



(21)申請案號：103143380

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 10 月 21 日

(51)Int. Cl.：

A61K47/50 (2017.01)

A61K38/24 (2006.01)

C07K14/59 (2006.01)

A61K9/08 (2006.01)

(30)優先權：2013/10/21 美國 14/059,134
2014/06/19 美國 14/309,496

(71)申請人：以色列商歐科生物製品有限公司 (以色列) OPKO BIOLOGICS LTD. (IL)
以色列

(72)發明人：法瑞斯 富瓦 FARES, FUAD (IL)；費瑪 烏迪 艾歐 FIMA, UDI EYAL (IL)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：
US 2013/0184207A1

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：39 共 190 頁

(54)名稱
長效型多肽及其生產和給藥的方法

(57)摘要

揭露 CTP 修飾的人類生長激素多肽以及含有該多肽的藥物製劑和藥物組合物，以及其生產和使用它們的方法。

CTP-modified human growth hormone polypeptides and pharmaceutical formulations and pharmaceutical compositions comprising the same and methods of producing, and using the same are disclosed.

指定代表圖：

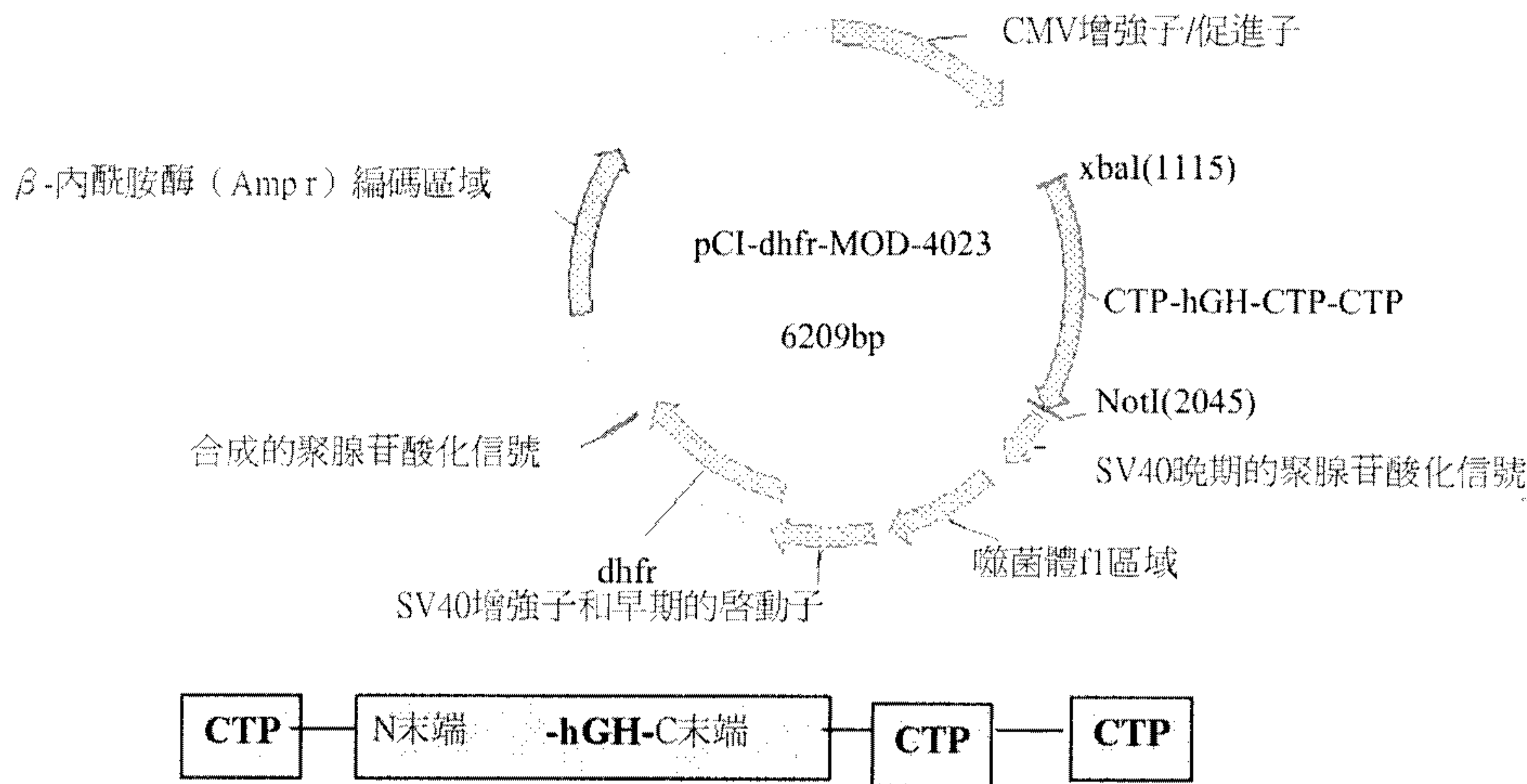


圖3

發明摘要

I720940

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：C07K; A61K

【發明名稱】

長效型多肽及其生產和給藥的方法

LONG-ACTING POLYPEPTIDES AND METHODS OF
PRODUCING AND ADMINISTERING SAME

【中文】

揭露CTP修飾的人類生長激素多肽以及含有該多肽的藥物製劑和藥物組合物，以及其生產和使用它們的方法。

【英文】

CTP-modified human growth hormone polypeptides and pharmaceutical formulations and pharmaceutical compositions comprising the same and methods of producing, and using the same are disclosed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（3 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

長效型多肽及其生產和給藥的方法

LONG-ACTING POLYPEPTIDES AND METHODS OF
PRODUCING AND ADMINISTERING SAME

【技術領域】

本發明公開CTP修飾的人生長激素〈hGH〉多肽和包含該多肽的藥物製劑和藥物組合物，以及製備和使用它們的方法。

【先前技術】

在血液、肝臟或腎臟中，多肽易於變性或被酶降解。因此，多肽通常只具有幾個小時的短的循環半衰期。因為其穩定性低，肽類藥物通常以持續的次數被施用，以便保持活性肽的有效血漿濃度。另外，由於肽類藥物通常是經由注射給藥，肽類藥物的頻繁注射會對受試者引起相當大的不適感。

不利的藥物代謝動力學，例如短的血清半衰期，會阻礙許多其它的有希望的候選藥物的開發。血清半衰期是一種分子的實驗特徵，對每一個新的有潛力的藥物，必須做實驗來確定此特徵。具有較低分子量的多肽藥物，由於如腎臟過濾的生理清除機制，血清半衰期較短，故需要頻頻地給藥，提高了成本，也不易維持藥物的治療濃度。相反地，當藥物或其代謝物具有毒性副作用時，長的血清半衰期是不希望的。

因此，需要一種技術，能延長治療性多肽的半衰期，同時能保持其較高的藥效。這種所需的肽藥物也應滿足增強的血清穩定性，高的活性，和注射入受試者時，不易誘導不希望的免疫反應等要求。本發

明滿足了這些需求，因本發明可提供一種CTP修飾的肽，其具有延長的半衰期，同時保持高的藥效，且同時具有增強的血清穩定性、高的活性和低概率的對受試者誘導不希望的免疫反應。

【發明內容】

在一個實施例中，本發明涉及藥物製劑，該藥物製劑包含緩衝劑，等滲劑，和CTP修飾的多肽，該多肽包含人類生長激素〈hGH〉，和一個附著於該生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）和二個附著於該生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素羧基末端肽〈CTPs〉。

在一個實施例中，本發明涉及一種製劑，其對於具有生長激素缺乏症的受試者可一周給藥一次。在另一個實施例中，受試者是成年人。在另一個實施例中，受試者是具有生長激素缺陷的成年人。在另一個實施例中，受試者是兒童。在另一個實施例中，受試者是具有生長激素缺陷的兒童。另一個實施例中，本發明涉及一種用於製備藥物製劑的方法，該藥物製劑對於具有生長激素缺乏症的受試者可一周給藥一次，該方法包括以下的步驟：

a. 修飾生長激素，其係將一個絨毛膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）附著到生長激素的氨基末端，和將二個絨毛膜促性腺激素羧基末端肽〈CTPs〉附著到生長激素的羧基末端；

b. 將步驟a的修飾的生長激素，緩衝液，與等滲劑等於pH=6.2-6.4中相混合；以及

c. 將所述的製劑預先填充注射器。

在一個實施例中，本發明涉及以本發明所提供的製劑預先填充注射器的方法，其包括以下的步驟：

a. 將預定量的CTP修飾的hGH（人類生長激素）配製成每週施用一次的劑量形式；及

b. 將所述製劑填充注射器。

本發明的其它的特徵和優點，經由下面的詳細描述的例子和圖式，將會變得顯而易見。然而，應理解到，顯示本發明的較佳的實施例的詳細描述和具體例子僅是以示例的方式給出，因為對於本領域的技術人員而言，從這些詳細的描述，在本發明的精神和範圍內的各種改變和修改會變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

圖1是蛋白質的印跡（Western blot），顯示下列蛋白質的分子量及特性：MOD-4020（SEQ ID NO：36），MOD-4021（SEQ ID NO：37），MOD-4022（SEQ ID NO：38），MOD-4023（SEQ ID NO：39）和MOD-4024（SEQ ID NO：40）。它們被塗上十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺凝膠（PAGE SDS gel），並用單株抗-hGH的抗體來染色。照片顯示，如商業和野生型hGH的MOD-7020-4變體可經由抗-hGH的抗體來識別。

圖2是條形圖，顯示切除垂體的大鼠在服用本發明的hGH-CTP多肽後的體重收益。

圖3包括兩個示意圖：（1）CTP-hGH-CTP-CTPpCI-dhfr的質體的圖，及（2）CTP-hGH-CTP-CTP結構蛋白的分子式。

圖4是曲線圖，顯示大鼠在CTP-hGH-CTP-CTP或GH的單個靜脈或皮下注射（n=3-6每劑/路徑）之後的 averages 的CTP-hGH-CTP-CTP或GH的血漿濃度（皮克/毫升）。

圖5是曲線圖，顯示切除垂體的大鼠在CTP-hGH-CTP-CTP（0.4，0.8和4毫克/千克）的單個皮下注射之後的平均體重的收益，其並與每日的GH的注射（0.1毫克/千克/天）（n = 10每劑量）相比較。

圖6是曲線圖，顯示大鼠在CTP-hGH-CTP-CTP的單個注射之後的有關體重收益的曲線下的面積。

圖7是曲線圖，顯示切除垂體的大鼠在CTP-hGH-CTP-CTP（0.4，0.8和4毫克/千克）的相隔4天的皮下注射的平均體重的收益，並與每日的GH的注射（0.1毫克/公斤/日）（n = 10每劑量）相比較。

圖8是曲線圖，顯示切除垂體的大鼠在CTP-hGH-CTP-CTP和商業的hGH的皮下注射後的hGH血清的濃度。0.6或1.8毫克/千克的單劑量的CTP-hGH-CTP-CTP和0.35或1.05毫克/千克的單劑量的比奧托品（Biotropin）皮下注射到切除垂體的大鼠，用來確定PK / PD的輪廓。使用特異性ELISA試劑盒來量測注射後的血清hGH。

圖9是曲線圖，顯示切除垂體的大鼠在CTP-hGH-CTP-CTP和商業的hGH的皮下注射之後的IGF-1血清的水平。0.6或1.8毫克/千克的單劑量的CTP-hGH-CTP-CTP和0.35或1.05毫克/千克的單劑量的比奧托品（Biotropin）皮下注射到切除垂體的大鼠，用來確定PK / PD的輪廓。使用特異性ELISA試劑盒（羅氏診斷公司，Roche Diagnostics）來量測注射後的血清IGF-1。

圖10是示意圖，顯示II期的研究的設計。

圖11顯示所有的組在第四周的給藥之後的IGF-1 SDS。

圖12顯示生長激素缺乏的成人在MOD-4023的皮下注射（階段I；第四的注射之後）之後的IGF-1的血漿濃度距離基線的平均變化。

圖13顯示在4個月的延長研究（52個患者）期間的 averages IGF-1的水平（在給藥後4天確定）。

圖14是示意圖，顯示MOD-4023的II期的臨床研究。

圖15是曲線圖，顯示（A）：平均的MOD-4023的周的PK分佈，和（B）：平均的hGH的日的PK分佈。

圖16是曲線圖，顯示MOD-4023的小兒II期，6個月的 averages IGF-1的SDS輪廓。

圖17是曲線圖，顯示第二周於各個最終給藥時的MOD-4023的小兒

2期，IGF-1 BP-3的輪廓。

圖 18 是曲線圖，顯示 MOD-4023 的小兒 II 期 - 六個月的平均的 IGF-1 BP-3 的輪廓。

圖 19 是曲線圖，顯示所有完成六個月的治療的患者的 MOD-4023 的小兒 II 期的 HV 的結果 - 六個月的年高度速度。

圖 20 是曲線圖，顯示 (A)：MOD-4023 的小兒 II 期的預研的 HV SDS 的結果，與 (B)：6 個月的 HV SDS 的結果。

圖 21 是曲線圖，顯示 MOD-4023 的小兒 II 期 - 在各個最終給藥的 PD (IGF-1 SDS) 的輪廓。

圖 22 是曲線圖，顯示 Δ 高度 SDS。

圖 23 是曲線圖，顯示 MOD-4023 的小兒 II 期 - 在最後終給藥的 IGF-1 的距離基線的變化。

圖 24 是表格，顯示在 10 毫莫耳的檸檬酸鹽，147 毫莫耳的氯化鈉，pH = 6 的溶液中所產生的非 GMP 和 GMP 的批量。

圖 25A 是曲線圖，顯示選殖株 2 MOD-4023 在 -20°C 下 RP-HPLCX 的穩定性。

圖 25B 是曲線圖，顯示選殖株 2 MOD-4023 在 5°C 下 RP-HPLCX 的穩定性。

圖 26 是曲線圖，顯示選殖株 2 MOD-4023 在 25°C 下 RP-HPLCX 的穩定性。

圖 27A 是曲線圖，顯示選殖株 28 (Xcellerex) 在 -20°C 下 RP-HPLCX 的穩定性。

圖 27B 是曲線圖，顯示選殖株 28 (Xcellerex) 在 5°C 下 RP-HPLCX 的穩定性。

圖 28A 是曲線圖，顯示選殖株 28 (Xcellerex) 在 25°C 下 RP-HPLCX 的穩定性。

圖28B是曲線圖，顯示選殖株2和28在5°C下RP-HPLCX的穩定性的比較。

圖29是表格，顯示自Xcellerex（XC）到Rentschler（RB）製造的MOD-4023的轉移。

30A是曲線圖，顯示Rentschler（RB）和Xcellerex（XCLX）在RP-HPLCX的穩定性的結果的差異—主峰。

圖30B是表格，顯示GMP1（RB）的主峰的穩定性的結果。

圖30C是表格，顯示XCLX的主峰的穩定性的結果（在RB測試）。

圖31A是曲線圖，顯示Rentschler（RB）和Xcellerex（XCLX）在RP-HPLCX的穩定性的結果的差異—主峰3。

圖31B是表格，顯示GMP1（RB）的主峰3的穩定性的結果（RB）。

圖31C是表格，顯示XCLX的主峰3的穩定性的結果（在RB測試）。

圖32A是曲線圖，顯示Rentschler（RB）和Xcellerex（XCLX）在RP-HPLCX的穩定性的結果的差異—主峰5。

圖32B是表格，顯示GMP1（RB）的主峰5的穩定性的結果。

圖32C是表格，顯示XCLX的主峰5的穩定性的結果（在RB測試）。

圖33A是曲線圖，顯示Xcellerex的批量的GMP 在3個月後於25°C下CRP-HPLC的穩定性的結果。主峰7在XC材料中未被觀察到。

圖33B是曲線圖，顯示Rentschler 的批量的GMP-1 的RP-HPLC的穩定性的結果。在XC材料中未被觀察到的主峰7在25°C下2周後出現。

圖34是曲線圖，顯示GMP-1在3個月後25°C下的RP-HPLC的穩定性。箭頭指向新的峰（7），其在XC材料中未被觀察到。

圖35A顯示MOD-4023的批量的IEF的輪廓。在等電點值（pI-value）從3.5到4.2的範圍有類似的帶狀圖案。在一個XCLX的批量中，在高的PI邊界有較少微弱的異構型。在RB的批量中，在低的PI邊界有較多微弱的異構型。

圖35B顯示RB和XCLX的穩定性的結果(IEF)(在25°C下3個月)。在XCLX的樣品中有較擴散的帶。

圖36顯示高溫對峰值的%的影響(選植株2)。兩個峰(3和5)的形成依賴於溫度且在高溫度下加速。

圖37顯示pH值對峰值的%的影響(選植株2)。峰3：在pH= 4培育上至5天，及在pH= 12培育上至2小時之後，峰值的%未變化。峰5：在pH= 4培育上至6小時之後，峰值的%未變化。然而，再6小時之後，峰值的%急劇增加而被觀察到。在pH=12培育2上至小時之後，峰值消失。

圖38顯示Rentschler(選植株28)的強制降解的研究。原生(上圖)和加強(下圖)的MOD-4023藥物的縮放的疊加。當未加強的藥物的峰值低於定量極限〈LOQ〉時，製備 MOD-4023 (CTP-hGH-CTP-CTP)藥物的加強的樣品(65°C下約三天)，用來進行MOD-4023藥物的有關的形狀5的分析。

圖39顯示pH值對RP-HPLC的有關的形狀的影響。試驗樣品：RB - 40毫克/毫升，pH=5.9；RB - 10毫克/毫升，pH=6.2；XCLX - 40毫克/毫升，pH=6.2。

【發明內容】

本申請案要求2013年10月21日申請的美國專利申請案公開號：US-2014-0113860-A1的效益，並要求2014年6月19日申請的美國專利申請案序列號14/309496的效益。這些申請案的全部內容被引用並併入本發明作為參考。

在一個實施例中，本發明涉及藥物製劑，該藥物製劑包含緩衝劑，等滲劑，和CTP修飾的多肽，CTP修飾的多肽係由生長激素，一個附著於該生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽(CTP)，和二個附著於該生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端

肽（**CTPs**）所組成。

在一個實施例中，本發明涉及一種製劑，該製劑可以一周一次地給藥於具有生長激素缺乏症的受試者。在另一個實施例中，受試者是成年人。在另一個實施例中，受試者是具有生長激素缺乏症的成年人。在另一個實施例中，受試者是兒童。在另一個實施例中，受試者是具有生長激素缺乏症的兒童。在另一個實施例中，本發明涉及一種用來製備藥物製劑的方法，該藥物製劑可以一周一次地給藥於具有生長激素缺乏症的受試者，該方法包括以下的步驟：

a. 修飾生長激素，其係將一個絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（**CTP**）附著於該生長激素的氨基末端的，和將二個絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（**CTPs**）附著於該生長激素的羧基末端；

b. 將步驟a的修飾的生長激素，與緩衝液，及pH = 6.2-6.4之等滲劑相混合；

c. 以製劑預填充注射器。

在一個實施例中，本發明涉及一種用來以本發明所提供的製劑填充注射器的方法，該方法包括以下的步驟：

a. 將具有預先確定的量的**CTP**修飾的人類生長激素（**hGH**）配製成每週一次的劑量形式；及

b. 將所述的製劑填充注射器。

在一個實施例中，本發明描述長效型多肽以及製備和使用它們的方法。在另一個實施例中，長效型多肽包含人類絨毛膜促性腺激素（**hCG**）的羧基末端肽（**CTP**）。在另一個實施例中，羧基末端肽（**CTP**）可作為其所衍生的蛋白質或肽的降解的防護劑。在另一個實施例中，羧基末端肽（**CTP**）可延長其所衍生的蛋白質或肽的循環半衰期。在一些實施例中，羧基末端肽（**CTP**）可增強其所衍生的蛋白質或肽的功效。

在另一個實施例中，“CTP肽”，“羧基末端肽”，“CTP序列”，和“絨毛膜促性腺激素的C-末端肽”在本文中可互換使用。在另一個實施例中，羧基末端肽是全長的CTP。在另一個實施例中，羧基末端肽是截短的CTP。每一個可能性均代表本發明的個別的實施例。

在另一個實施例中，“信號序列”和“信號肽”在本文中可互換使用。在另一個實施例中，關於多核苷酸的“序列”係指編碼部分。每一個可能性均代表本發明的個別的實施例。

在另一個實施例中，“感興趣的肽”和“感興趣的多肽的序列”在本文中可互換使用。在另一個實施例中，感興趣的肽是全長的蛋白質。在另一個實施例中，感興趣的肽是蛋白質的片段。每一個可能性均代表本發明的個別的實施例。

在另一個實施例中，本發明提供了一種包含多肽的藥物製劑，該多肽由生長激素，一個附著於該生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著於該生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTPs）所組成。在另一個實施例中，本發明提供了一種包含多肽的藥物製劑，該多肽由生長激素，一個附著於該生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），二個附著於該生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTPs），和一個附著於所述的一個絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽的氨基末端的信號肽所組成。在另一個實施例中，藥物製劑還包含緩衝劑和等滲劑。在另一個實施例中，緩衝液是10毫末耳（mM）的檸檬酸鹽，而等滲劑是147毫末耳的氯化鈉。在另一個實施例中，製劑是液體製劑。在另一個實施例中，製劑的pH值約6.2。

在另一個實施例中，本發明提供包含本文所提供的藥物製劑的每週一次的劑型。

在另一個實施例中，本發明提供了一種包含多肽的藥物組合物，

該多肽由生長激素，一個附著於生長激素的氨基末端的單絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽，以及兩個附著於生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽。在另一個實施例中，本發明提供了一種包含多肽的藥物組合物，該多肽由生長激素，一個附著於生長激素的氨基末端的單絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽，二個附著於生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽，和一個附著於所述的一個絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽的氨基末端的信號肽。

在另一個實施例中，含有如本文所述的羧基末端肽〈CTPs〉的生長激素，比起不含有CTP的相同的生長激素，具有增強的體內生物活性。在另一個實施例中，含有至少一個附著到其氨基末端的CTP和至少兩個附著到其羧基末端的CTPs的生長激素，比起不含有CTP的相同的生長激素，具有增強的體內生物活性。在另一個實施例中，含有一個附著到其氨基末端的CTP和兩個附著到其羧基末端的CTPs的生長激素，比起不含有CTP的相同的生長激素，具有增強的體內生物活性。

在另一個實施例中，提供一種多肽，該多肽包含至少兩個附著於感興趣的多肽序列的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP）序列，其中至少兩個CTP序列的第一個CTP序列附著於感興趣的多肽序列的氨基末端，而至少兩個CTP序列的第二個CTP序列附著於感興趣的多肽序列的羧基末端。在另一個實施例中，羧基末端肽（CTP）序列是人類絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP）序列。

在另一個實施例中，受試者是人類受試者。在另一個實施例中，受試者是寵物。在另一個實施例中，受試者是哺乳動物。在另一個實施例中，受試者是農場動物。在另一個實施例中，受試者是狗。在另一個實施例中，受試者是貓。在另一個實施例中，受試者是猴子。在另一個實施例中，受試者是馬。在另一個實施例中，受試者是牛。在另一個實施例中，受試者是小鼠。在另一個實施例中，受試者是大鼠。

在一個實施例中，受試者是男性。在另一個實施例中，受試者是女性。在另一個實施例中，受試者是青春期前生長激素缺乏（GHD）的兒童。如本文所顯示，各種劑量的MOD-4023（CTP-hGH-CTP-CTP）可提供給青春期前的兒童好的追趕生長的響應（參見實施例10）。

術語“感興趣的多肽序列”（"polypeptide sequence of interest"）是指，在另一個實施例中，任何多肽序列，例如包含生物活性的多肽序列。在另一個實施例中，肽被糖基化。在另一個實施例中，肽是非糖基化。循環半衰期可被延長的多肽的例子包括，但不限於：促紅細胞生成素（EPO），干擾素，人類生長激素（hGH），和胰高血糖素樣的肽-1（GLP-1）。

在另一個實施例中，如本文中所描述的CTP-生長激素-CTP-CTP的組態包括生長激素，或其經由肽鍵連接到至少一個CTP單位的活性片段。在另一個實施例中，如本文中所描述的CTP-生長激素-CTP-CTP包括生長激素，或其經由肽鍵連接至少一個CTP單位的活性片段，該至少一個CTP單位經由肽鍵連接到一個另外的CTP單位。在另一個實施例中，如本文所述的多肽，其所包括的生長激素片段和CTP單位和/或其片段經由肽鍵相互連接。在另一實施例中，一種核酸分子編碼如本文所述的多肽，該肽包括生長激素和/或其片段和CTP單位和/或其片段。

在另一個實施例中，羧基末端肽（CTP）經由連接子附著到感興趣的多肽序列。在另一個實施例中，至少一個CTP選擇性地經由連接子附著到所述的感興趣的多肽序列。在另一個實施例中，將CTP序列連接到感興趣的多肽序列的连接子是共價鍵。在另一個實施例中，將CTP序列連接到感興趣的多肽序列的连接子是肽鍵。在另一個實施例中，將CTP序列連接到感興趣的多肽序列的连接子是取代的肽鍵。在另一個實施例中，羧基末端肽（CTP）序列包含選自SEQ ID NO: 48中

所列的序列的胺基酸序列。

在另一個實施例中，SEQ ID NO: 48包含下列的胺基酸（AA）序列：DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILQ（SEQ ID NO: 48）。

在另一個實施例中，人類絨毛膜促性腺激素（hCG）的羧基末端肽（CTP）被融合到蛋白質。在另一個實施例中，人類絨毛膜促性腺激素（hCG）的羧基末端肽（CTP）被融合到糖蛋白。在另一個實施例中，人類絨毛膜促性腺激素（hCG）的羧基末端肽（CTP）被融合到糖蛋白激素。在另一個實施例中，人類絨毛膜促性腺激素（hCG）的羧基末端肽（CTP）被融合於衍生自糖蛋白激素的肽。在一些實施例中，糖蛋白激素包括促紅細胞生成素（EPO），濾泡刺激素（FSH），或促甲狀腺激素（TSH）和衍生的肽。

在一些實施例中，多肽的氨基末端及多肽的羧基末端的CTP序列提供增強的保護，防止蛋白質的降解。在一些實施例中，多肽的氨基末端及多肽的羧基末端的CTP序列可所延長附著的蛋白質的半衰期。

在一些實施例中，多肽的氨基末端的CTP序列，多肽的羧基末端的CTP序列，以及至少一個另外的串聯地附著在羧基末端的CTP序列的CTP序列提供增強的保護，可防止蛋白質的降解。在一些實施例中，多肽的氨基末端的CTP序列，多肽的羧基末端的CTP序列，以及至少一個另外的串聯地附著在羧基末端的CTP序列的CTP序列可延長所附著的蛋白質的半衰期。在一些實施例中，多肽的氨基末端的CTP序列，多肽的羧基末端的CTP序列，以及至少一個另外的串聯地附著在羧基末端的CTP序列的CTP序列可增強所附著的蛋白質的活性。

在一些實施例中，多肽的氨基末端的CTP序列，多肽的羧基末端的CTP序列，以及至少一個串聯附著在氨基末端的CTP序列提供增強的保護，可防止所附著的蛋白的降解。在一些實施例中，多肽的氨基末端的CTP序列，多肽的羧基末端的CTP序列，以及至少一個串聯地附著

在氨基末端的CTP序列的另外的CTP序列可延長所附著的蛋白質的半衰期。在一些實施例中，多肽的氨基末端的CTP序列，多肽的羧基末端的CTP序列，以及至少一個串聯地附著在氨基末端的CTP序列的另外的CTP序列可增強所附著的蛋白質的活性。

在一些實施例中，生長激素的氨基末端和生長激素的羧基末端的CTP序列提供增強的保護，可防止生長激素的降解。在另一個實施例中，至少一個生長激素的氨基末端的CTP序列，和兩個生長激素的羧基末端的CTP單位提供增強的保護，可防止清除。在另一個實施例中，至少一個生長激素的氨基末端的CTP序列，和兩個生長激素的羧基末端的CTP單位可延長清除時間。在另一個實施例中，至少一個生長激素的氨基末端的CTP序列，和兩個生長激素的羧基末端的CTP單位可提高生長激素的C_{max}。在另一個實施例中，至少一個生長激素的氨基末端的CTP序列，和兩個生長激素的羧基末端的CTP單位可提高生長激素的T_{max}。在另一個實施例中，至少一個生長激素的氨基末端的CTP序列，和兩個生長激素的羧基末端的CTP單位可提高提T_{1/2}。

在一些實施例中，生長激素的氨基末端和生長激素的羧基末端的CTP序列可延長修飾的生長激素的半衰期。在另一個實施例中，至少單一的生長激素的氨基末端的CTP序列，和至少兩個生長激素的羧基末端的CTP序列可延長修飾的生長激素的半衰期。在另一個實施例中，單一的生長激素的氨基末端的CTP序列，和兩個生長激素的羧基末端的CTP序列可延長所附著的生長激素的半衰期。在另一個實施例中，單一的生長激素的氨基末端的CTP序列，和兩個串聯的生長激素的羧基末端的CTP序列可延長修飾的生長激素的半衰期。

在一些實施例中，多肽的氨基末端的CTP序列，生長激素的羧基末端的CTP序列，以及至少一個串聯地附著在羧基末端的CTP序列的另外的CTP序列可提供增強的保護，防止生長激素的降解。在一些實施

例中，生長激素的氨基末端的CTP序列，生長激素的羧基末端的CTP序列，以及至少一個串聯地附著在羧基末端的CTP序列的另外的CTP序列可延長生長激素的半衰期。在一些實施例中，生長激素的氨基末端的CTP序列，生長激素的羧基末端的CTP序列，以及至少一個串聯地附著在羧基末端的CTP序列的另外的CTP序列可增強生長激素的生物活性。

在另一個實施例中，本發明的羧基末端肽（CTP）的肽包含人類絨毛膜促性腺激素的由胺基酸112到145的胺基酸序列，如SEQ ID NO：17之所列。在另一個實施例中，本發明的CTP序列包含人類絨毛膜促性腺激素的由胺基酸118到145的胺基酸序列，如SEQ ID NO：18之所列。在另一個實施例中，CTP序列也開始於人類絨毛膜促性腺激素的位置112-118之間的任何位置，並終止於位置145。在一些實施例中，CTP序列的肽是28、29、30、31、32、33或34個胺基酸長度，並開始於CTP胺基酸序列的位置112、113、114、115、116、117、或118。

在另一個實施例中，CTP肽是絨毛膜促性腺激素CTP的變體，其不同於天然CTP的地方在於1-5個保守胺基酸的置換，如美國專利5712122案之所述。在另一個實施例中，CTP肽是絨毛膜促性腺激素CTP的變體，其不同於天然CTP的地方在於1個保守胺基酸的置換。在另一個實施例中，CTP肽是絨毛膜促性腺激素CTP的變體，其不同於天然CTP的地方在於2個保守胺基酸的置換。在另一個實施例中，CTP肽是絨毛膜促性腺激素CTP的變體，其不同於天然CTP的地方在於3個保守胺基酸的置換。在另一個實施例中，CTP肽是絨毛膜促性腺激素CTP的變體，其不同於天然CTP的地方在於4個保守胺基酸的置換。在另一個實施例中，CTP肽是絨毛膜促性腺激素CTP的變體，其不同於天然CTP的地方在於5個保守胺基酸的置換。在另一個實施例中，本發明的CTP肽胺基酸序列至少70%同源性於天然CTP胺基酸序列或其肽。在另

一個實施例中，本發明的CTP肽胺基酸序列至少80％同源性於天然CTP胺基酸序列或其肽。在另一個實施例中，本發明的CTP肽胺基酸序列至少90％同源性於天然CTP胺基酸序列或其肽。在另一個實施例中，本發明的CTP肽胺基酸序列至少95％同源性於天然CTP胺基酸序列或其肽。

另一個實施例中，本發明的CTP肽的DNA序列至少70％同源性於天然CTP的 DNA序列或其肽。在另一個實施例中，本發明的CTP肽的DNA序列至少80％同源性於天然CTP的 DNA序列或其肽。在另一個實施例中，本發明的CTP肽的DNA序列至少90％同源性於天然CTP的 DNA序列或其肽。在另一個實施例中，本發明的CTP肽的DNA序列至少95％同源性於天然CTP的 DNA序列或其肽。

在一個實施例中，至少一個絨毛膜促性腺激素的CTP胺基酸序列被截短。在另一個實施例中，絨毛膜促性腺激素的CTP胺基酸序列二者被截短。在另一個實施例中，絨毛膜促性腺激素的CTP胺基酸序列中的2個被截短。在另一個實施例中，2個或更多的絨毛膜促性腺激素CTP胺基酸序列被截短。在另一個實施例中，所有的絨毛膜促性腺激素CTP胺基酸序列被截短。在一個實施例中，截短的CTP包含SEQ ID NO:43的首先的10個胺基酸。在一個實施例中，截短的CTP包含SEQ ID NO:43的首先的11個胺基酸。在一個實施例中，截短的CTP包含SEQ ID NO:43的首先的12個胺基酸。在一個實施例中，截短的CTP包含SEQ ID NO:43的首先的13個胺基酸。在一個實施例中，截短的CTP包含SEQ ID NO:43的首先的14個胺基酸。在一個實施例中，截短的CTP包含SEQ ID NO:43的首先的15個胺基酸。在一個實施例中，截短的CTP包含SEQ ID NO:43的首先的16個胺基酸。在一個實施中，截短的CTP包含SEQ ID NO:43的最後的14個胺基酸。

在一個實施例中，絨毛膜促性腺激素的CTP胺基酸序列中的至少

一個被糖基化。在另一個實施例中，絨毛膜促性腺激素的CTP胺基酸序列之二者被糖基化。在另一個實施例中，2個絨毛膜促性腺激素的CTP胺基酸序列被糖基化。在另一個實施例中，2個或更多的絨毛膜促性腺激素的CTP胺基酸序列被糖基化。在另一個實施例中，所有絨毛膜促性腺激素的CTP胺基酸序列被糖基化。在一個實施例中，本發明的CTP序列包含至少一個糖基化位點。在一個實施例中，本發明的CTP序列包含2個糖基化位點。在一個實施例中，本發明的CTP序列包含3個糖基化位點。在一個實施例中，本發明的CTP序列包含4個糖基化位點。每一個可能性均代表本發明的個別的實施例。

在一些實施例中，根據本發明，“同源性”（“homology”）還包括它們的刪除，插入，或取代的變體，包括其胺基酸取代物，以及其生物活性多肽片段。

在一些實施例中，人類生長激素（hGH）根據本發明的教示而被利用。在一些實施例中，CTP序列附著到hGH蛋白質的氨基與羧基末端二者會導致效力的增加（圖2、圖3、圖5、圖7和圖9）。在一些實施例中，CTP序列附著到hGH蛋白質的氨基與羧基末端二者會增強體內活性。在一個實施例中，本發明的CTP-hGH多肽是SEQ ID NO：39-41之所列。

如本文所提供，切除垂體的大鼠（他們沒有生長激素的分泌）在CTP-hGH的注射之後顯示出生長的收益。如本文進一步所提供，與病人的追趕生長有良好相關性的生長的收益被青春期前生長激素缺乏的兒童所顯示（參見本文中的例子10）。

在一個實施例中，本文提供一種方法，用來使青春期前生長激素缺乏的兒童恢復正常的生長，該方法包括施用含有本發明所提供的CTP修飾的生長激素的藥物組合物。在另一個實施例中，本文提供恢復青春期前生長激素缺乏的兒童的生長的方法，該方法包括施用含有

本發明所提供的CTP修飾的生長激素的藥物組合物。

在一個實施例中，“人類生長激素”（“human growth hormone”（hGH））係指一種表現出hGH的活性（即，生長的刺激）的多肽，如 Genbank Accession No. P01241（SEQ ID NO：47）之所列。

在另一個實施例中，本發明的“GH”也指同源物。在另一個實施例中，本發明的方法和組合物中的GH（生長激素）胺基酸序列至少50%同源於本文所述的GH序列，其使用生物技術資訊國家中心（NCBI）的BLASTP軟體利用默認參數來確定。在另一個實施例中，同源性百分比為60%。在另一個實施例中，同源性百分比為70%。在另一個實施例中，同源性百分比為80%。在另一個實施例中，同源性百分比為90%。在另一個實施例中，同源性百分比至少95%。在另一個實施例中，同源性百分比大於95%。每一個可能性均代表本發明的個別的實施例。

本發明的示例性的CTP-GH多肽和CTP-hGH多肽被列於SEQ ID NO：39、SEQ ID NO：40和SEQ ID NO：41中。

在另一個實施例中，本發明的方法提供了一種生長激素（GH）的肽，其另外具有用來刺激肌肉生長的至少一個在N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個在C-末端的CTP胺基酸肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供了GH肽，其另外具有用來刺激肌肉生長的一個在N-末端的CTP胺基酸肽和二個在C-末端的CTP胺基酸肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供了如SEQ ID NO：23所列的生長激素的肽，其另外具有用來刺激肌肉生長的至少一個在N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個在C-末端的CTP胺基酸肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供了如SEQ ID NO：36所列的生長激素的肽，其另外具有用來刺激肌肉生長的至少一個在N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個在C-末端的CTP胺基酸肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供了如SEQ ID NO：37

所列的生長激素的肽，其另外具有用來刺激肌肉生長的至少一個在N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個在C-末端的CTP胺基酸肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供了如SEQ ID NO：38所列的生長激素的肽，其另外具有用來刺激肌肉生長的至少一個在N-末端的CTP胺基酸肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供了如SEQ ID NO：39所列的用來刺激肌肉生長的生長激素的肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供了如SEQ ID NO：40所列的用來刺激肌肉生長的生長激素的肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供了如SEQ ID NO：41所列的用來刺激肌肉生長的生長激素的肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供了如SEQ ID NO：42所列的生長激素的肽，其另外具有用來刺激肌肉生長的至少一個在N-末端的CTP胺基酸肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供了用來刺激肌肉生長的如本文所提供的被CTP修飾的生長激素肽。

在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外具有用來刺激肌肉生長的至少一個在N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個在C-末端的CTP胺基酸肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外具有用來刺激肌肉生長的一個在N-末端的CTP胺基酸肽和二個在C-末端的CTP胺基酸肽。在一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：44的核酸，該GH肽包括用來刺激肌肉生長的一個在N-末端的CTP胺基酸肽和一個在C-末端的CTP胺基酸肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：45的核酸，該GH肽包括用來刺激肌肉生長的一個在N-末端的CTP胺基酸肽和二個在C-末端的CTP胺基酸肽。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：46的核酸，該GH肽包括用來刺激肌肉生長的一個在N-末端的CTP胺基酸肽和二個在C-末端的CTP胺基酸肽。

在一個實施例中，本發明提供了減少受試者的生長激素的給藥頻率的方法，該方法包括給予受試者治療上有效量的多肽，該多肽包括生長激素，一個附著在生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著在生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTPs），且其中所述的多肽選擇性地包括附著於所述的一個CTP的氨基末端的信號肽，藉此降低受試者的生長激素的給藥頻率。

在另一個實施例中，本發明提供一種改善受試者的生長激素的曲線下的面積（AUC）的方法，該方法包括給受試者施用治療上有效量的多肽，該多肽包括生長激素，一個附著在生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著在生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTPs），且其中所述的多肽選擇性地包括附著於所述的一個CTP的氨基末端的信號肽，藉此降低受試者的生長激素的給藥頻率。

在一個實施例中，本發明提供一種需要生長激素療法的受試者的治療方法，該方法包括給受試者施用治療上有效量的多肽，該多肽包括生長激素，一個附著在生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著在生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTPs），且其中所述的多肽選擇性地包括附著於所述的一個CTP的氨基末端的信號肽，藉此降低受試者的生長激素的給藥頻率。

在另一個實施例中，本發明提供一種提高受試者的胰島素樣生長因子（IGF-1）的水平的方法，該方法包括給受試者施用治療上有效量的多肽，該多肽包括生長激素，一個附著在生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著在生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTPs），且其中所述的多

肽選擇性地包括附著於所述的一個**CTP**的氨基末端的信號肽，藉此提高受試者的胰島素樣生長因子（**IGF-1**）的水平。

在另一個實施例中，本發明提供一種提高受試者的胰島素樣生長因子（**IGF-1**）的水平的方法，該方法包括給受試者施用治療上有效量的多肽，該多肽包括生長激素，一個附著在生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（**CTP**），和二個附著在生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（**CTPs**），且其中所述的多肽選擇性地包括附著於所述的一個**CTP**的氨基末端的信號肽，藉此保持受試者的胰島素樣生長因子（**IGF-1**）的水平。在另一個實施例中，**IGF-1**的水平被保持在一個限定的範圍內，如本文進一步所提供的。

在另一個實施例中，本發明提供一種提高及保持受試者的胰島素樣生長因子（**IGF-1**）的水平在一個限定的範圍內的方法，該方法包括給受試者施用治療上有效量的多肽，該多肽包括生長激素，一個附著在生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（**CTP**），和二個附著在生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（**CTPs**），且其中所述的多肽選擇性地包括附著於所述的一個**CTP**的氨基末端的信號肽，藉此提高及保持受試者的胰島素樣生長因子（**IGF-1**）的水平在一個限定的範圍內。

在另一個實施例中，所限定的範圍是施用本發明所提供的**CTP**修飾的生長激素達到治療劑量的範圍。在另一個實施例中，所限定的範圍是這樣的一個範圍，其中在**CTP**修飾的生長激素的連續給藥下保持了**IGF-1**的正弦行為的**Cmax**〈最高濃度〉和**Ctrough**〈最低濃度〉，如本文進一步所提供的（參見例子15）。在另一個實施例中，所限定的範圍是連續給予本發明所提供的**CTP**修飾的生長激素的治療劑量的範圍，而受試者的反應良好，且劑量調整的需要最小。在另一個實施例中，所限定的範圍比得上被認為是正常的個人的**IGF-1**水平的範圍。在

另一個實施例中，所限定的範圍是正常個人的IGF-1水平/值的正常範圍。在又另一個實施例中，所限定的範圍是在IGF-1的SDS〈標準差比分〉值在 ± 2 SDS內的正常範圍。

在另一個實施例中，本發明的方法提供任何本文所描述的用來刺激骨生長的CTP修飾的生長激素（GH）的肽。

在另一個實施例中，本發明的方法提供了編碼任何本文所描述的用來刺激骨生長的CTP修飾的生長激素（GH）肽的核酸序列。

在另一個實施例中，本發明的複合的生長激素以相同於未修飾的生長激素的使用方式被使用。在另一個實施例中，本發明的複合的生長激素具有增加的循環半衰期和血漿停留時間，降低的清除率，及提高的體內臨床活性。在另一實施例中，由於如本文所述的複合的生長激素的改進的性能，這些複合物給藥頻率低於未修飾的生長激素的給藥頻率。在另一個實施例中，如本文所述的複合的生長激素的給藥為每二週一次至每三週一次。在另一個實施例中，如本文所述的複合的生長激素的給藥為一天一次至一週三次。在另一個實施例中，給藥頻率的降低將導致患者順應性的改善，進而提高治療的效果，以及改善患者的生活品質。在另一個實施例中，已經發現到，相較於連接於聚（乙二醇）的生長激素的傳統的複合物，具有本發明的複合物的分子量和連接子結構的生長激素CTP的複合物具有改善的效力，改善的穩定性，提高的AUC的水平，增長的循環半衰期。在另一個實施例中，已經發現到，相較於連接於聚（乙二醇）的生長激素的傳統的複合物，具有本發明的複合物的分子量和連接子結構的生長激素具有改善的效力，改善的穩定性，提高的AUC的水平，增長的循環半衰期。在另一個實施例中，複合的生長激素的治療有效量是體內可量測的希望的生物活性的必要的複合物的量。在另一個實施例中，根據本發明的教示而被使用的生長激素表現出增強的效力。在一些實施例中，附著在生

長激素的氨基和羧基末端的CTP序列導致體內活性的增強。

在另一個實施例中，複合的生長激素的治療有效量的決定係根據幾個因素，如被治療的病症的確切的類型，被治療的患者的情況，以及組合物中其他的成分。在另一個實施例中，複合的生長激素的治療有效量為在每週施用一次時每公斤體重0.01至10微克。在另一個實施例中，複合的生長激素的治療有效量為在每週給藥一次時每公斤體重0.1至1微克。在另一個實施例中，包含複合的生長激素的藥物組合物，係以經由各種方式施予人類患者的有效給藥的強度而被配製。

在另一個實施例中，生長激素是本領域技術人員已知的任何的生長激素。在另一個實施例中，生長激素是人類生長激素。在另一個實施例中，生長激素是非人類生長激素。在另一個實施例中，生長激素的核苷酸序列和/或胺基酸序列可由基因銀行數據庫中獲得。在另一個實施例中，生長激素是同源物。在另一個實施例中，同源物也指刪除，插入，或取代的變體，包括其胺基酸的取代，和其生物活性的多肽片段。

