



(51) МПК
C07K 14/61 (2006.01)
C07K 14/59 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2017123789, 10.12.2015

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 10.12.2014 US 62/090,104;
 10.12.2014 US 62/090,116;
 10.12.2014 US 62/090,124

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2019 Бюл. № 01

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 10.07.2017

(86) Заявка РСТ:
 IL 2015/051196 (10.12.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2016/092549 (16.06.2016)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Большая Спасская, д. 25,
 строение 3, ООО "Юридическая фирма
 Городисский и Партнеры"

(71) Заявитель(и):

ОПКО БАЙОЛОДЖИКС ЛТД. (IL)

(72) Автор(ы):

**ГЕРШКОВИЦ Орен (IL),
 МОШКОВИЧ Лаура (IL)**

(54) СПОСОБЫ ПРОИЗВОДСТВА СТР-МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ ГОРМОНА РОСТА ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

(57) Формула изобретения

1. Полипептид гормона роста человека (hGH), модифицированный карбоксиконцевым пептидом (СТР) человеческого хорионического гонадотропина, причем указанный полипептид состоит из двух СТР, присоединенных к карбоксильному концу hGH и одного СТР, присоединенного к аминоконцу hGH, при этом аминокислотная последовательность указанного полипептида представлена в SEQ ID NO: 7, и при этом СТР-модифицированный полипептид hGH содержит гликозилирование в положении между 13-м и 18-м сайтами О-гликозилирования.

2. Человеческий СТР-модифицированный полипептид hGH по п.1, отличающийся тем, что указанное гликозилирование происходит на СТР-единицах, и гликозилирование у hGH отсутствует.

3. Человеческий СТР-модифицированный полипептид hGH по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что каждый СТР содержит 4, 5 или 6 О-гликанов.

4. Человеческий СТР-модифицированный полипептид hGH по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что гликозилирование указанных СТР-

единиц содержит по меньшей мере 15 О-гликанов.

5. Человеческий СТР-модифицированный полипептид hGH по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что человеческий СТР-модифицированный полипептид hGH содержит О-гликозилирование остатков 10, 13, 15, 21, 229, 232, 234, 240, 257, 260, 262 и 268 последовательности SEQ ID NO: 7.

6. Человеческий СТР-модифицированный полипептид hGH по п.5, отличающийся тем, что профиль указанного гликозилирования человеческого СТР-модифицированного полипептида hGH дополнительно включает О-гликозилирование одного или двух остатков, выбранных из аминокислотных остатков 1-4, одного или двух остатков, выбранных из аминокислотных остатков 220-223, одного или двух остатков, выбранных из аминокислотных остатков 248-251 в последовательности SEQ ID NO: 7, или их комбинации.

7. Человеческий СТР-модифицированный полипептид hGH по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что О-гликановые структуры содержат сиалилированные структуры остова.

8. Человеческий СТР-модифицированный полипептид hGH по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что гликозилирование в каждом из указанных сайтов О-гликозилирования содержит структуру гликанового остова, выбранную из группы, включающей моносиалилированный остов 1 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc), нейтральный остов 1 (Gal β 1-3GalNAc), моносиалилированный остов 1 (Neu5Ac α 2-6(Gal β 1-3) GalNAc) или дисиалилированный остов 1 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3 (Neu5Ac α 2-6)GalNAc),

9. Композиция, содержащая СТР-модифицированный полипептид hGH по любому из предшествующих пунктов, и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Композиция по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере около 90% СТР-модифицированных полипептидов hGH, присутствующих в композиции, гликозилированы путем присоединения О-гликанов между 13 и 18 положением.

11. Композиция по любому из пп. 9-10, отличающаяся тем, что наиболее богатая О-гликанами форма гликозилированного СТР-модифицированного полипептида hGH, присутствующая в композиции, содержит 15 О-гликанов.

12. Композиция по любому из пп. 9-11, отличающаяся тем, что по меньшей мере около 60% СТР-модифицированных полипептидов hGH, присутствующих в композиции, являются сиалилированными.

13. Композиция по любому из пп. 9-12, отличающаяся тем, что СТР-модифицированный полипептид hGH, присутствующий в композиции, содержит О-гликановую структуру с моносиалилированным остовом 1 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc).

14. Композиция по любому из пп. 10-13, отличающаяся тем, что основной О-гликан в композиции представляет собой моносиалилированный остов 1 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc).

15. Композиция по любому из пп. 12-14, отличающаяся тем, что основная сиаловая кислота в композиции представляет собой Neu5Ac.

