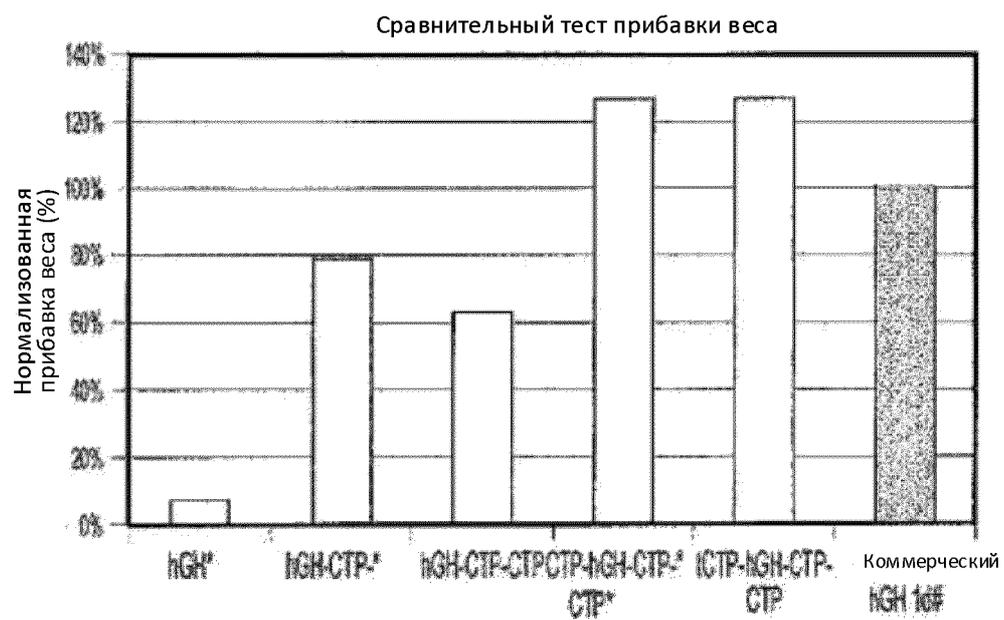
31. Применение по любому из пп.17-30, где указанный СТР-модифицированный полипептид вводят указанному индивиду подкожно.

32. Применение полипептида, модифицированного карбоксиконцевым пептидом хорионического гонадотропина (СТР), содержащего соматотропный гормон, для получения лекарственного средства для лечения дефицита соматотропного гормона у ребенка, измеряемого по поддержанию уровней инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в пределах нормального терапевтического диапазона, где указанный СТР-модифицированный полипептид содержит один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к аминоконцу указанного соматотропного гормона, и два хорионического гонадотропина СТР, прикрепленные к карбоксиконцу указанного соматотропного гормона, где аминокислотная последовательность указанного СТР-модифицированного полипептида содержит аминокислоты 27-301 последовательности SEQ ID NO:11, где СТР-модифицированный полипептид в указанном лекарственном средстве получают для введения один раз в неделю в количестве 1-60 мг/неделя.