在另一種實施例中，生長激素是缺少外顯子2，3，4的hGH的變體，或它們的任意組合。在另一個實施例中，生長激素包括信號肽。在另一個實施例中，生長激素包括信號裂解位點。在另一個實施例中，含有本發明的被CTPs修飾的生長激素的多肽包含重組的生長激素。

在另一個實施例中，本發明的方法提供了本發明的生長激素的肽，用來保持肌肉的品質。

在另一個實施例中，本發明的方法提供了本發明的生長激素，用來保持骨的品質。

在另一個實施例中，本發明的方法提供了本發明的GH-CTP的核酸序列，用來維持骨的品質。

在另一個實施例中，本發明的方法提供了任何本文所述的CTP修

飾的生長激素的肽，用來治療萎縮疾病。

1在另一個實施例中，本發明的方法提供了編碼任何本文所述的CTP修飾的GH肽的核酸序列，用來治療萎縮疾病。

在另一個實施例中，本發明的方法提供任何本文所述的CTP修飾的GH肽，用來提高心臟的功能。

在另一個實施例中，本發明的方法提供了編碼任何本文所述的CTP修飾的GH肽的核酸序列，用來提高心臟的功能。

在另一個實施例中，本發明的方法提供了本文所述的生長激素多肽，用來增加脂解作用。

在另一個實施例中，本發明的方法提供了編碼任何本文所述的CTP修飾的GH肽的核酸序列，用來增加脂解作用。

在另一個實施例中，本發明的方法提供任何本文所述的CTP修飾的GH肽，用來改善體液的平衡。

在另一個實施例中，本發明的生長激素包括登錄號 AAA72260的基因銀行保藏的胺基酸序列。在另一個實施例中，本發明的生長激素包括登錄號AAK69708的基因銀行保藏的胺基酸序列。在另一個實施例中，本發明的生長激素包括登錄號CAA01435的基因銀行保藏的胺基酸序列。在另一個實施例中，本發明的生長激素包括登錄號CAA01329的基因銀行保藏的的胺基酸序列。在另一個實施例中，本發明的生長激素包括登錄號CAA00380的基因銀行保藏的胺基酸序列。在另一個實施例中，本發明的生長激素包括登錄號AAA72555的基因銀行保藏的胺基酸序列。在另一個實施例中，本發明的生長激素包括登錄號NP_000506.2的基因銀行保藏的胺基酸序列。在另一個實施例中，本發明的生長激素包括登錄號NP_072053.1的基因銀行保藏的胺基酸序列。在另一個實施例中，本發明的生長激素包括登錄號NP_072054.1的基因銀行保藏的胺基酸序列。在另一個實施例中，本發明的生長激

素包括登錄號NP_072055.1的基因銀行保藏的胺基酸序列。在另一個實施例中，本發明的生長激素包括登錄號NP_072056.1的基因銀行保藏的胺基酸序列。

在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善體液的平衡。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少二個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善體液的平衡。在一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：44的核酸，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和一個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善體液的平衡。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：45的核酸，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善體液的平衡。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：46的核酸，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善體液的平衡。

在另一個實施例中，本發明的方法提供一種GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種GH肽，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：23所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：36所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一

個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：37所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：38所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：39所列的GH肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：40所列的GH肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：41所列的GH肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：42所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如本文所提供的CTPs修飾的GH肽，用來治療骨質疏鬆症。

在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。在一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：44的核酸序列，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和一個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：45的核酸序列，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：46的核酸序列，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和

二個C末端的CTP胺基酸肽，用來治療骨質疏鬆症。

在另一個實施例中，本發明的方法提供一種GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種GH肽，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：23所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：36所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：37所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：38所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：39所列的GH肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：40所列的GH肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：41所列的GH肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：42所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如本文所提供的CTPs修飾的GH肽，用來抑制骨質疏鬆症。

在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C

末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。在一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的SEQ ID NO：44的核酸序列，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和一個C末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的SEQ ID NO：45的核酸序列，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的SEQ ID NO：46的核酸序列，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來抑制骨質疏鬆症。

在另一個實施例中，本發明的方法提供本發明的生長激素（GH）肽，用來改善運動能力。

在另一個實施例中，本發明的方法提供一種GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種GH肽，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：23所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：36所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：37所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：38所

列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：39所列的GH肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：40所列的GH肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：41所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：42所列的GH肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供如本文所提供的CTPs修飾的生長激素（GH）肽，用來改善肺的功能。

在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。在一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的SEQ ID NO：44的核酸序列，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和一個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：45所列的GH肽，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如SEQ ID NO：46所列的GH肽，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善肺的功能。

在另一個實施例中，本發明的方法提供一種GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種

SEQ ID NO：23中所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：36中所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C末端的CTP胺基酸肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：37中所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：38中所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：39中所列的GH肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：40中所列的GH肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：41中所列的GH肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：42中所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如本文所提供的CTPs修飾的生長激素（GH）肽，用來改善免疫力。

在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C-末端的CTP胺基酸肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來改善免疫力。在一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的SEQ ID NO：44的核酸序列，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和一個C-末端的CTP胺基酸肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的SEQ ID NO：45的核酸序列，該GH肽具有一個

N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來改善免疫力。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的SEQ ID NO：46的核酸序列，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來改善免疫力。

在另一個實施例中，本發明的方法提供一種GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種GH肽，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：23中所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：36中所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：37中所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：38中所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：39中所述的GH肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：40中所列的GH肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：41中所列的GH肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：42中所列的GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如

本文所提供的CTPs修飾的生長激素(GH)肽，用來再生長重要的器官。

在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的SEQ ID NO：44的核酸序列，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和一個C-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的SEQ ID NO：45的核酸序列，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種編碼GH肽的SEQ ID NO：46的核酸序列，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來再生長重要的器官。

在另一個實施例中，本發明的方法提供一種本發明的GH肽，用來增加健康幸福感。

在另一個實施例中，本發明的方法提供一種GH肽，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C-末端的CTP胺基酸肽，用來恢復快速眼動睡眠(REM sleep)。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種GH肽，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來恢復快速眼動睡眠。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：23中所列的GH肽，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來恢復快速眼動睡眠。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：36中所列的GH肽，該GH肽另外地具有一個N-

末端的CTP胺基酸肽，用來恢復快速眼動睡眠。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：37中所列的GH肽，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來恢復快速眼動睡眠。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：38中所列的GH肽，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽，用來恢復快速眼動睡眠。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：39中所列的GH肽，用來恢復快速眼動睡眠。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：40中所列的GH肽，用來恢復快速眼動睡眠（REM sleep）。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：41中所列的GH肽，用來恢復快速眼動睡眠。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種SEQ ID NO：42中所列的GH肽，用來恢復快速眼動睡眠。在另一個實施例中，本發明的方法提供一種如本文所提供的CTPs修飾的生長激素（GH）肽，用來恢復快速眼動睡眠。

在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有至少一個N-末端的CTP胺基酸肽和至少一個C-末端的CTP胺基酸肽，用來恢復快速眼動睡眠。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的核酸序列，該GH肽另外地具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來恢復快速眼動睡眠。在一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：44的核酸序列，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和一個C-末端的CTP胺基酸肽，用來恢復快速眼動睡眠。在一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：45的核酸序列，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來恢復快速眼動睡眠。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼GH肽的SEQ ID NO：46的核酸序列，該GH肽具有一個N-末端的CTP胺基酸肽和二個C-末端的CTP胺基酸肽，用來恢復快速眼動睡眠。

在另一個實施例中，本發明的方法提供如本文所述的編碼GH蛋白的核酸序列。在另一個實施例中，本發明的方法提供如本文所述的編碼生長激素蛋白的核酸序列。在另一個實施例中，本發明的方法提供編碼多肽的核酸序列，該多肽包含CTPs 修飾的人類生長激素（hGH），用來刺激肌肉的生長，增加心臟的功能，刺激骨的生長，維持肌肉的完整性，平衡肌肉的代謝作用，誘發肌肉的積聚，誘導新生肌肉的積聚，增強骨骼的負荷，治療與骨質疏鬆症有關的症狀，治療消耗性疾病，增加脂肪的分解，改善體液的平衡，治療骨質疏鬆症，改善心肺的功能，改善免疫力，再生長重要的器官，增加健康幸福感，恢復快速眼動睡眠，或者它們的任意組合。

在一些實施例中，根據本發明，“同源性”也包括它們的刪除，插入，或取代的變體，包括胺基酸取代，和其生物活性的多肽片段。在一個實施例中，取代的變體是這樣的一個變體，其中人類生長激素（hGH）的第65位點的谷氨酰胺被纈氨酸所取代[Gellerfors等人，J Pharm Biomed Anal1989，7：173-83]。

在另一個實施例中，如本文中所述的編碼生長激素的核酸分子，其編碼本領域技術人員已知的任何生長激素的胺基酸序列。在另一個實施例中，如本文中所述的編碼生長激素的核酸分子，其編碼人類生長激素（hGH）。在另一個實施例中，編碼生長激素的核酸分子包括登錄號NM_000515.3的基因銀行保藏的核酸的序列。在另一個實施例中，編碼生長激素的核酸分子包括登錄號NM_022559.2的基因銀行保藏的核酸的序列。在另一個實施例中，編碼生長激素的核酸分子包括登錄號NM_022560.2的基因銀行保藏的核酸的序列。在另一個實施例中，編碼生長激素的核酸分子包括登錄號NM_022561.2的基因銀行保藏的核酸的序列。在另一個實施例中，編碼生長激素的核酸分子包括登錄號NM_022562.2的基因銀行保藏的核酸的序列。

在一個實施例中，同源物也指它們的刪除，插入，或取代的變體，包括胺基酸的取代，和生物學活性的多肽片段。

在另一實施例中，感興趣的多肽序列是人類生長激素（hGH）。在另一實施例中，感興趣的多肽序列是包括任何修飾形式的肽或蛋白質。

在另一個實施例中，本發明的方法提供人類生長激素（hGH），該人類生長激素另外地具有至少一個N末端的CTP胺基酸肽和至少一個C-末端的CTP胺基酸肽，用來治療消耗性疾病，艾滋病（AIDS），惡病質，或人類生長激素缺乏症等。

在一個實施例中，本發明被應用在獸醫學中。在一個實施例中，本發明提供家養哺乳動物的治療，這些動物保持為人類的夥伴（例如，狗，貓，馬），這些動物具有顯著的商業價值（例如，奶牛，肉牛，體育動物），這些動物具有顯著的科學價值（例如，瀕危物種的圈養的或自由的物種），或具有其他的價值。

在一些實施例中，CTP序列的修飾有利於更低劑量的使用。

在一些實施例中，本文所用的“多肽”包括原生的多肽（無論是降解產物，人工合成的合成多肽，或重組的多肽），和多肽的類似物：類肽（一般地，合成的多肽），以及擬肽，和半擬肽，在一些實施例中，它們具有修飾而使多肽在體內甚至更穩定，更能夠穿透到細胞中。

在一些實施例中，修飾包括，但不限於N末端的修飾，C末端的修飾，多肽鍵結的修飾，包括，但不限於， $\text{CH}_2\text{-NH}$ ， $\text{CH}_2\text{-S}$ ， $\text{CH}_2\text{-S}=\text{O}$ ， $\text{O}=\text{C-NH}$ ， $\text{CH}_2\text{-O}$ ， $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ， $\text{S}=\text{C-NH}$ ， $\text{CH}=\text{CH}$ ，或 $\text{CF}=\text{CH}$ ，主鏈的修飾，以及殘基的修飾。製備肽模擬物的化合物的方法在本技藝領域中係屬公知，其被說明於，例如，定量藥物的設計，C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)，其被引用併入本文中作為參考，如在此的完整的闡述。下文將提供這方

面進一步的細節。

在一些實施例中，多肽中的多肽鍵（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）被取代。在一些實施例中，多肽鍵被N-甲基化鍵（ $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CO}-$ ）取代。在一些實施例中，多肽鍵被酯鍵（ $-\text{C}(\text{R})-\text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{O}-\text{C}(\text{R})-\text{N}-$ ）取代。在一些實施例中，多肽鍵被亞甲基酮鍵（ $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ）取代。在一些實施例中，多肽鍵被*氮雜鍵（ $-\text{NH}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$ ）取代，其中R是任何烷基，例如，甲基，碳代鍵（ $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ）。在一些實施例中，多肽鍵被羥基亞乙基鍵（ $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$ ）取代。在一些實施例中，多肽鍵被硫代酰胺鍵（ $-\text{CS}-\text{NH}-$ ）取代。在一些實施例中，多肽鍵被烯烴雙鍵（ $-\text{CH}=\text{CH}-$ ）取代。在一些實施例中，多肽鍵被後向酰胺鍵（ $-\text{NH}-\text{CO}-$ ）取代。在一些實施例中，多肽鍵被多肽衍生物（ $-\text{N}(\text{R})-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ）取代，其中R是“正常的”側鏈，即，自然呈現在碳原子上的。在一些實施例中，這些修飾發生在沿著多肽鏈上的任何鍵，且甚至同時發生在幾個鍵（2-3個鍵）上。

在一些實施例中，多肽的天然芳香族胺基酸，如色胺酸（**Trp**），酪胺酸（**Tyr**），和苯丙胺酸（**Phe**）被合成的非天然的胺基酸所取代，非天然的胺基酸，如苯甘胺酸，四羥基異喹啉-3-甲酸【蒂克（**TIC**）】，萘基丙胺酸（朗諾）（**No1**），苯丙胺酸的環 - 甲基衍生物，苯丙胺酸和鄰甲基酪胺酸的鹵化衍生物。在一些實施例中，本發明的多肽包含一個或多個修飾的胺基酸，或一個或多個非胺基酸單體（例如脂肪酸，複合碳水化合物等）。

在一個實施例中，“胺基酸”（"amino acid"）被理解為包括20種天然存在的胺基酸；這些胺基酸往往在體內轉化後被修飾，其包括，例如，羥脯胺酸，磷酸絲胺酸，和磷酸蘇胺酸；和其它不尋常的胺基酸，包括但不限於：2-氨基己二酸，羥賴胺酸，異鎖鏈素，正纈胺酸，正亮胺酸，和鳥胺酸。在一個實施例中，“胺基酸”包括D-和L-胺基酸二

者。

在一個實施例中，本發明的多肽被用在需要多肽為可溶形式時的治療。在一些實施例中，本發明的多肽包含一個或多個非天然的或天然的極性胺基酸，包括但不限於，絲胺酸和蘇胺酸，由於它們含羥基側鏈故能增加多肽的溶解度。

在一個實施例中，本發明的多肽以直鏈形式被使用，雖然本領域技術人員可以理解到，環化不會嚴重干擾多肽的特性，但多肽的環狀形式也可以被使用。

在一個實施例中，本發明的多肽可以生化地合成，例如使用標準的固相技術。在一些實施例中，這些生化方法除了固相合成之外，還包括，部分固相合成，片段縮合，或經典的溶液合成。在一些實施例中，在多肽相對短（約5-15kDa），和/或當它無法經由重組技術（即，不被核酸序列編碼）來製造時，這些方法被使用，因此，涉及不同的化學反應。

在一個實施例中，固相多肽合成方法係屬本領域技術人員所熟知，其進一步描述於：John Morrow Stewart 及Janis Dillaha Young的固相多肽合成（第二版Pierce 化學公司，1984）。在一些實施例中，合成的多肽經由製備型高效液相色譜法來純化[Creighton T. (1983) 蛋白質，結構和分子原理。WH Freeman 及 Co. N.Y.]。且其組成可經由本領域技術人員已知的胺基酸測序方法來證實。

在一個實施例中，重組蛋白技術被用來生成本發明的多肽。在一些實施例中，重組蛋白質技術被用來生成相對長的多肽（例如，長於18-25個胺基酸）。在一些實施例中，重組蛋白技術可用來生成大量的本發明的多肽。在一些實施例中，重組技術被描述於：Bitter 等人，(1987) 酶學方法，153:516-544，Studier 等人，(1990) 酶學方法，185:60-89，Brisson等人，(1984) 自然310:511-514，Takamatsu 等人，

(1987) EMBO J. 6:307-311, Coruzzi等人, (1984) EMBO J. 3:1671-1680 及 Brogli等人, (1984) 科學224:838-843, Gurley等人, (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565 及 Weissbach & Weissbach, 1988, 植物分子生物學方法, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463。

在一個實施例中，本發明的多肽使用編碼本發明的多肽的多核苷酸來合成。在一些實施例中，編碼本發明的多肽的多核苷酸被連接到表現載體，其包含順式調節序列（如啟動子序列）的轉錄控制。在一些實施例中，順式調節序列適於引導本發明的多肽的構成型表現。在一些實施例中，順式調節序列適於引導本發明的多肽的組織特異性表現。在一些實施例中，順式調節序列適於引導本發明的多肽的誘導型表現。

在一些實施例中，表現本發明的多肽的多核苷酸，如SEQ ID NO：44、45和46中之所列。

在一些實施例中，適用於本發明使用的組織特異性啟動子包括功能性的特定細胞群的序列，例子包括，但不限於啟動子，諸如肝特異性的白蛋白[Pinker等人，(1987) Genes Dev. 1:268-277]，淋巴特異性啟動子[Calame等人，(1988) Adv. Immunol. 43:235-275]；T細胞受體的特定的啟動子[Winoto等人，(1989) EMBO J. 8:729-733]和免疫球蛋白[Banerji等人，(1983) Cell 33:729-740]；神經元特異性啟動子，諸如神經絲啟動子[Byrne等人，(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477]，胰腺特異性啟動子[Edlunch等人，(1985) Science 230:912-916]或乳腺特異性啟動子諸如牛奶乳清啟動子（美國專利案4873316號和歐洲專利申請公開案264166號）。適合於本發明使用的誘導型啟動子包括，例如，四環素誘導型啟動子(Srour, M.A.等人，2003. Thromb.Haemost. 90: 398-405)。

在一個實施例中，語詞“多核苷酸”(“a polynucleotide”)係指單鏈

或雙鏈的核酸序列，其可以以下列之形式被分離而被提供：**RNA**序列，互補多核苷酸序列（**cDNA**），基因體多核苷酸序列，和/或複合的多核苷酸序列（例如，上述的組合）。

在一個實施例中，“互補的多核苷酸序列”係指一種序列，其導自信使**RNA**使用逆轉錄酶或任何其它**RNA**依賴的**DNA**聚合酶的逆轉錄。在一個實施例中，序列可以隨後在體內或體外使用**DNA**聚合酶來擴增。

在一個實施例中，“基因體多核苷酸序列”係指衍生（分離）自染色體的序列，因此其代表了染色體的鄰接部分。

在一個實施例中，“複合多核苷酸序列”係指一種序列，其至少部分是互補的且至少部分是基因組的。在一個實施例中，複合序列可以包括一些編碼本發明的多肽所需的外顯子序列，以及一些插入其間的內含子序列。在一個實施例中，內含子序列可以是任何來源，包括其它的基因，並且通常將包括保存的剪接信號序列。在一個實施例中，內含子序列包括順式表現的調控元件。

在一個實施例中，本發明的多核苷酸還包含編碼信號肽的信號序列，該信號肽用於本發明的多肽的分泌。在一些實施例中，信號序列包括但不限於：用於促紅細胞生成素（**EPO**）的如**SEQ ID NO：19**中所列的內源信號序列，或用於干擾素- β 1（**IFN- β 1**）的如**SEQ ID NO：26**中所列的內源信號序列。在另一個實施例中，信號序列是連到**CTP**序列的**N**-末端，進而是連到感興趣的多肽序列的**N**-末端；例如，該序列為（**a**）信號序列 - （**b**）**CTP**-（**c**）感興趣的序列-（**d**）選擇性的1個或多個另外的**CTP**序列。在另一實施例中，1個或多個的**CTP**序列被插入感興趣的多肽序列的信號序列與感興趣的多肽序列本身之間，從而中斷感興趣的野生型序列。每一個可能性均代表本發明的個別的實施例。

在另一個實施例中，生長激素還包括信號肽。在一些實施例中，信號序列包括但不限於內源信號序列。在一些實施例中，信號序列包括但不限於任何已知的生長激素或任何的生長激素的內源信號序列。在另一個實施例中，本發明的多肽與方法提供生長激素，其另外地具有包括下列胺基酸序列的信號肽：
MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSA (SEQ ID NO: 49)。

在一個實施例中，隨著表現和分泌，信號肽從產生成熟蛋白質的前驅體蛋白質裂解。

在一些實施例中，本發明的多核苷酸係使用本領域技術人員已知的程序和方法：**PCR**技術來製備。在一些實施例中，程序包括兩個不同的**DNA**序列的連接（參見，例如，“當今分子生物學的協議”，編輯，**Ausubel**等人, **John Wiley & Sons**, 1992）。

在一個實施例中，本發明的多核苷酸被插入表現載體中（即，核酸構築體），以啓用重組多肽的表現。在一個實施例中，本發明的表現載體包括另外的序列，該另外的序列使得此載體適於原核細胞的複製和整合。在一個實施例中，本發明的表現載體包括另外的序列，該另外的序列使得此載體適於真核細胞的複製和整合。在一個實施例中，本發明的表現載體包括另外的穿梭載體，該另外的穿梭載體使得此表現載體適於原核細胞和真核細胞的複製和整合。在一些實施例中，選殖載體包含轉錄和轉譯起始序列（如啟動子，增強子）和轉錄和轉譯終止子（例如，多腺苷酸化信號）。

在一個實施例中，多種原核或真核細胞可作為宿主表現系統，來表現本發明的多肽。在一些實施例中，這些包括，但不限於微生物，諸如細菌，酵母，植物細胞系統；該細菌係被含有多肽編碼序列的重組噬菌體**DNA**，質粒**DNA**或粘粒**DNA**的表現載體所轉化；該酵母係被含有多肽編碼序列的重組酵母表現載體所轉化；該植物細胞系統被重

組病毒表現載體（例如，花椰菜花葉病毒，**CaMV**；煙草花葉病毒，**TMV**）所感染，或是被含有多肽編碼序列的重組質粒表現載體，例如**Ti**質粒，所轉化。

在一些實施例中，非細菌表現系統（例如，哺乳動物的表現系統如**CHO**細胞）被用來表現本發明的多肽。在一個實施例中，哺乳動物細胞中被用來表現本發明的多核苷酸的表現載體是**pCI-DHFR**載體，其含有**CMV**啟動子和新黴素抗性基因。根據一個實施例，**pCI-dhfr**載體的構建被描述於例子1和圖3中。

在一些實施例中，在本發明的細菌系統中，許多表現載體可以有利地根據被表現的多肽的預期用途而被選擇。在一個實施例中，大量的多肽是被期望的。在一個實施例中，一些載體被期望，這些載體指導蛋白質產物高水平的表現，其可能是與疏水性信號序列的融合，其將表現產物導入細菌的外周胞質中，或蛋白質產物容易被純化的培養基中。在一個實施例中，某些融合蛋白質被改造具有特定裂解位點以幫助多肽的回復。在一個實施例中，適合於這種操作的載體包括，但不限於，大腸桿菌（*E. coli*）表現載體的**pET**系列〔**Studier**等人，酶學方法。 185：60-89（1990）〕。

在一個實施例中，酵母表現系統被使用。在一個實施例中，許多含有組成型或誘導型啟動子的載體可被所用於酵母中，如美國專利5932447號案之所述。在另一個實施例中，一些載體被使用，這些載體可促進外源的**DNA**序列整合入酵母染色體中。

在一個實施例中，本發明的表現載體可進一步包括另外的核苷酸序列，該核苷酸序列允許，例如，幾種蛋白質從單一的**mRNA**的轉譯，例如內部核糖體進入位點（**IRES**），和用於啟動子-嵌合多肽的基因整合的序列。

在一些實施例中，哺乳動物表現載體包括，但不限於，

pcDNA3 , pcDNA3.1 (+/-) , pGL3 , pZeoSV2 (+/-) , pSecTag2 , pDisplay , pEF/ myc/ cyto , pCMV/ myc/ cyto , pCR3.1 , pSinRep5 , DH26S , DHBB , pNMT1 , pNMT41 , pNMT81 , 這些都可以從 Invitrogen 公司取得 , pCI 可從 Promega 公司取得 , pMbac , pPbac , pBK-RSV 和 pBK-CMV 可從 Strategene 公司取得 , pTRES 可從 Clontech 公司取得 , 以及它們的衍生物。

在一些實施例中，一些表現載體被本發明所使用，該些表現載體含有來自如反轉錄病毒的真核病毒的調節元件。SV40載體包括pSVT7和PMT2。在一些實施例中，衍生自牛乳頭瘤病毒的載體包括PBV-1MTHA，及衍生自人類疱疹病毒（Epstein Bar virus）的載體包括pHEBO和p2O5。其它示例性的載體包括PMSG，pAV009/ A +，pMTO10/ A +，pMAMneo-5，桿狀病毒pDSVE，和任何其它允許蛋白質的表現的載體，該蛋白質的表現係受一些啟動子所導引，這些啟動子包括SV-40早期啟動子，SV-40後期啟動子，金屬硫蛋白啟動子，鼠乳腺腫瘤病毒啟動子，勞氏肉瘤病毒啟動子（Rous sarcoma virus promoter），多角體蛋白啟動子，或其它顯示在真核細胞中表現有效的啟動子。

在一些實施例中，重組的病毒載體可用於本發明的多肽的體內表現，因為它們具有如側向感染和靶向特異性的優勢。在一個實施例中，側向感染在例如，逆轉錄病毒的生命週期中是固有的，且是一種過程，在此過程中單一被感染的細胞產生許多子代病毒粒子，這些子代病毒粒子發芽生出並感染鄰近的細胞。在一個實施例中，其結果是大範圍迅速受到感染，此範圍的大部分最初未被原來的病毒粒子感染。在一個實施例中，病毒載體被產生，其無法側向擴展。在一個實施例中，如果所要的目的只是要將特定基因引入局部數量的靶細胞，此特性可以是有用的。

在一個實施例中，各種方法可以被用來將本發明的表現載體引入細胞中。這樣的方法通常被描述於：Sambrook等人，分子選殖：實驗室手冊，Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992)；Ausubel等人，分子生物學當前的協議，John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989)；張等人，體細胞基因治療，CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995)；Vega等人，基因靶向，CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995)；載體：分子選殖載體及其用途的研究，Butterworths, Boston Mass. (1988) 及Gilboa等人，[Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]及包括，例如，穩定的或瞬時的轉染，脂質轉染，電穿孔和以重組病毒載體感染。另外，請參閱美國專利案5464764號和5487992號的正-負選擇方法。

在一些實施例中，引入被病毒感染的核酸可提供幾個優於如脂轉染和電穿孔的其它方法的優點，因為由於病毒的感染的性質而可獲得更高的轉染效率。

在一個實施例中，將理解到，本發明的多肽也可以從核酸構築體來表現，該核酸構築體可以以任何合適的給藥方式施用給個人，如上之所述（即，生物體內的基因療法）。在一個實施例中，核酸構築體經由適當的基因遞送載體/方法（轉染，轉導，同源重組，等）和需要時的表現系統而被引入合適的細胞中，然後被修飾的細胞在培養基中擴展並返回個人（即，活體外基因治療）。

在一個實施例中，植物表現載體被使用。在一個實施例中，編碼序列的多肽的表現被許多啟動子所驅動。在一些實施例中，病毒啟動子被使用，這些病毒啟動子是例如CaMV的35S RNA和19S RNA啟動子[Brisson等人，自然 310:511-514 (1984)]，或者TMV的外殼蛋白啟動子[Takamatsu等人，EMBO J. 6：307-311 (1987)]。在另一個實施例中，植物啟動子被使用，這些植物啟動子是例如，RUBISCO的小的次

單元[Coruzzi等人，EMBO J.3：1671-1680（1984）；和Brogli等人，科學 224：838-843（1984）]或熱休克啟動子，例如大豆hsp17.5-E或hsp17.3-B [Gurley等人，Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986)]。在一個實施例中，構築體被引入植物細胞中，其係使用Ti質粒，Ri質粒，植物病毒載體，直接的DNA的轉化，顯微注射，電穿孔和其他的本領域技術人員公知的技術。參見，例如，Weissbach 及 Weissbach [植物分子生物學的方法，Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 (1988)]。本發明也可使用其他表現系統，如昆蟲和哺乳動物宿主細胞系統，其是本領域一般技術人員所公知的。

應理解到，除了含有插入的編碼序列（編碼多肽）的轉錄和轉譯所需的元件之外，本發明的表現構築體也可包括這些序列，其被用來最佳化表現多肽的穩定性、生產、純化、產量或活性。

在一些實施例中，各種方法可被用來將本發明的表現載體引入宿主細胞系統中。在一些實施例中，這樣的方法通常被描述於：Sambrook等人，分子選殖：實驗室手冊，Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992)；Ausubel等人，當前分子生物學的協議，John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989)；張等人，體細胞基因治療，CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995)；Vega等人，基因靶向，CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995)；載體：分子選殖載體及其用途的研究，Butterworths, Boston Mass. (1988) 及 Gilboa等人，[Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]；及包括，例如，穩定的或瞬時的轉染，脂質轉染，電穿孔，和利用重組病毒載體的感染。另外，請參閱美國專利案5464764號和5487992號的正-負選擇方法。

在一些實施例中，轉化的細胞被培養於有效的條件下，其允許大量的重組多肽的表現。在一些實施例中，有效的培養條件包括，但不限於，有效的介質、生物反應器、溫度、pH值和允許蛋白質生成的氧

氣條件。在一個實施例中，有效的介質係指任何介質，在其中細胞可被培養生成本發明的重組多肽。在一些實施例中，介質通常包括水溶液，該水溶液具有可吸收的碳、氮和磷酸鹽源，以及合適的鹽、礦物質、金屬和其他營養物，例如維生素。在一些實施例中，本發明的細胞可以在傳統的發酵生物反應器，搖瓶，試管，微量滴定皿，和培養皿中被培養。在一些實施例中，培養是在適合重組細胞的溫度，pH值，和氧含量中進行。在一些實施例中，培養條件是在本領域的一般技術人員的專業技能內。

在一些實施例中，取決於用於製備的載體和宿主系統，本發明所得的多肽可保留在重組細胞中，或保留在細胞或病毒膜的外表面上；保留在重組細胞中係分泌到發酵培養基中，分泌到兩個細胞膜之間的空間中，如大腸桿菌的週質空間。

在一個實施例中，在培養基中一段預定的時間之後，實現重組多肽的回收。

在一個實施例中，本文所用的語詞“回收重組多肽”係指收集含有多肽的完全發酵的培養基，且不需要另外的分離和純化的步驟。

在一個實施例中，本發明的多肽被純化，其係使用多種標準的蛋白質純化技術，諸如但不限於，親和層析，離子交換層析，過濾，電泳，疏水相互作用層析，凝膠過濾層析，反相層析，刀豆蛋白A層析，層析聚焦和差異溶解。

在一個實施例中，為了促進回收，被表現的編碼序列可以被建構用來編碼本發明的多肽和被融合的可裂解的部分。在一個實施例中，融合蛋白可被如此設計，使得多肽可以經由親和層析容易地被分離；例如，經由特定用於可裂解部分的層析柱的固定化。在一個實施例中，裂解位點被建構在多肽和可裂解部分之間，且多肽可以以適當的酶或試劑來處理而從層析柱被釋放出，該酶或試劑可以特異性地裂解該位

點的融合蛋白[例如，參見Booth等人，Immunol. Lett.19:65-70 (1988); 及 Gardella等人，J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].

在一個實施例中，本發明的多肽以“基本上純”的形式被收回。

在一個實施例中，語詞“基本上純”係指其純度允許蛋白質有效地被利用在本文所述的應用。

在一個實施例中，本發明的多肽也可以使用體外表現系統來合成。在一個實施例中，體外合成的方法是本領域熟知的，且系統的組件可商購得到。

在一些實施例中，重組多肽被合成且被純化；它們的治療功效可以在體內或體外測定。在一個實施例中，使用重組DNA技術來實現CTPs修飾的GH的生成。

在一些實施例中，重組多肽被合成且被純化；它們的治療功效可以在體內或體外測定。在一個實施例中，本發明的CTPs修飾的重組GH的結合活性可使用多種測定法來確定。

在一個實施例中，本發明包括CTP-GH-CTP多肽。在一個實施例中，重組DNA技術的方法被用來生產CTP-GH-CTP多肽，如例1和圖1之所示。在一個實施例中，本發明的CTP-GH-CTP多肽的治療功效可以在體內測定。在一個實施例中，本發明的CTP-GH-CTP多肽的治療功效可以在體外測定。在一個實施例中，本發明的重組GH多肽的結合活性可以使用NB2（促乳素依賴型鼠淋巴瘤細胞系（ECACC細胞庫））或FCD-P1鼠細胞系來測定，它們預先被轉染人類生長激素受體。在一個實施例中，GH對這些受體的結合可誘導細胞的增生，在一個實施例中其係以作為GH活性的作用的MTT細胞染色的水平來測定。在一個實施例中，經由被治療的生長激素缺陷的動物的體重，隨著時間的增加的測量，可以用來推導在體內的活性。

在一個實施例中，本發明提供誘導受試者生長或體重收益的方

法，該方法包括對受試者施用治療有效量的多肽，該多肽包括生長激素，一個附著於生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著於生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的CTPs，藉此誘導受試者生長或體重的收益。

在另一個實施例中，本發明提供誘導非人類受試者生長或體重收益的方法，該方法包括對非人類受試者施用治療有效量的表現載體，該表現載體包含多核苷酸，該多核苷酸由編碼多肽的核酸組成，所述多肽包括非人類生長激素，一個附著於非人類生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著於非人類生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的CTPs，且其中所述多肽選擇性地包括附著於所述的一個CTP的氨基末端的信號肽，藉此誘導非人類受試者生長或體重的收益。

在另一個實施例中，本發明提供誘導受試者體重減輕或減少體脂肪的方法，該方法包括對受試者施用治療有效量的多肽，該多肽包括生長激素，一個附著於生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著於生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的CTPs，藉此誘導受試者體重減輕或減少體脂肪。在另一個實施例中，所述的受試者是超重的。

在另一個實施例中，本發明提供誘導非人類受試者減少體脂肪的方法，該方法包括對非人類受試者施用治療有效量的表現載體，該表現載體包含多核苷酸，該多核苷酸包括非人類生長激素，一個附著於非人類生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著於非人類生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的CTPs，且其中所述多肽選擇性地包括附著於所述的一個CTP的氨基末端的信號肽，藉此誘導非人類受試者生長或體重的收益。

在另一個實施例中，本發明提供減少受試者的脂肪沉積的方法。

在另一個實施例中，本發明提供增加受試者的肌肉質量的方法。在另一個實施例中，本發明提供促進受試者的肌肉生長的方法。在另一個實施例中，本發明提供提高肌肉對脂肪比的方法。在另一個實施例中，本發明提供降低身體質量指數（**BMI**）或克托萊（**Quetelet**）指數的方法。

在另一個實施例中，生長係以重量的收益來測量。在另一個實施例中，生長係以高度的收益來測量。在另一個實施例中，生長係以肌肉質量的收益來測量。在另一個實施例中，生長係以重量的收益來測量。在另一個實施例中，生長係以骨質量的收益來測量。在另一個實施例中，生長係以重量的收益來測量。在另一個實施例中，生長係以肌肉質量的收益來測量。在另一個實施例中，重量的收益是由於骨和/或肌肉質量的收益。在另一個實施例中，生長係以本技藝領域的技術人員已知的任何公知的測量方法來測量。

在一些實施例中，本發明的人類生長激素多肽可用來治療受試者，該受試者具有生長和重量的相關的症狀，如生長缺陷症，艾滋病（**AIDS**）消瘦，老化，艾滋病毒感染（**HIV-infected**）者的免疫功能的受損，分解代謝病，手術恢復，充血性心肌病，肝移植，肝切除後的肝再生，慢性腎衰竭，腎性骨營養不良症，骨質疏鬆，軟骨發育不全/季肋發育不全，骨骼發育不良，慢性炎症或營養障礙如克羅恩氏（**Crohn's**）病，短腸症，幼年型慢性關節炎，囊性纖維化，男性不育症，**X**連鎖低血磷性佝僂病，唐氏（**Down's**）綜合症，脊柱裂，努南（**Noonan**）綜合症，肥胖，受損的肌肉強度和纖維肌痛。在一些實施例中，本發明的干擾素多肽可用來治療受試者，該受試者具有一些症狀，例如毛細胞白血病（**HCL**），卡波濟氏（**Kaposi's**）肉瘤（**KS**），慢性髓細胞性白血病（**CML**），慢性丙型肝炎（**CHC**），尖銳濕疣（**CA**），慢性乙型肝炎，惡性黑色素瘤，濾泡性非霍奇金（**non-Hodgkin's**）淋

巴瘤，多發性硬化症，慢性肉芽腫病，鳥分枝桿菌複合體（MAC），肺纖維化和骨質疏鬆症。

在一個實施例中，本發明的多肽可被提供給個體本身。在一個實施例中，本發明的多肽可被提供給個體作為藥物組合物的一部分，在藥物組合物中，其與藥學上可接受的載體相混合。

在一個實施例中，“藥物組合物”（"pharmaceutical composition"）係指一種製劑，該製劑包含一種或多種的如本文所述的活性成分與諸如生理學上適合的載體和賦形劑的其它化學成分。藥物組合物的目的是要促進化合物對生物體的施用。

在一個實施例中，“活性成分”（"active ingredient"）係指感興趣的多肽序列，該多肽序列對於生物效應有效。

在一些實施例中，任何本發明的組合物將包含至少兩個以任何形式結合於感興趣的蛋白的CTP序列。在一個實施例中，本發明提供組合的製劑。在一個實施例中，“組合製劑”（"a combined preparation"）特別定義了“組份試劑盒”（"kit of parts"），其意思是如上所述的組合夥伴可以獨立地來給藥，或者以不同量的組合夥伴的不同的固定組合來給藥，即，同時地，並行地，分別地，或依序地來給藥。在一些實施例中，組分試劑盒的組分因此能，例如同時給藥或在時間上錯開給藥，即對於組分試劑盒的任意組分在不同時間點並且以相同或不同的時間間隔給藥。組合夥伴的總量的比例，在一些實施例中，可以以組合製劑施用。在一個實施例中，組合製劑可以被改變，例如，為了被治療的患者亞群的需要，或單一患者的需要，這些患者因特定疾病，疾病的嚴重程度，年齡，性別，或體重而有不同的需要，這些改變是本領域技術人員容易實施的。

一個實施例中，可以互換使用的語詞“生理上可接受的載體”和“藥學上可接受的載體”（"physiologically acceptable carrier" and

"pharmaceutically acceptable carrier") 係指一種載體或稀釋劑，其不會對生物體引起顯著的刺激，且不會消除所施用的化合物的生物學活性和性質。助劑包含在這些語詞內。在一個實施例中，包括在藥學上可接受的載體中的成分可為，例如聚乙二醇（PEG），在有機和水性介質中有寬廣溶解度的生物相容的聚合物（Mutter等人，（1979））。

在一個實施例中，“賦形劑”（"excipient"）係指加入藥物組合物中進一步促進活性成分施用的惰性物質。在一個實施例中，賦形劑包括碳酸鈣，磷酸鈣，各種糖，和各種類型的澱粉，纖維素衍生物，明膠，植物油和聚乙二醇。

用於藥物的製劑和給藥的技術被說明於“雷明頓（Remington's）的藥物科學”，Mack出版公司，Easton，PA，最新版本，其被併入本文中作為參考。

在一個實施例中，合適的給藥途徑，例如，包括口服，直腸，經粘膜，經鼻，腸道或胃腸外遞送，包括肌內，皮下和髓內以及椎管內注射，直接心室內，靜脈內，腹膜內，鼻內，或眼內注射。

在一個實施例中，製劑以局部而非全身的方式被施用，例如，將製劑直接注射進入患者身體的特定區域。

在一個實施例中，其中所述的藥物製劑或藥物組合物之給藥係經由注射入受試者，其使用注射器或筆（PEN）式裝置來施行。

在另一個實施例中，包括本發明的CTPs修飾的GH的多肽被施用的劑量在0.1-5毫升的溶液中為1-90微克。在另一個實施例中，包括CTPs修飾的GH的多肽被施用的劑量在0.1-5毫升的溶液中為1-50微克。在另一個實施例中，包括CTPs修飾的GH的多肽被施用的劑量在0.1-5毫升的溶液中為1-25微克。在另一個實施例中，包括CTPs修飾的GH的多肽被施用的劑量在0.1-5毫升的溶液中為50-90微克。在另一個實施例中，包括CTPs修飾的GH的多肽被施用的劑量在0.1-5毫升的溶液中為10-50

微克。

在另一個實施例中，包括CTPs修飾的GH的多肽被施用的劑量在0.1-5毫升的溶液中為1-90微克，其可經由一周一次的肌肉（IM）注射，皮下（SC）注射，或靜脈內（IV）注射。在另一個實施例中，包括CTPs修飾的GH的多肽被施用的劑量在0.1-5毫升的溶液中為1-90微克，其可經由一周二次的肌肉（IM）注射，皮下（SC）注射，或靜脈內（IV）注射。在另一個實施例中，包括CTPs修飾的GH的多肽被施用的劑量在0.1-5毫升的溶液中為1-90微克，其可經由一周二次的肌肉（IM）注射，皮下（SC）注射，或靜脈內（IV）注射。在另一個實施例中，包括CTPs修飾的GH的多肽被施用的劑量在0.1-5毫升的溶液中為1-90微克，其可經由二周一次的肌肉（IM）注射，皮下（SC）注射，或靜脈內（IV）注射。在另一個實施例中，包括CTPs修飾的GH的多肽被施用的劑量在0.1-5毫升的溶液中為1-90微克，其可經由17天一次的肌肉（IM）注射，皮下（SC）注射，或靜脈內（IV）注射。在另一個實施例中，包括CTPs修飾的GH的多肽被施用的劑量在0.1-5毫升的溶液中為1-90微克，其可經由19天一次的肌肉（IM）注射，皮下（SC）注射，或靜脈內（IV）注射。

本發明考慮劑量範圍的各種實施例。本發明的多肽的劑量，在一個實施例中，是在0.05-80毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.05～50毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.1～20毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.1～10毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.1-5毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.5-5毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.5～50毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在5-80毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在35-65毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在35-65毫克/天的範圍內。在另一個實施

例中，劑量是在20～60毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在40～60毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在45-60毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在40～60毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在60-120毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在120-240毫克 /天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在40～60毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在240-400毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在45-60毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在15～25毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在5-10毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在55-65毫克/天的範圍內。

在一個實施例中，劑量是20毫克/天。在另一個實施例中，劑量是30毫克/天。在另一個實施例中，劑量是40毫克/天。在另一個實施例中，劑量是50毫克m/天。在另一個實施例中，劑量是60毫克/天。在另一個實施例中，劑量是70毫克/天。在另一個實施例中，劑量是80毫克/天。在另一個實施例中，劑量是90毫克/天。在另一個實施例中，劑量是100毫克/天。

本發明的CTPs修飾的GH的劑量，在一個實施例中，是在0.005-100毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.005～5毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.01～50毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.1～20毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.1～10毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.01-5毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.001-0.01毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.001-0.1毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.1-5毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.5～50毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.2-15mg/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在0.8-65毫克/

周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在1-50毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在5-10毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在8-15毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在10-20毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在20~40毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在60-120毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在12-40毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在40~60毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在50-100毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在1-60毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在15~25毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在5-10毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在55-65毫克/周的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在1-5毫克/周的範圍內。

在另一個實施例中，給予受試者的GH劑量是標準劑量的50%，該標準劑量係給予來自受試者相同群體的參考受試者（例如，兒童，老年人，男人，女人，GH缺乏，特定國籍，等等）。在另一個實施例中，劑量是給予來自受試者特定群體的受試者的劑量的30%。在另一個實施例中，劑量是給予來自受試者特定群體的受試者的劑量的45%。在另一個實施例中，劑量是給予來自受試者特定群體的受試者的劑量的100%。

在另一個實施例中，劑量是1-5毫克/周。在另一個實施例中，劑量是2毫克 /周。在另一個實施例中，劑量是4毫克/周。在另一個實施例中，劑量是1.2 毫克/周。在另一個實施例中，劑量是1.8 毫克/周。在另一個實施例中，劑量是大約本文所述的劑量。

在另一個實施例中，劑量是1-5毫克/給藥。在另一個實施例中，劑量是2毫克/給藥。在另一個實施例中，劑量是4毫克/給藥。在另一個實施例中，劑量是1.2毫克/給藥。在另一個實施例中，劑量是1.8毫克/

給藥。在一個實施例中，每週一次給藥組合物。在另一個實施例中，每兩週一次給藥組合物。在另一個實施例中，每月一次給藥組合物。在另一個實施例中，每天給藥組合物。

在另一個實施例中，CTPs修飾的GH被配製成鼻內劑型。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH被配製成可注射的劑量形式。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是0.0001毫克至0.6毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是0.001毫克至0.005毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是0.005毫克至0.01毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是0.01毫克至0.3毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是0.2毫克至0.6毫克。