16. Композиция по любому из пп. 9-15, имеющая одну или более следующих характеристик:

- i. менее или равно 100 нг/мг (ppm - частей на миллион)) белков клетки-хозяина;
- ii. менее или равно 10 пг/мг ДНК;
- iii. менее 50 нг/мл метотрексата;
- iv. менее или равно 60 мкг/мл пропиленгликоля;
- v. менее или равно 2,5 мкг/мл Тритона;
- vi. менее или равно 115 пг/мл инсулина;
- vii. менее 250 мкг/мл ДМСО; или

viii. менее или равно 10 КОЕ/10 мл в анализе микробиологической нагрузки.

17. Полипептид гормона роста человека (hGH), модифицированный человеческим карбокси-концевым пептидом (СТР) по любому из пп. 1-8 или композиция по любому из пп. 9-16, изготовленные при помощи способа, включающего стадии:

(а) стабильного трансфицирования заданного количества клеток при помощи вектора экспрессии, содержащего кодирующую часть, которая кодирует указанный СТР-модифицированный hGH; при этом указанная трансфицированная клетка экспрессирует и секретирует указанный СТР-модифицированный hGH;

(b) получения клеточных клонов, которые сверхэкспрессируют указанный СТР-модифицированный hGH;

(c) размножения указанных клонов в растворе до заданной величины;

(d) сбора указанного раствора, содержащего указанные клоны;

(e) фильтрования указанного раствора, содержащего указанные клоны, для получения отфильтрованного собранного раствора; и,

(f) очистки указанного отфильтрованного собранного раствора для того, чтобы получить очищенный белковый раствор, имеющий желаемую концентрацию СТР-модифицированного hGH;

при этом указанный полипептид состоит из двух СТР, присоединенных к карбоксильному концу hGH и одного СТР, присоединенного к аминоконцу hGH, и при этом указанный изготовленный СТР-модифицированный hGH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

18. Способ получения полипептида гормона роста человека (hGH), модифицированного карбоксиконцевым пептидом (СТР) человеческого хорионического гонадотропина по любому из пп. 1-8 или композиции по любому из пп. 9-16, включающий стадии:

(а) стабильного трансфицирования заданного количества клеток при помощи вектора экспрессии, содержащего кодирующую часть, которая кодирует указанный СТР-модифицированный hGH; причем указанная трансфицированная клетка экспрессирует и секретирует указанный СТР-модифицированный hGH;

(b) получения клеточных клонов, которые сверхэкспрессируют указанный СТР-модифицированный hGH;

(c) размножение указанных клонов в растворе до заданной величины;

(d) сбора указанного раствора, содержащего указанные клоны;

(e) фильтрования указанного раствора, содержащего указанные клоны, для получения отфильтрованного собранного раствора; и,

(f) очистки указанного отфильтрованного собранного раствора для того, чтобы получить очищенный белковый раствор, имеющий желаемую концентрацию СТР-модифицированного hGH;

тем самым изготавливая СТР-модифицированный hGH, причем аминокислотная последовательность изготовленного СТР-модифицированного hGH представлена в SEQ ID NO: 7.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанная очистка (стадия f) указанного отфильтрованного собранного продукта включает последовательное выполнение следующих стадий, включающих:

(l) концентрирование и диафильтрацию указанного отфильтрованного собранного раствора;

(m) получение указанного отфильтрованного собранного продукта, полученного на стадии (g), и инактивацию вирусов, присутствующих в указанном отфильтрованном собранном продукте, путем инкубации в растворе, токсичном для указанных вирусов;

(n) получение указанного отфильтрованного собранного раствора со стадии (h) и

очистка указанного отфильтрованного собранного раствора,

i. причем указанную очистку осуществляют путем последовательного пропускания указанного отфильтрованного собранного раствора через анионообменную колонку и колонку гидрофобного взаимодействия, после чего следует стадия концентрирования и диафильтрации,

ii. при этом после указанной очистки следует последовательное пропускание указанного отфильтрованного собранного раствора через колонку смешанного режима с гидроксипатитом и катионообменную колонку;

(o) получение указанного отфильтрованного собранного раствора после стадии (ii) и физическое отделение указанного отфильтрованного собранного раствора от вирусов путем нанофильтрации;

(p) получение указанного отфильтрованного собранного раствора после стадии (j), и концентрирование и диафильтрацию указанного отфильтрованного собранного раствора для получения максимально очищенного отфильтрованного собранного продукта, содержащего указанный СТР-модифицированный hGH.

A 6 8 7 2 3 7 8 9 R U 2 0 1 7 1 2 3 7 8 9 A

R U 2 0 1 7 1 2 3 7 8 9 A