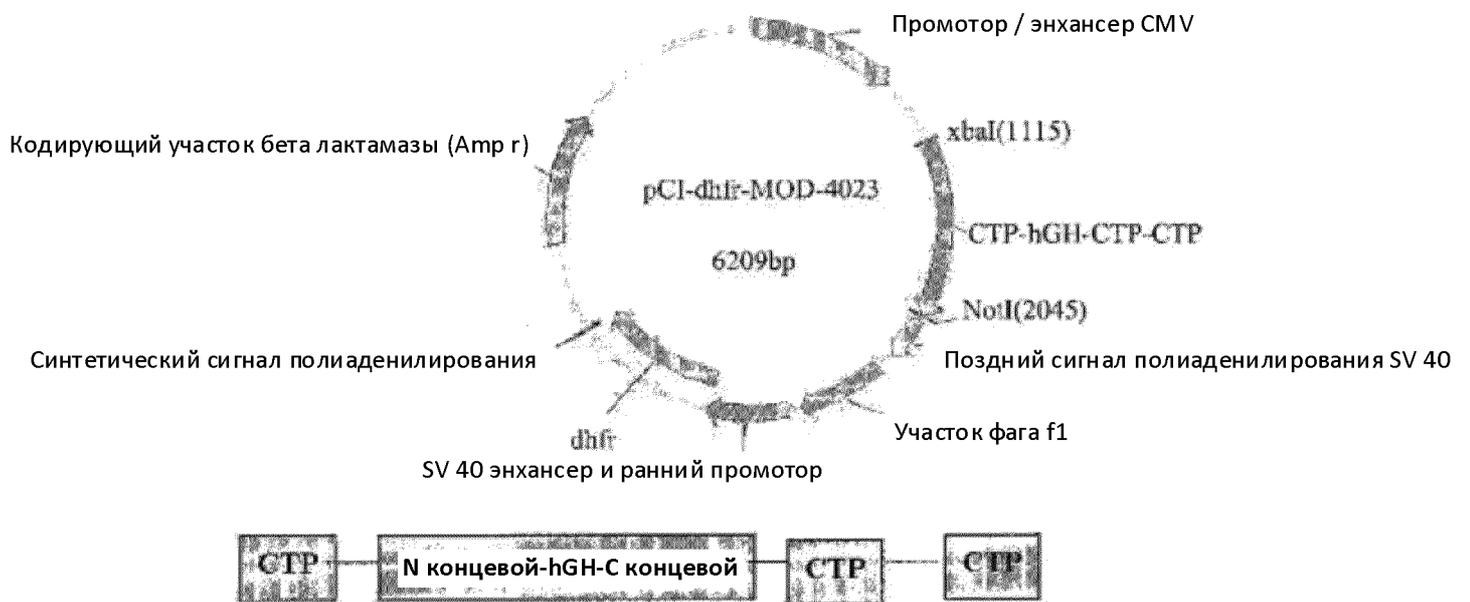
По доверенности



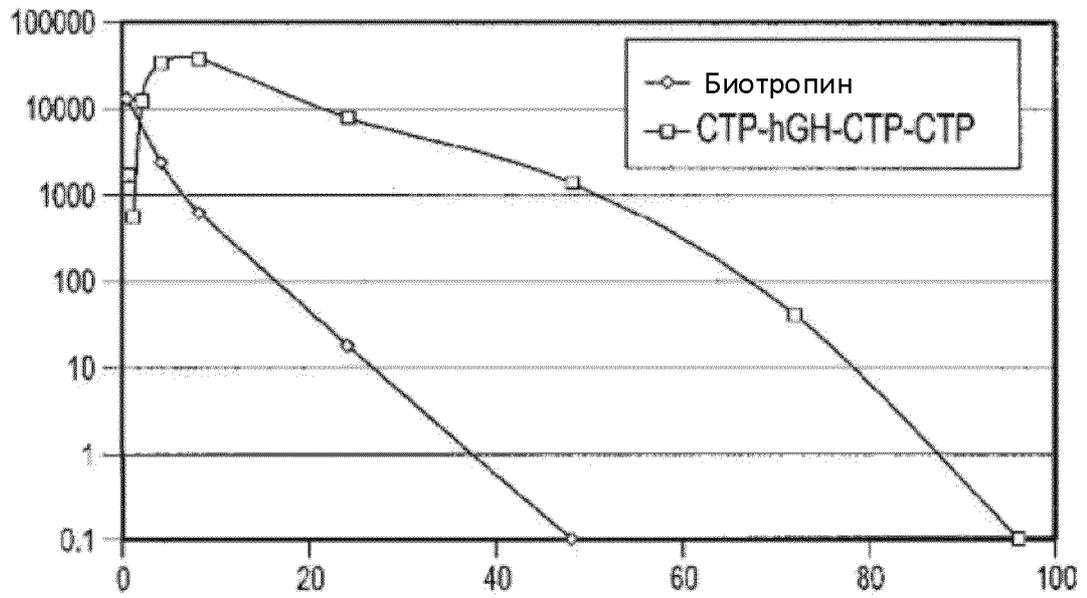