在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是1-100毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是10-80毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是20-60毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是10-50毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是40-80毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是10-30毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是30-60毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是4毫克到10毫克。

在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是0.2毫克到2毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是2毫克到6毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是4毫克到10毫克。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH施用給受試者的劑量範圍是5毫克到15毫克。

在另一實施例中，CTPs修飾的GH被注射到肌肉之內（肌肉注射）。

在另一個實施例中，CTPs修飾的GH被注射到皮膚之下（皮下注射）。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH被注射到肌肉。在另一個實施例中，CTPs修飾的GH被注射到皮膚下面。

在另一個實施例中，本發明的方法包括增加使用GH療法的順應性，其包括提供CTPs修飾的GH給有需要的受試者，藉此增加使用生長激素療法的順應性。

在另一個實施例中，分子量小於50,000道爾頓的蛋白質藥物，例如本發明的CTPs修飾的GH，在體內一般上是短命的物種，其具有幾個小時的短的循環半衰期。在另一個實施例中，給藥的皮下途徑一般上提供較慢的釋放到循環中。在另一個實施例中，本發明的CTP修飾的多肽可延長分子量小於50,000道爾頓的蛋白質藥物的半衰期，例如生長激素。在另一個實施例中，本發明的CTP修飾的多肽可使干擾素能發揮更長時間的有益作用。

在另一個實施例中，CTP修飾的多肽的免疫原性等於分離的生長激素（GH），該多肽包含CTPs修飾的生長激素（GH）。在另一個實施例中，包含CTPs修飾的生長激素（GH）的CTP修飾的多肽的免疫原性堪比於分離的生長激素（GH）。在另一個實施例中，如本文所描述的以CTP肽修飾的GH降低生長激素（GH）的免疫原性。在另一個實施例中，包含GH的CTP修飾的多肽，其活性如分離的生長激素蛋白。在另一個實施例中，包含GH的CTP修飾的多肽，其活性大於分離的生長激素蛋白。在另一個實施例中，包含GH的CTP修飾的多肽，使生長激素抵抗降解的防護能力最大化，同時使生物活性的降低最小化。

在另一個實施例中，本發明的方法包括增加受試者的順應性，該受試者患有需要GH治療的慢性疾病。在另一個實施例中，本發明的方法能夠減少如上所述的CTPs修飾的GH的給藥頻率。在另一個實施例中，術語順應性包括堅持。在另一個實施例中，本發明的方法包括藉

由降低生長激素的給藥頻率來增加有需要GH治療的患者的順應性。在另一個實施例中，由於CTP的修飾而使CTP修飾的GH更加穩定，故可實現降低生長激素的給藥頻率。在另一個實施例中，增加生長激素的T_{1/2}的結果，故可實現降低生長激素的給藥頻率。在另一個實施例中，增加GH的清除時間的結果，故可實現降低生長激素的給藥頻率。在另一個實施例中，增加生長激素的AUC量測的結果，故可實現降低生長激素的給藥頻率。

在另一個實施例中，本發明提供降低非人類受試者之體脂肪的方法，該方法包括給予受試者治療上有效量的包括多核苷酸的表現載體，該多核苷酸包括非人類生長激素，一個附著在非人類生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著在非人類生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTPs），且其中所述多肽選擇性地包括附著於所述一個CTP的氨基末端的信號肽，藉此誘導非人類受試者的生長或體重的收益。

在另一個實施例中，本發明提供增加人類受試者的胰島素樣生長因子（IGF-1）的水平的方法，該方法包括給予受試者治療上有效量的多肽，該多肽包括生長激素，一個附著在生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著在生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTPs），藉此增加受試者的IGF-1的水平。

在另一個實施例中，本發明提供增加非人類受試者的胰島素樣生長因子（IGF-1）的水平的方法，該方法包括給予受試者治療上有效量的含有多核苷酸的表現載體，該多核苷酸包括非人類生長激素，一個附著在非人類生長激素的氨基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTP），和二個附著在非人類生長激素的羧基末端的絨毛膜促性腺激素的羧基末端肽（CTPs），且其中所述多肽選擇性地包括附著於所

述的一個CTP的氨基末端的信號肽，藉此誘導非人類受試者的生長或體重的收益。

在一個實施例中，增加人類受試者的IGF-1的水平可以有效地治療.預防.或抑制1型糖尿病，2型糖尿病，肌萎縮性側索硬化症（ALS又名“盧伽雷病”（"Lou Gehrig's Disease"）），重度燒傷，和強直性肌營養不良（MMD）。

在另一實施例中，將CTPs修飾的GH（生長激素）施藥給受試者是一天一次。在另一個實施例中，將CTPs修飾的GH施藥給受試者是二天一次。在另一個實施例中，將CTPs修飾的GH施藥給受試者是三天一次。在另一個實施例中，將CTPs修飾的GH施藥給受試者是四天一次。在另一個實施例中，將CTPs修飾的GH施藥給受試者是五天一次。在另一個實施例中，將CTPs修飾的GH施藥給受試者是六天一次。在另一個實施例中，將CTPs修飾的GH施藥給受試者是一周一次。在另一個實施例中，將CTPs修飾的GH施藥給受試者是7-14天一次。在另一個實施例中，將CTPs修飾的GH施藥給受試者是10-20天一次。在另一個實施例中，將CTPs修飾的GH施藥給受試者是5-15天一次。在另一個實施例中，將CTPs修飾的GH施藥給受試者是15-30天一次。

在另一個實施例中，劑量是在50-500毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在50-150毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在100-200毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在150-250毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在200-300毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在250-400毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在250-400毫克/天的範圍內。在另一個實施例中，劑量是在350-500毫克/天的範圍內。

在一個實施例中，劑量是20毫克/天。在一個實施例中，劑量是30毫克/天。在一個實施例中，劑量是40毫克/天。在一個實施例中，劑量

是50毫克/天。在一個實施例中，劑量是0.01毫克/天。在另一個實施例中，劑量是0.1毫克/天。在另一個實施例中，劑量為1毫克/天。在另一個實施例中，劑量是0.530毫克/天。在另一個實施例中，劑量是0.05毫克/天。在另一個實施例中，劑量是50毫克/天。在另一個實施例中，劑量是10毫克/天。在另一個實施例中，劑量是20-70毫克/天。在另一個實施例中，劑量是5毫克/天。

在另一個實施例中，劑量是1-90毫克/天。在另一個實施例中，劑量是1-90毫克/2天。在另一個實施例中，劑量是1-90毫克/3天。在另一個實施例中，劑量是1-90毫克/4天。在另一個實施例中，劑量是1-90毫克/5天。在另一個實施例中，劑量是1-90毫克/6天。在另一個實施例中，劑量是1-90毫克/周。在另一個實施例中，劑量是1-90毫克/9天。在另一個實施例中，劑量是1-90毫克/11天。在另一個實施例中，劑量是1-90毫克/14天。

在另一個實施例中，生長激素的劑量是10-50毫克/天。在另一個實施例中，劑量是10-50毫克/2天。在另一個實施例中，劑量是10-50毫克/3天。在另一個實施例中，劑量是10-50毫克/4天。在另一個實施例中，劑量是10-50毫克/5天。在另一個實施例中，劑量是10-50毫克/6天。在另一個實施例中，劑量是10-50毫克/周。在另一個實施例中，劑量是10-50毫克/9天。在另一個實施例中，劑量是10-50毫克/11天。在另一個實施例中，劑量是10-50毫克/14天。

在一個實施例中，單位劑量形式包括片劑，膠囊劑，錠劑，可咀嚼片劑，混懸劑，乳劑等。這樣的單位劑量形式含有安全的和有效量的所需的化合物，在一個實施例中，其中每一個的量由約0.7或3.5毫克至約280毫克/ 70千克，或在另一個實施例中，其中每一個的量在由約0.5或10毫克至約210毫克/ 70千克。適合於口服給藥的單位劑量形式的製劑，其藥學上可接受的載體是本技藝領域熟知的。在一些實施例中，

片劑通常包含有傳統的藥學上相容的助劑，諸如，惰性稀釋劑，如碳酸鈣，碳酸鈉，甘露糖醇，乳糖，和纖維素；粘合劑，如澱粉，明膠，和蔗糖；崩解劑，如澱粉，藻酸，和交聯羧甲基；潤滑劑，如硬脂酸鎂，硬脂酸，和滑石。在一個實施例中，助流劑，例如二氧化矽，可被用來改善粉末混合物的流動特性。在一個實施例中，著色劑，如FD & C染料，可以為了外觀而被添加。甜味劑和調味劑，如天冬甜素，糖精，薄荷醇，薄荷，水果香精，可用作可咀嚼片的助劑。膠囊通常包括上述的一種或多種固體稀釋劑。在一些實施例中，載體組分的選擇取決於次要的考慮，如口味，成本，和儲存穩定性，這些不是本發明目的的重點，且可以被本領域技術人員容易實現。

在一個實施例中，口服劑型包含預定的釋放特性。在一個實施例中，本發明的口服劑型包含延長釋放的片劑，膠囊，錠劑或可咀嚼片劑。在一個實施例中，本發明的口服劑型包含緩慢釋放片劑，膠囊劑，錠劑，或咀嚼片劑。在一個實施例中，本發明的口服劑型包括立即釋放的片劑，膠囊，錠劑，或可咀嚼片劑。在一個實施例中，口服劑型的製定係根據本領域技術人員所知的藥物活性成分的所期望的釋放特性。

在一些實施例中，口服組合物包括液體溶液，乳液，懸浮液，和類似物。在一些實施例中，適合於這種組合物的製備的藥物上可接受的載體係本領域技術人員熟知的。在一些實施例中，液體口服組合物包含由約0.012%至約0.933%的所希望的化合物，在另一個實施例中，包含由約0.033%至約0.7%的所希望的化合物。

在一些實施例中，本發明的方法所使用的組合物包括溶液或乳液，在一些實施例中，組合物包括水性溶液或乳液，其包括安全的和有效量的本發明的化合物，和選擇性的其它的化合物，而用於局部鼻內給藥。在一些實施例中，組合物包括由約0.01%至約10.0% w / v的

標的化合物，更佳地由約0.1%至約2.0%，其經由鼻內途徑施用而使化合物全身性遞送。

在另一個實施例中，藥物組合物之給藥係經由靜脈內，動脈內，或肌肉內注射的液體製劑。在一些實施例中，液體製劑包括溶液，懸液，分散體，乳劑，油，等等。在一個實施例中，藥物組合物係經由靜脈內給藥，因此藥物組合物被配製成適合於靜脈內給藥的形式。在另一個實施例中，藥物組合物係經由動脈內給藥，因此藥物組合物被配製成適合於動脈內給藥的形式。在另一個實施例中，藥物組合物係經由肌肉內給藥，因此藥物組合物被配製成適合於肌肉內給藥的形式。

在另一個實施例中，藥物組合物係經由身體表面局部地給藥，因此藥物組合物被配製成適合於局部給藥的形式。合適的局部製劑包括凝膠，軟膏，霜劑，洗劑，滴劑，等等。對於局部給藥，本發明的化合物與另外的適當的治療試劑或試劑相結合，而在有或沒有藥物載體的生理上可接受的稀釋劑中，被製備成溶液，懸浮液，或乳劑，並被施用。

在一個實施例中，本發明的藥物組合物係以本領域熟知的方法來製造，例如傳統的混合、溶解、製粒、制錠、研磨、乳化、包封、包埋或凍乾等方法。

在一個實施例中，根據本發明使用的藥物組合物，依傳統的方式以一種或多種的生理上可接受的載體來配製，該載體包括賦形劑和助劑，用來幫助活性成分被加工成藥物製劑。在一個實施例中，製劑取決於所選擇的給藥途徑。

在一個實施例中，本發明的注射藥物被配製成水溶液。在一個實施例中，本發明的注射藥物被配製在生理相容的緩衝液中，該緩衝液有如漢克氏（Hank's）溶液，林格氏（Ringer's）溶液，或生理鹽水等

緩衝液。在一些實施例中，對於經粘膜給藥的製劑，使用適合於待滲透的障礙物的滲透劑。此類滲透劑通常是本領域已知的。

在一個實施例中，本文所述的製劑被配製成腸胃外給藥，例如，經由大劑量注射或連續輸入。在一些實施例中，注射的製劑係為單位劑量的形式，例如在具有選擇性地添加的防腐劑的安瓿或多劑量容器中。在一些實施例中，組合物是在油性或水性載體中的懸浮液，溶液，或乳液，且含有如懸浮劑，穩定劑和/或分散劑之調配劑。

在一些實施例中，組合物還包括：防腐劑，如氯化苯甲烴銨和硫柳汞等；螯合劑，如乙二胺四乙酸鈉等；緩衝劑，如磷酸鹽，檸檬酸鹽，和醋酸鹽；等滲劑，如氯化鈉，氯化鉀，甘油，甘露糖醇等；抗氧化劑，如抗壞血酸，乙酰半胱胺酸，焦亞硫酸鈉鈉，及其他；芳香劑；粘度調節劑，如聚合物，包括纖維素及其衍生物；和聚乙烯醇以及根據需要來調整含水組合物的pH值的酸和鹼。在一些實施例中，組合物還包括局部麻醉劑或其它活性物質。組合物可被使用作為噴劑，霧劑，滴劑，和類似物。

在一些實施例中，用於胃腸外給藥的藥物組合物，包括水溶性形式的活性製劑的水溶液。另外，在一些實施例中，活性成分的懸浮液，被製備成適當的油性或水基注射懸浮液。在一些實施例中，合適的親脂性溶劑或載體包括：脂肪油，如芝麻油，或合成脂肪酸酯，如油酸乙酯，甘油三酯，或脂質體等。在一些實施例中，水性注射懸浮液含有用來增加懸浮液的粘度的物質，如羧甲基纖維素鈉，山梨醇，或葡聚糖。在另一個實施例中，懸浮液還含有合適的穩定劑或增加活性成分的溶解度的試劑，以允許高度濃縮溶液的製備。

在另一個實施例中，活性化合物可以在介質中被遞送，特別是脂質體（參見Langer，科學249：1527-1533（1990）；Treat等人，感染性疾病和癌症的治療的脂質體，Lopez- Berestein 及Fidler（編輯），Liss，

New York, pp. 353-365 (1989) ; Lopez-Berestein, 同上, pp. 317-327; 一般上參見同上)

在另一個實施例中，在控制釋放系統中遞送的藥物組合物被配製成用來靜脈內輸注，可植入滲透泵，透皮貼片，注射器，脂質體，或其它給藥方式等輸入。在一個實施例中，泵浦被使用（參見 Langer，同上； Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987)； Buchwald 等人， Surgery 88：507（1980）； SAUDEK 等人， N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)。在另一個實施例中，可以使用聚合材料。在另一個實施例中，控制釋放系統可以被放置接近治療靶標之處，例如，腦，因此藥劑只需要全身劑量的一小部分（參見，例如， Goodson，控釋的醫療應用，同上， vol. 2, pp. 115-138 (1984)。其他的控制釋放系統被討論於 Langer 的回顧中（科學 249：1527-1533（1990））。

在一些實施例中，活性成分具有合適的介質的粉末的形式，例如，在使用前是無菌的，無熱源的水基溶液。在一些實施例中，組合物被配製成用來霧化和吸入給藥。在另一個實施例中，組合物被包含在具有附加霧化裝置的容器中。

在一個實施例中，本發明之製劑係使用，例如，傳統的栓劑基質如可可脂或其它甘油酯等被配製成如栓劑或滯留型灌腸劑的直腸組合物。

在一個實施例中，本發明的製劑被配製成液體製劑，而使用於注射器或筆式（Pen）裝置的注射。在一些實施例中，適合於本發明上下文中使用的藥物組合物包括這種藥物組合物，其含有用來達到預期的目的的有效量的活性成分。在一些實施例中，治療上有效量係指活性成份的有效量，可以給予被治療的受試者預防，緩解，或改善疾病症狀，或延長其存活。

在一個實施例中，治療有效量的確定係在本領域技術人員的能力

之內。

在一個實施例中，本文提供的製劑也包含防腐劑，如氯化苯甲烴銨；和硫柳汞等；螯合劑，如乙二胺四乙酸鈉等；緩衝劑，如磷酸鹽，檸檬酸鹽，和醋酸鹽；等滲劑，如氯化鈉，氯化鉀，甘油，甘露糖醇等；抗氧化劑，如抗壞血酸，乙酰半胱胺酸，焦亞硫酸鈉等；芳香劑；粘度調節劑，如聚合物，包括纖維素及其衍生物；和聚乙烯醇以及根據需要來調整這些含水組合物的pH值的酸和鹼。組合物還包括局部麻醉劑或其它的活性物質。組合物可作為噴劑，霧劑，滴劑，和類似物。

可以用作藥學上可接受的載體或其組分的物質的一些例子是糖：如乳糖，葡萄糖，和蔗糖；澱粉：如玉米澱粉，和馬鈴薯澱粉；纖維素及其衍生物：如羧甲基纖維素鈉，乙基纖維素，和甲基纖維素；粉狀黃耆膠；麥芽；明膠；滑石粉；固體潤滑劑：如硬脂酸，和硬脂酸鎂；硫酸鈣；植物油：如花生油，棉籽油，芝麻油，橄欖油，玉米油，和可可油；多元醇：如丙二醇，甘油，山梨醇，甘露醇，和聚乙二醇；藻酸；乳化劑：如Tween™品牌的乳化劑；潤濕劑：如十二烷基硫酸鈉；著色劑；調味劑；製片試劑；穩定劑；抗氧化劑；防腐劑；無熱源的水；等滲鹽水；和磷酸鹽緩衝液。用來與化合物配合的藥學上可接受的載體的選擇，基本上由化合物的給藥方式來決定。如果目的化合物是要被注射輸入，在一個實施例中，藥學上可接受的載體是具有血液相容的懸浮劑的無菌的生理鹽水，其pH值已被調整至約7.4。

另外，製劑還包括結合劑（例如阿拉伯膠，玉米澱粉，明膠，卡波姆（carbomer），乙基纖維素，瓜爾膠（guar gum），羥丙基纖維素，羥丙基甲基纖維素，及聚維酮等）；崩解劑（如玉米澱粉，馬鈴薯澱粉，藻酸，二氧化矽，交聯羧甲基鈉，交聚維酮，瓜爾膠（guar gum），及羥乙酸澱粉鈉等）；各種pH和離子強度的緩衝劑（例如，三-鹽酸，乙酸鹽，及磷酸鹽等）；添加劑，如白蛋白或明膠用以防止

吸附於表面；去污劑（例如，Tween 20，Tween 80，Pluronic F68，及膽汁酸鹽等）；蛋白酶抑制劑；表面活性劑（如十二烷基硫酸鈉）；滲透增強劑；增溶劑（如甘油，及聚甘油）；抗氧化劑（例如，抗壞血酸，抗壞血酸鈉，焦亞硫酸鈉，及丁基羥基苯甲醚等）；穩定劑（例如羥丙基纖維素，及羥丙基甲基纖維素）；增粘劑（例如卡波姆（carbomer），膠態二氧化矽，乙基纖維素，及瓜爾膠（guar gum）等）；甜味劑（如阿斯巴甜，及檸檬酸）；防腐劑（例如，硫柳汞，苧醇，及對羥基苯甲酸酯類）；潤滑劑（如硬脂酸，硬脂酸鎂，聚乙二醇，及十二烷基硫酸鈉）；流動-助劑（如膠體二氧化矽）；增塑劑（如鄰苯二甲酸二乙酯，及檸檬酸三乙酯）；乳化劑（例如卡波姆（carbomer），羥丙基纖維素，及十二烷基硫酸鈉）；聚合物塗層（例如，泊洛沙姆（poloxamers）或泊洛沙胺（poloxamines））；塗層和薄膜形成劑（例如乙基纖維素，丙烯酸酯，及聚甲基丙烯酸酯）；和/或助劑。

糖漿，酞劑，乳液，和懸浮液的典型的載體的組分包括乙醇，甘油，丙二醇，聚乙二醇，液體蔗糖，山梨糖醇，和水。對於懸浮液，典型的懸浮劑包括甲基纖維素，羧甲基纖維素鈉，纖維素（如Avicel™，RC-591），西黃蓍膠，和藻酸鈉。典型的潤濕劑包括卵磷脂和聚環氧乙烷山梨糖醇（如聚山梨酯80）。典型的防腐劑包括對羥基苯甲酸甲酯和苯甲酸鈉。在另一個實施例中，經口給藥的液體組合物也含有一種或多種如上所述的組分，例如甜味劑，調味劑和著色劑。

本文所提供的配製也包含將活性物質摻入或摻到聚合化合物的顆粒製劑，聚合化合物包括如聚乳酸，聚乙醇酸，及水凝膠等，或者摻到脂質體，微乳，微團，單層或多層囊泡，紅細胞形骸細胞，或原生質球。此類組合物將影響到物理狀態，溶解性，穩定性，體內釋放速率，以及體內清除速率等。

本發明也了解塗有聚合物的微粒的組合物（例如泊洛沙姆（poloxamers）或泊洛沙胺（poloxamines）），以及耦合到組織特異性受體的抗體的化合物，或耦合到組織特異性受體的配體或抗原。

在一些實施例中，化合物被水溶性聚合物的共價連接所修飾，水溶性聚合物包括如聚乙二醇，聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物，羧甲基纖維素，葡聚醣，聚乙烯醇，聚乙烯吡咯烷酮，或聚脯氨酸。在另一個實施例中，被修飾的化合物比起對應的未修飾的化合物，在靜脈注射後，在血液中表現出長很多的半衰期。在一個實施例中，修飾也增加了在水溶液中的化合物的溶解度，消除了聚集，增強了化合物的物理和化學穩定性，且大大降低了化合物的免疫原性和反應性。在另一個實施例中，施用這樣的聚合物-化合物的持綁，比起未修飾的化合物有較小的給藥頻率或較低的給藥劑量，藉此達成了所期望的體內的生物活性。

在一些實施例中，製劑的有效量或劑量開始時可以由體外的測定來估計。在一個實施例中，劑量可以在動物模型中被配製且這樣的資料可被用來更精確地確定人類的有用的劑量。

在一個實施例中，本文所述的活性成分的毒性和治療效果可以在體外，在細胞培養物，或實驗動物中經由標準藥學方法來確定。在一個實施例中，從這些體外和細胞培養測定和動物研究中所獲得的數據可以被用來配製人類使用的劑量範圍。在一個實施例中，劑量的變化取決於採用的劑型和使用的給藥途徑。在一個實施例中，確切的製劑，給藥途徑，和劑量可以由個別醫師考慮患者的狀況來選擇。[參見例如，Fingl等人，（1975）“治療的藥理學基礎”，第1章第1頁]。

在一個實施例中，根據被治療的情況的嚴重程度和響應性，給藥可以是單次或多次施用，實施持續數天到數周或直到治愈的治療的過程，或是達成減低疾病的狀態。

在一個實施例中，組合物或製劑的施用量，當然取決於被治療的

受試者，痛苦的嚴重程度，給藥方式，開處方醫生的判斷等。

在一個實施例中，包括配製在相容的藥物載體中的本發明的製劑的組合物也被製備在適當的容器中，且具有指示病症之治療的標記。

在另一實施例中，CTPs修飾的生長激素的給藥係經由全身給藥。在另一個實施例中，如本文中所述的生長激素的給藥係經由靜脈內，肌肉內或皮下的注射給藥。在另一個實施例中，CTPs修飾的生長激素配合複雜的有機的賦形劑和穩定劑而被凍乾（即冷凍乾燥）製備，複雜的有機的賦形劑和穩定劑包括如非離子性表面活性劑（即表面活性劑），各種糖，有機多元醇，和/或人類血清白蛋白。在另一個實施例中，注射用的藥物組合物包含在無菌水中的凍乾的如本文中所述的生長激素。在另一個實施例中，注射用的藥物組合物包含在無菌的0.9% NaCl中的凍乾的如本文中所述的生長激素。

在另一個實施例中，包括如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物另被配製成包括如人類血清白蛋白的複合載體，多元醇，糖，和陰離子表面活性穩定劑。參見，例如WO 89/10756（Hara等人-含有多元醇和對羥基苯甲酸）。在另一個實施例中，包括如本文所述的生長激素的藥物組合物另被配製成包括乳糖酸和醋酸/甘胺酸緩衝液。在另一個實施例中，包括如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物另被配製成包括胺基酸，例如可提高干擾素組合物在水中的溶解度的精胺酸或谷胺酸鹽。在另一個實施例中，藥物組合物包括凍乾的如本文所述的CTPs修飾的生長激素，並另被配製成含有甘胺酸或人類血清白蛋白（HSA），緩衝劑（例如，乙酸）和等滲劑（如氯化鈉）。在另一個實施例中，藥物組合物包括凍乾的如本文所述的CTPs修飾的生長激素，並另被配製成含有磷酸鹽緩衝液，甘胺酸和HSA。

在另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物，被放置在具有約4至7.2的pH值的緩衝溶液時是穩定的。在

另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物，被放置在具有約6至6.4的pH值的緩衝溶液時是穩定的。在另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物，被放置在具有6的pH值的緩衝溶液時是穩定的。在另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物，被放置在具有6.2的pH值的緩衝溶液時是穩定的。在另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物，被放置在具有6.4的pH值的緩衝溶液時是穩定的。在另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物係以胺基酸作為穩定劑而被穩定，且在某些情況下係以鹽作為穩定劑而被穩定（如胺基酸不含有帶電荷的側鏈）。

在另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物被配製成液體組合物，其含有的穩定劑是約0.3重量%和5重量%的胺基酸。

在另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物提供劑量的精確性和產品的安全性。在另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物提供用於注射的生物學上活性的，穩定的液體製劑。在另一個實施例中，藥物組合物包括不是凍乾的如本文所述的CTPs修飾的生長激素。

在另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾改的生長激素的藥物組合物提供液體製劑，其允許以液體狀態長時間的存儲，而方便於施用之前的貯存和運送。

在另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾的生長激素的藥物組合物包括作為基質的固體脂質。在另一個實施例中，包含如本文所述的CTPs修飾的生長激素的可注射的藥物組合物包括作為基質的固體脂質。在另一個實施例中，利用噴霧凍凝來生產經口給藥的脂質微粒被Speiser所描述（Speiser等人，Pharm. Res.8（1991）47-54）隨

後又有脂質納米小球的生產（**Speiser EP0167825（1990）**）。在另一個實施例中，人體對被使用的脂類有很好的耐受性（例如脂肪酸組成的甘油酯，其存在於用於腸胃外營養的乳劑中）。

在另一個實施例中，包含如本文所述的**CTPs**修飾的生長激素的藥物組合物是脂質體的形式（**J. E. Diederichs**等人，**Pharm./nd. 56 (1994) 267- 275**）。

在另一個實施例中，包含如本文所述的**CTPs**修飾的生長激素的藥物組合物包括聚合物微粒。在另一個實施例中，包含如本文所述的**CTPs**修飾的生長激素的可注射的藥物組合物包括聚合物微粒。在另一個實施例中，包含如本文所述的**CTPs**修飾的生長激素的藥物組合物包括奈米顆粒。在另一個實施例中，包含如本文所述的**CTPs**修飾的生長激素的藥物組合物包括脂質體。在另一個實施例中，包含如本文所述的**CTPs**修飾的生長激素的藥物組合物包括脂質乳劑。在另一個實施例中，包含如本文所述的**CTPs**修飾的生長激素的藥物組合物包括微米球。在另一個實施例中，包含如本文所述的**CTPs**修飾的生長激素的藥物組合物包括脂質的奈米顆粒。在另一個實施例中，包含如本文所述的**CTPs**修飾的生長激素的藥物組合物包括含有兩性脂質的脂質的奈米顆粒。在另一個實施例中，包含如本文所述的**CTPs**修飾的生長激素的藥物組合物包括含有脂質的奈米顆粒，該奈米顆粒含有藥物，脂質基質，和表面活性劑。在另一個實施例中，脂質基質具有至少**50%**重量/重量的含量的單甘油酯。

在一個實施例中，本發明的組合物可存在於包裝或分配器裝置中，如食品和藥物管理局（**FDA**）所批准的藥盒，其包含含有活性成分的一個或多個單位劑量。在一個實施例中，包裝含有，例如，金屬或塑料箔片，如泡罩包裝。在一個實施例中，包裝或分配裝置中附有給藥說明書。在一個實施例中，包裝或分配裝置中附有政府機構規定

的與容器有關的公告，該政府機構管理藥物的製造，使用，與銷售。該公告反映機關對組合物或人或獸的給藥的形式的批准。這樣的公告，在一個實施例中，係美國食品和藥物管理局對處方藥或產品嵌入的批准的標識。

在一個實施例中，理解到，本發明的CTPs修飾的生長激素可以提供給個體另外的活性劑，相比於各試劑本身的治療，其可以達到改進的治療效果。在另一個實施例中，措施（例如，劑量和互補試劑的選擇）被用來使組合療法相關的不良副作用達到最小化。

本領域的一般技術人員在研究了下面的例子之後，本發明的其它的目的，優點，以及新穎特徵將變得顯而易見，這些例子並非用來限制本發明。另外，每個不同的實施例，和本文上面所述的本發明的各個方面，和下面的申請專利範圍會在以下的例子中找到實驗上的支持。

例子

一般來說，本文使用的命名法和本發明中所用的實驗室程序包括分子，生物化學，微生物學，和重組DNA技術。這些技術在文獻中有充分的說明。請參見，例如，“分子選殖：實驗室手冊”Sambrook等人，(1989)；“目前分子生物學方法”卷 I - III Ausubel, R. M., 編輯(1994)；Ausubel等人，“最新分子生物學方法”，John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)；Perbal, “分子選殖的實用指南”，John Wiley & Sons, New York (1988)；Watson等人，“重組DNA”，Scientific American Books, New York；Birren 等人，(編輯)“基因組分析：實驗室手冊系列” Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)；方法如美國專利案4,666,828；4,683,202；4,801,531；5,192,659 及 5,272,057；“細胞生物學：實驗手冊”，卷 I - III Cellis, J. E., 編輯 (1994)；“動物細胞的培養-基本技術手冊” Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition；“當今免疫學”卷 I - III Coligan J. E. 編輯, (1994)；Stites等人，

(編輯), 基礎與臨床免疫學”(第8版), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell 及 Shiigi (編輯), “細胞免疫學的選擇的方法”, W. H. Freeman 及 Co., New York (1980); 可用的免疫測定被廣泛描述於專利和科學文獻中。請參見, 例如, 美國專利案 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 及 5,281,521; “寡核苷酸的合成 Gait, M. J., ed. (1984); “核酸雜交” Hames, B. D., 及 Higgins S. J., eds. (1985); “轉錄和轉譯” Hames, B. D., 及 Higgins S. J., eds. (1984); “動物細胞的培養” Freshney, R. I., 編輯, (1986); “固定化的細胞和酶” IRL Press, (1986); “分子選殖的實用指南” Perbal, B., (1984) 及 “酶學的方法” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR協議: 方法和應用的指南” Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak 等人, “蛋白質純化與鑑定的戰略-實驗室課程手冊” CSHL Press (1996); 所有這些被併入本文中作為參考。其它一般參考文獻被提供在本文件中之各處。

例1

人類生長激素 (hGH) 構築體的生成

材料和方法

4個hGH選殖株 (20KD的蛋白質的變體) 被合成。含有4個變體的hGH序列的XbaI –Not I片段被連接到預先用XbaI-NotI消化的真核表現載體的pCI-dhfr。4個選殖株的DNA (401-0, 1, 2, 3和4) 被製備。22kD的蛋白的另一部分的hGH選殖株 (1-242 bp) 也被合成 (0606114)。引子訂購自Sigma-Genosys公司。用來產生本發明的hGH-CTP多肽的引子序列總結在表1

表1

引子編號	SEQ ID NO	序列	限制位點（序列底下劃線的部分）
25	27	5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'	XbaI
32 ^R	28	5' ACAGGGAGGTCTGGGGGTTCTGCA 3'	
33	29	5' TGCAGAACCCCCAGACCTCCCTGTGC 3'	
4 ^R	30	5' CCAAACATCATCAATGTATCTTA 3'	
25	31	5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'	XbaI
35 ^R	32	5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3'	
34	33	5' GCCTTTGACACCTACCAGGAGTTCG 3'	
37 ^R	34	5'ACGCGGCCCGCATCCAGACCTTCATCACTGAG GC 3'	NotI
39 ^R	35	5' GCGGCCGCGGACTCATCAGAAGCCGCAGCTGCC 3'	

402-0-p69-1 (hGH) SEQ ID NO : 36：MOD-4020的結構是野生型重組人類生長激素（沒有CTP），其被製備作為下面所述的實驗的對照組。

三個PCR反應被施行。第一個反應係以引子25和引子32R和0606114的質粒DNA（hGH的1-242 bp的部分選殖株）作為模板來進行；PCR擴增的結果，形成245 bp的產物。

第二個反應係以引子33和引子4R和401-0-p57-2的質粒DNA作為模板來進行；PCR擴增的結果，形成542 bp的產物。

最後的反應係以引子25和4R和前兩個反應的產物的混合物作為模板來進行；PCR擴增的結果，705 bp的產物被形成，並連接入TA選殖載體（Invitrogen公司，目錄K2000-01）。含有hGH-0序列的XbaI-NotI片段被連接入真核表現載體pCI-dhfr。該載體被轉染入DG-44CHO細胞。細胞在無蛋白質的培養基中生長。

402-1-p83-5 (hGH-CTP) - SEQ ID NO : 37 和 402-2-p72-3 (hGH-CTPx2) - SEQ ID NO : 38：MOD-4021的構造是重組的人生長激素，其被融合到1個副本的人類絨毛膜促性腺激素的β鏈的C-末端肽（CTP）。MOD-4021的CTP盒被連接到C末端（一個盒）。MOD-4022是重組的人生長激素，其被融合到2個副本的人絨毛膜促性腺激素的β鏈的C-末端肽。MOD-4022的2個副本的CTP盒被連接到C末端（兩個盒）。

hGH-CTP 和 hGH-CTP-CTP 的 建 構 的 方 式 相 同 於 hGH-0. pCI-dhfr-401-1-p20-1 (hGH*-ctp) 的 建 構，且 pCI-dhfr401-2-p21-2 (hGH*-CTPx2) 被用來作為第二個PCR反應的模板。

MOD-4021和MOD-4022被表現在DG-44 CHO細胞中。細胞在無蛋白質的培養基中生長。因為hGH具有22Kd的分子量（MW）而每個“CTP盒”對總分子量貢獻8.5 Kd，故 MOD-4021的分子量有～30.5Kd（參見圖1），MOD-4022的分子量有～39Kd（參見圖1）。

402-3-p81-4 (CTP-hGH-CTP-CTP) - SEQ ID NO : 39 和 402-4-p82-9 (CTP*hGH-CTP-CTP) - SEQ ID NO : 40：MOD-4023的構造是重組的人生長激素，其被融合到3個副本的人類絨毛膜促性腺激素的β鏈的C-末端肽。MOD-4023的三個CTP盒被連接到N-末端（一個盒）和C末端（兩個盒）二者。MOD-4024是重組的人生長激

素，其被融合到人類絨毛膜促性腺激素的 β 鏈的1份截短的和2份完整的C-末端肽。MOD-4024的截短的CTP盒被連接到N末端而兩份CTP盒被連接到C末端（兩個盒）。

三個PCR反應被施行。第一個反應係以引子25和引子35R和p401-3-p12-5或401-4-p22-1的質粒DNA（hGH的1-242 bp的部分選殖株）作為模板來進行；PCR擴增的結果，形成265或220 bp的產物。第二個反應係以引子34和引子37R和TA-hGH-2- q65-1的質粒DNA作為模板來進行；PCR擴增的結果，形成695 bp的產物。最後的反應係以引子25和37R和前兩個反應的產物的混合物作為模板來進行；PCR擴增的結果，938或891bp的產物被形成，並連接入TA選殖載體（Invitrogen公司，目錄K2000-01）。含有hGH序列的XbaI-NotI片段被連接入我們的真核表現載體PCI-dhfr。（圖3）

MOD-4023和MOD-4024被表現在DG-44 CHO細胞中。細胞在無蛋白質的培養基中生長。MOD-4023的分子量是 ~ 47.5 Kd（參見圖1）和MOD-4024的分子量為 ~ 43.25 Kd（圖1）。

402-6-p95a-8 (CTP-hGH-CTP) - SEQ ID NO: 41: hGH-6的結構的建構方式相同於hGH-3的建構，且pCI-dhfr -402-1-p83-5（hGH-ctp）被用來作為第二個PCR反應的模板。

402-5-p96-4 (CTP-hGH) - SEQ ID NO: 42的構建：使用引子25和引子39R和pCI-dhfr-ctp-EPO- ctp（402- 6- p95a-8）的質粒DNA作為模板來進行PCR反應；PCR擴增的結果是，763 bp的產物被形成，並連接入TA選殖載體（Invitrogen公司，目錄K2000-01）。包含CTP-hGH序列的Xba I -Not I片段被連接到我們的真核表現載體PCI-dhfr來產生402-5-p96-4選殖株。

例2

本發明的hGH-CTP多肽的體內生物活性的測試

下面的實驗被施行，用來測試hGH-CTP多肽的潛在的長期作用的生物活性，並與商業的重組的人類生長激素和MOD-4020相比較。

材料和方法

垂體被切除的雌性大鼠（60-100克）接受每周21.7微克的hGH-CTP多肽的皮下注射，或接受每天一次5微克的對照的商業化重組人生長激素的皮下注射。

在治療前，第一次注射後24小時，然後每隔一天，直至第21天研究結束，測定所有的動物的重量。每個點代表組的平均重量收益百分數（（第0天的體重—最後一天的重量）/（第0天的體重）。平均重量收益對每日一次的商業hGH的注射進行歸一化。治療方案總結於表2中。

表2

編號	藥物	N	途徑	治療時間表	等摩爾劑量（微克/鼠）	積累劑量（微克/鼠）	劑量體積（毫升）
1	介質	7	s.c. （皮下注射）	1, 7及 13天; 1/周	NA	NA	0.25
2	Mock	7	s.c.	1, 7及 13天; 1/周	NA	NA	0.25
3	MOD-4020 SEQ ID NO: 36	7	s.c.	1, 7及 13天; 1/周	21.7	65	0.25
4	MOD-4021 SEQ ID NO: 37	7	s.c.	1, 7及 13天; 1/周	21.7	65	0.25
5	MOD-4022 SEQ ID NO: 38	7	s.c.	1, 7及 13天; 1/周	21.7	65	0.25
6	MOD-4023 SEQ ID NO: 39	7	s.c.	1, 7及 13天; 1/周	21.7	65	0.25
7	MOD-4024 SEQ ID NO: 40	7	s.c.	1, 7及 13天; 1/周	21.7	65	0.25
8	商業的 hGH v.1	7	s.c.	1, 7及 13天; 1/周	21.7	65	0.25
9	商業的hGH v.1	7	s.c.	1－ 13天; 天/周	5	65	0.25

結果

結果總結於圖2中。這些結果顯示，比起誘發100％重量收益的商用的rhGH，MOD-4023（SEQ ID NO：39）和MOD-4024（SEQ ID NO：

40) 誘發超過120%的重量收益。

結論

相比於商業的rhGH的相同的累積劑量的注射，其係每天一次的5微克的劑量給藥13天，MOD-4023(SEQ ID NO: 39)和MOD-4024(SEQ ID NO: 40)的21.7微克的三周的劑量（注射的天;1,7，和13），對垂體被切除的大鼠，誘發出大於30%的重量增加。

例3

CTP修飾的生長激素的藥物代謝動力學的研究

對Sprague-Dawley大鼠進行單劑量的藥物代謝動力學的研究。所有的動物試驗的進行係按照動物福利法，實驗動物的護理和使用的指南，及在Modigene, Biotechnology General有限公司的協會動物管理和使用委員會的批准與監督之下進行。大鼠單獨或每個籠子二隻地被飼養在12小時的光/暗的週期的室內。隨意供給水（城市供水）和未經認證的齧齒動物的飼料。

為了比較大鼠中的CTP-hGH-CTP-CTP和GH（生長激素）的藥物代謝動力學，使用了四組Sprague-Dawley大鼠（270-290克），每組三至六隻雄性大鼠。大鼠被隨機分配到四個組（參見表3）。大鼠被施予單一皮下或靜脈注射GH（50微克/公斤的靜脈或皮下注射）或CTP-HGH-CTP-CTP（108微克/公斤的靜脈或皮下注射）。除了給藥前的在異氟烷麻醉下收集到的樣品之外，也對未麻醉的動物進行採血。血液樣品（約0.25毫升）被收集在EDTA塗佈的微容器中，用來進行CTP-hGH-CTP-CTP的血漿濃度的ELISA分析，其時間列於表11中。在每次採樣之後，血液體積被置換為等體積的無菌的0.9%的鹽水。在離心和血漿收成之前，樣品被保存在冰上至多1小時。在分析之前，血漿樣品被保存在約-20°C之下。

表3. 大鼠藥物代謝動力學研究的實驗設計

Trt. Grp.	測 試 物 品	動 物 / 組 / 時間點的 編號	給 藥 途徑	性別	劑量水 平（微 克 / 千 克）	注射體 積（微 升）	濃度（微克/ 毫升）/總體 積（毫升）	時間點*（給 藥後時數）
1	Biotropin	6#	SC	雄性	50	500	20/5	0（給藥前） 0.5,2, 4, 8, 24, 48
2	CTP-hG H-CTP-C TP	6#	SC	雄性	108	500	43.2/5	0.5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
3	Biotropin	6#	IV（靜 脈 注 射）	雄性	50	300	20/3	0, 0.12, 2, 4, 8, 24
4	CTP-hG H-CTP-C TP	6#	IV	雄性	108	300	43.2/3	0.12, 2, 4, 8, 24, 48,72
血液樣本/時間點的體積- 500微升								終端血液樣 本

每個時間點3隻大鼠

特定用於檢測人類生長激素（Roche Diagnostics公司）的市售的夾心ELISA試劑盒被用來評價大鼠的血漿的樣品。此試劑盒利用抗體夾心ELISA格式來檢測血漿中的人類生長激素。此試劑盒最初被用來測量大鼠血漿中的CTP-hGH-CTP-CTP的濃度。為了這些血漿樣品，使用CTP-hGH-CTP-CTP的標準曲線（1.2-100奈克/毫升），而大鼠血漿中的CTP-hGH-CTP-CTP的濃度係由該曲線內插而得。

標準藥物代謝動力學參數，包括清除率（CL或CL/ F），分佈容積（Vd或Vd/ F），半衰期（T1 /2），血漿濃度對時間曲線下的面積（AUC），最大的觀察到的血漿濃度（Cmax）和最大的觀察到的血漿濃度的時間（Tmax）等，使用建模程式WinNonlin（Pharsight公司，

版本3.1)經由非隔室分析(noncompartmental analysis)，從血漿融合蛋白(albutropin)或生長激素濃度/時間的曲線可得到這些參數。為了此分析，血漿CTP-HGH-CTP-CTP或GH濃度的數據被均勻加權。對於靜脈注射的數據使用對數-線性梯形分析，對於皮下注射的數據使用線性-向上/對數-向下的梯形方法，來計算AUC。每隻大鼠或猴子的血漿濃度的曲線(除了皮下融合蛋白的數據)的分別分析，及藥物代謝動力學參數的平均值的平均±標準誤差(S.E.M)的值列於表4和圖4中。

CTP-hGH-CTP-CTP是275個胺基酸及上至12個O-連接的碳水化合物的單鏈蛋白質。該結構包括連接於三份的人類絨毛膜促性腺激素(hCG)的β鏈的C端肽(CTP)：一份在N-末端和兩份(串聯)在C末端。人體生長激素是由191個胺基酸所組成。CTP是由28個胺基酸和4個O-連接的糖鏈所組成。

例4

SD大鼠的CTP-修飾的GH的藥物代謝動力學

CTP-hGH-CTP-CTP的藥物代謝動力學被評價，並與商業生長激素(Biotropin)相比較。

表4是SD(Sprague-Dawley)大鼠在單一劑量的CTP-hGH-CTP-CTP和GH(Biotropin)的靜脈注射及皮下注射之後的 averages 的藥物代謝動力學參數。

表4

PK的統計					
SC			IV		
參數	單位	Biotropin	CTP-hGH-CTP-CTP	Biotropin	CTP-hGH-CTP-CTP
劑量	毫克/千克	50	50	50	50
AUClast	小時*奈克/毫升	41	680	162.7	1568.3
Cmax	奈克/毫升	13	36.8	275.8	926
Tmax	hr （小時）	0.5	8	0	0
MRT	hr	2.5	12.9	0.5	9.9
T1/2 alpha	hr		1.58		0.74
T1/2 beta	hr	1.73	9	0.5	6.9