Фиг. 1



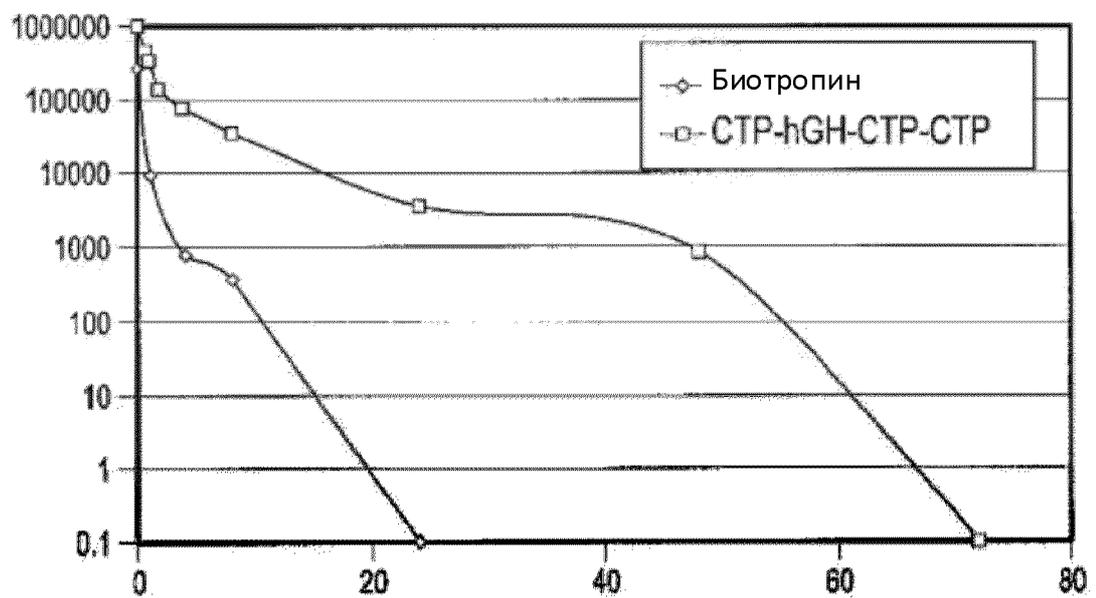
Фиг. 2



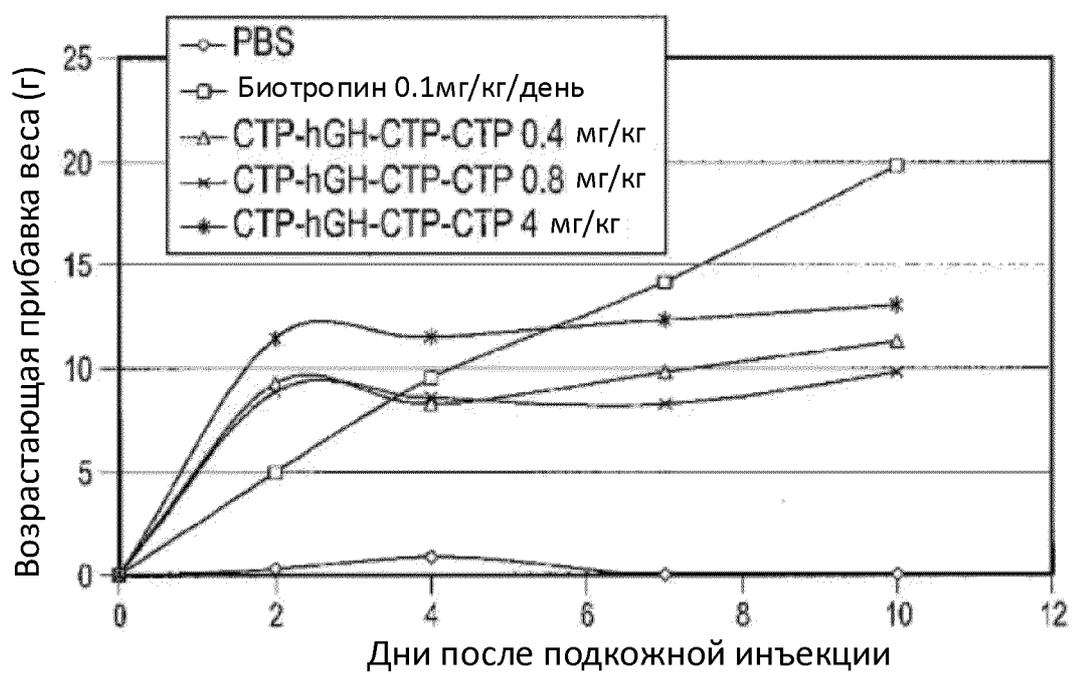