數據的統計分析

進行血清樣品的分析，用以確定每個樣品的特定的濃度水平。濃度和時間點的數據使用 WinNonlin非隔室分析來處理。

被確定的參數包括：AUC，MRT，T1 /2，Cmax，和Tmax。圖4顯示大鼠在單一劑量的CTP-hGH-CTP-CTP或 GH的靜脈注射及皮下注射之後（N=3-6每劑/途徑），其CTP-hGH-CTP-CTP的血漿濃度，相比於GH的血漿濃度（皮克/毫升）具有優勢的藥物代謝動力學曲線。

在 50 微克 / 千克的單一的皮下注射之後，SD 大鼠血液的 CTP-hGH-CTP-CTP的清除率顯著慢於 Biotropin和 CTP-hGH-CTP的清除率。對應的計算的半衰期和AUC為：

Biotropin	T1/2	1.7小時,	AUC	41小時*奈克/毫升
CTP-hGH-CTP	T1/2	8.5小時,	AUC	424小時*奈克/毫升
CTP-hGH-CTP-CTP	T1/2	9.0小時,	AUC	680小時*奈克/毫升

結論：由6種其它的變體選擇CTP-hGH-CTP-CTP作為最終的候選物。CTP-hGH-CTP-CTP顯示出在生物活性和藥物代謝動力學方面有優越的性能。

例5

CTP修飾的生長激素的單劑量/重複劑量的體重收益的檢測 (WGA)

垂體被切除（耳間法）的雄性大鼠，3-4周齡，購自CRL實驗室，在手術後3周的適應期間，大鼠進行了每週兩次的檢查與稱重，以消除動物的垂體被切除不完整的疑慮，大鼠的垂體被切除不完整被證明會有相似於假手術的體重的增加。垂體切除不完全的大鼠不被用來作研究。在實驗的期間，垂體被切除的大鼠的平均體重為70-90克。這是hGH的標準的USP和EP的生物檢測。垂體被切除的大鼠（腦下垂體被去除的大鼠）失去增加體重的能力。這些大鼠被注射hGH（和CTP-hGH-CTP-CTP）會導致體重的增加。依據界定的時間和注入的hGH的量所測量的體重的收益，hGH（和CTP-hGH-CTP-CTP）的特殊活性被確定。3周的時間，大鼠被施予0.4，0.8，和4毫克/千克的單一的皮下注射劑量，或是0.6及1.8毫克/公斤的相隔4天的重複的皮下注射劑量。在第一劑量之前，之後每兩天或萬一死亡時，及處死之前，所有動物的個體的體重隨機地被確定。

單一劑量和重複劑量的重量收益的檢測

圖5顯示切除垂體的大鼠在不同的CTP-hGH-CTP-CTP的給藥方式之後，比較整個身體的生長反應的結果。此結果顯示出0.4及0.8毫克/千克/天的劑量的hGH-CTP的單次注射等效於0.1毫克/千克/天的劑量的Biotropin的4次的每天的注射。hGH-CTP的效果的高峰是在2天之後。

圖6另顯示，大鼠在CTP-hGH-CTP-CTP的單次注射之後的與體重收益相關的曲線下的面積。因此，收集到的數據顯示，體重收益與累

積的AUC（曲線下的面積）非常有關係。

4天間隔的hGH-CTP的構築體的給藥與Biotropin的每天注射有相同的體重的收益，如圖7之所示。人體中的hGH的半衰期被預期比大鼠好5倍-指示人類潛在的峰值效應係在一個單次的注射的十天之後。這些結果支持，人類的 hGH-CTP結構，CTP-hGH-CTP-CTP，的給藥應為每周一次或兩周一次。

例6

CTP修飾的生長激素的藥效學/藥動學的研究

垂體被切除（耳間法）的雄性大鼠，3-4周齡，購自CRL實驗室。在手術後3周的適應期間，大鼠進行了每周兩次的檢查與稱重，以消除動物的垂體被切除不完整的疑慮，大鼠的垂體被切除不完整被證明會有相似於假手術的體重的增加。垂體切除不完全的大鼠不被用來作研究。在實驗的期間，垂體被切除和假手術組的大鼠的平均體重分別為70及90克。

大鼠被施予CTP-hGH-CTP-CTP，介質，人類生長激素CTP-hGH-CTP-CTP，或是人類生長激素（20微克/鼠）的單一皮下注射，以0.2毫升/鼠的注射體積施予皮下注射。生長激素的劑量為0.35和1.05微克/公斤，此生長激素的劑量等摩爾於對應的0.6和1.8微克/千克的劑量的CTP-hGH-CTP-CTP中GH的量。治療群被總結於表5中。在注射之後，用於IGF-1分析的血漿樣品係在表5中所述的時間取得。使用商業的ELISA（R&D系統）來進行分析樣品中IGF-1的濃度。

表5 切除垂體的大鼠的研究的治療時間表

Trt. Grp.	測試物品	動物 / 組 / 時間點的編號	給藥途徑	等劑量 (毫克/鼠)	等劑量 (毫克 / 千克)	CTP-hGH-CTP-CTP 的濃度 毫克/毫升	劑量 體積 (毫升)	時間點* (給藥後的時數)
M7	Biotropin	9	SC	0.032	0.35	0.16	0.2	0 (給藥前) 0.5,2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
M8	Biotropin	9	SC	0.095	1.05	0.475	0.2	0 (給藥前) 0.5,2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
M9	EN648-01-08-005	12	SC	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	SC	0.095 (0.165)	1.05 (1.8)	0.825	0.2	1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
血液樣本/時間點的體積 - 500微升								終端的血液樣本

每一組的平均血清濃度對時間的曲線被進行非隔室藥物代謝動力學分析。 CTP-HGH-CTP-CTP的 Cmax顯著高於 Biotropin的 Cmax。 CTP-hGH-CTP-CTP的終端的半活期比Biotropin高6倍。

表6：切除垂體的大鼠在單次的皮下注射之後，CTP-hGH-CTP-CTP和Biotropin的藥物代謝動力學參數的評估。

表6

組群	劑量	性別	Cmax	Tmax	AUC _{0-∞}	AUC _{0-t}	CL/F	T _{1/2}
	毫克 / 千克		奈 克 / 毫升	小時	奈克-小時/ 毫升	奈克-小時 /毫升	毫 升 / 小 時/千克	小時
CTP-h GH-C TP-CT P	1.8	M	2,150	8	37,713	37,695	0.928	6.86
	0.6	M	681	8	11,505	11,489	3.042	6.8
hGH	1.05	M	1,078	0.5	3,541	3,540	9.884	1
	0.35	M	439	0.5	1,279	1,279	27.36	1

AUC 0-t和AUC 0-∞非常相似，此提示採樣的持續時間適於描繪藥物代謝動力學曲線的特性。 CTP-hGH-CTP-CTP的AUC比Biotropin的高10倍。此外，C max通常正比於CTP-hGH-CTP-CTP的劑量，且它比Biotropin的Cmax高兩倍。然而，如圖8之所示，CTP-hGH-CTP-CTP的Tmax為8小時，作為比較，Biotropin的Tmax則為0.5小時，且終端的半衰期並未隨劑量水平而改變。 CTP-hGH-CTP-CTP的T1 / 2比Biotropin的長6.8倍。

GH的間接效應主要係由胰島素樣生長因子（IGF-1）調節，胰島素樣生長因子（IGF-1）係響應生長激素而從肝和其它組織中分泌出的激素。生長激素的大部分的增長促進效應實際上是由於IGF-1作用於它的靶細胞。因此，CTP-hGH的構築體，CTP-hGH-CTP-CTP，對切除垂體的大鼠中的IGF-1血清水平的影響被測定。圖9顯示在CTP-hGH-CTP-CTP和商業的hGH的皮下注射之後，切除垂體的大鼠中的IGF-1的血清水平的結果。

CTP-hGH-CTP-CTP的0.6或1.8毫克/千克和Biotropin的0.35或1.05毫克/千克的單劑量被皮下注射到切除垂體的大鼠，以測定PK / PD曲線。使用特定的ELISA試劑盒（羅氏診斷公司，Roche Diagnostics)來

測定注射後的血清的IGF-1。

CTP-HGH-CTP-CTP的注射後的累積的IGF-1的血清水平明顯高於Biotropin的注射後的。C max通常與劑量成比例，且對CTP-hGH-CTP-CTP而言，其比Biotropin的C max高3-4倍。CTP-hGH-CTP-CTP的Tmax是36-48小時，作為比較，Biotropin的Tmax則是20-24小時。總之，較高的hGH水平及存在於血清中較久會顯著增加IGF-1的水平。

例7

CTP修飾的GH的糖的含量及唾液酸的含量

O-型聚糖的分析係基於複合酵試劑盒。O-型聚醣係自蛋白質化學地和酶促地裂解而得，並利用紙層析自肽分離出。O-聚醣池的測序係利用連續的酶消化（外切糖苷酶）來實施。接著再利用HPLC分析與標準比較。

以序列分析的糖分析

糖分析由盧德格爾有限公司（Ludger Ltd）實施。兩個樣品（EN648和RS0708）取自一式三份的版本，每個版本也進行一式三份的HPLC分析。EN648及RS0708的一式三份的300微克的樣品和氯化鈉/檸檬酸鈉緩衝液的單一的100微升的樣品，加上陽性對照的胎球蛋白（250微克）和100微升的水的陰性對照組，使用10,000Da的分子量的切斷膜來進行離心的超過濾，以水代替緩衝液，然後在O-模式的條件下（60°C 6小時）進行胥解作用。釋放的聚醣被重新-N-乙酰化，並以LudgerClean CEX盒淨化。釋放的聚醣的等分試樣然後用2-氨基苯甲酰胺（2AB）標記，以LudgerClean S盒淨化，並以LudgerSep-N2 HILIC-HPLC分析。

單糖的含量

中性單糖的分析需要聚醣水解成它們的組成的單糖組分。水解由盧德格爾有限公司（Ludger Ltd）對完整的糖蛋白樣品施行。具體而言，

50微克的完整的糖蛋白被酸水解，標記為2-AB（2-氨基苯甲酰胺），並在反相HPLC柱運行。這種方法水解所有存在於含N和O連接的類型的糖蛋白的所有聚醣。

唾液酸的分析

兩個樣品（EN648和RS0708）和緩衝液對照組被分析。唾液酸分析需要單糖的弱酸釋放，隨後以DMB熒光標記並在LudgerSep-R1柱進行HPLC分析。對每一個分析，50微克的完整的糖蛋白被酸水解。

CTP-HGH-CTP-CTP的糖分析

表7。聚醣分析。結構的分配和峰的面積百分比係基於HPLC和酶陣列的消化。

峰ID ^a	GU ^b	結構	名稱	總聚醣的百分比 ^c			
				Und ^d	NAN1	ABS	ABS B3C
1 ^r	0.92	 +bgd	GalNAc	0.4	0.4	0.6	53.0
2 ^r	1.02	 +bgd	galactose	1.9	9.7	23.8	26.5
*	1.72			4.3	4.6	2.3	
3	1.79		Gal 1-3GalNAc	2.3	67.7	69.4	17.1 ^b
4 ^b	2.25		NeuNAc 2-3Gal	19.8	13.0 ^b		
*	2.57			1.5	1.9	1.1	1.1
5	2.90		NeuNAc 2-3Gal 1-3GalNAc	70.6			
*	3.58			0.6	0.7	0.6	
6	3.22		Gal 1-3[NeuNAc 2-6]GalNAc	0.9	2.3		
7	4.42		NeuNAc 2-3Gal 1-3[NeuNAc 2-6]GalNAc	1.8			

單糖曲線顯示，CTP-hGH-CTP-CTP糖蛋白樣品主要含有O-連接式聚醣。主要的O-聚醣的峰是唾液酸化核心1（Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc）。主要的唾液酸是Neu5Ac，並且有一

些小的峰，表示有3-4％的二-乙酰化唾液酸N-乙酰基- 9-O-乙酰基神經氨酸（ Neu5， 9Ac2）和小於1％的N-羥基乙醯神經胺酸的存在。也有少量的Neu5Acα2-6（ Galβ1-3） GalNAc。

例8

獼猴的CTP-修飾的GH的藥物代謝動力學/毒代動力學分析

每隻動物的血清濃度對時間的關係曲線被產生。以WinNonlin專業版5.2.1（ Pharsight公司， Mt View CA.）進行非隔室分析。所估計的藥物代謝動力學參數顯示於下面的表8中：

表8：在獼猴被單次皮下注射之後，利用非隔室分析來估計CTP-hGH-CTP-CT P的藥物代謝動力學參數（平均值±標準偏差）

參數	1.8毫克/千克	90毫克/千克
Cmax（微克/毫升）	2.073 ± 0.417	108.7 ± 46.0
Tmax（小時）	4 ± 0	11 ± 7
AUC _{0-t} （微克-小時/毫升）	38.7 ± 7.4	2,444 ± 394
AUC _{0-∞} （微克-小時/毫升）	39.0 ± 7.3	2,472 ± 388
CL/F（毫升/小時/千克）	47.5 ± 9.0	37.04 ± 4.78
T _{1/2} （小時）	10.00 ± 1.47	9.85 ± 1.07
Vz/F（毫升/千克）	701 ± 236	529 ± 104

AUC 0-t和AUC 0-∞非常相似，此提示採樣的持續時間適於描繪藥物代謝動力學曲線的特性。Cmax與劑量成比例。而劑量愈高則Tmax愈後面。低劑量組的所有動物的Tmax為4小時，高劑量組是8或24小時。兩個劑量組的終端半衰期是相似的。

AUC大致上與劑量成比例，在較高劑量時AUC稍大於成比例的值，比起較低的劑量，會產生稍低的CL / F和Vz/ F A的估計。不可能認為在較高劑量時CL和Vz較低或在較低劑量時F較低。組之間有重疊，因此，若認為此表示了CL/ F和Vz/ F間存在有意義的差別，這是

值得商榷的。

利用模型所估計的藥物代謝動力學參數非常相似於非隔室分析所估計的。吸收和消除的半衰期顯示於下面的表9：

表9：獼猴在皮下注射之後，其導自藥物代謝動力學模型的CTP-hGH-CTP-CTP的吸收和消除的半衰期的估計（平均值±標準偏差）

表9		
劑量	T _{1/2 abs} （小時）	T _{1/2 el} （小時）
1.8毫克/千克	1.17 ± 0.40	10.41 ± 2.36
90毫克/千克	6.49 ± 1.87	7.26 ± 1.85

數據顯示，各組的消除速率非常相似，而較低劑量的組有稍長的T_{1/2 el}。然而，90毫克/千克的皮下給藥比1.8毫克/千克的皮下給藥，其吸收慢了5倍以上。如在非隔室分析的情況，建模顯示在高劑量時有較遲的T_{max}。

雖然生長激素的補充對生長激素缺乏症的兒童和成人的治療是有效的，但過長時間的每日注射的缺點，限制了醫師對某些患者人群的使用，也提高了劑量誤差的風險，看護者的人數，治療和/違規的成本等。在某些人群尤其重要，如較小的兒童，他們可能不理解不按規定GH之給藥療程的影響。要實現GH治療的最佳效益，順應是必要的。需要尋找更為合適的替代品來替代每天生長激素的注射，且當GH缺乏的兒童過渡到成人而仍需生長激素的治療時，隨後的順應性更重要。需要每日的治療主要是由於重組的生長激素的血漿半衰期短，並因此導致生長激素的持續釋放形式的發展(Reiter EO. Attire KM. Mashing TJ. Silverman BL. Kemp SF. Neolith RB. Ford KM. 及 Sanger P.等人的持續釋放生長激素對GH缺乏的幼兒患者的治療的功効和安全的多重的研究。J. Clin.Endocrinol.Metab.86 (2001), pp. 4700–4706.)

如本文所述，大鼠的的藥物代謝動力學的特性，顯示其 GH-CTP

〈重組的人類生長激素-CTP的融合蛋白〉的持續時間較長於GH〈生長激素〉的持續時間。這種獨特的藥物代謝動力學的特性允許GH-CTP的間歇給藥，而能使生長激素缺乏的大鼠達到藥效動力學的效果，此效果分別被生長和血漿IGF-1水平的升高所證實。

對大鼠施予皮下注射給藥，GH-CTP比起GH提供了比較優越的藥物代謝動力學的特性。GH-CTP的血漿清除率比起GH的血漿清除率有很大的差別。具體而言，在皮下注射給藥之後，血漿的GH-CTP的清除率比GH的清除率慢了6倍以上。對大鼠施予皮下注射給藥之後，GH-CTP的終端半衰期和平均滯留時間大約是GH的6倍長。另外，在皮下注射給藥之後，GH-CTP的Cl/F比GH低了10倍。

在研究大鼠的藥物代謝動力學的優勢是否能轉換為藥效的益處的努力中，以等摩爾的CTP-hGH和GH的劑量水平來測試此種可能性：以小於每日給藥的頻率，給GH缺乏的垂體被切除的大鼠施用GH-CTP以刺激其生長。因為促進體重增加的GH-CTP的單個皮下注射等於GH的連續4次的每日注射。另外，每第四天給藥的方案顯示了GH-CTP對體重收益的增強大於GH。

量測切除垂體的大鼠在單個皮下注射後的血漿，在藥效上，顯示GH-CTP比GH有較長的循環時間，導致了延長的IGF-1的反應。對於切除垂體的大鼠，GH-CTP的單劑量的皮下給藥，以劑量依賴性的方式增加了循環的IGF-1的濃度。以最高的融合蛋白的劑量，在單次給藥後，IGF-1的濃度升高超過75小時的基線。因此，比起GH的單一劑量，GH-CTP的單一劑量的增強的循環時間導致了藥效大幅度的改進，而提高了此可能性：比起標準的GH的治療方案，GH-CTP可以以減少的給藥頻率來提供類似的生長的增強。

獼猴在90毫克/千克和大鼠在180毫克/千克的單個CTPs修飾的hGH-劑量下，都有良好的耐受性。大鼠和靈長類動物之間的異速生長

因子大約是2倍，其係依據這些動物中蛋白質的預期的清除率所估算。線上的治療性蛋白的半衰期的業界接受的外推模型在物種之間增加了（FDA指南）。靈長類動物的CTPs修飾的hGH的90毫克/千克的PK的輪廓稍好於大鼠的180毫克/千克。因此，異速生長外推到人類支持了每週一次或一次/二週（2W）的注射。

本發明的利用CTP-GH構築體的概念，比起商業的GH的重組產物，減少了給藥的頻率。NutropinDepot®是被批准用於兒童的GH的緩釋的製劑；然而，歷史對照的比較透露出，對於1年和2年的生長率，給予NutropinDepot®的兒童（1年成長率 8.2 ± 1.8 厘米/年）比起以GH治療的兒童（1年成長率 10.1 ± 2.8 厘米/年）明顯降低了（ $P < 0.001$ ）(Silverman BL, 等人, J. Pediatr. Endocrinol.Metab.15 (2002), pp. 715–722.)。NutropinDepot®的皮下給藥的局部效應包括結節，紅斑，注射部位的疼痛，頭痛，和嘔吐等。對大鼠和獼猴的臨床前毒理學的研究表明，對比介質，CTP-hGH-CTP-CTP的皮下給藥產生了非局部性反應。鑑於GH的較不頻繁的給藥形式的醫療需求，本研究的大鼠的CTP-hGH-CTP-CTP的藥理學性質表明，本產品在毒理學和患者的順應性上也是有利的。大鼠的CTP-hGH-CTP-CTP的持續活性支持了其作為藥劑的潛在效用，該藥劑僅需要間歇給藥就可獲得目前的每天給藥所達到的治療益處。

例9

長效的人類生長激素的CTP-修飾的版本(hGH-CTP)對於生長激素缺乏的成年人是非常有效的—II期臨床試驗

隨機的，開放-標記的II期臨床試驗被施行用來評估患者每周一次或每月兩次注射hGH-CTP的安全性，耐受性，藥物代謝動力學，和藥效學特性，該患者目前正在接受生長激素的每天注射。該試驗進行於六個國家的多個地點。試驗的三個主要組群接受的hGH-CTP的一週一

次的單劑量，含有等效的累積的商業hGH的劑量的30%，45%或100%，該劑量是生長激素缺陷的成年患者所接受的每天注射的七天的過程的量（分別稱為“30%”，“45%”，“和”100%“的組群）。數據取自39個患者，每個組群有13個，每個組群包含2個女性。

除了三個主要的組群之外，生長激素缺乏的成年人被納入參加實驗的第四個組群，其進行於正規的II期臨床試驗之外。實驗的第四組群的患者接受每兩個星期一次的hGH-CTP的單次注射，其包含累計的商業劑量的50%，該劑量是生長激素缺陷的成年患者所接受的每日注射的兩個星期的量。

接受hGH-CTP的每周一次的單次注射的三個主要組群的療效，被定義為在七天的期間（研究的治療的最後一週）每日測量在所期待的治療範圍內的胰島素樣生長因子-1（IGF-1）的水平。所期待的治療範圍被定義為正常的人群被期待的IGF-1的平均值的 ± 2 標準差的範圍，該人群係以年齡和性別來分層。另外，在 ± 1.5 標準差的較窄範圍的試驗測量的IGF-1的水平，被用來觀察正常範圍內的患者的變異。

結果：

表10中包含正常治療範圍內（ ± 2 標準差）的天數的平均百分比，較窄的正常治療範圍內（ ± 1.5 標準差）的天數的平均百分比，以及最後治療一周測量的男性的IGF-1的平均的C_{max}（最高濃度水平），其以偏離正常人群的平均的IGF-1水平的標準偏差來表示。

表 10：人類II期臨床試驗的結果。

群組	IGF-1的窄的正常範圍（+/-1.5 SD）內的天數的%	IGF-1 的正常範圍（±2 SD）內的天數的%	IGF-1的平均的C max（低於2 SD較佳）
30%	57%	100%	-0.9
45%	100%	100%	0.1
100%	86%	100%	0.4

每周二毫克的hGH-CTP含有累積的每週一次的hGH的劑量的50%，其具有被界定為成人III期的男性和女性的起始劑量的高可能性，該每週一次的hGH的劑量為一般成年患者的初始的治療劑量。

沒有安全性和/或耐受性的問題的證據，且沒有顯示：hGH-CTP使用高劑量時，會誘導患者的IGF-1過高的水平或甚至高於正常範圍的水平。

II期-IGF-1的總結與展望

MOD-4023的 II期研究的設計和目標：

證實CTP-hGH-CTP-CTP（MOD-4023）的每周給藥的方案的两階段的II期研究被完成（參見圖10）。試驗是研究上的開關，研究施行於生長激素缺乏（GHD）的患者，患者目前正接受每日的hGH的治療，其被歸一化於MOD-4023給藥之前的每日的治療，如正常範圍內（±2標準偏差）的IGF-1標準偏差的水平所反映的。研究的階段I是4周的劑量-發現的研究（4次注射），其被在MOD-4023的第4個劑量之後的一周的完整的藥物代謝動力學-藥效學（PK-PD）的分析所支持。這部分的主要目的是要確認治療劑量的範圍，其中，IGF-1的水平被保持在一個規定的範圍之內。另一個目的是要評估在3個不同的劑量/倍增數的MOD-4023的PK-PD的輪廓，並確認劑量依賴性的反應。研究的第二階段（階段II）是16周的MOD-4023的治療和劑量滴定期。繼續階段II的

所有患者開始施用相同的MOD-4023的劑量水平（其個人的，優化的，每週一次的累積的r-hGH的劑量的61.7%），但可以基於其被監測的IGF-1水平而有自己的被修正的劑量。

在研究的第一部分中，劑量依據每週一次的累積的hGH的百分比而被施用，用來評價MOD-4023的每週一次的治療方案的初始的響應。例如：接受hGH的1毫克/天的患者被注射1毫克*7天*每週一次的0.55%的 MOD-4023的劑量，該患者係隨機分配到的55%的組群。

結果

本研究的主要療效的終點是IGF-1水平的平均時間間隔，該IGF-1水平係在階段I的最後的劑量給藥之後的正常範圍內，平均時間間隔的單位以小時表示。在最後的分析中，大多數患者的IGF-1水平在一周裡均在正常的範圍內（表11）。於最後的時間點在特定的SDS範圍內的患者被指定為168小時的時間間隔。沒有患者超過C max的+2 SDS，其顯示不存在過度的IGF-1的水平。八十五百分比的男性（28/33的男性）具有正常範圍內的平均的IGF-1的 SDS（±2 SDS）（圖11）。因為所有的平均時間間隔均在彼此的1個標準差內，故在所有三個組群的±正常範圍內的IGF-1水平的平均時間間隔未顯示顯著的變化。

表11：在階段I的第4次劑量給藥之後，在±2SDS內的IGF-1的時間間隔

組群2 每周一次的hGH的37%	組群3 每周一次的hGH的55%	組群1a 每周一次的Hgh的123.4%
156.37小時 120.9±66.24 (小時)	168小時 146.49±50.62(小時)	151.17小時 119.9±66.51(小時)

如所預期的，每周一次的hGH的37%的給藥導致IGF-1SDS的值在正常範圍的較低部分，且在正常範圍內持續較短的時間。當較高的劑量（每周一次的累積的hGH劑量的55%）被施用時，觀察到IGF-1的水平有顯著的改善，如在正常範圍內時所反映的。

與基線相比的劑量依賴的IGF-1的響應顯示於圖12。圖12所示的結果，支持此觀點：IGF-1的水平以MOD-4023劑量依賴的方式增加，可以用來調整IGF-1的周的輪廓。另外，給藥後120-168小時，偏離IGF-1值的基線的平均變化會返回到基線值，此顯示IGF-1的谷底水平是穩定的，在此歸一化的生長激素缺乏的成年人（GHDA）群體中沒有惡化（圖12）。

每日治療的歸一化的患者的C_{avg}（AUC/時間），其表示平均的IGF-1的接觸，比較於相同患者的每周一次的MOD-4023的治療（分別為AUC0-24/ 24小時對比0-168/168小時）。累積的每周一次的hGH劑量的55-123.4%的周劑量提供可比較的IGF-1的接觸，如C_{avg}所反映的，而對於以周劑量的37%治療的患者，其C_{avg}則被觀察到減少了，其係由於相對低的周劑量所致而與我們的期望相一致（表12及13）。

表12：對於生長激素缺乏的成人，於MOD-4023給藥之前，在r-hGH的皮下給藥之後，IGF-1的藥物代謝動力學參數的總結（階段1；4周）

參數	群組*（最佳化的生長激素的治療）		
	2	3	1a
C _{avg} (奈克/毫升)	174 ± 57.0 (11)	178 ± 43.1 (11)	154 ± 28.5 (11)

*平均值±標準差（N）

表13：對於生長激素缺乏的成人，在MOD-4023的皮下給藥之後，IGF-1的藥物代謝動力學參數的總結（階段1；4周）

參數	群組*（MOD-4023的治療）		
	2 (37%)	3 (55.5%)	1a (123.4%)
C _{avg} （奈克/毫升）	117 ± 32.5 (11)	147 ± 50.9 (11)	50.4 (11)

根據II期的階段I的PD的分析，得到以下的結論：1）雖然研究的目的是不是要最佳化患者的IGF-1的水平，即，針對為0的IGF-1 SDS之值，（因為IGF-1 SDS的最佳化需要較長的滴定時間），但仍然可以建

立MOD-4023的每周給藥的治療劑量的範圍：約每日的hGH的周累積的劑量的56%-123%。 2）每周一次的MOD-4023的給藥之後的IGF-1的曲線比較平坦，如Cmax和Ctrough之間的相當小的差異所反映的。 3）表示平均的周的IGF-1的接觸的Cavg（AUC0-168/168小時）關連到第4天的值。因此，MOD-4023給藥後第4天被選為IGF-1的水平的監測日。

II期階段II（4個月的延長）的結果和展望：

研究的第二部分揭露：MOD-4023的每周一次的給藥在最佳劑量和更長的時間下維持IGF-1在正常範圍內的能力（階段II-4個月的延長期間；圖10）。在此研究中，來自第一階段的相同的患者群組被給予其hGH的周劑量的61.7%且每兩個星期監測IGF-1。在整個研究中，大多數患者維持IGF-1的SDS之值在正常範圍內，如注射後第4天之所測。顯示IGF-1水平低於正常範圍的患者需進一步被滴定且增加他們的MOD-4023的劑量（與臨床實踐相一致）。

IGF-1的SDS值低於正常範圍的少數患者需要進一步的滴定，但已證明IGF-1的SDS值有顯著的改善，此表明IGF-1的曲線可以被MOD-4023劑量的增加/減少來最佳化。優異的響應和最小的劑量的修正是需要的，如圖13之所示，且被總結於下面的表14中。

表14：階段II期間需要的劑量調整的總結。

劑量調整的數目	男性	女性
無劑量調整	22 (34)	3 (8)
1個劑量調整	6 (34)	1 (8)
2個劑量調整	3 (34)	3 (8)
3個劑量調整	3 (34)	1 (8)

根據第4天的IGF-1的SDS值（關連到Cavg），比起研究的第一階

段，個體患者的IGF-1的水平有顯著的改善。這種觀察進一步支持了此觀點：要達到最佳的IGF-1的水平和分佈需要調整期間。已知雌性對hGH的替代治療（以及MOD-4023）較不敏感，且通常需要較高的劑量和較長的滴定期間。另外，在4個月的延長的期間，第4天所測得的IGF-1的SDS的水平恆定地維持在正常範圍內的相似的值，這表明MOD-4023可以以每周一次的方案給藥。已觀察到：MOD-4023的連續給藥之後，IGF-1的水平在第4天無重大的減少，此顯示IGF-1的“正弦”行為的C_{max}和C_{trough}被維持於研究過程中，再次證實了MOD-4023的每周一次的方案。

總之，MOD-4023可避免目前的生長激素缺乏症（GHD）的治療需要的大量的注射。本研究的結果表明：MOD-4023可以每周注射一次並達到臨床評估的療效的終點，同時保持了有利的安全性特徵。需要較少頻率的注射的生長激素的治療方案可以改善順應性和潛在的整體效果。

因此，基於所獲得的IGF-1的輪廓和II期的安全性和耐受性的結果，用於III期研究的被推薦的注射頻率和給藥是：每一個病人每周單次注射含有累積的每周一次的hGH的給藥劑量的61.7%的MOD-4023。

例10

用來改善青春前期生長激素缺乏（GHD）之兒童的藥物代謝動力學的人類生長激素的CTP-修飾的變體（hGH-CTP）的給藥

隨機的，開放-標記的，II期的臨床試驗被施行用來評估三個MOD-4023劑量相對於市售標準的每天的重組人類生長激素的安全性，耐受性，藥物代謝動力學，和藥效學特性。研究包括6個月的篩選和兩個活性治療周期：包括PK / PD的採樣的6個月的治療，接著另6個月的連續反復給藥周期，如圖14之所示。次要目的是要評估三個不同劑量的MOD-4023對青春前期生長激素缺乏（GHD）的兒童的藥物代

謝動力學（PK）與藥效學（PD）的輪廓，及在安全性和有效性的基礎上來選擇MOD-4023的最佳劑量用於隨後的3期的研究。

為了以漸進的方式使初治患者施用分配的MOD-4023的劑量(見表15)，以逐步地增加劑量來實施。所有病患隨機地接受三種MOD-4023的劑量之一來開始2周的低劑量（0.25毫克/千克）的MOD-4023的治療。根據患者的劑量分配，在這之後，每兩周地將劑量增加至下一個劑量的水平，直至最後分配的劑量。

表15：劑量的組群

組群	MOD-4023/Genotropin 的劑量
1	相當於0.18毫克的hGH /千克每周的注射的0.25毫克的MOD-4023的蛋白質/千克/周。
2	相當於0.35毫克的hGH /千克每周的注射的0.48毫克的MOD-4023的蛋白質/千克/周。
3	相當於0.48毫克的hGH /千克每周的注射的0.66毫克的MOD-4023的蛋白質/千克/周。
4	GENOTROPIN：0.034毫克/千克/天。

目標劑量的第二劑量給藥之後，進行限制的（依據群體）PK和PD的取樣，如表16之所示。

表16：MOD-4023組群的劑量增加的方案

組群	給藥方案					
	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周
組群1	0.25 毫克的蛋白質/千克/周					
		PK/PD 取樣				

組群2	0.25 毫克的蛋白質/千克/周	0.48 毫克的蛋白質/千克/周	PK/PD 取樣
組群3	0.25 毫克的蛋白質/千克/周	0.48 毫克的蛋白質/千克/周	0.66 毫克的蛋白質/千克/周 PK/PD 取樣

根據下面的表 17，分配到MOD-4023劑量組群的患者被隨機地分為三個區塊之一，而接受限制的PK/ PD的取樣（為期一周，每名患者採4個樣品）。

表 17：MOD-4023組群的PK和PD的取樣方案

診察(V2, V3, V4)	a			b	c	d	e	f	g
給藥後時間（小時）/區塊編號 Time after dosing(h)/ Block number	0 小時	6小時	12小時	24 小時	48 小時	72 小時	96 小時	120 小時	168 小時
區塊1									
區塊2									
區塊3									

分配到組群 1 的患者在MOD-4023的第2個劑量（ V2a-g–第 2週）後接受限制的PK/ PD的取樣，並在第6周給藥之後4天返回醫療中心單次診察（ V4h）。

分配到組群 2 的患者在第2周的給藥之後4天回到醫療中心單次診察（ V2h），在MOD-4023的第4個劑量之後接受限制的PK/ PD的取樣（第4週：分配的劑量的水平的第二個劑量； V3a-g），並在第6週的給藥之後4天返回到醫療中心單次診察（ V4h）。

分配到組群 3 的患者在第2週和第4週的給藥之後4天回到醫療中心接受單次診察（ V2h和V3h），並在MOD-4023的第6個劑量之後接受限制的PK/ PD的取樣（第6週：分配的劑量水平的第二個劑量， V4a-g）。

在2a和2h，3a和3h，和4a和4h的診察時，患者接受身體檢查，生命體徵，AEs，局部耐受性，伴隨藥物，葡萄糖代謝參數（餐前葡萄糖和胰島素；僅在V4時的HbA1C），其它的激素水平（TSH，FT4，T3，皮質醇），日常安全生物化學和血液病學（2a和2h，4a和4h的診察），患者的身高和體重，脂質代謝的參數，和IGF-1和IGFBP-3的血清水平。

分配到Genotropin的組群（組群4）的患者在治療的第2周和第6周回到醫療中心接受診察2和4。施行下面的過程：身體檢查，生命體徵，AEs，局部耐受性，伴隨藥物，葡萄糖代謝參數（餐前葡萄糖和胰島素；僅在V4時的糖化血紅蛋白（HbA1C）），其它的激素水平（TSH，FT4，T3，皮質醇），日常安全生物化學和血液病學，患者的身高和體重，脂質代謝的參數，和IGF-1和IGFBP-3的血清水平（圖17）。

另外，在第8次的Genotropin的劑量之後（給藥的第2周的開始），分配到Genotropin的組群的患者，根據下面表18，隨機地分為三個區塊中的一個，並接受了限制的PK/ PD的取樣（每名患者在24小時的期間取4個樣品）：

表18：Genotropin的組群的PK和PD的取樣方案（診察2）

給藥後的時間(小時) /區塊編號號	0 小 時	1 小 時	2 小 時	4 小 時	6 小 時	12 小 時	16 小 時	20小	24 小 時
區塊1									
區塊2									
區塊3									

在研究的第1個6周之後，所有患者按月入院就診（第10，14，18，22和26周）。分配到MOD-4023劑量的群組（群組1-3）的患者，在MOD-4023給藥後4天被要求返回以獲得MOD-4023，IGF-1，和IGFBP-3的水平，且進行常規的安全性評估。另外，在給藥5個月後，分配到MOD-4023的給藥的患者被要求早上吃藥前返回醫療中心，以獲得谷底

水平的MOD-4023和PD(IGF-1和IGF-1BP-3)的樣品。分配到Genotropin給藥的群組（群組4）的患者被要求在有關的給藥的星期中的任何一天返回。

結果：

呈現所有患者的研究的人口統計列於下面表19中：

	群組 1		群組 2		群組 3		群組 4	
劑量	0.25 mg/kg/w MOD-4023		0.48 mg/kg/w MOD-4023		0.66 mg/kg/w MOD-4023		0.034 µg/kg/d Genotropin	
N	9		9		10		7	
	平均值	標準差	平均值	標準差	平均值	標準差	平均值	標準差
年紀 (年)	6.44	2.3	6.33	2.1	6.10	2.2	5.43	1.9
峰的 GH (ng/ml)*	2.84	2.9	3.58	1.7	4.41	3.2	2.92	2.4
HV SDS	-3.05	2.0	-2.82	1.1	-3.11	1.8	-3.36	2.0
HT SDS	-3.99	0.9	-3.82	0.8	-3.91	1.1	-4.79	1.7
Ht SDS - TH SDS	-3.47	0.9	-3.23	0.7	-3.25	1.3	-4.20	1.8
篩選 IGF-1 SDS	-2.48	0.8	-2.28	0.7	-1.81	0.7	-2.34	1.2
性別(%)	F 1 (11.1)	M 8 (88.8)	F 4 (44.4)	M 5 (55.6)	F 3 (30)	M 7 (70)	F 3 (42.9)	M 4 (57.1)

給藥給初治的GHD的MOD-4023在最終給藥時；其平均的PK的概況顯示在圖15中，而PK參數顯示在下面的表20中：

表20：比較平均的PK的參數

	單位	MOD-4023			hGH
		C1 (n=13)	C2 (n=12)	C3 (n=13)	C4 (n=11)
T _{1/2}	小時	36.1	29.2	29.1	3.6
T _{max}	小時	12	12	12	2
C _{max}	奈克/毫升	459.9	810.2	795.5	17.3
AUC 0-inf_obs	奈克/毫升*小時	10943.4	20050.3	25503.1	135.7
Cl/F_obs	(毫克/千克) / (奈克/毫升) /小時	2.28E-05	2.39E-05	2.59E-05	2.51E-04

如預期的每周一次地給藥的MOD-4023表現出延長的半衰期，比起

每日給藥的hGH其半衰期高了8倍。另外，劑量依賴的反應被觀察到，如各個MOD-4023劑量的AUC值所反映的。

劑量依賴的反應被維持在MOD-4023的每周給藥的前6個月（數據未被顯示）。

被證實為hGH的活性的替代標記的IGF-1也以劑量依賴的水平增加（圖23），在大部分的星期中保持在目標值（在-2高的SD分數[SDS]以上）而沒有過高的水平（>2SDS，圖21）。在研究中的前6個月，IGF-1SDS水平以劑量依賴的方式持續溫和地升高，而沒有達到大於2SDS的過高水平（圖16）。

治療手臂的hGH（組群4）也顯示出IGF-1的SDS值的提高，其非常相似於在兩個MOD-4023的最高的組群中所觀察到的趨勢。此外對於MOD-4023的給藥，IGF-1 BP-3的值也以劑量依賴的方式增加，約15周達到穩定狀態的值（分別為圖17和圖18）。總之，IGF-1和IGF1BP-3此兩個藥效特性證實了：在相似的劑量範圍，MOD-4023的每周單次的注射可以取代7個每日的注射。

在給藥前和在MOD-4023的每周給藥或hGH的每日給藥之後的六個月，監測高度的速度。對於所有的組群，均得到卓越的生長反應，在不同的組群之間沒有統計上的差異（表21和圖19），進一步證實了：MOD-4023的每周的注射，如每天的hGH，可以允許適當的生長。

表21：MOD-4023的6個月的按年計算的身高的速度 -所有患者均完成6個月的治療。

組群	劑量	N	平均（公分）	標準差
組群1	0.25毫克/千克/周MOD-4023	9	13.48	2.71
組群2	0.48毫克/千克/周 MOD-4023	9	12.25	2.64
組群3	0.66毫克/千克/周MOD-4023	10	14.37	5.26
組群4	0.034微克/千克/天Genotropin	7	15.46	2.68
	歷史的數據 - 每日的hGH		~10	

同時，也得到高度速度的SDS的卓越的增加（表22，表23，和圖20）。最後，高度差的SDS顯現與患者的追趕生長有良好的相關性（圖22）。

表22：MOD-4023 的Ped.期2 - 前期-研究的HV的 SDS的結果

組群	劑量	N	平均	標準差	SE平均
組群1	0.25毫克/千克/周 MOD-4023	8	-3.21	2.05	0.72
組群2	0.48毫克/千克/周 MOD-4023	8	-2.94	1.14	0.40
組群3	0.66毫克/千克/周 MOD-4023	10	-3.11	1.79	0.56
組群4	0.034微克/千克/天 Genotropin	7	-3.36	1.98	0.75

表23：MOD-4023的 Ped.期2 – 6個月的HV 的SDS的結果

組群	劑量	N	平均	標準差	SE 平均
組群1	0.25毫克/千克/周 MOD-4023	8	5.03	1.23	0.44
組群2	0.48 毫克/千克/周 MOD-4023	8	3.23	1.88	0.67
組群3	0.66 毫克/千克/周 MOD-4023	10	5.73	3.72	1.18
組群4	0.034 微克/千克/天 Genotropin	7	5.67	1.53	0.58

結論

所有劑量提供了好的追趕生長的反應。初步統計分析表明：在組群之間沒有統計學上的顯著的差異，但有一些限制，如對每組群患者的受限的數目和比較嚴重的生長激素缺乏症的患者。

例11

MOD-4023的配方的開發

蛋白質：MOD-4023是皮下給藥的長效型的重組人類生長激素（hGH）。MOD-4023包括融合到三份的人類絨毛膜促性腺激素（hCG）

的β鏈的C-端肽（CTP）的hGH；CTP包括四個O-糖基化位點，因此，蛋白質是具有高達12個 O-連接的碳水化合物的275個胺基酸的單鏈。該蛋白質在CHO細胞中從生產選殖株被製造出。

生產選殖株：選殖株 # 2是用於早期的毒理學研究，第一期和第二期（成人）的原始選殖株。這個選殖株的DS和DP在-20°C和5°C下的穩定性數據可用於長達2年。轉換成新的生產選殖株（選殖株 # 28）被施行用來提高生產率和選殖株的穩定性。選殖株 # 28的 DP支持長期的毒性研究和兒童的第二期的研究，並將支持所有進一步的臨床活動和商業的生產。這個選殖株的DP在-20°C和5°C下的穩定性數據可用於長達1年。

製造CMO：MOD-4023是Xcellerex（USA）在早期階段所製造，並支持第二期的非臨床研究。該過程被轉移到 Rentschler Biotechnologie (RB)，（德國）。兩個優良製造規範（GMP）的批次已經在RB被生產了。

其它的訊息

物化性質－

高度糖基化和帶有pI =3-4.5的負電荷

密度：1.0216克/毫升

可溶於水溶液

DS和DP的液體製劑：10毫莫耳的檸檬酸，147毫莫耳的氯化鈉，pH = 6。

DS的最終濃度：40毫克/毫升

DP的最終濃度：5，10，20，和40毫克/毫升

主要包裝 -

2R的瓶子（Schott）

有塞的瓶子（West）

鋁箔密封的瓶子（West）

未來的主要包裝—筆式（PEN）裝置

製劑最佳化的目的

開發MOD-4023的穩定的液體製劑：

1.第一個目標：在5°C 的瓶子中2年的穩定性

2.第二個目標：在5°C 的盒子中2年的穩定性

所需的分析測試：

RP-HPLC（驗證的方法）

SEC-HPLC（驗證的方法）

CZE（TBD）（確定的方法）

時間軸：

基於穩定性數據，25°C 2周的穩定性數據可被用來預測產品在5°C 的穩定性，而允許廣泛的基質配方的初步評估。

穩定性的數據

數據顯示製備於pH=6的10毫莫耳的檸檬酸鹽，147毫莫耳的氯化鈉中的非GMP和GMP的批次，（圖24）。數據也顯示：MOD-4023選植株2於5°C，20毫克/毫升時可穩定24個月，及在5毫克/毫升和20毫克/毫升之間有類似的穩定性的特徵（參見圖25A和25B）。另外，MOD-4023選植株2於室溫下可穩定3個月（參照圖26）。MOD-4023選植株28在5°C，20毫克/毫升或40毫克/毫升下，可穩定十二個月；DP的主峰規格>88%（圖27A和圖27B）。MOD-4023選植株28在室溫下可穩定至少1個月（圖28A）。

基於選植株28和選植株2之間的相似性，在5°C下可以穩定24個月，因此可預期：在Xcellerex（XC）生產的選植株28會在5°C下保持穩定24個月；DP的主峰規格>88%（圖28B）。

MOD-4023的製造

Xcellerex(XC)在T =0的特性媲美於Rentschler (RB)的DS(圖29)。圖30-34顯示XC與RB之間的穩定性的差異。等電聚焦(IEF)表明：從3.5到4.2的PI-值範圍有類似的帶狀圖案。在一個XC的批次中，在高的pI值邊界中有較少的微弱的異構體，而在一個RB的批次中，在低的pI值邊界中有較多的微弱的異構體(圖35A)。另外，XC的樣品比RB的樣品有更擴散的帶(圖35B)。