Фиг. 3



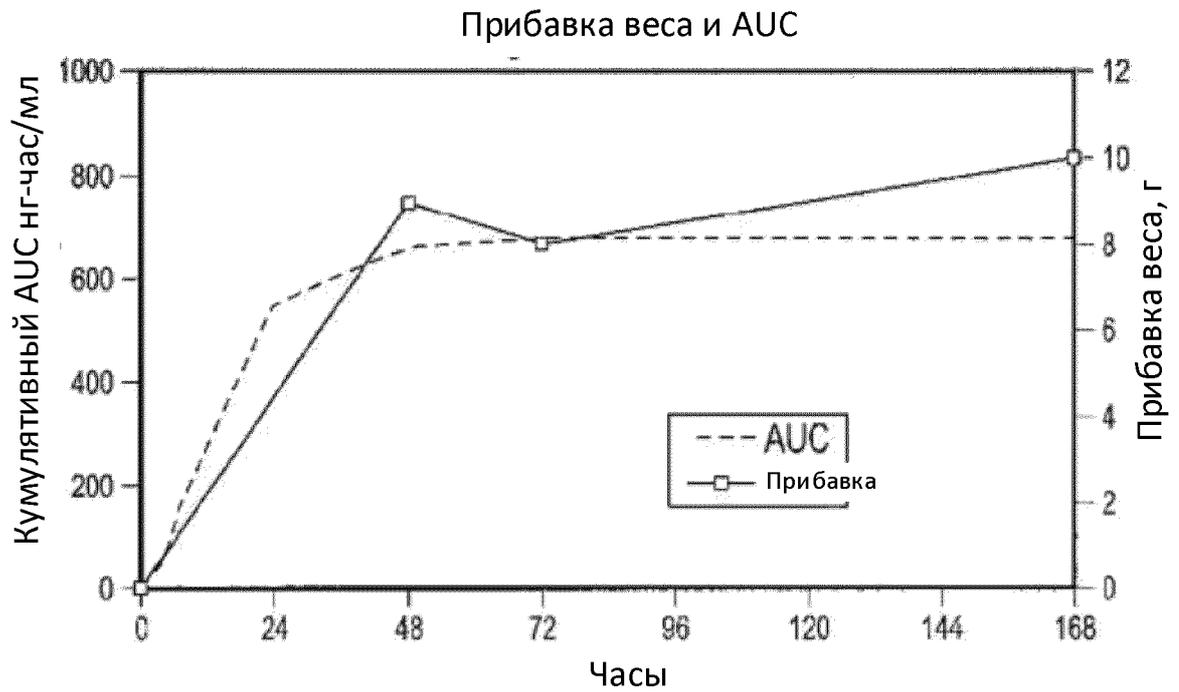
Фиг. 4А



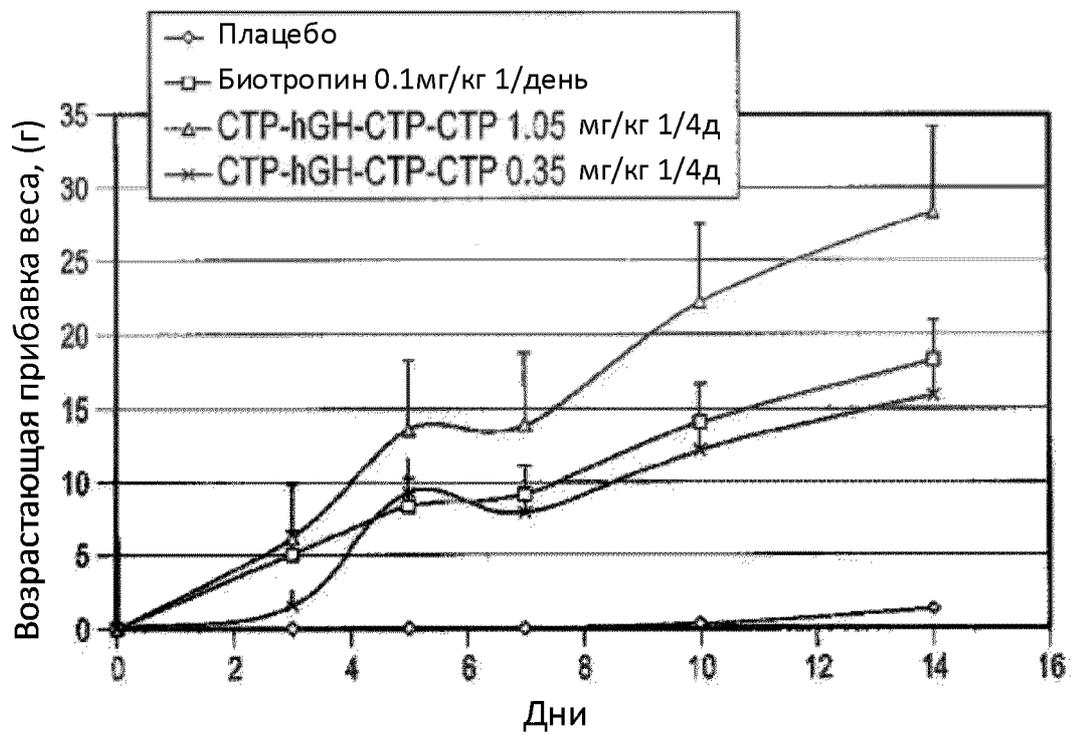