其它的觀察表明：兩個峰的形成(3及5 -參見下面的峰的定義)是溫度依賴的，並在高溫下加速(圖36)。另外，在pH= 4時上至5天，及在pH= 12時上至6小時的培育之後，峰3的%沒有變化(圖37)，以及在pH= 4時上至6小時的培育之後，峰的%沒有變化。然而，在隨後的6小時峰的%的急劇上升被觀察到；在pH=12時培育上至2小時 - 峰消失(圖37)。

在RB的強制的降解的研究(選植株28)

當未加強的樣品的峰低於定量的限制〈LOQ〉時，MOD-4023的藥物物質的加強的樣品被製備(65°C，約三天)，而被用於MOD-4023的藥物物質的有關形狀5的分析。

為了測試pH值對RP-HPLC有關的形狀的影響，3個樣品被測試：

RB - 40毫克/毫升，pH值=5.9

RB - 10毫克/毫升，pH值=6.2

XC-40毫克/毫升，pH值=6.2

有關形狀的峰(1-7)的分離及特徵- M-掃描

峰1-脫酰胺的MOD-4023的氧化作用

峰2-MOD-4023的脫酰胺作用

峰3- MOD-4023的部分氧化作用

峰5- MOD-4023的胺基酸殘基167和168之間和胺基酸殘基171和172之間的肽鍵的裂解。二硫化物

峰6和峰7-截短的形狀

結論（參見圖24-39）

穩定性

選殖株2衍生的產物在5°C下穩定長達2年。

在XC製造的選殖株28衍生的產物在5°C下穩定至少1年，其具有如選殖株2的類似的特徵曲線。

在RB製造的選殖株28衍生的產物已經改變了穩定性特徵曲線，其具有加速的有關形狀（主要是峰5）的形成和新的峰（峰7）的形成，這些以前沒有被觀察到。

以前的研究顯示：峰3和5具有相似的作為主峰的M_w，並與相應於MOD-4023帶的抗-hGH反應。

兩個峰：3和5是溫度決定的（當溫度升高時峰的%增加）。

培養在-20°C和5°C時，觀察到HMW的形狀的百分比沒有變化。

RB的產物GMP1（2周的培育之後）在5，25，37，50，和65°C的不同的溫度下的穩定性顯示：峰7的形成在25°C和37°C下被加速，但在50°C和65°C下未被觀察到的。

RB的樣品在65°C下培育10分鐘然後在25°C下培育，可根除峰7的形成（在25°C下2星期之後）。

本發明的較佳的實施例已經參照附圖加予描述，但應理解到，本發明並不限於所述的確切的實施例，並且各種變化和修改可以被本領域之技術人員實現而不背離本發明的如申請專利範圍所界定的範圍或精神。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 以色列商歐科生物製品有限公司

<120> 長效型多肽及其生產和給藥的方法

<130> P-9520-TW

<140> TW103143380

<141> 2014-10-21

<150> 14/059,134

<151> 2013-10-21

<150> 14/309,496

<151> 2014-06-19

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1 $\langle 211 \rangle$ 221

<212> PRT

<213> 智人

 $\langle 400 \rangle$ 1

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
195 200 205

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
210 215 220

<210> 2
<211> 249
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly

115

120

125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu

130135140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile

145150155160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu

165170175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp

180185190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser

195200205

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser

210215220

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly

225230235240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

245

<210> 3

<211> 277

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
20 25 30

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
35 40 45

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
50 55 60

Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
65 70 75 80

Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
85 90 95

Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
100 105 110

Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
115 120 125

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
130 135 140

Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
145 150 155 160

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
165 170 175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
180 185 190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
195 200 205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser
210 215 220

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
225 230 235 240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
245 250 255

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
260 265 270

Pro Ile Leu Pro Gln
275

- <210> 4
- <211> 387
- <212> PRT
- <213> 智人

- <400> 4

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
195 200 205

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro
210 215 220

Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala
225 230 235 240

Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu
245 250 255

Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp
260 265 270

Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu
275 280 285

Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn
290 295 300

Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val
305 310 315 320

Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln
325 330 335

Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg
340 345 350

Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn
355 360 365

Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr
370 375 380

Gly Asp Arg
385

<210> 5
<211> 221
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
20 25 30

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
35 40 45

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
50 55 60

Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
65 70 75 80

Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
85 90 95

Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
100 105 110

Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
115 120 125

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
130 135 140

Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
145 150 155 160

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
165 170 175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
180 185 190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
195 200 205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
210 215 220

<210> 6
<211> 249
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
20 25 30

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
35 40 45

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
50 55 60

Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
65 70 75 80

Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
85 90 95

Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
100 105 110

Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala

115

120

125

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu

130135140

Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu

145150155160

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro

165170175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr

180185190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu

195200205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser

210215220

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly

225230235240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

245

- <210> 7
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> 人工

<220>
<223> EPO-CTP 構築體之正向引子

<400> 7
aatctagagg tcatcatggg ggtgc 25

<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> EPO-CTP 構築體之正向引子

<400> 8
attgcggccg cggatccaga agacctttat tg 32

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> EPO-CTP 構築體之反向引子

<400> 9
taaatatagg ggtgtccgag ggccc 25

<210> 10
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> EPO-CTP 構築體之正向引子

<400> 10

ccaatattac cacaagcccc accacgcctc at

32

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> EPO-CTP 構築體之反向引子

<400> 11

tgcggccgcg gatccttata tgteccctgt cctgc

35

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> EPO-CTP 構築體之正向引子

<400> 12

gccctgctgt cggaagc

17

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> EPO-CTP 構築體之反向引子

<400> 13

attgcggccg cggatccaga agacctttat tg

32

<210> 14

<211> 32
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> EPO-CTP 構築體之反向引子

<400> 14
ctttgaggaa gaggagccca ggactgggag gc 32

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> EPO-CTP 構築體之正向引子

<400> 15
cctgggctcc tcttcctcaa aggc 24

<210> 16
<211> 193
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 17
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CTP 胺基酸序列

<400> 17

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
20 25 30

Pro Gln

<210> 18
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CTP 胺基酸序列

<400> 18

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
20 25

<400> 19

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly
20 25

$\langle 400 \rangle$	20
-----------------------	----

tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tccctgcctgg ctgtggcttc tccctgtccct	60
tctgtcgctc cctctggggc tcccagtcct gggtcctct tccctcaaagg cccctccccc	120
gagccttcca agtccatccc gactcccggg gccctcggac accccaatat taccacaagc	180
cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga	240
ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga aactgcagc ttgaatgaga atatcactgt	300
cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt	360
agaagtctgg cagggcctgg ccttgcctgc ggaagctgtc ctgcgggggc aggccctgtt	420
ggtcaactct tcccagccgt gggagccccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg	480
ccttcgcagc ctccaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccattctccc	540

tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact 600

cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660

caggacaggg gacagatcct cttectcaaa ggccccctcc ccgagccttc caagtccatc 720

ccgactcccg gggccccctgg acacccccgat cctcccacaa taaaggtctt ctggatccgc 780

ggccgc 786

<210> 21

<211> 873

<212> DNA

<213> 智人

<400> 21

tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtccct 60

tctgtcgctc cctctgggcc tcccagtcct gggtcctct tcctcaaagg cccctccccc 120

gagccttcca agtccatccc gactccccgg gccctcggac accccaatat taccacaagc 180

cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga 240

ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga aactgcagc ttgaatgaga atatcactgt 300

cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt 360

agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt 420

ggtcaactct tcccagccgt gggagcccc tgcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg 480

ccttcgcagc ctaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc 540

tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact 600

cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660

caggacaggg gacagatcct cttcctcaaa ggccccctccc ccgagccttc caagtccatc

720

ccgactccccg gggccccctccg acacaccaat cctgccacag agcagctcct ctaaggcccc

780

tectccatcc ctgccatccc cctccccggct gcctggcccc tctgacaccc ctatcctgcc

840

tcagtgatga aggtctttctg gatccgcggc cgc

873

<210> 22

<211> 221

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu

20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu

35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu

50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg

65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu

85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Ser Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
195 200 205

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
210 215 220

- <210> 23
- <211> 217
- <212> PRT
- <213> 智人

- <400> 23

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

1					5					10					15				
Cys	Leu	Pro	Trp	Leu	Gln	Glu	Gly	Ser	Ala	Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu				
			20					25					30						
Ser	Arg	Leu	Phe	Asp	Asn	Ala	Met	Leu	Arg	Ala	His	Arg	Leu	His	Gln				
		35					40					45							
Leu	Ala	Phe	Asp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Glu	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Lys				
50					55						60								
Val	Gln	Lys	Tyr	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro	Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe				
65				70						75			80						
Ser	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys				
			85					90					95						
Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser	Trp				
			100					105					110						
Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val				
115						120						125							
Tyr	Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	Asn	Val	Tyr	Asp	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu				
130					135						140								
Glu	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	Pro	Arg				
145					150						155			160					
Thr	Gly	Gln	Ile	Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser	Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser				

165					170					175					
His	Asn	Asp	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe
180					185					190					
Arg	Lys	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Val	Gln	Cys
195					200					205					
Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe							
210					215										
<210>	24														
<211>	166														
<212>	PRT														
<213>	智人														
<400>	24														
Met	Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Phe	Gln
1	5				10					15					
Ser	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu
20					25					30					
Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln
35					40					45					
Gln	Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Tyr	Glu	Met	Leu	Gln
50					55					60					
Asn	Ile	Phe	Ala	Ile	Phe	Arg	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Gly	Trp	Asn
65				70				75				80			

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 26
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser
20

<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> HGH-CTP 構築體之 XbaI 正向引子

<400> 27
ctctagagga catggccac 19

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> HGH-CTP 構築體之反向引子

<400> 28
acagggaggt ctgggggttc tgca 24

<210> 29
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> HGH-CTP 構築體之正向引子

<400> 29
tgcagaaccc ccagacctcc ctgtgc 26

<210> 30
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> HGH-CTP 構築體之反向引子

<400> 30
ccaaactcat caatgtatct ta 22

<210> 31
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> HGH-CTP 構築體之 XbaI 正向引子

<400> 31
ctctagagga catggccac 19

<210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> HGH-CTP 構築體之反向引子

<400> 32

cgaactcctg gtaggtgtca aaggc25

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> HGH-CTP 構築體之正向引子

<400> 33

gcctttgaca cctaccagga gttcg25

<210> 34

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> HGH-CTP 構築體之 NotI 反向引子

<400> 34

acgcggccgc atccagacct tcatcactga ggc33

<210> 35

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> HGH-CTP 構築體之反向引子

<400> 35

gcggccgcgg actcatcaga agccgcagct gccc

34

<210> 36

<211> 217

<212> PRT

<213> 智人

<400> 36

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu

20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln

35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys

50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe

65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys

85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp

100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val

115

120

125

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

130135140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg

145150155160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser

165170175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe

180185190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys

195200205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

210215

<210> 37

<211> 245

<212> PRT

<213> 智人

<400> 37

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

151015

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu

202530

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
180 185 190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
210 215 220

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
225 230 235 240

Pro Ile Leu Pro Gln
245

<210> 38
<211> 273
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
180 185 190

Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
210 215 220

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
225 230 235 240

Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
245 250 255

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
260 265 270

Gln

- <210> 39
- <211> 301
- <212> PRT
- <213> 智人

<400> 39

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
20 25 30

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
35 40 45

Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
50 55 60

Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
65 70 75 80

Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
85 90 95

Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
100 105 110

Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
115 120 125

Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
130 135 140

Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
145 150 155 160

Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
165 170 175

Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
180 185 190

Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
195 200 205

Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
210 215 220

Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
225 230 235 240

Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
245 250 255

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
260 265 270

Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
275 280 285

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
290 295 300

<210> 40
<211> 285
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
20 25 30

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

Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp

50

55

60

Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr

65707580

Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile

859095

Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu

100105110

Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val

115120125

Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser

130135140

Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln

145150155160

Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile

165170175

Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp

180185190

Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met

195200205

Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu

210

215

220

Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu

225

230

235

240

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro

245

250

255

Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser

260

265

270

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

275

280

285

<210> 41

<211> 273

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

1

5

10

15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala

20

25

30

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp

35

40

45

Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe

50

55

60

Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
65 70 75 80

Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
85 90 95

Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
100 105 110

Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
115 120 125

Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
130 135 140

Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
145 150 155 160

Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
165 170 175

Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
180 185 190

Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
195 200 205

Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
210 215 220

Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
225 230 235 240

Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
245 250 255

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
260 265 270

Gln

<210> 42
<211> 245
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
20 25 30

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
35 40 45

Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
50 55 60

Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
65 70 75 80

Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
85 90 95

Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
100 105 110

Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
115 120 125

Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
130 135 140

Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
145 150 155 160

Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
165 170 175

Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
180 185 190

Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
195 200 205

Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
210 215 220

Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
225 230 235 240

Gly Ser Cys Gly Phe
245

<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CTP 胺基酸序列

<400> 43

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro
1 5 10

<210> 44
<211> 853
<212> DNA
<213> 智人

<400> 44
tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60

cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctctttcttct aaggctccac ccccatctct 120

gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac 180

catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct 240

ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag 300

cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa 360

cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat 420

ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctgggtgta 480

cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac 540

cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagaccta 600

cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct 660

gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag 720

aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gcccctcccc cgagcctgcc 780

ctccccaagc aggctgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgcctcagt gatgaaggtc 840

tggatgcggc cgc 853

<210> 45

<211> 937

<212> DNA

<213> 智人

<400> 45

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60

cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct 120

gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac 180

catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct 240

ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag 300

cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa 360

cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat 420

ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctggtgta 480

cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac 540

cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagaccta 600

cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct 660

gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag 720

aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gcccctcccc cgagcctgcc 780

ctccccaagc aggctgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgccacaga gcagctcctc 840

taaggccctt cctccatccc tgccatcccc ctcccggctg cctggccctt ctgacacccc 900

tatcctgcct cagtgatgaa ggtctggatg cggccgc 937

<210> 46

<211> 889

<212> DNA

<213> 智人

<400> 46

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60

cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctctttcttct aaggctccac ccccgagcct 120

gcccttcccc accatcccc tgagcaggct gttcgacaac gccatgctga gggctcacag 180

gctgcaccag ctggcctttg acacctacca ggagttcgag gaagcctaca tccccaaagga 240

gcagaagtac agcttcctgc agaaccceca gacctccctg tgcttcagcg agagcatccc 300

cacccccagc aacagagagg agaccagca gaagagcaac ctggagctgc tgaggatctc 360

cctgctgctg atccagagct ggctggagcc cgtgcagttc ctgagaagcg tgttcgccaa 420

cagcctggtg tacggcgcca gcgacagcaa cgtgtacgac ctgctgaagg acctggagga 480

gggcatccag accctgatgg gccggctgga ggacggcagc cccaggaccg gccagatctt 540

caagcagacc tacagcaagt tcgacaccaa cagccacaac gacgacgccc tgctgaagaa 600

ctacgggctg ctgtactgct tcagaaagga catggacaag gtggagacct tcctgaggat 660

cgtgcagtgc agaagcgtgg agggcagctg cggcttcagc tccagcagca aggccccctcc 720

cccgagcctg cccctccccaa gcaggctgcc tggggccctcc gacacaccaa tcctgccaca 780

gagcagctcc tctaaggccc ctctcccatc cctgccatcc cccctcccggc tgccctggccc 840

ctctgacacc cctatcctgc ctcagtgatg aaggtctgga tgcggccgc 889

<210> 47

<211> 217

<212> PRT

<213> 智人

<400> 47

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu

20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln

35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys

50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe

<210> 48

<211> 33
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
20 25 30

Gln

<210> 49
<211> 26
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala
20 25

<210> 50
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EPO-CTP 構築體之反向引子

<400> 50
gcttccgaca gcagggc

17

申請專利範圍

1. 一種藥物製劑，其含有緩衝液、等滲劑和經羧基末端肽（CTP）修飾之感興趣的多肽的序列，該經CTP修飾之感興趣的多肽的序列係由在氨基末端附著一個絨毛膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）之感興趣的多肽序列，和在羧基末端附著兩個絨毛膜促性腺激素羧基末端肽（CTPs）之感興趣的多肽序列所組成，其中該感興趣的多肽為生長激素、人類生長激素（hGH）、生長激素同源物、促紅細胞生成素（EPO）、胰高血糖素樣的肽-1（GLP-1）、干擾素或IFN-β1，其中該緩衝液是10毫莫耳（mM）的檸檬酸鹽，其中該等滲劑是147毫莫耳的氯化鈉，且其中至少一個CTP係由下列胺基酸序列所組成： SEQ ID NO：17或SEQ ID NO：18。
2. 如請求項1之藥物製劑，其中該製劑是液體製劑。
3. 如請求項1之藥物製劑，其中該製劑的pH值約6.2-6.4。
4. 如請求項1之藥物製劑，其中該至少一個CTP是糖基化的。
5. 如請求項1之藥物製劑，其中該至少一個CTP是被截斷的。
6. 如請求項1之藥物製劑，其中該多肽選擇性地由附著於所述一個CTP的氨基末端的信號肽所組成。
7. 如請求項6之藥物製劑，其中該信號肽的序列如SEQ ID NO：19、SEQ ID NO：26或SEQ ID NO：49中所列。
8. 如請求項1之藥物製劑，其中至少一個CTP係選擇性地經由連接子附著於該感興趣的多肽的序列上。
9. 如請求項8之藥物製劑，其中該連接子是肽鍵。
10. 如請求項1之藥物製劑，其中該感興趣的多肽的序列係每周一次或每兩周一次地被施用。
11. 如請求項1之藥物製劑，用來每周一次地給藥於有需要的個體。

12. 如請求項11之藥物製劑，其中該個體是人類成人或人類兒童。
13. 如請求項11之藥物製劑，其中該給藥是靜脈內或皮下給藥。
14. 如請求項1之藥物製劑，其中該製劑在5°C 下可以穩定至少24個月。

圖式

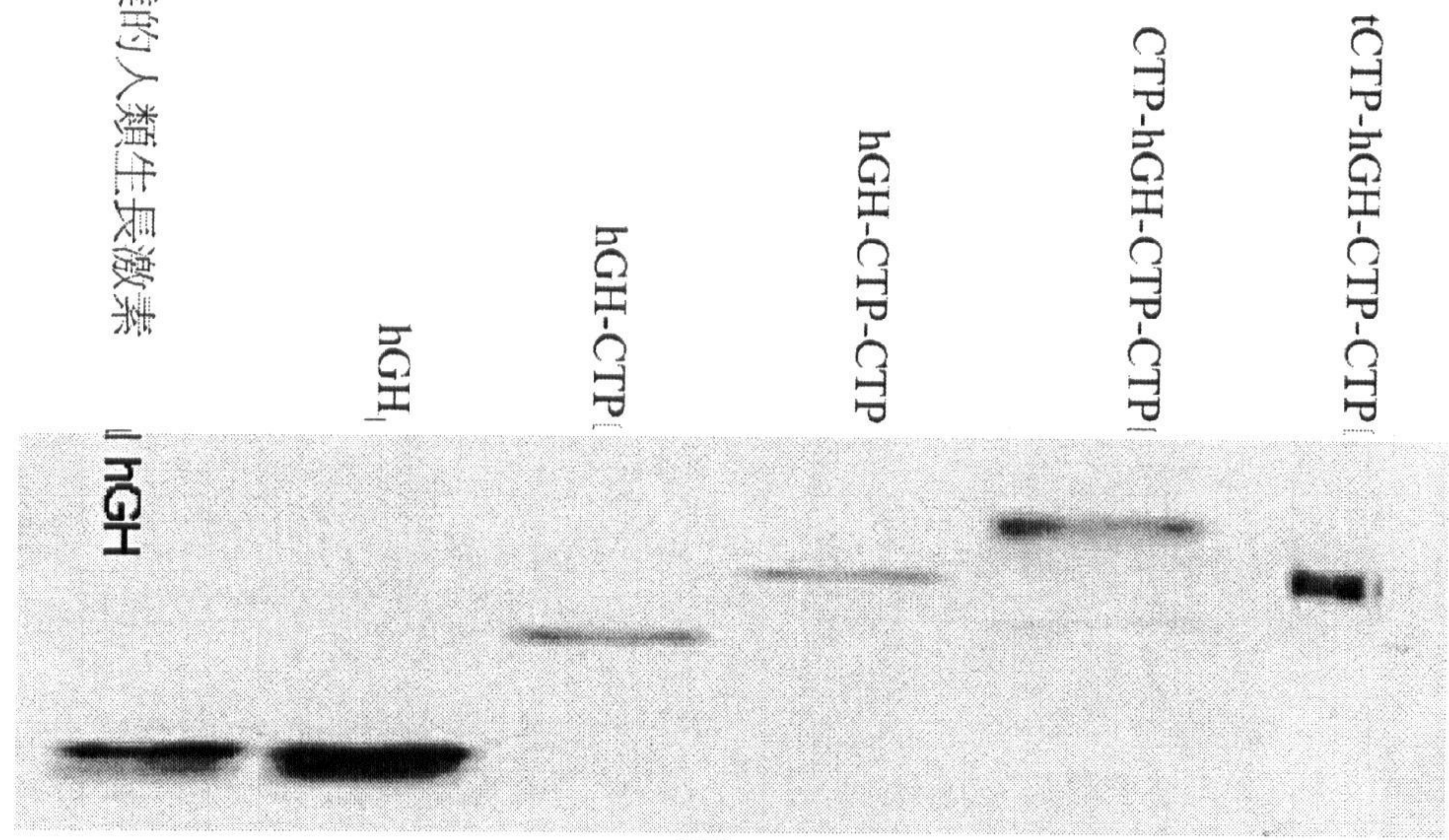


圖1

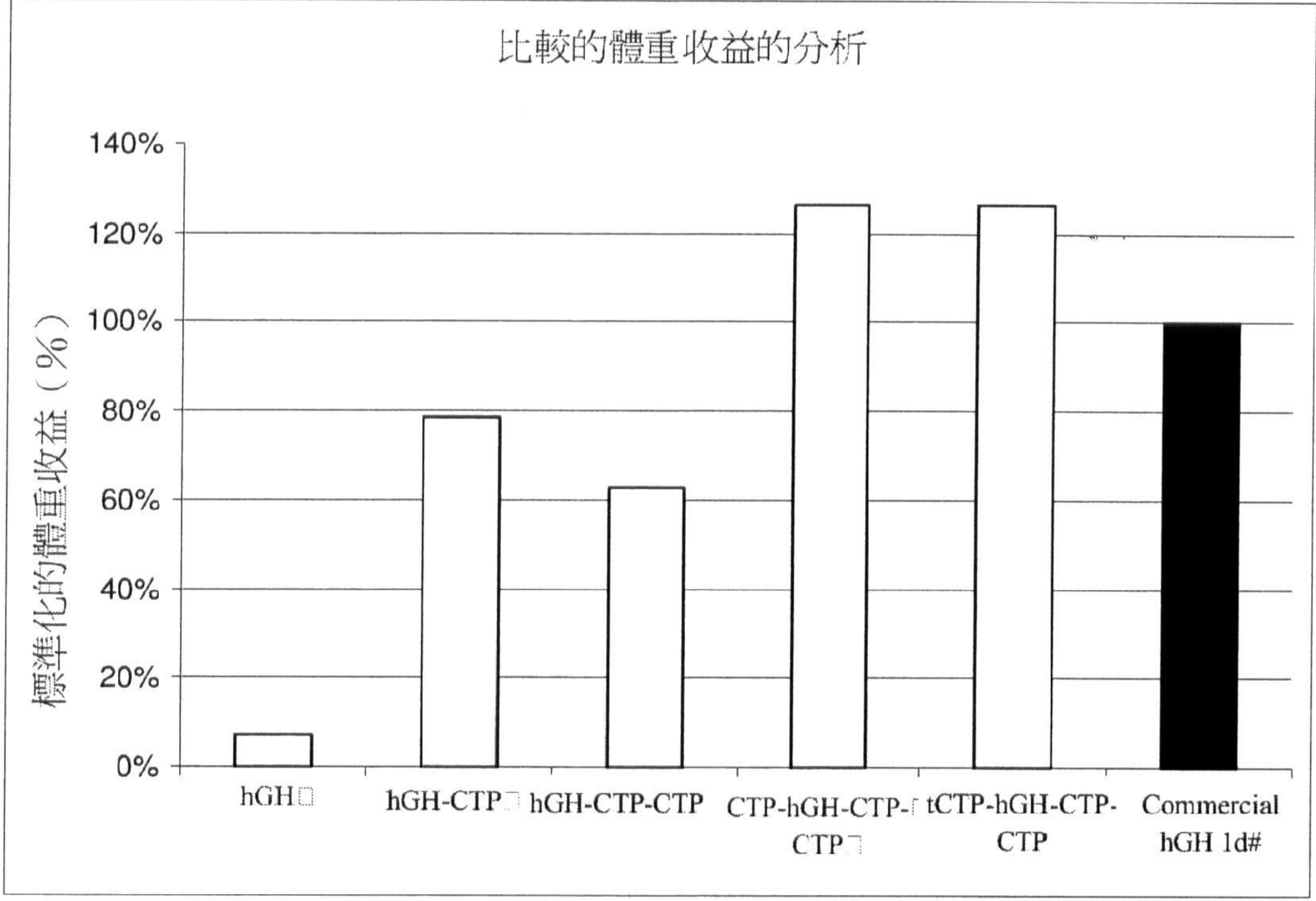


圖2

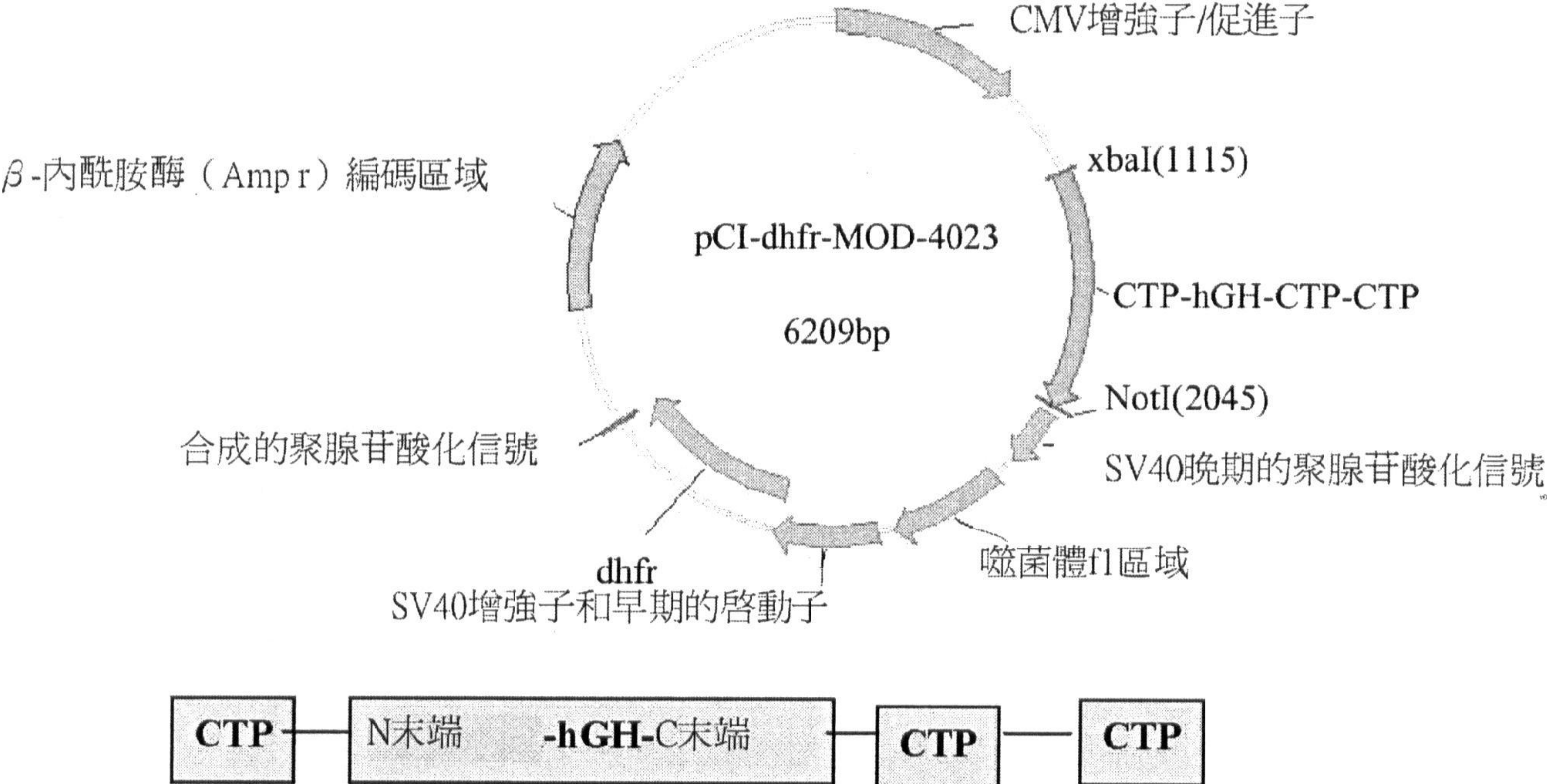


圖3

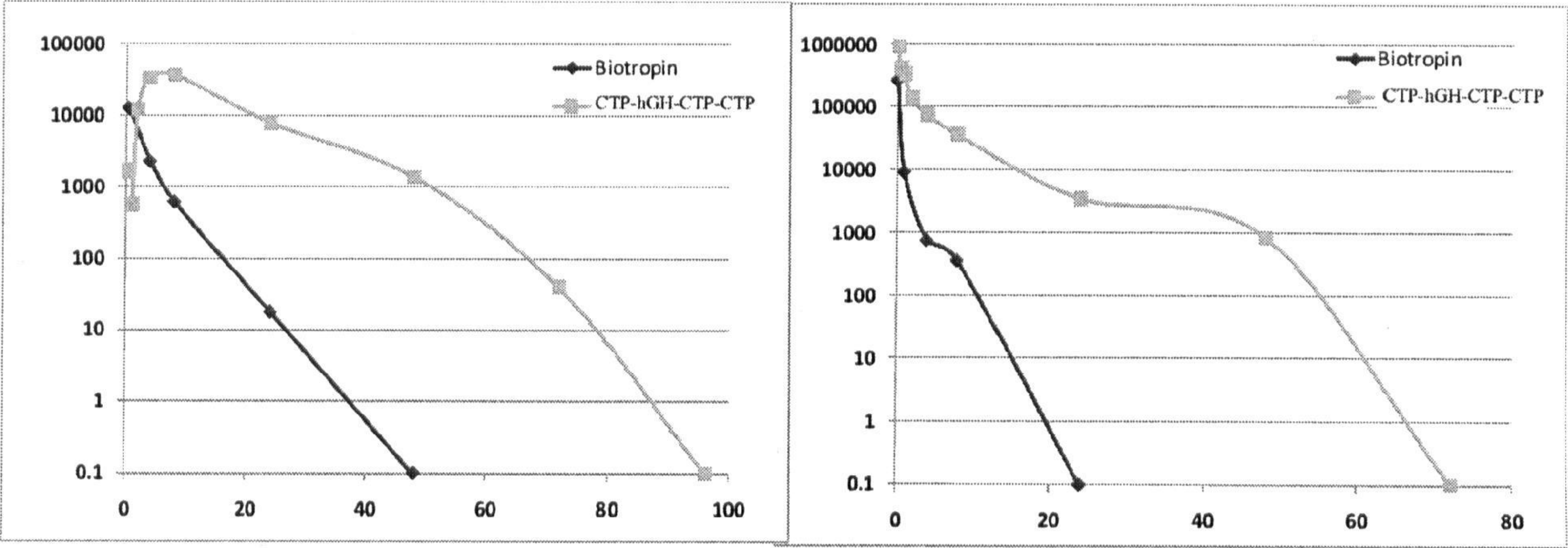


圖4

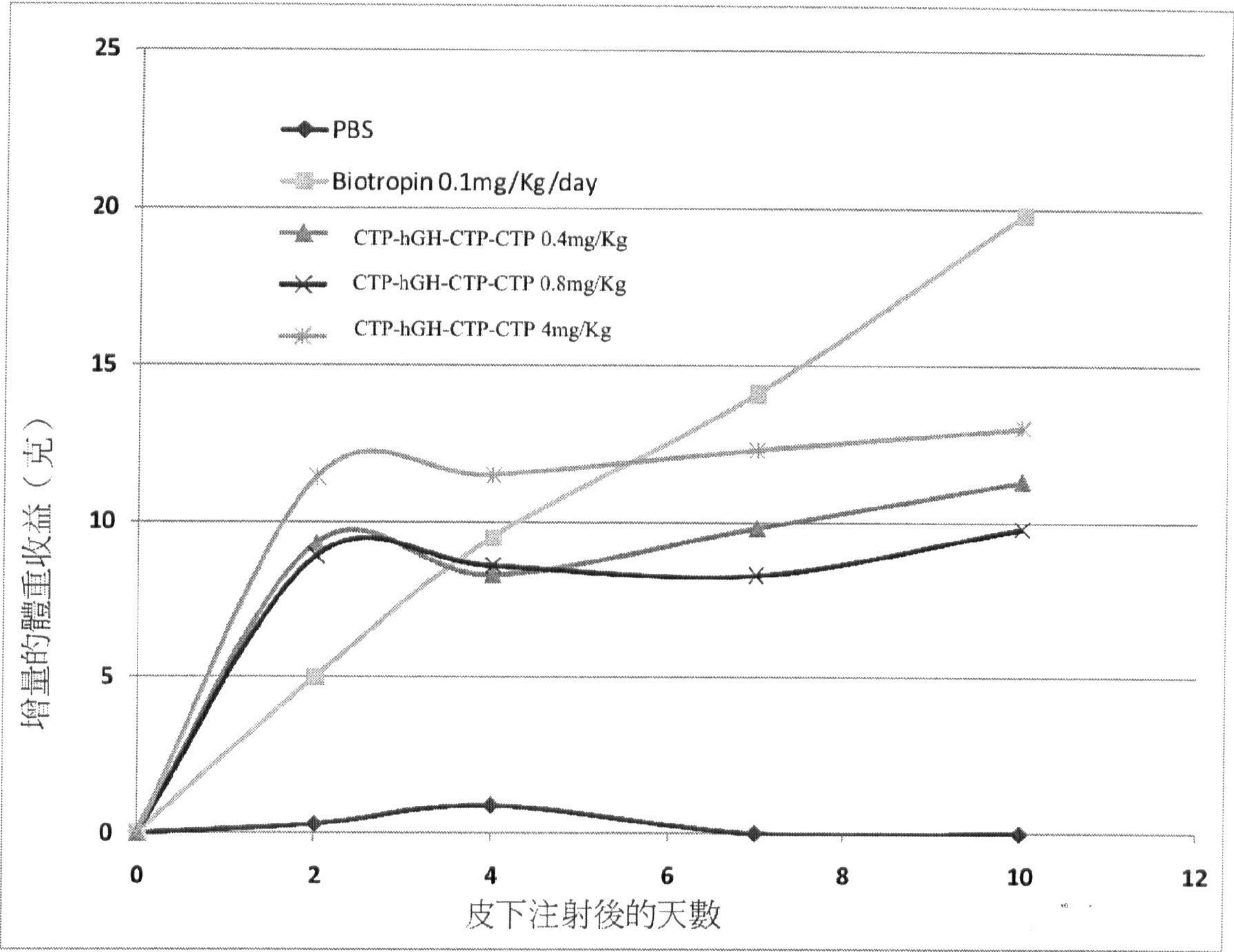


圖5

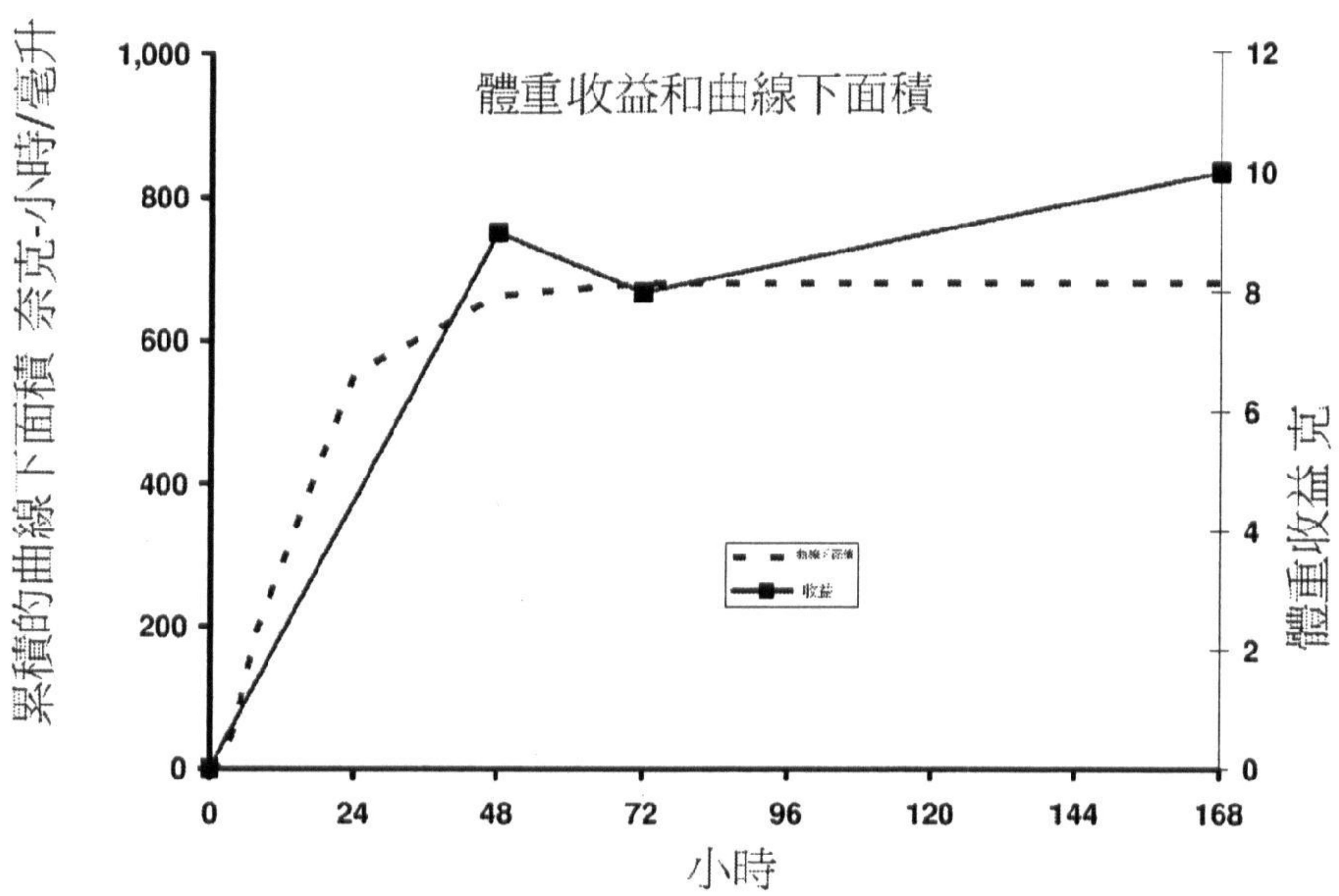


圖6

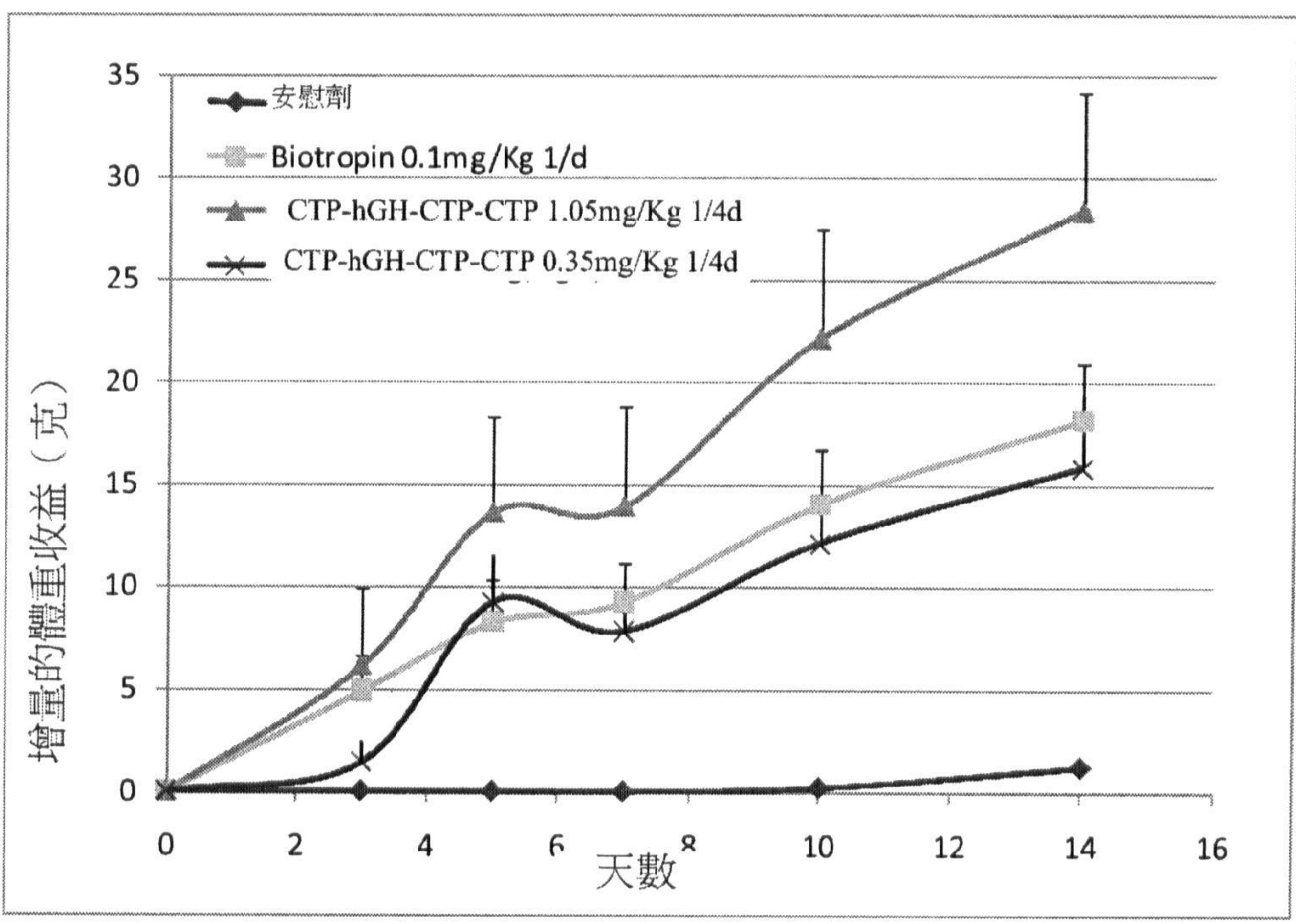


圖7

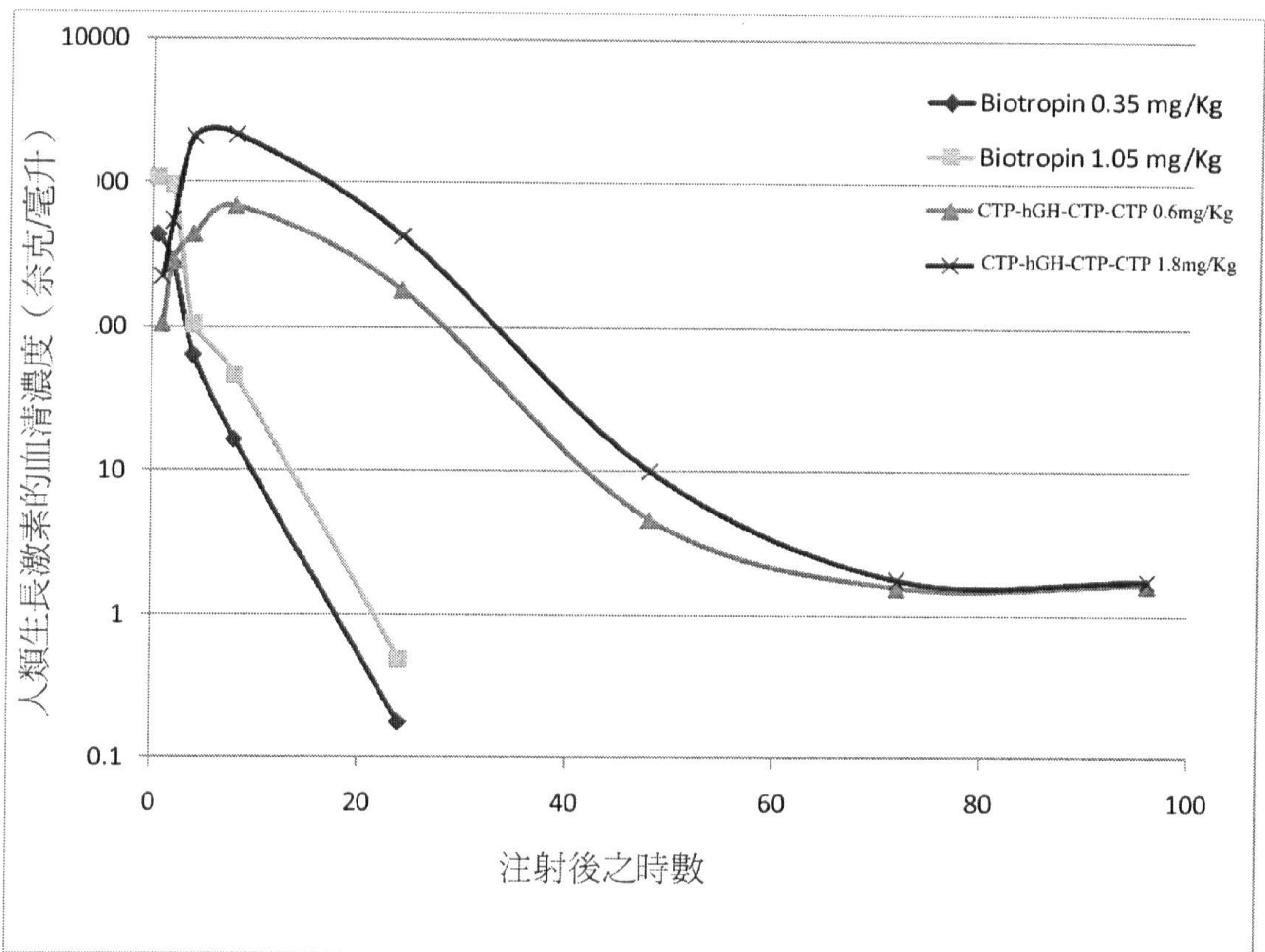


圖8

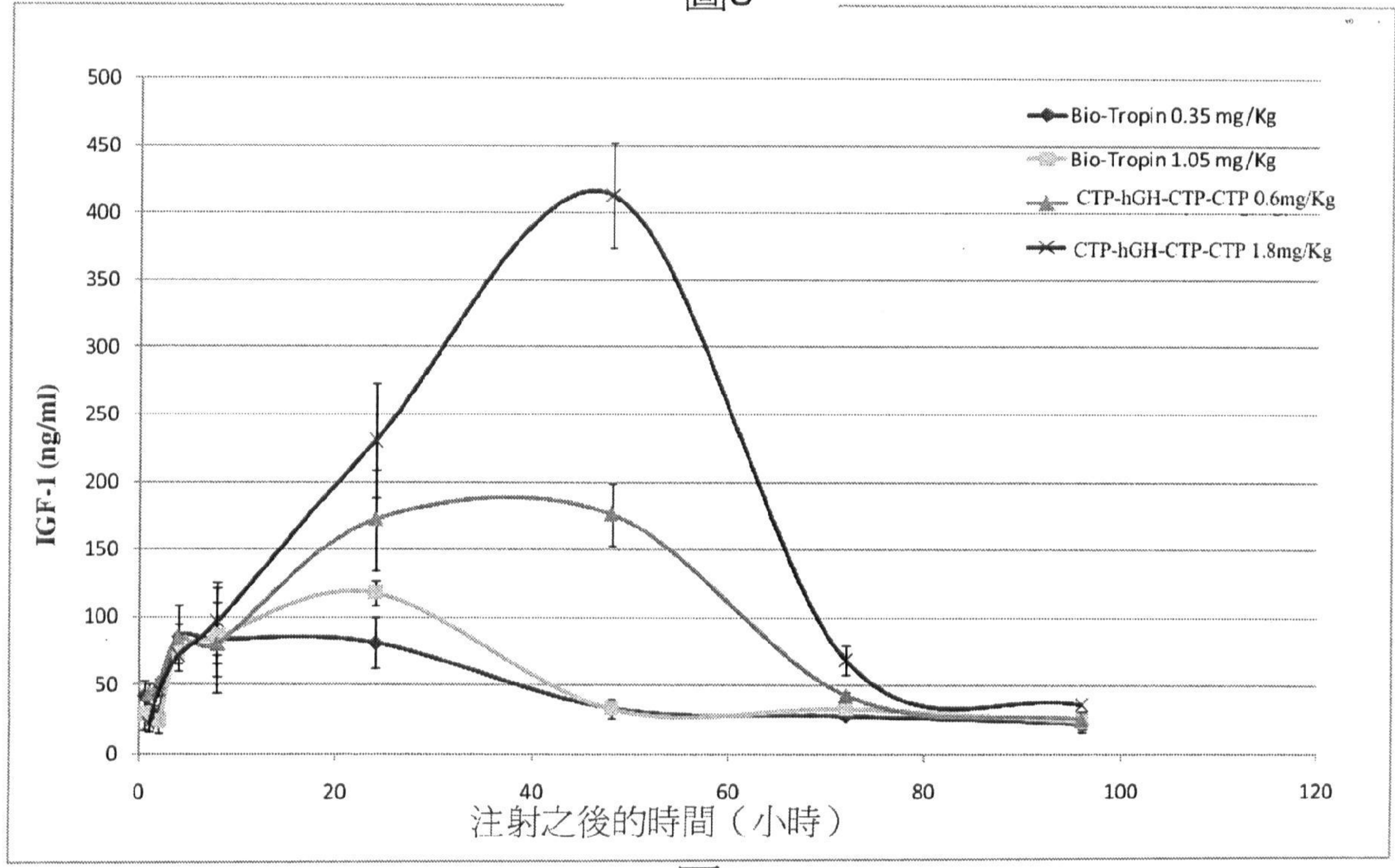


圖9

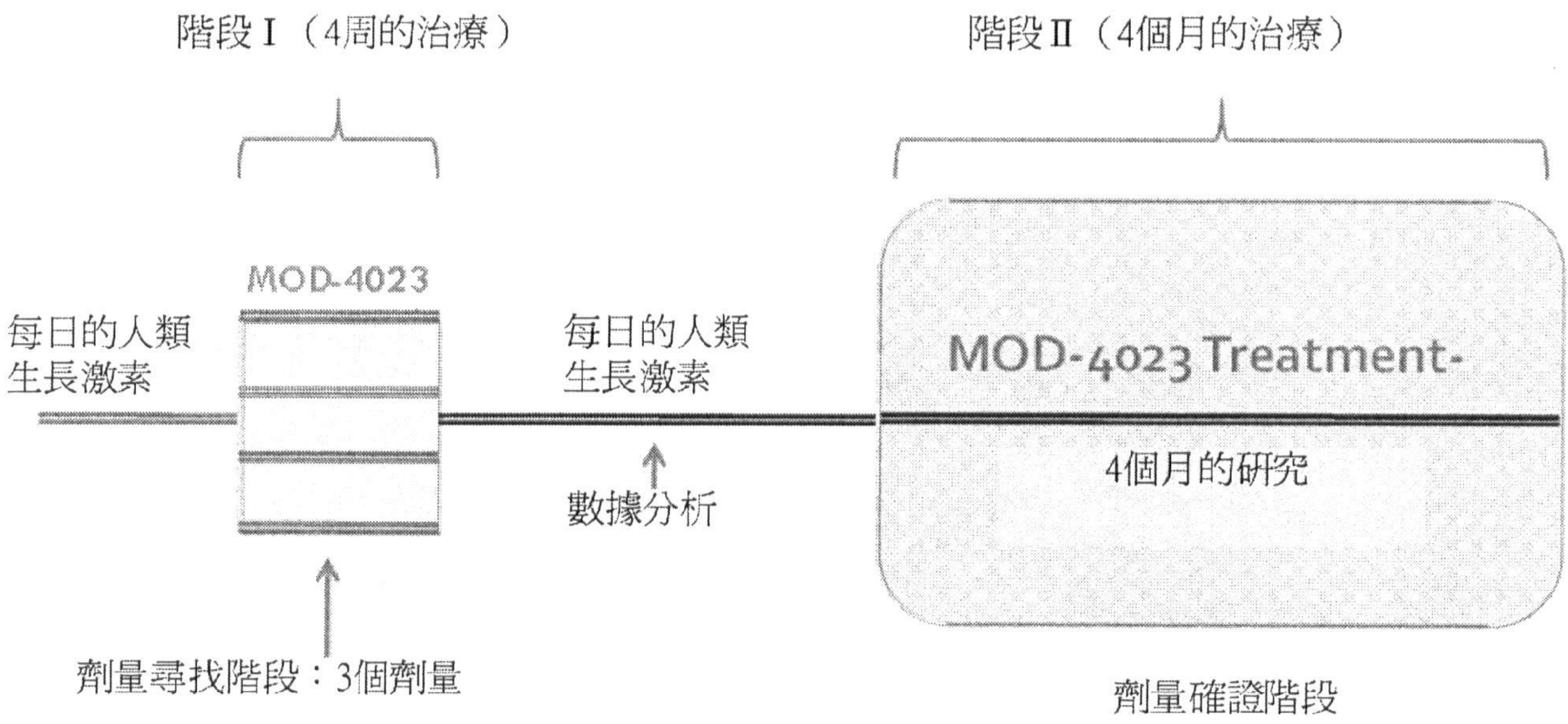


圖10

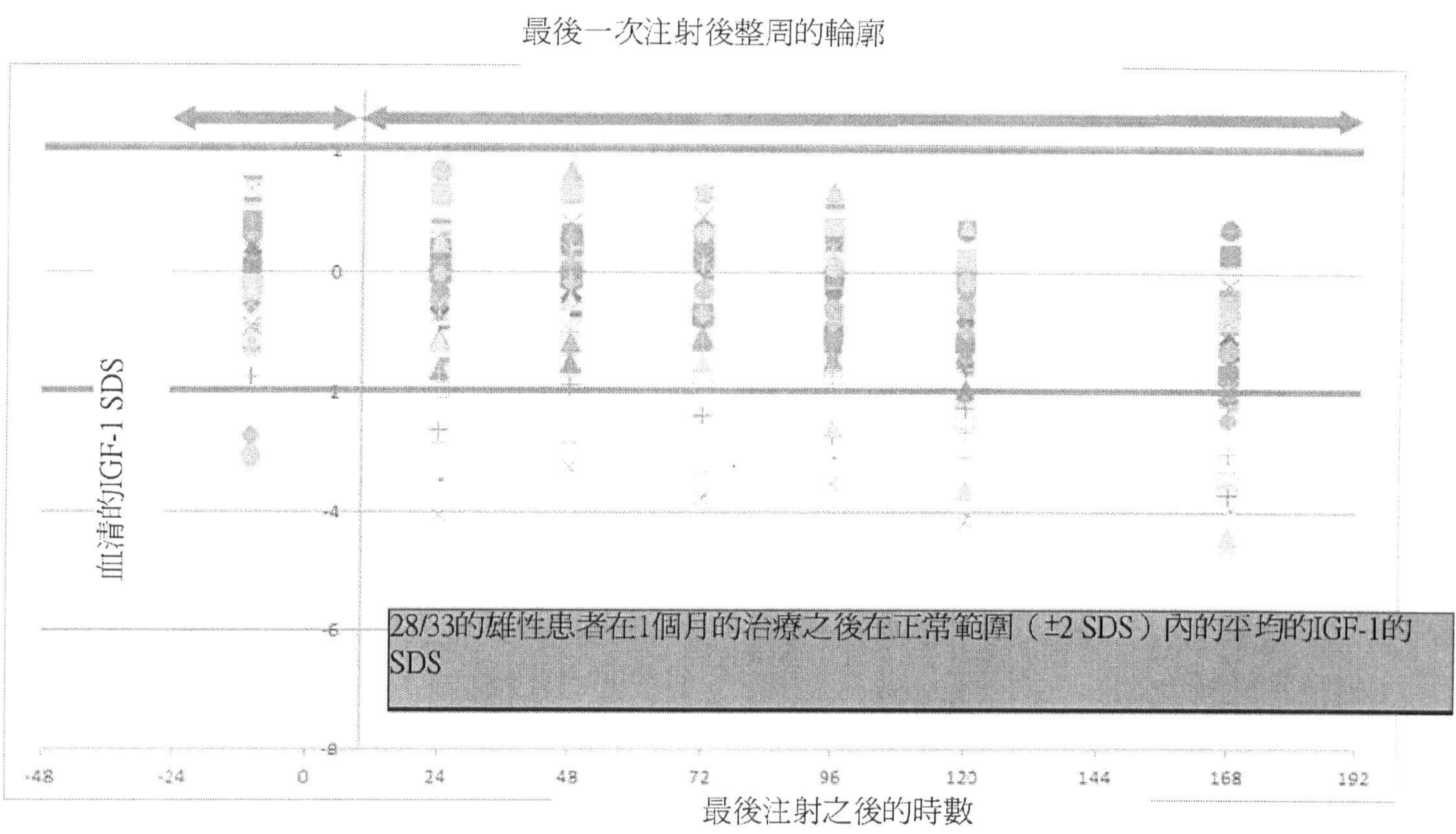


圖11

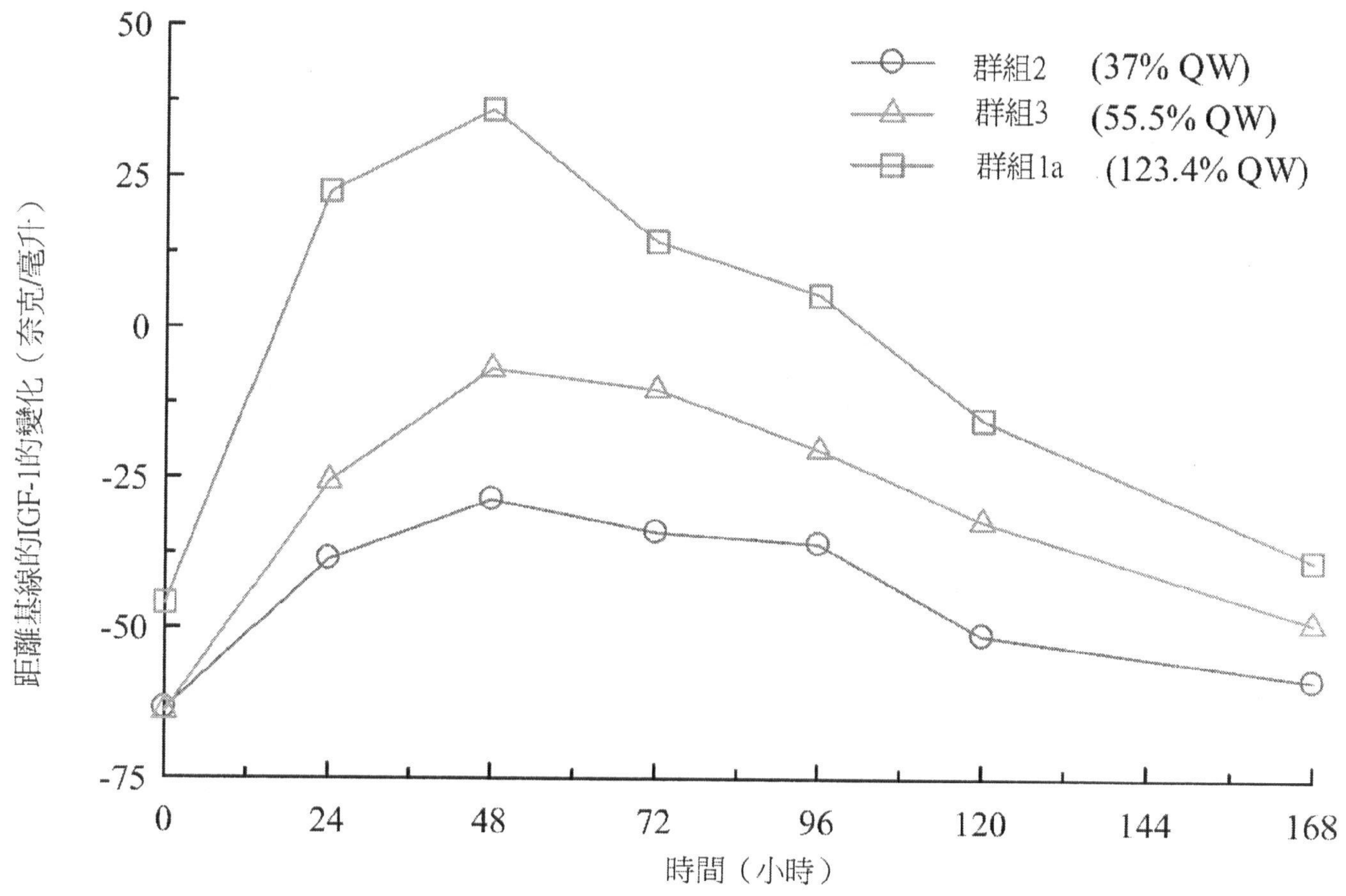


圖12

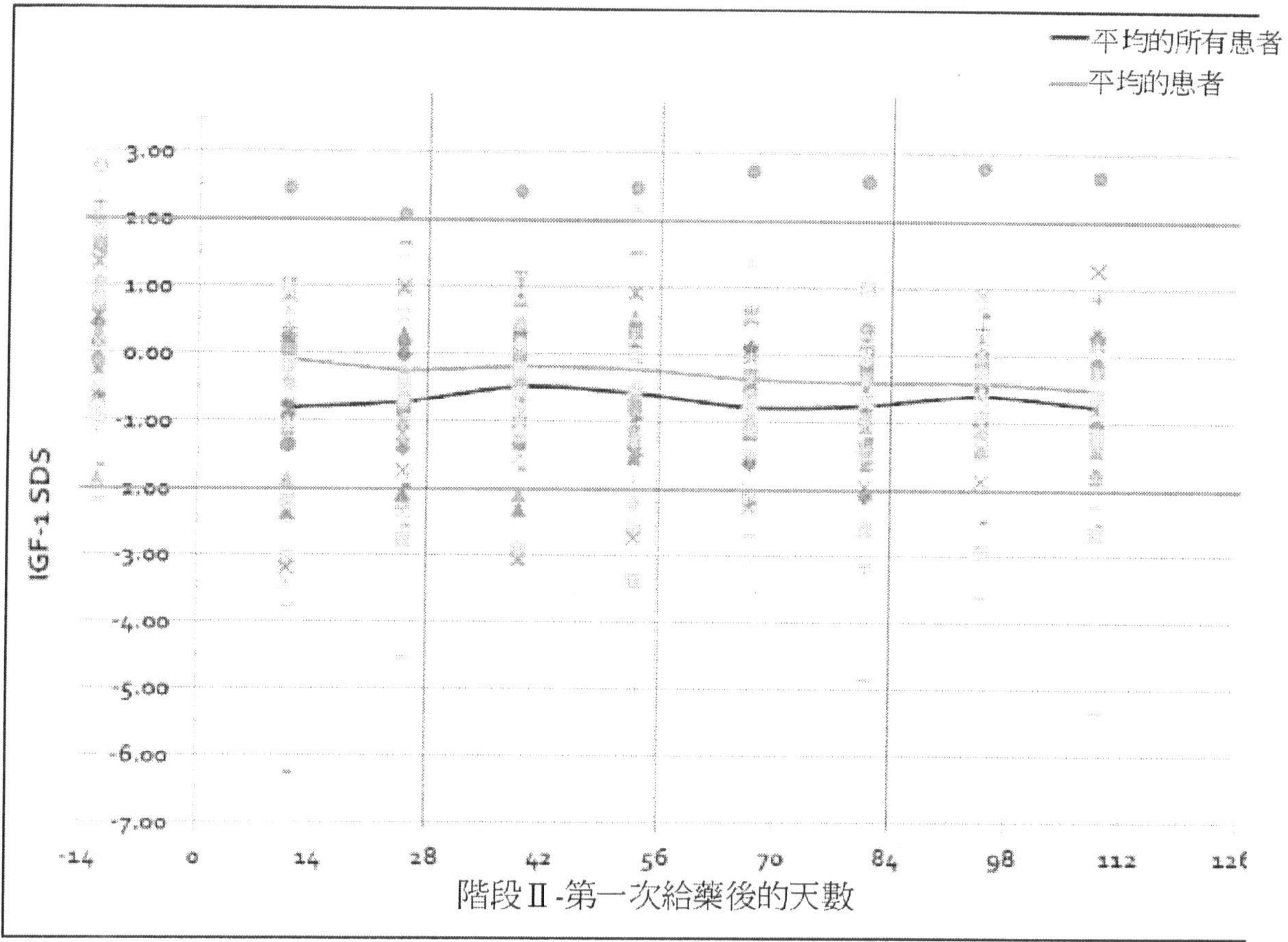


圖13

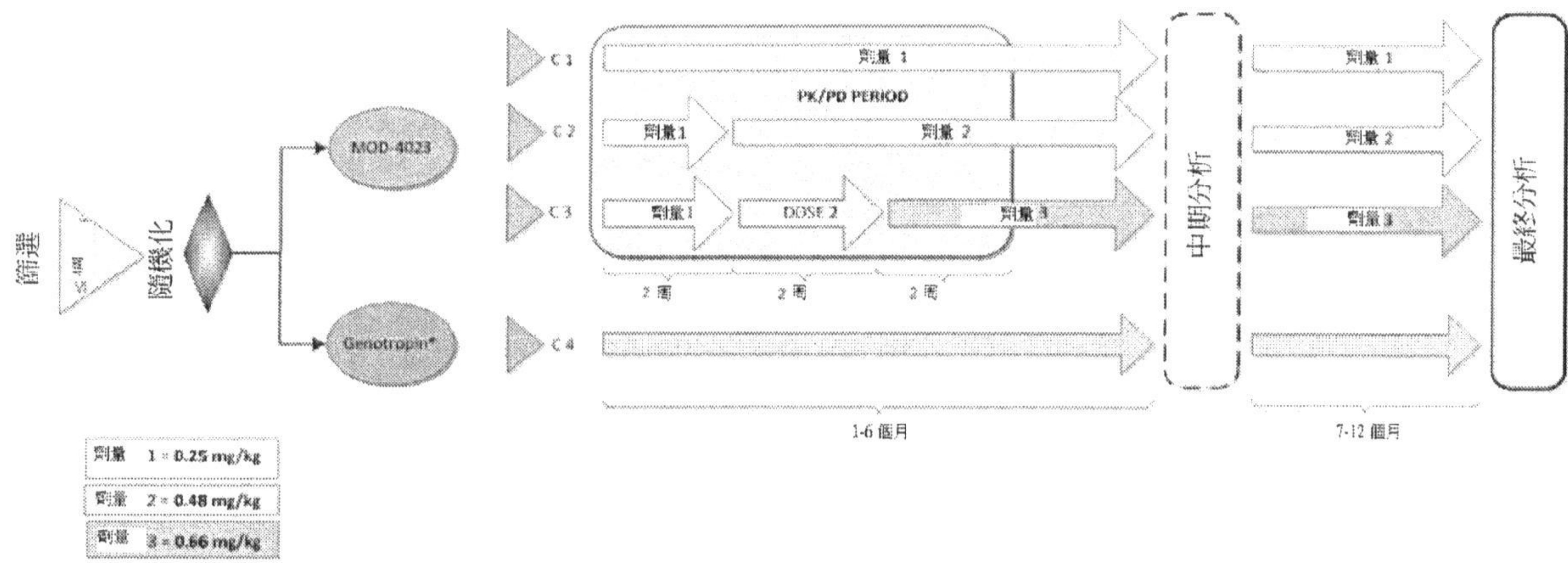


圖 14

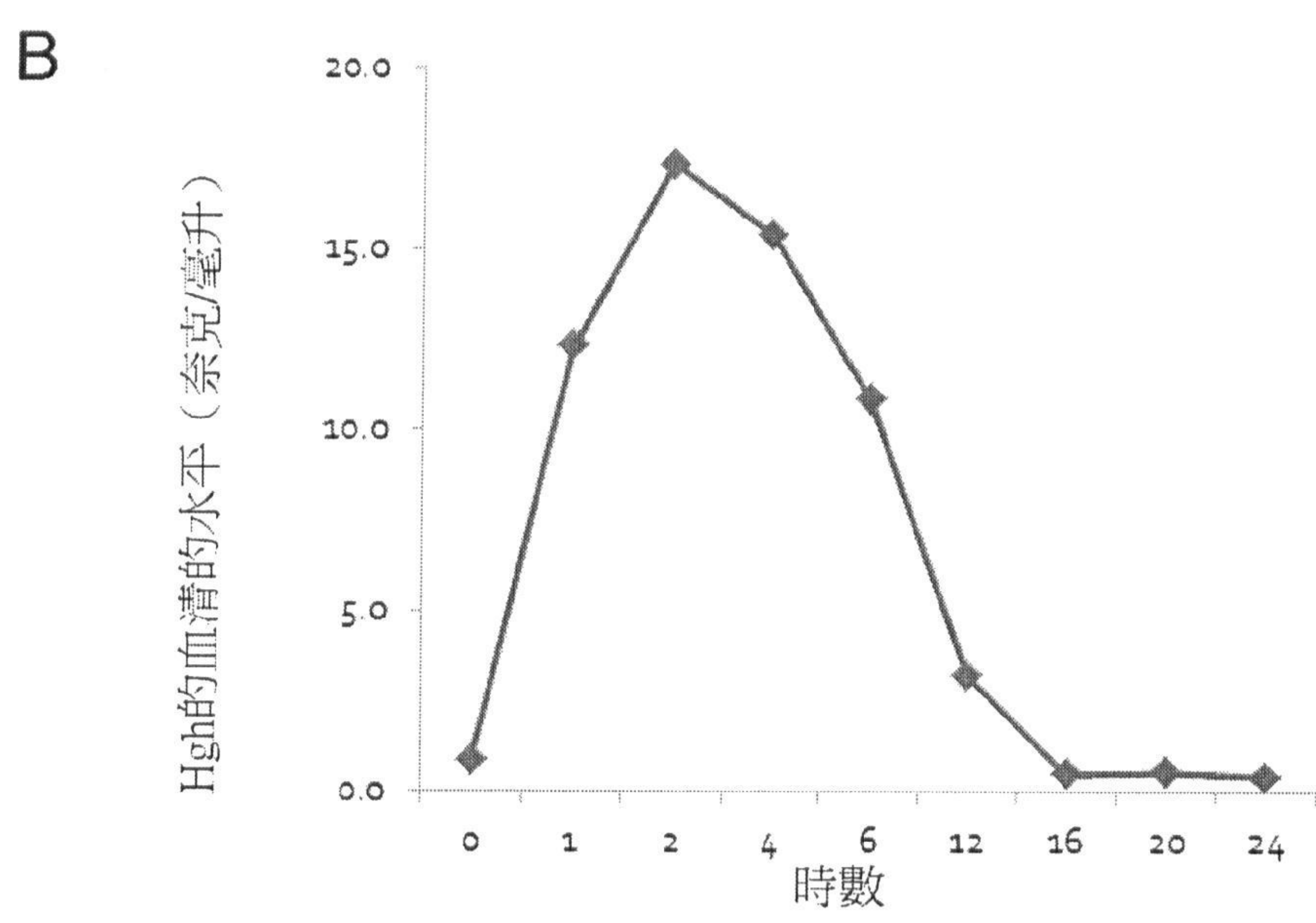
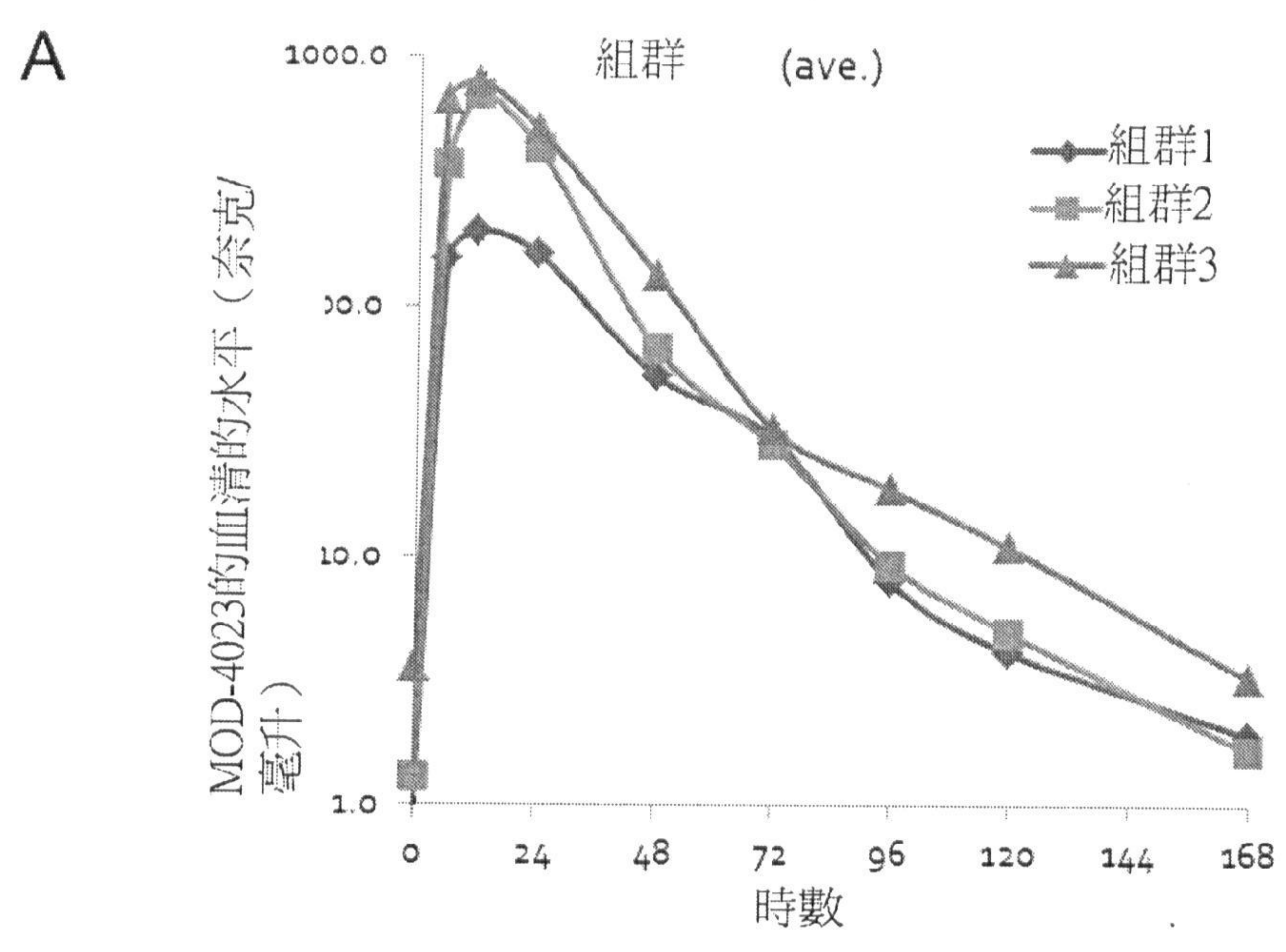