Фиг. 4В

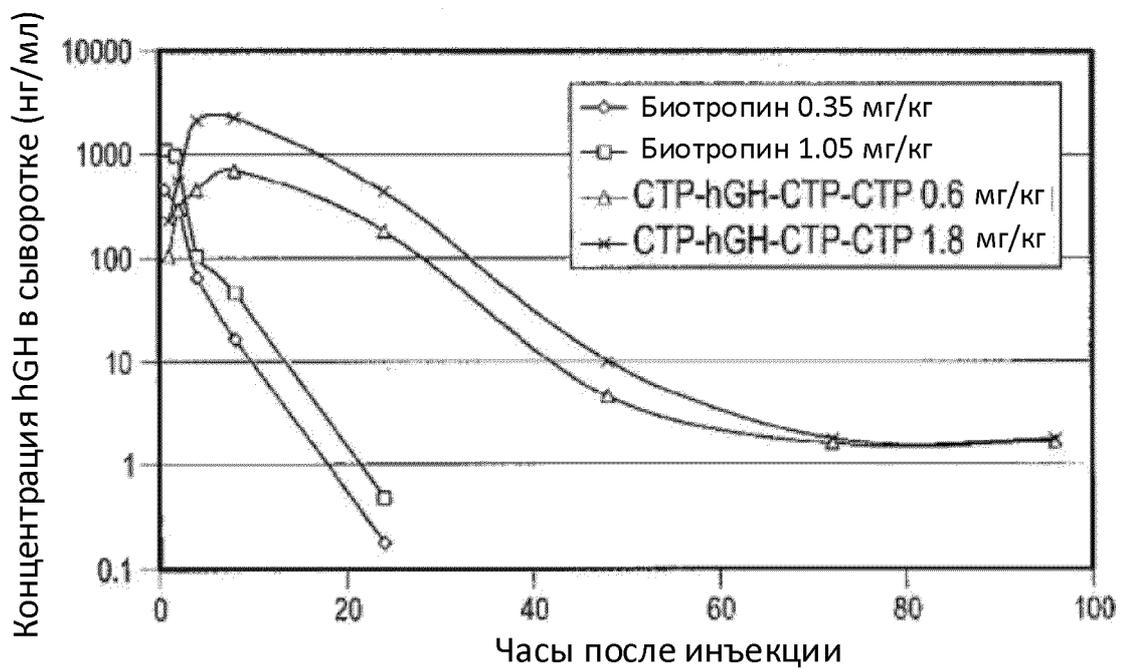


Фиг. 5



Фиг. 6





Фиг. 8