圖15

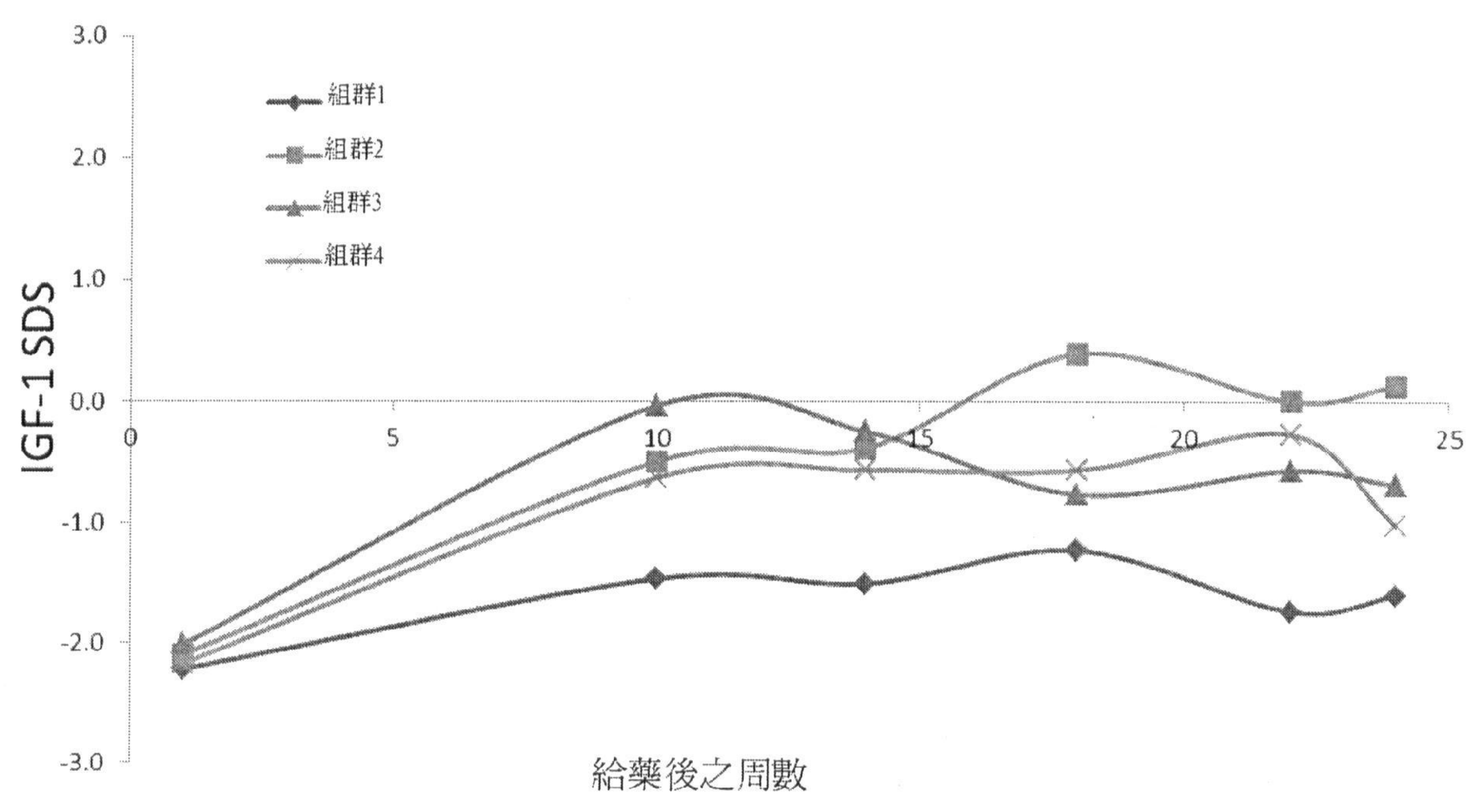


圖16

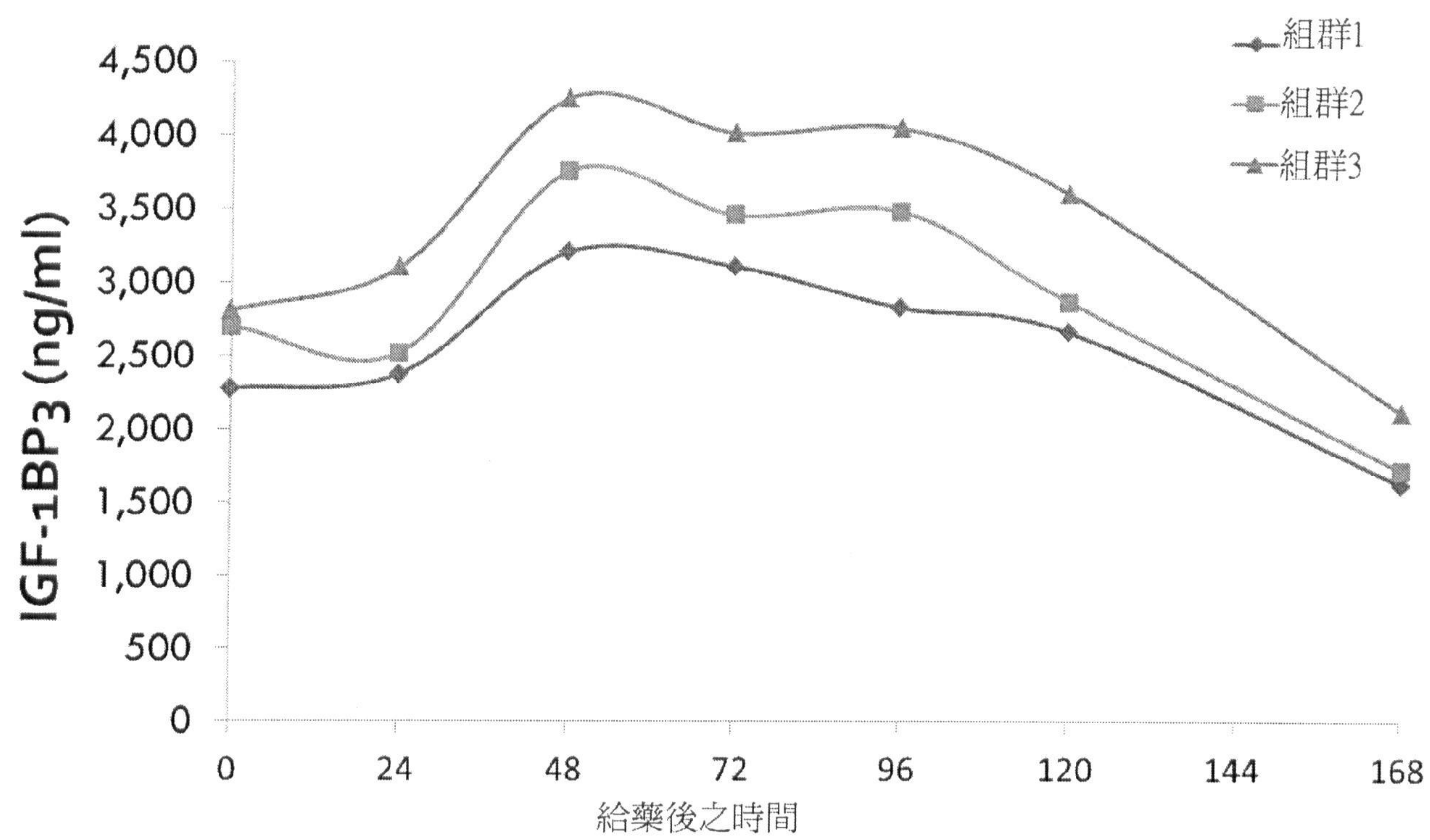


圖17

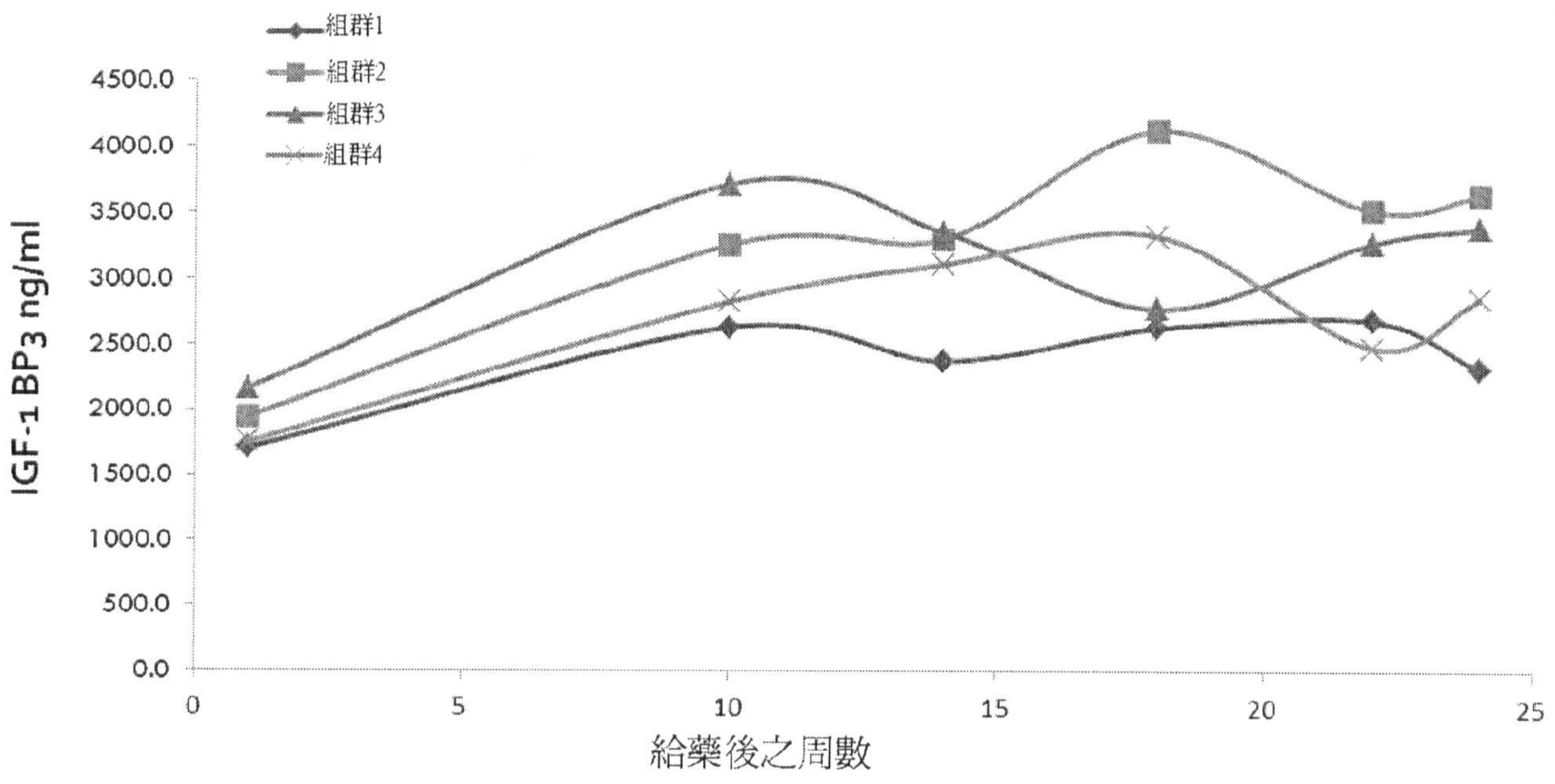


圖18

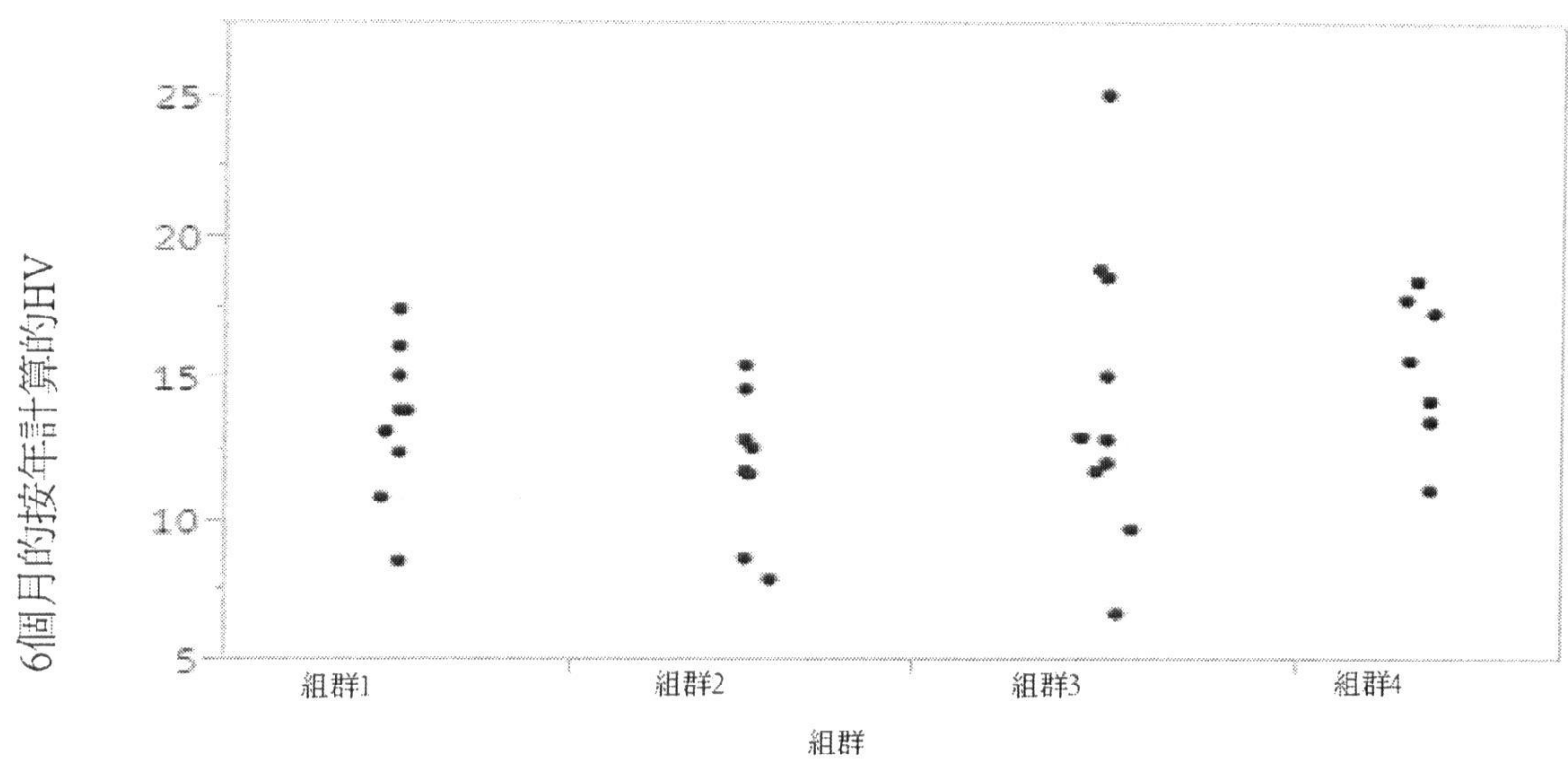


圖19

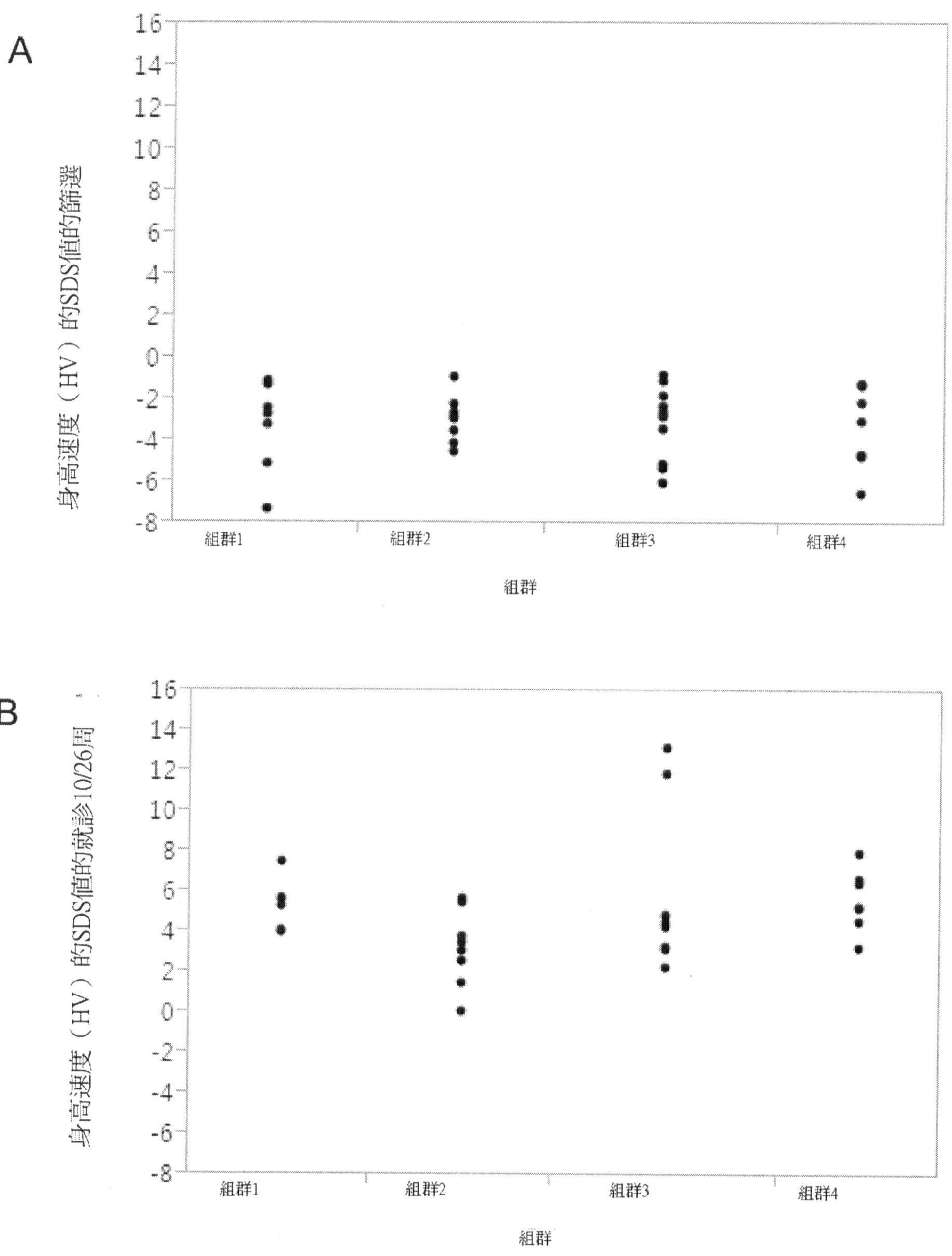


圖20

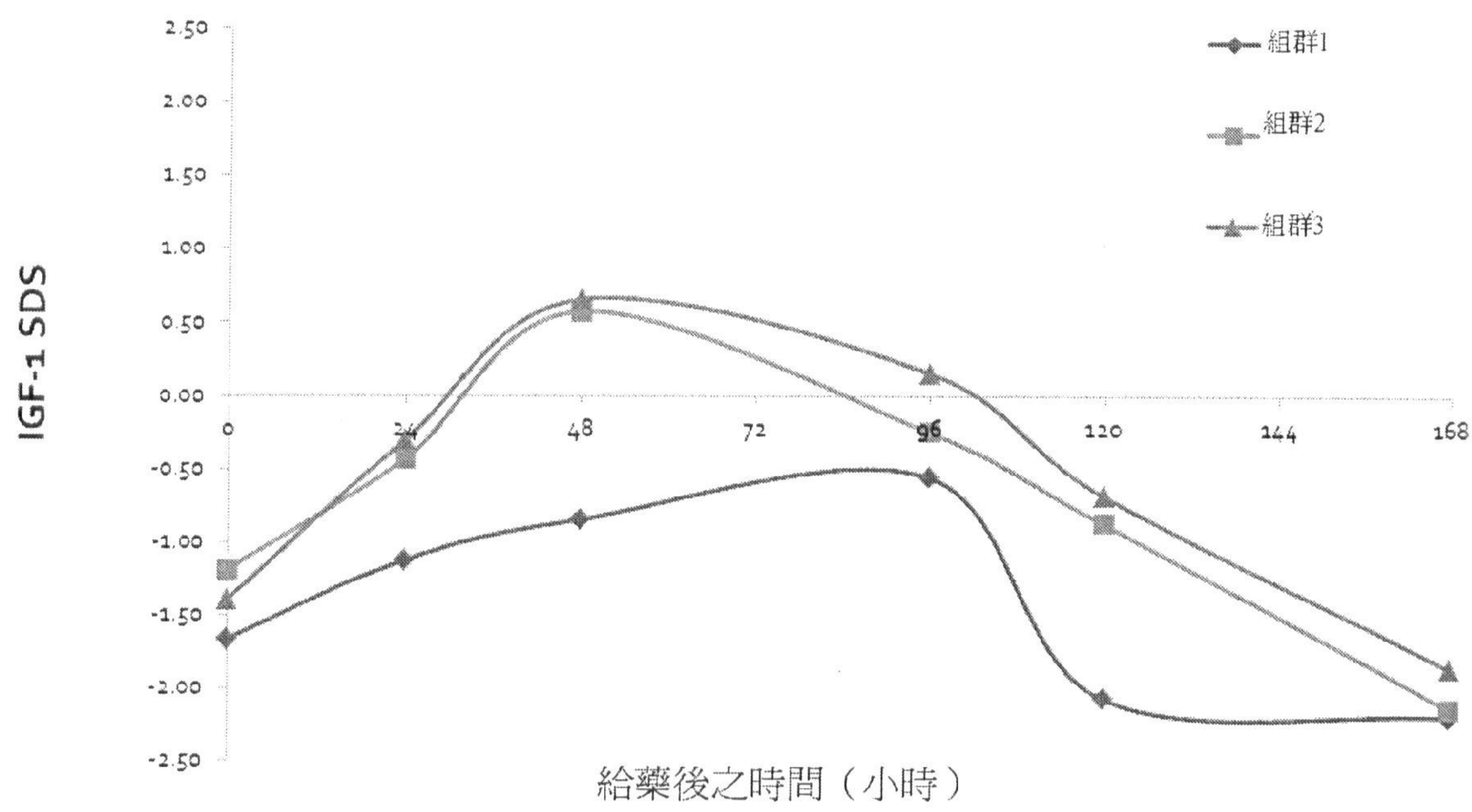


圖21

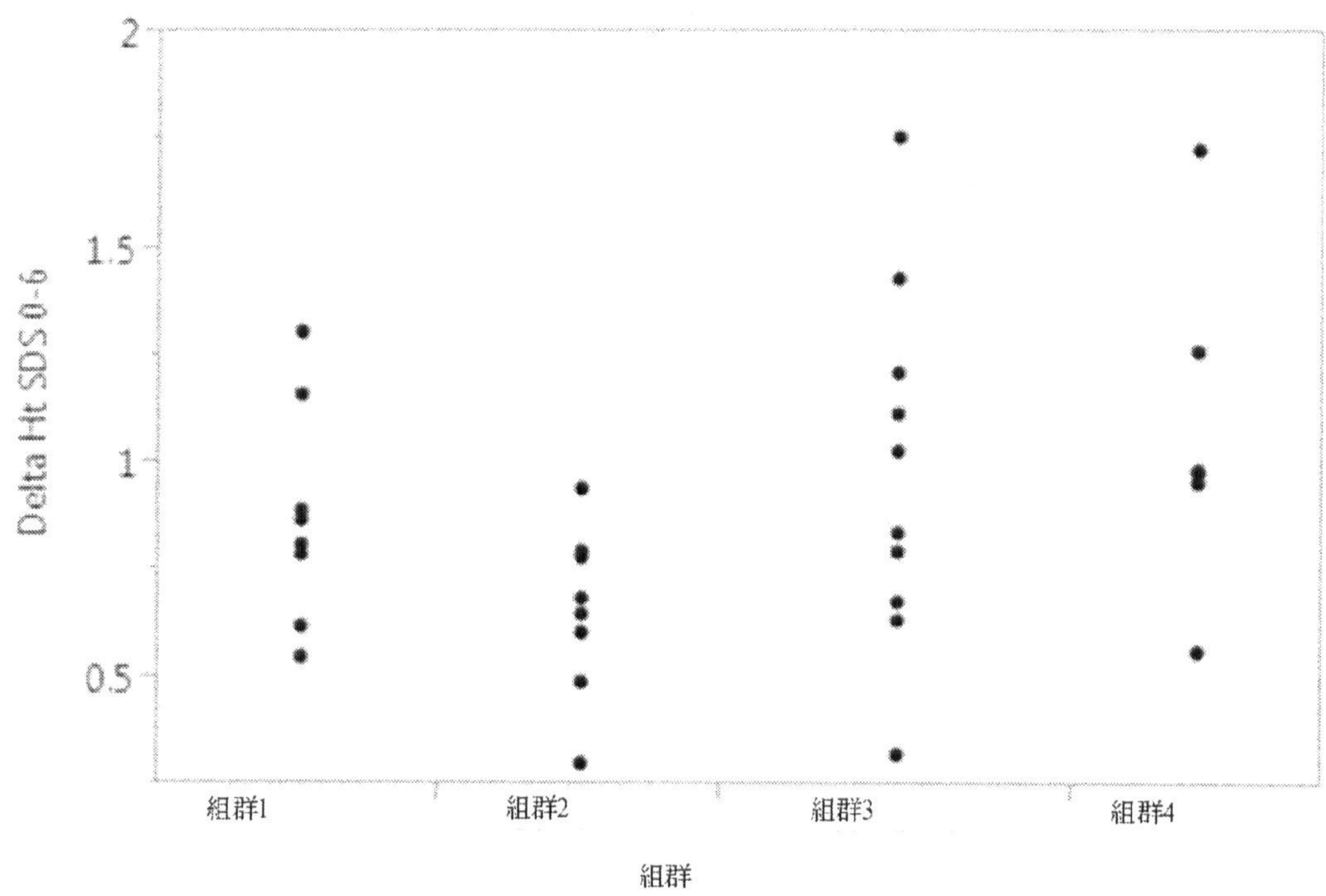


圖22

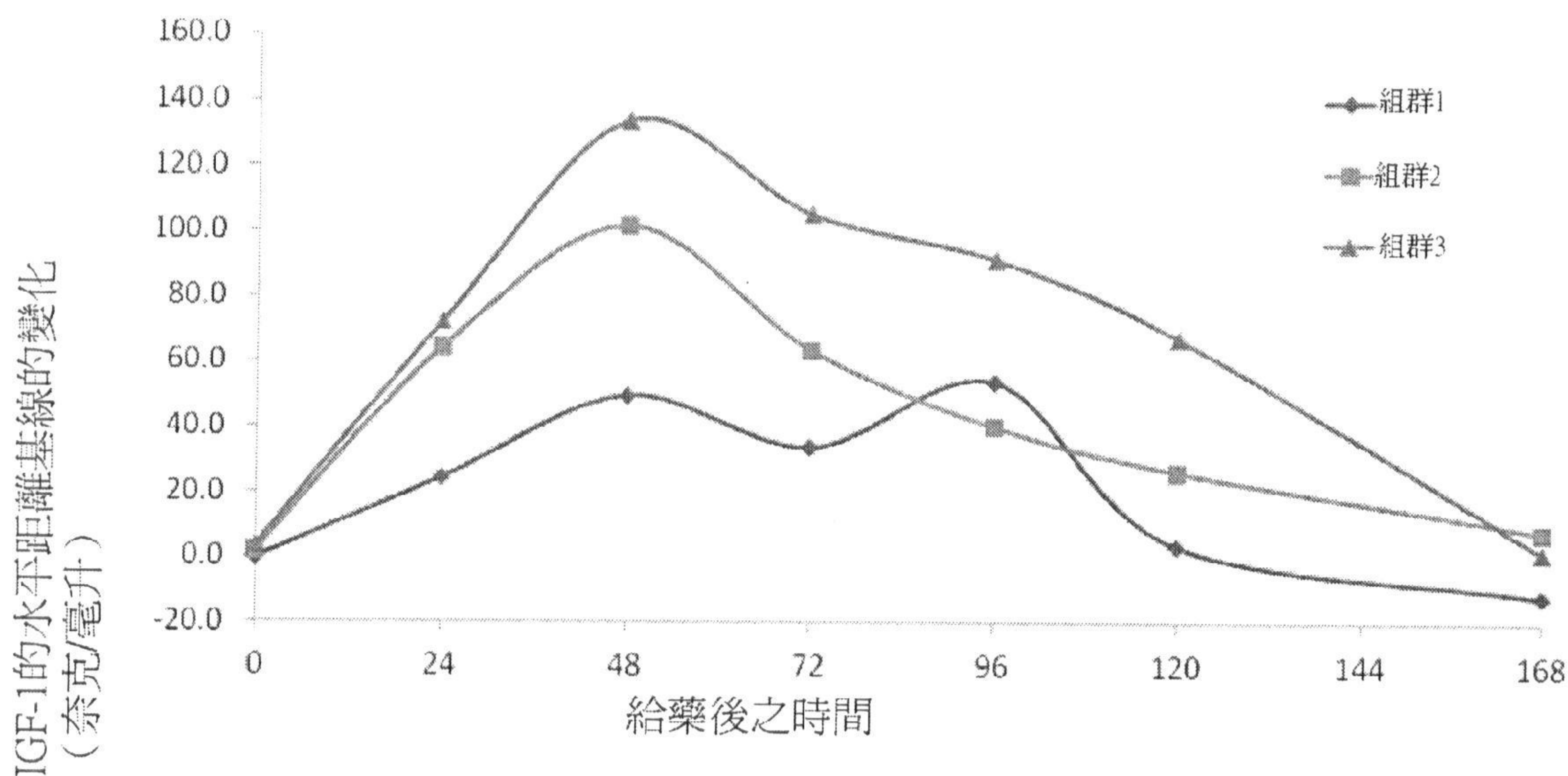


圖23

DS批量的編號	製造		克隆	批量的大小（淨值）	使用
	位置	日期			
EN648-01-08-005	Xcellerex	2008 十月	2	200L	急性毒性和PK的研究 1592-001 和 1592-002, 用來製備參考的標準RS0809 標準 RS0809
EN648-01-09-002	Xcellerex	2009 二月	2	500L	4周的毒性的研究 1592-003和1592-004
648-01-09-003B	Xcellerex	2009 四月	2	700L	I期的臨床試驗 CP-4-001 II期的臨床試驗 CP-4-003
EN648-01-10-014A	Xcellerex	2010 十月	28	200L	猴子的26周的慢性毒性的研究 （1592-006）， 大鼠的再生/發展的毒性 （1592-007，1592-008，1592-009）
EN648-01-10-019A	Xcellerex	2010 十二月	28	700L	猴子的26周的慢性毒性的研究 （1592-006）， 大鼠的再生/發展的毒性 （1592-007，1592-008，1592-009） 1592-001和1592-002， 用來製備參考的標準RS0911
648-01-11-003	Xcellerex	2011 六月	28	700L	II期的臨床試驗
648-01-11-003A	Xcellerex	2011 六月	28	700L	II期的臨床試驗
GMP-1	Rentschler	2012 一月	28	700L	II期的臨床試驗
GMP-2	Rentschler	2012 五月	28	700L	II期的臨床試驗

灰色的標記：從相同的GMP 700升的規模的批量所製造的20和40毫克/毫升的DS的批量

圖24

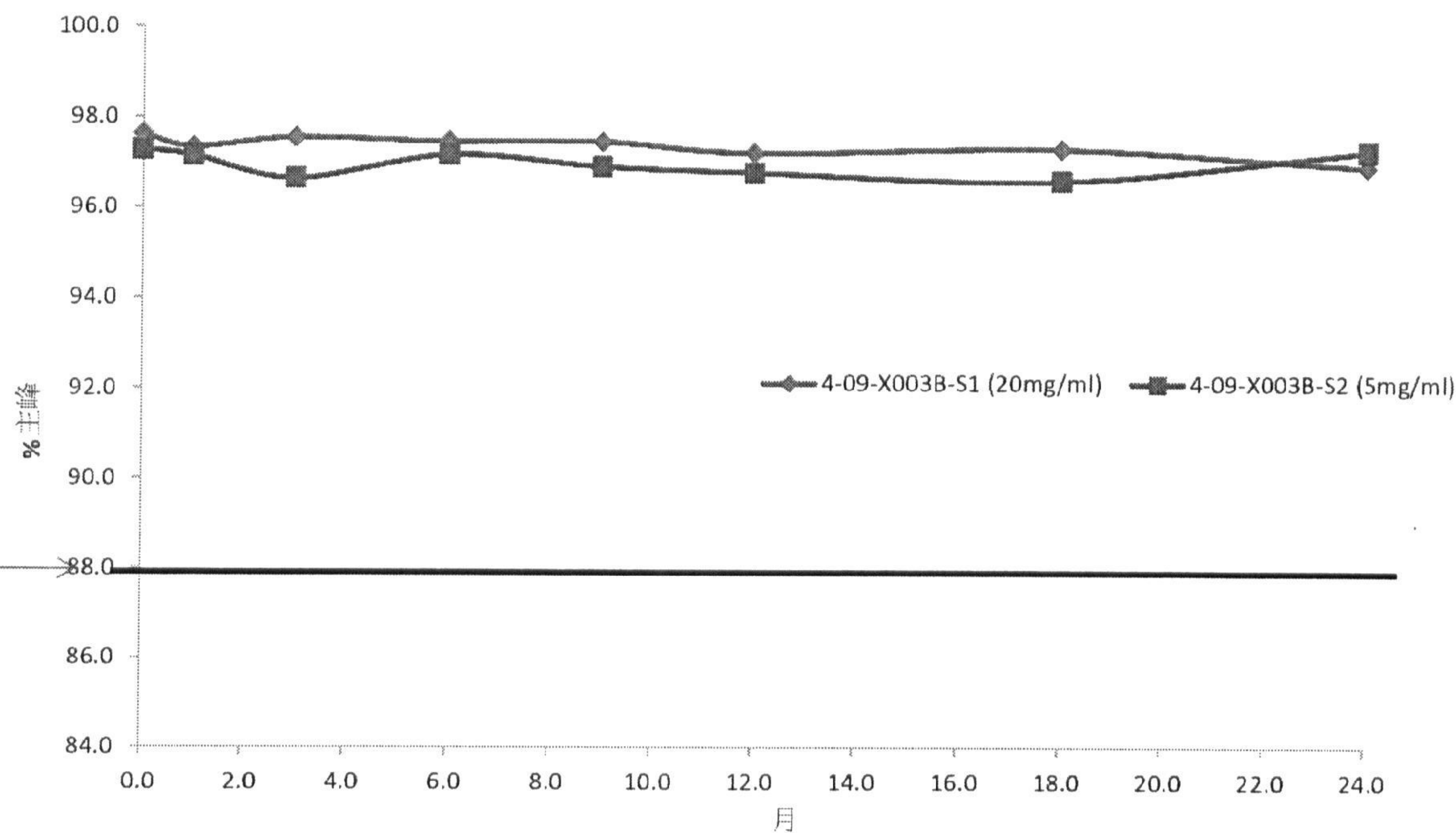


圖25A

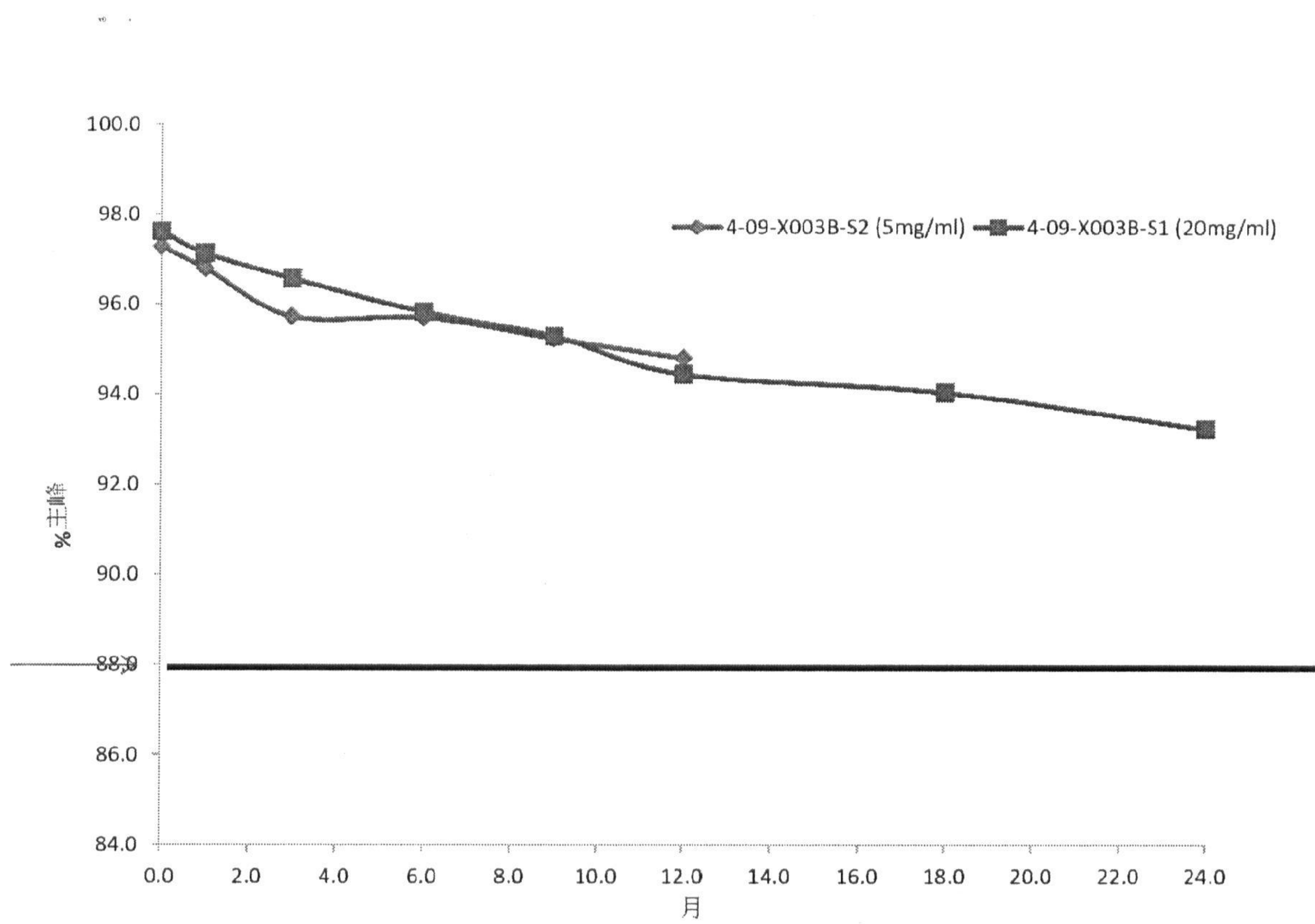


圖25B

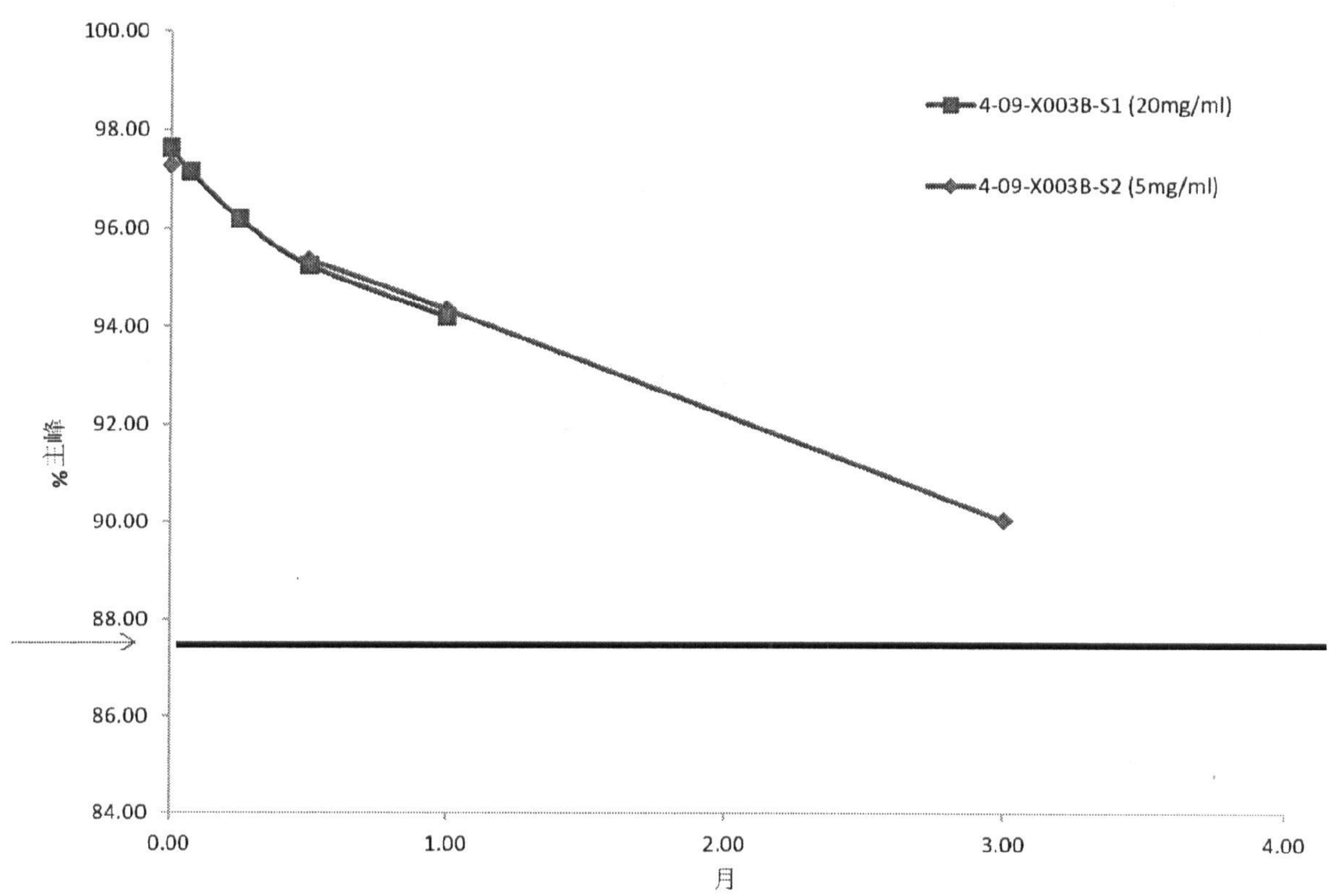


圖26

S

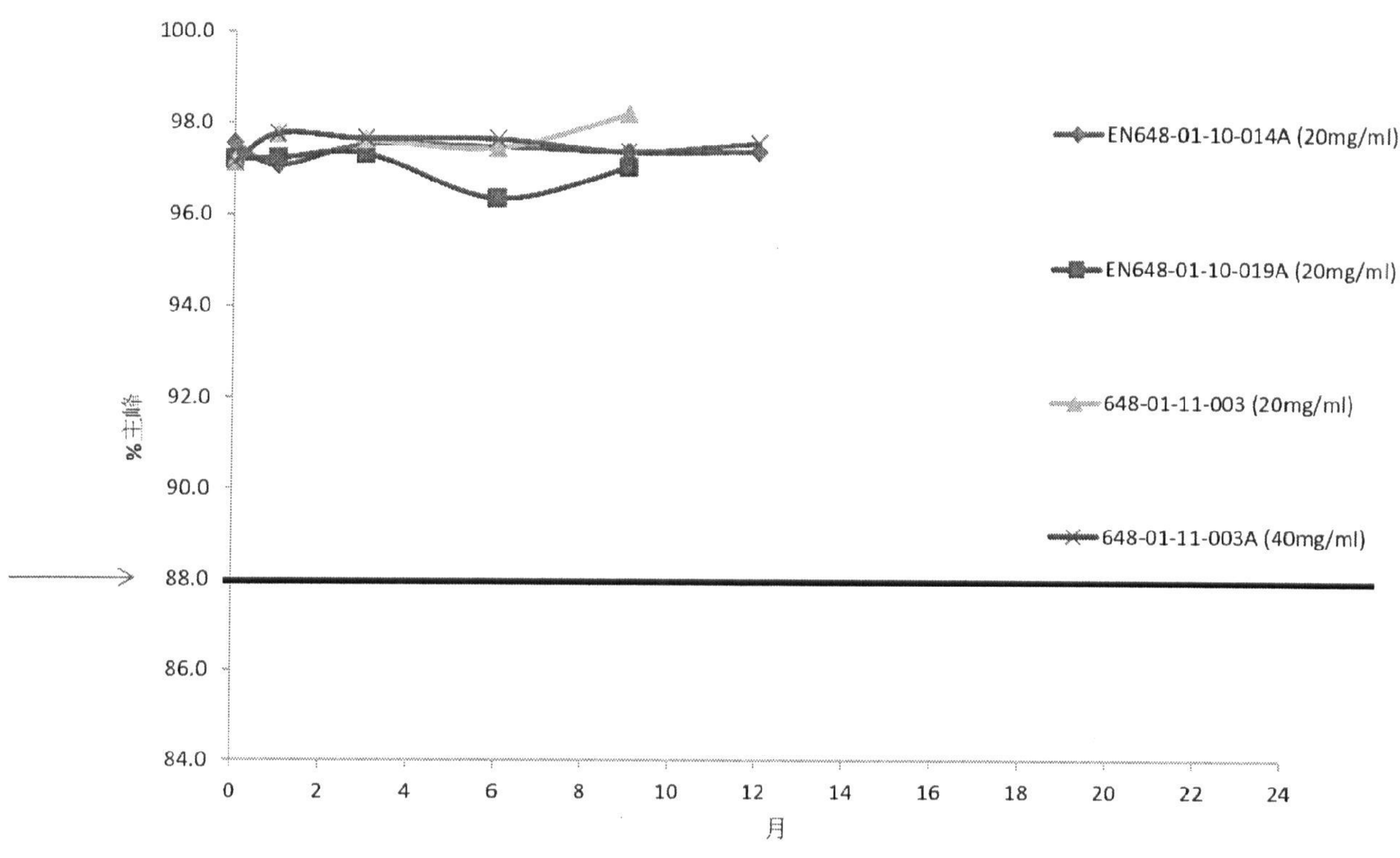


圖27A

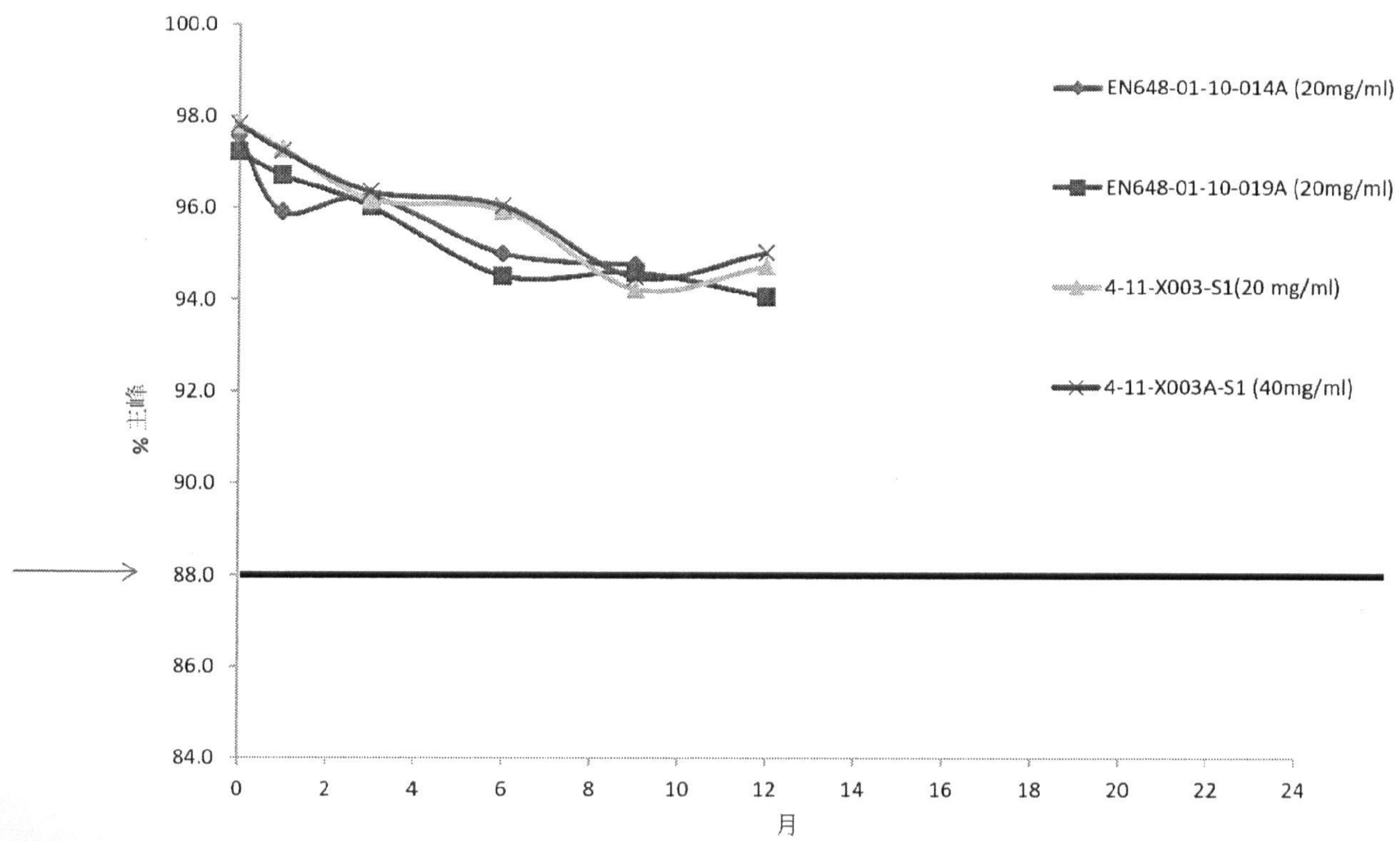


圖27B

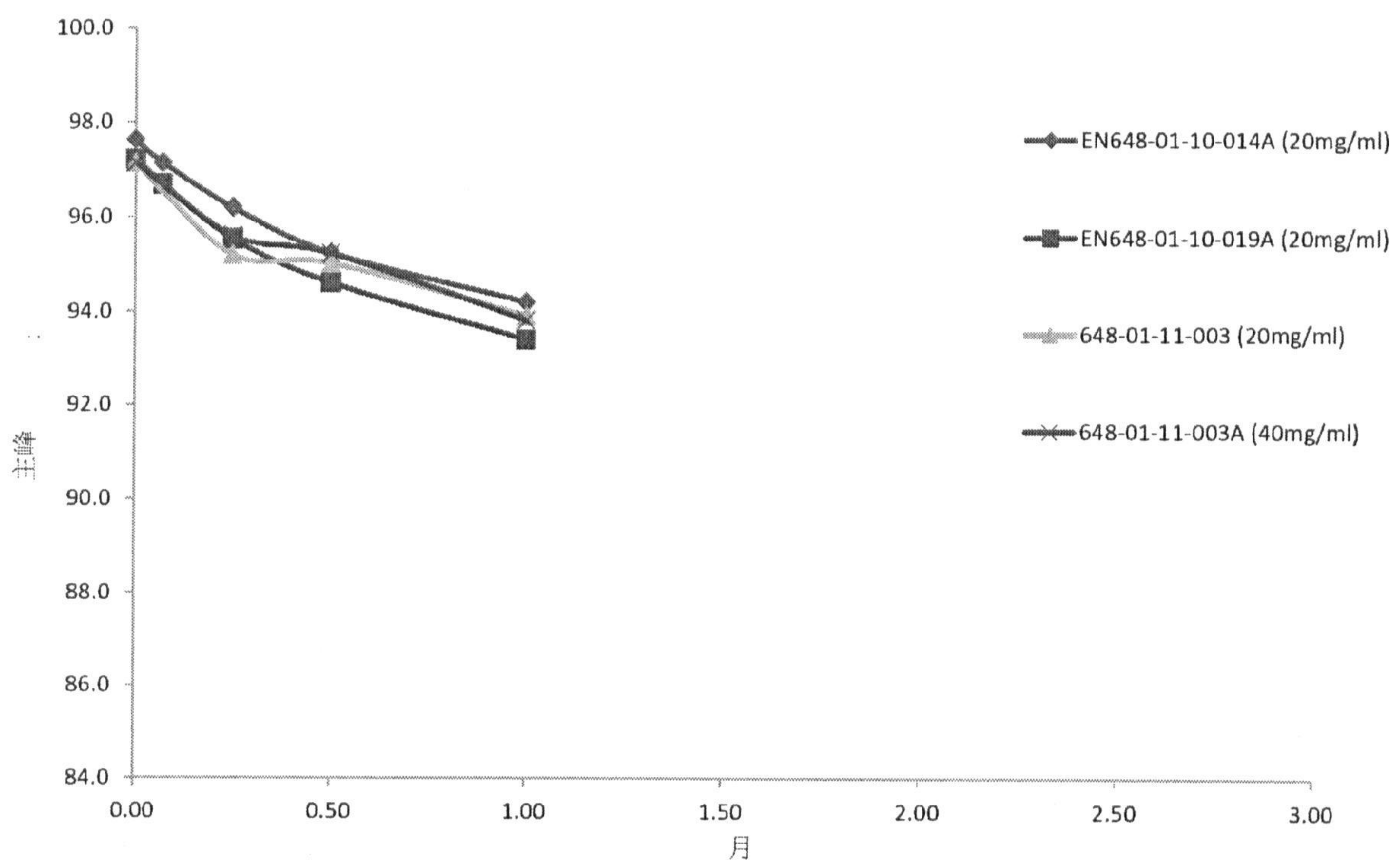


圖28A

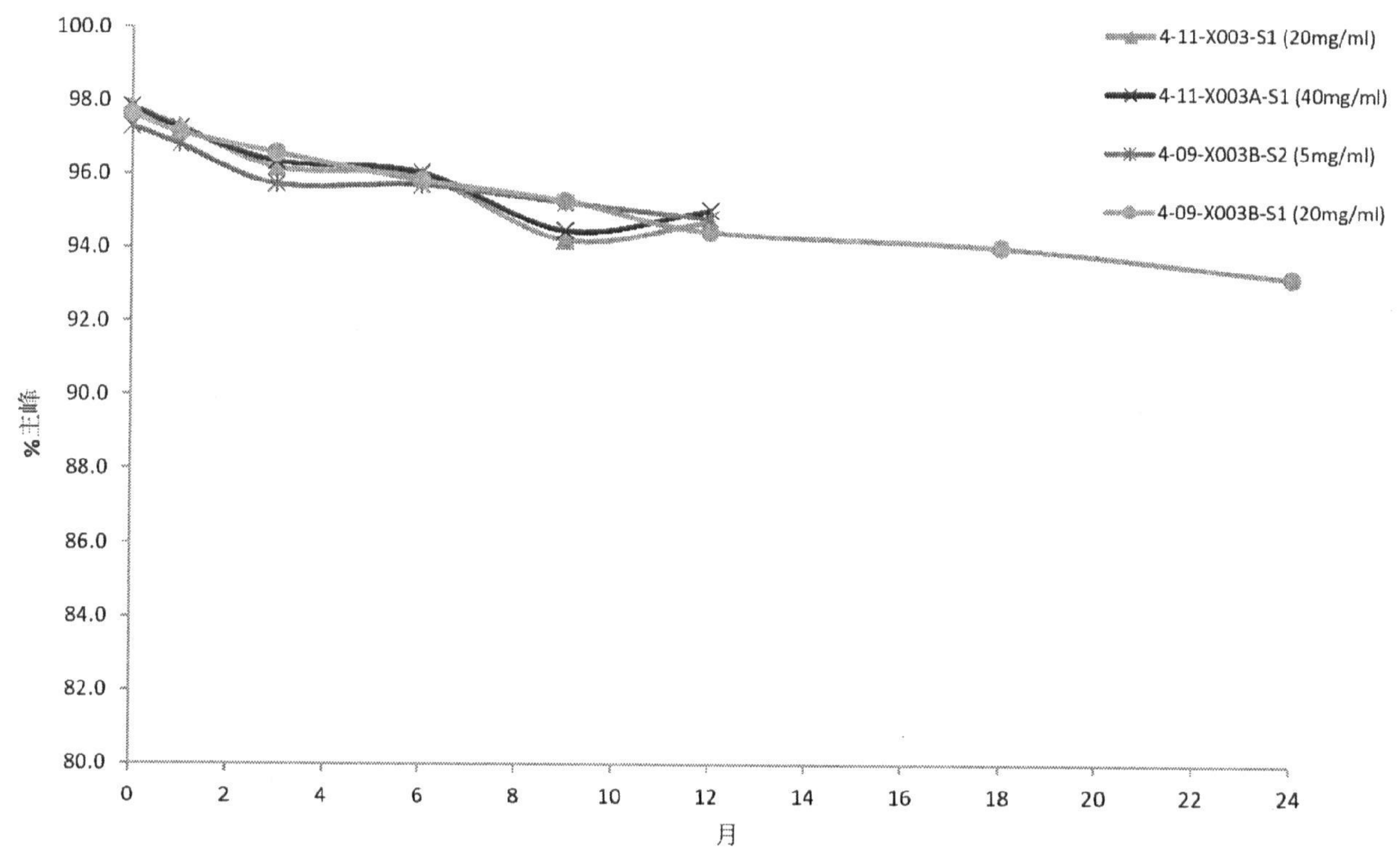


圖28B

分析方法	接受準則	Xc. (DS)/Sc. (DP) 4-11-X003A-S1	RB (DS) 155C011001
SE-HPLC (面積-%)	HMWS ≤ 8.0%	1.7	<0.9
	單體≥92%	98.3	>99.1
	二聚體：報告結果	0.9	0.3
	聚合物：報告結果	0.8	<0.6
RP-HPLC (area-%)	總共的有關的形狀：≤ 6面積-%	3.1	2.7
	主峰：≥94面積-%	96.9	97.3
	任何有關的形狀>1.0面積-%：報告結果	2.8 (有關的形狀3：1.1 有關的形狀4：1.7)	1.7 有關的形狀4：1.7)

圖29

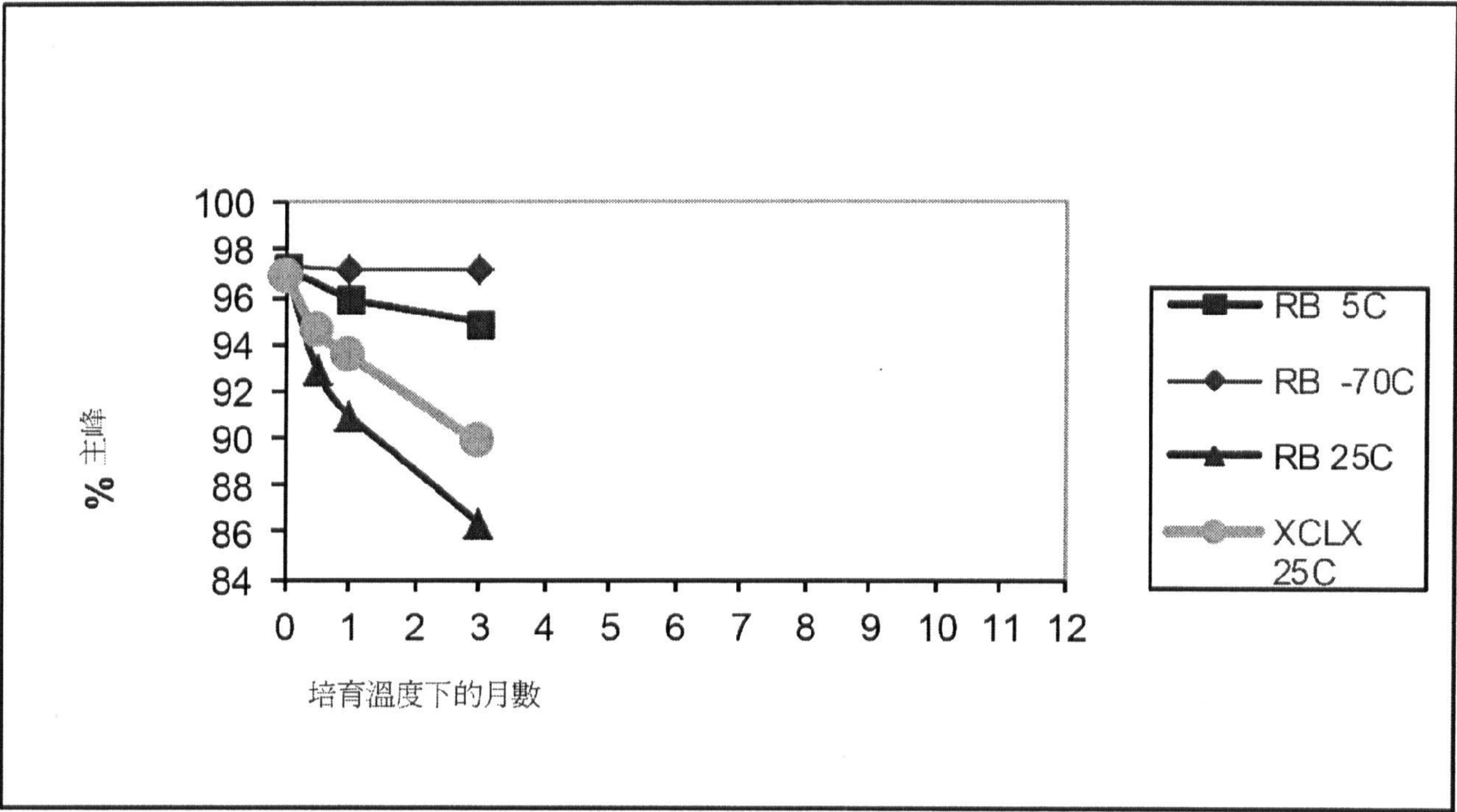


圖30A

GMP1的穩定性的結果 (RB)

% 主峰

培育時間 (月)	-70C	5C	25C
0	97.25	97.25	97.25
0.5			92.9
1	97.1	95.9	91
3	97.2	94.9	86.4

圖30B

XCLX的穩定性的結果 (在RB測試)

% 主峰

培育時間 (月)	-70C	5C	25C
0	96.9	96.9	96.9
0.5			94.5
1			93.5
3			89.8

圖30C

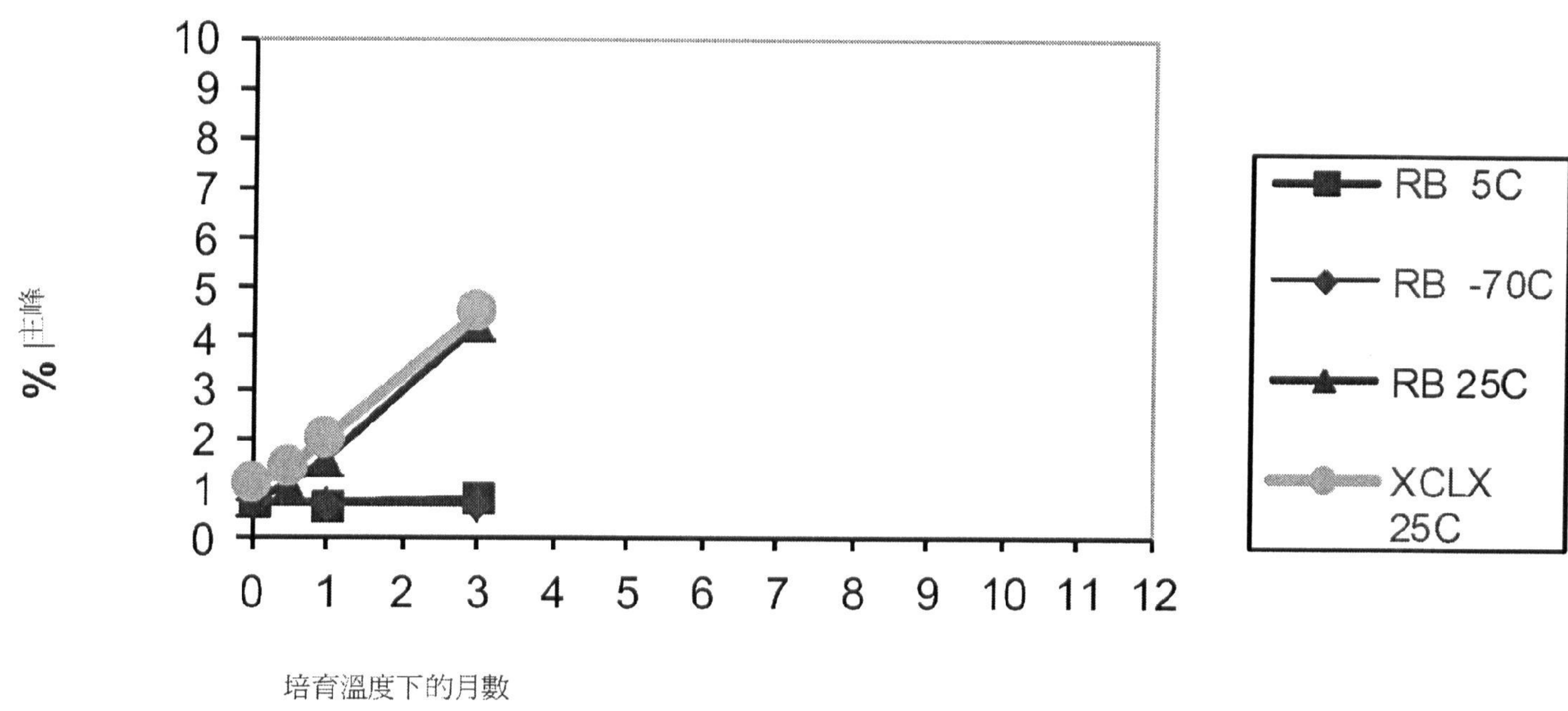


圖31A

%峰3			
培育時間 (月)	-70C	5C	25C
0	0.72	0.72	0.72
0.5			1.1
1m	0.7	0.7	1.6
3m	0.7	0.8	4.3

圖31B

%峰3			
培育時間 (月)	-70C	5C	25C
0	1.1	1.1	1.1
0.5			1.4
1			2
3			4.5

圖31C

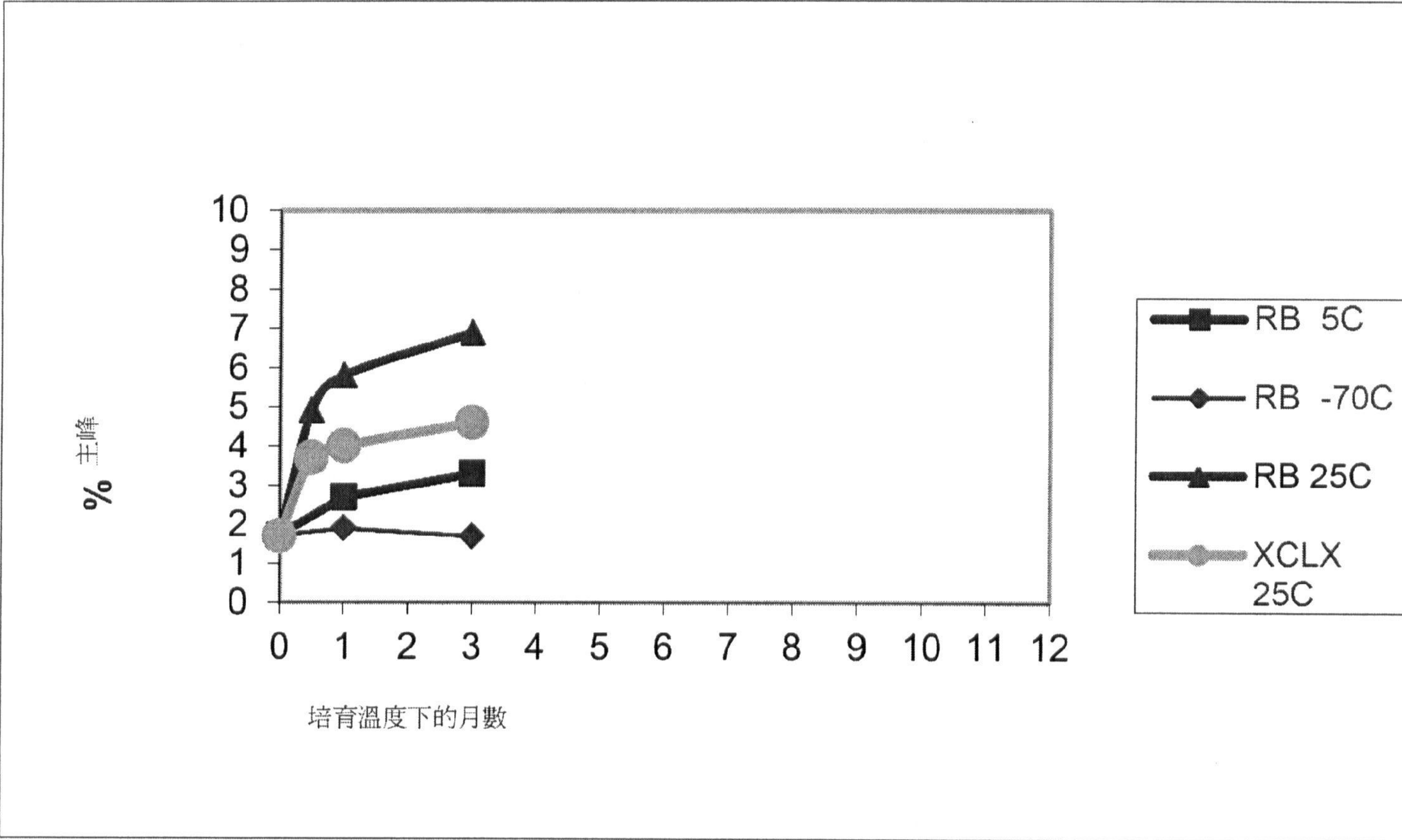


圖32A

RB			
% 峰5			
培育時間 (月)	-70C	5C	25C
0	1.72	1.72	1.72
0.5			4.9
1m	1.9	2.7	5.8
3m	1.7	3.3	6.9

圖32B

XCLX			
% 峰5			
培育時間 (月)	-70C	5C	25C
0	1.7	1.7	1.7
0.5			3.7
1m			4
3m			4.6

圖32C

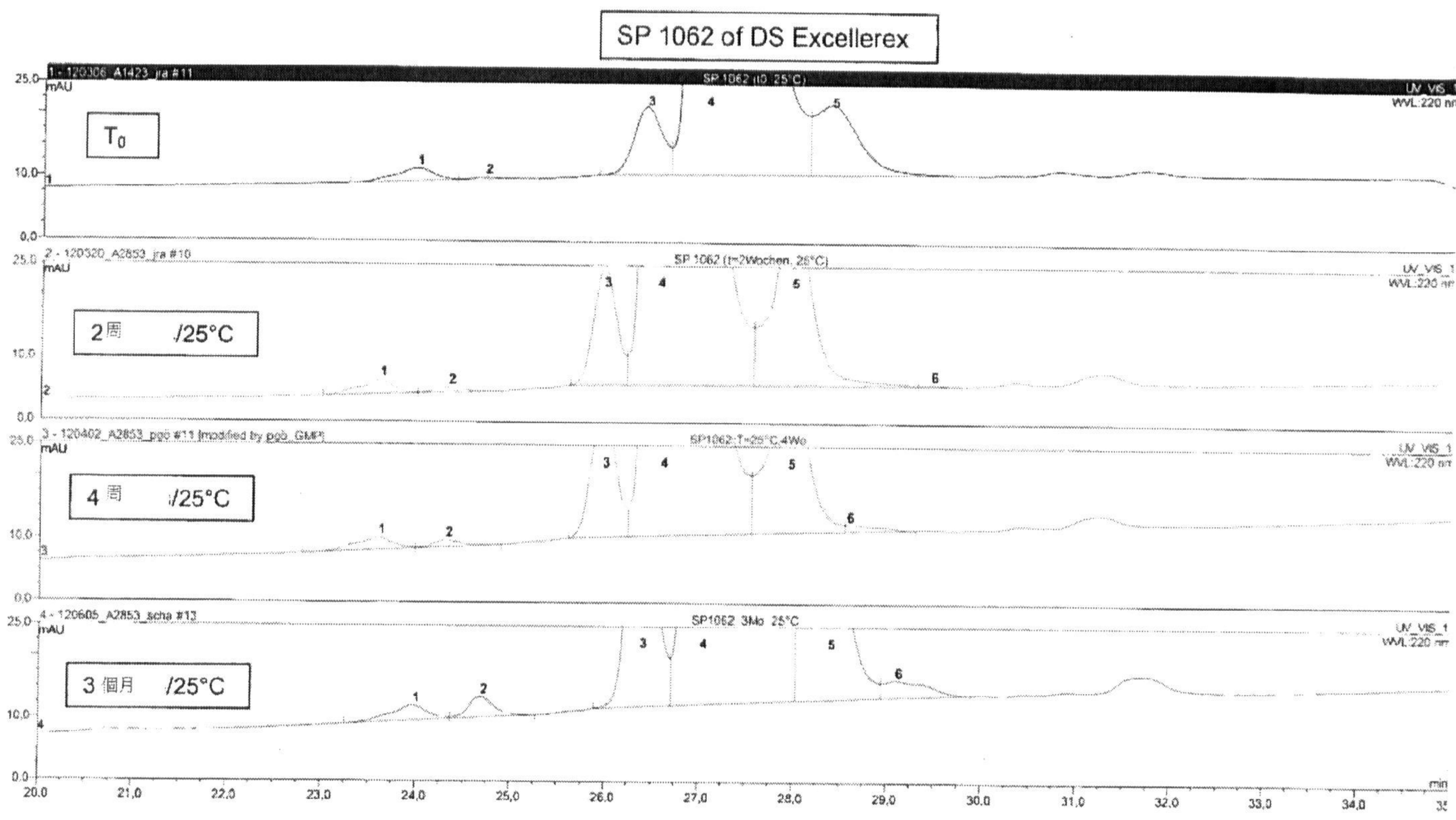


圖33A

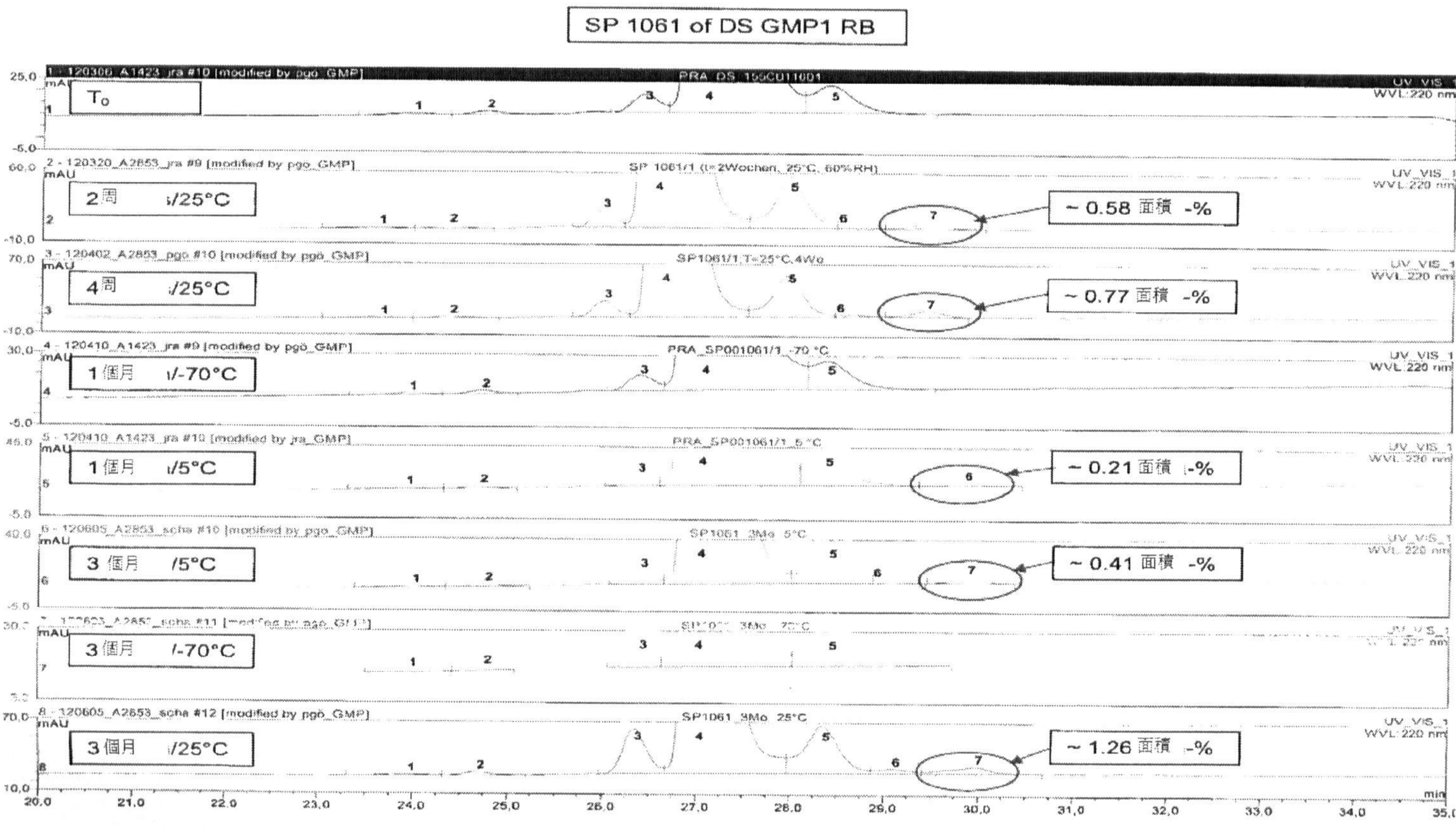
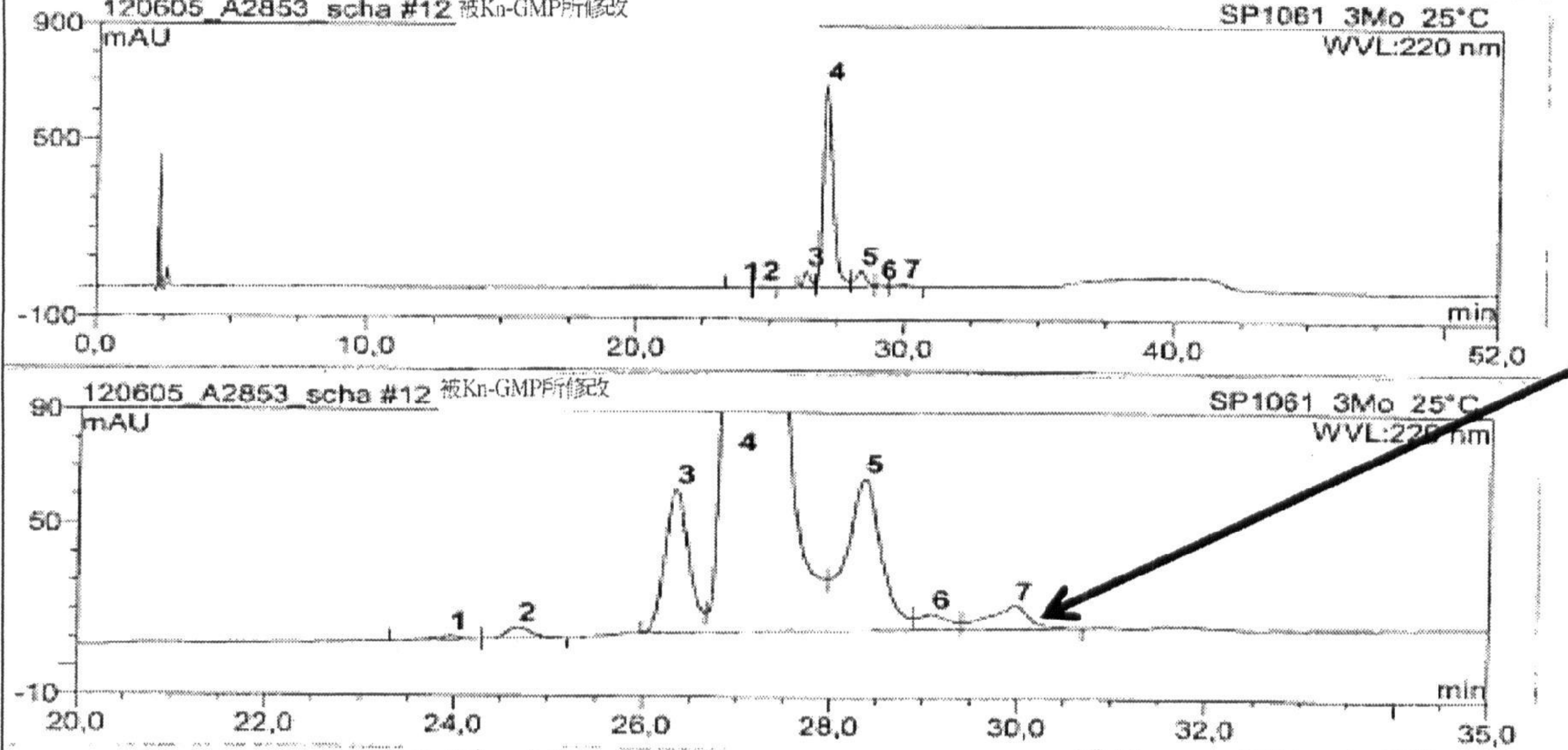


圖33B

樣本名稱	SP1061 3Mo 25°C		200041037
序列名稱:	120605_A2853_scha	樣品號碼:	12
計劃方法:	PRA-QC-004_DAD_V1	系統:	A-2853
量化:	PRA-QC-004	住:	C18-7/161211
注射容積:	10,0	注射劑小瓶:	7
收集的日期時間:	5.6.2012 7:04 PM	稀釋:	40,00
洗脫劑:	PRA-12/115 12_A12/036	序列創建子:	Scha_GMP
數據來源:	CHROMDB_QCPRA_GMP	操作子:	Scha_GMP
		計劃編號:	100190/13600



編號	峰的名稱	tR min	面積 mAU	相對面積 %	群組	群組面積 [%]
1	有關形狀 1	23,951	32,58	0,2	1	0,2
2	有關形狀 2	24,679	70,23	0,3	1	0,3
3	有關形狀 3	26,342	885,18	4,3	1	4,3
4	主峰	26,991	17670,80	86,4	1	86,4
5	有關形狀 4	28,345	1414,27	6,9	1	6,9
6	有關形狀 5	29,088	132,21	0,6	1	0,6
7	其它的峰	29,966	257,89	1,3	1	1,3

圖34

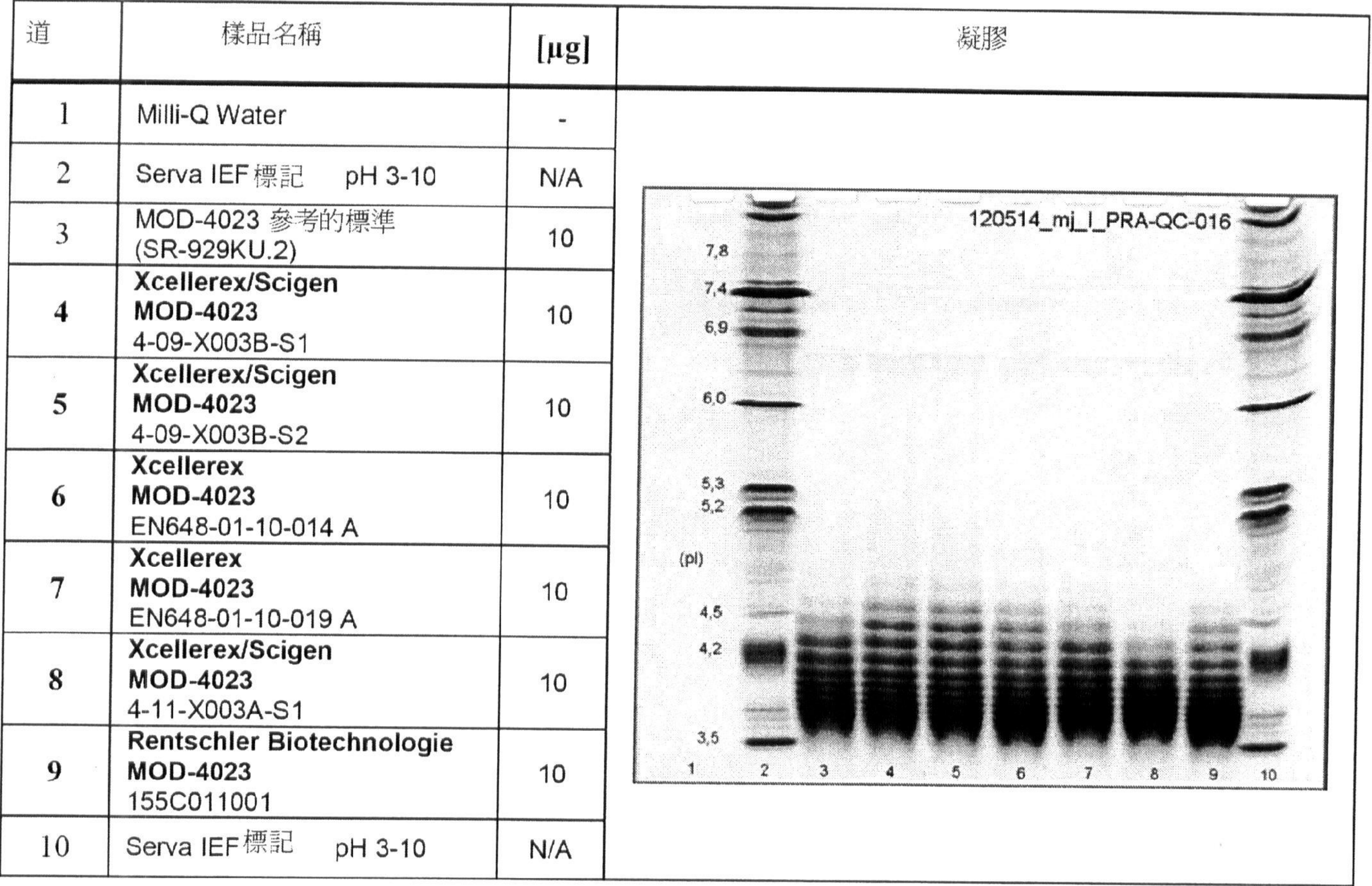


圖35A

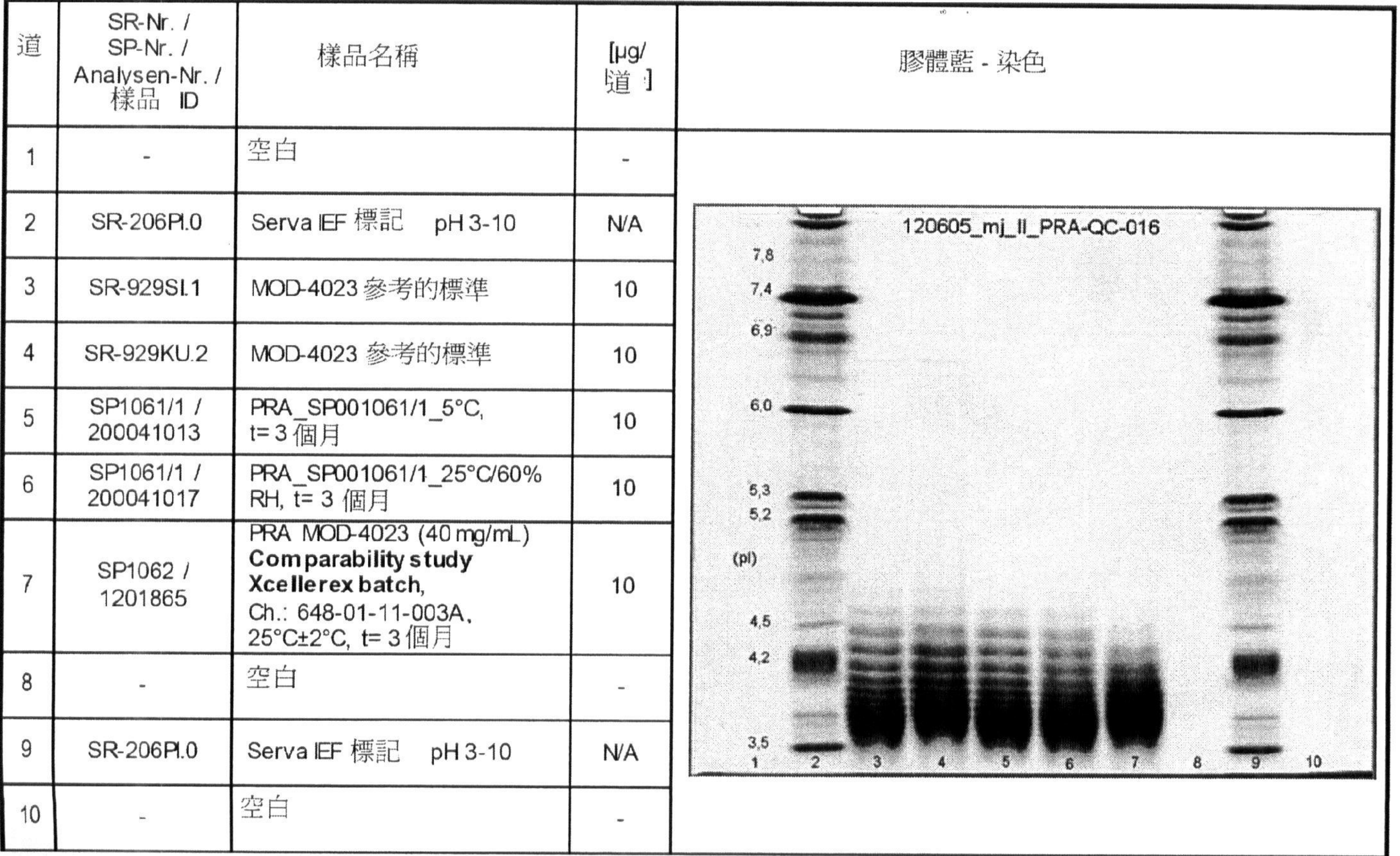
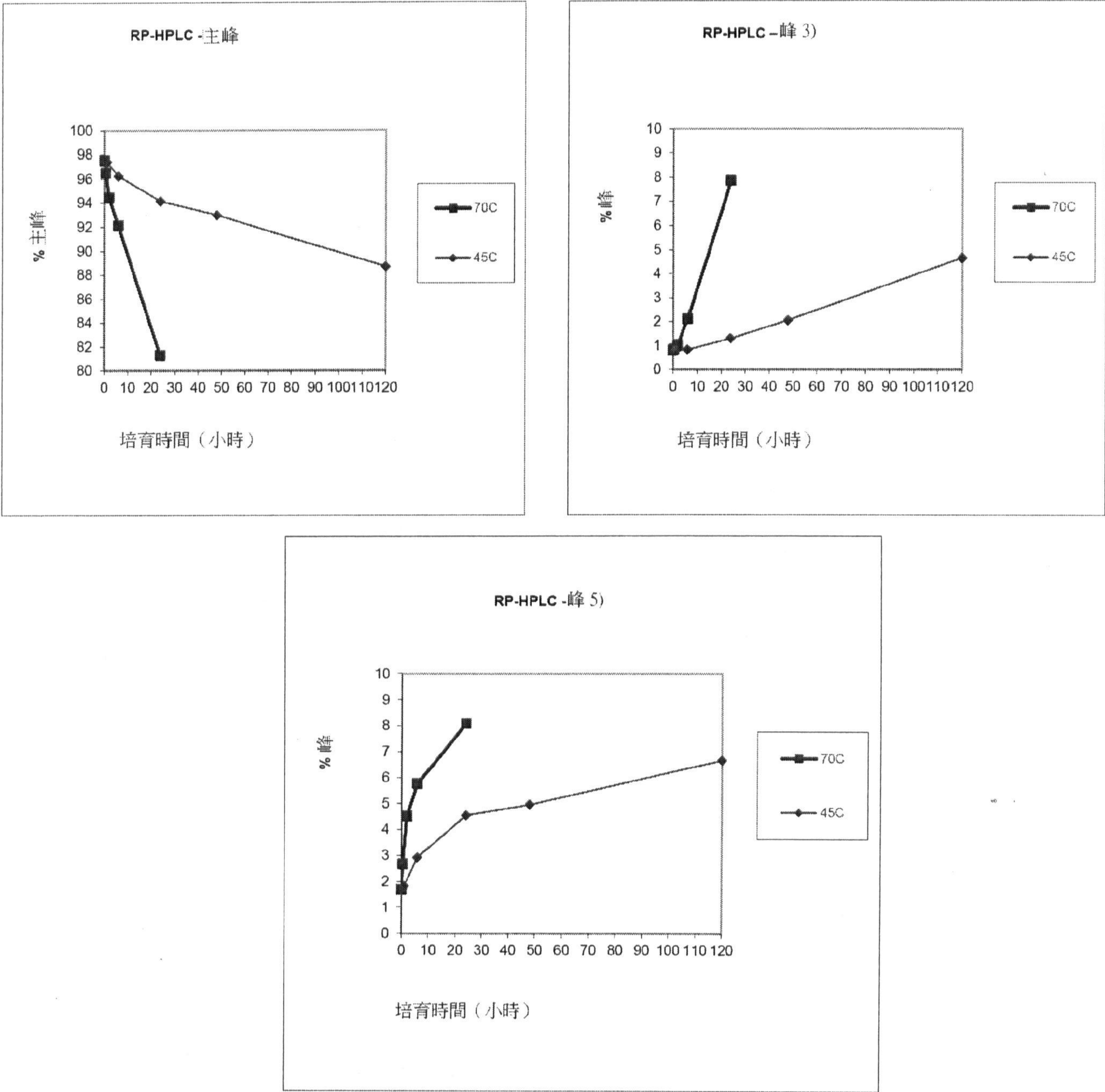
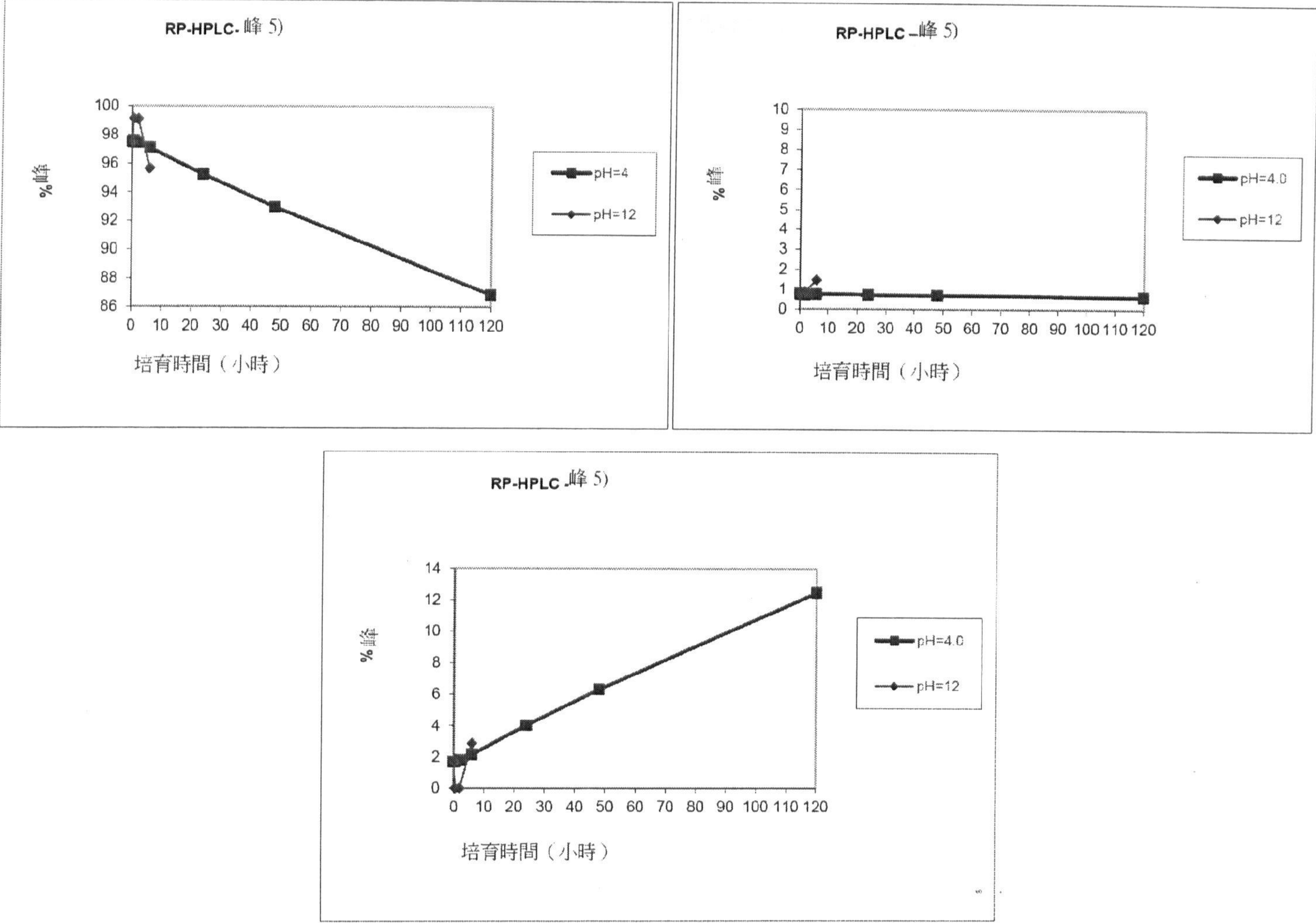


圖35B



存儲溫度	培育溫度下的時數	%主峰	21-22分鐘時的峰	25-26分鐘時的峰
45°C	0	97.50	0.81	1.69
	1	97.40	0.77	1.83
	6	96.24	0.83	2.93
	24	94.15	1.30	4.55
	48	92.99	2.06	4.96
	120	88.68	4.65	6.67
70°C	0	97.50	0.81	1.69
	0.5	96.48	0.85	2.67
	2	94.46	1.02	4.52
	6	92.12	2.12	5.77
	24	81.29	7.87	8.09

圖36



pH	培育時間 (小時)	%主峰	峰3	峰5
pH=12	0	97.51	0.79	1.70
	0.5	99.14	0.86	0.00
	2	99.11	0.89	0.00
	6	95.65	1.48	2.86
pH=4.0	0	97.51	0.79	1.70
	0.5	97.57	0.75	1.68
	2	97.46	0.74	1.80
	6	97.08	0.77	2.16
	24	95.24	0.74	4.02
	48	92.97	0.72	6.31
	120	86.86	0.65	12.49

圖37

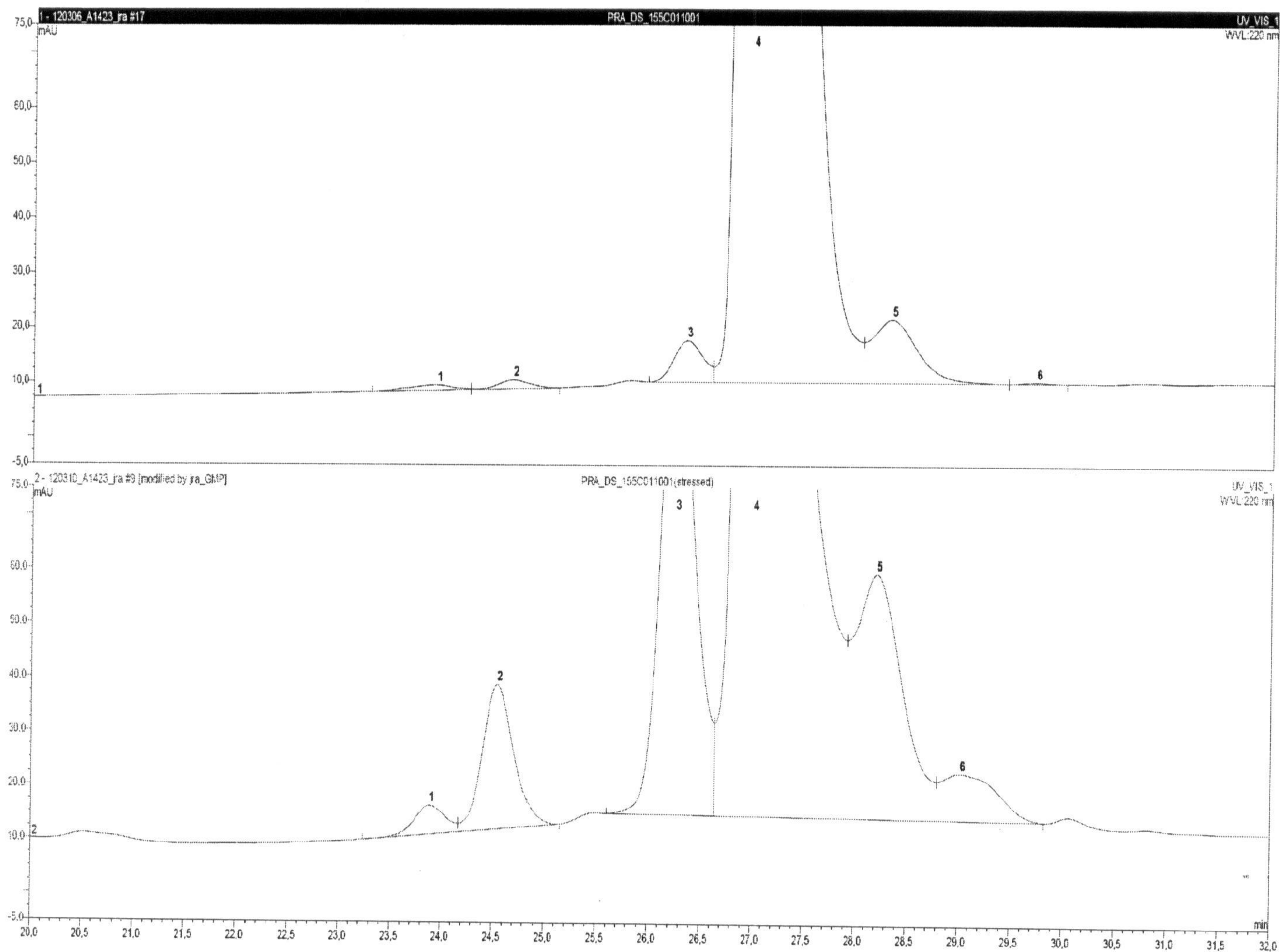


圖 38

測試的樣品

RB – 40 mg/ml, pH=5.9

RB - 10 mg/ml, pH=6.2

XCLX - 40 mg/ml, pH=6.2

% 主峰			
培育時間（月）	RB 40 mg/ml pH=5.9	RB 10 mg/ml pH=6.2	XCLX 40 mg/ml pH=6.2
0	97.3	97.3	96.9
0.5	92.9	95.5	94.5
1	91		93.5
3	86.4		89.8

% 峰3			
培育時間（月）	RB 40 mg/ml pH=5.9	RB 10 mg/ml pH=6.2	XCLX 40 mg/ml pH=6.2
0	0.72	0.7	1.1
0.5	1.1	1.2	1.4
1	1.6		2
3	4.3		4.5

% 峰5			
培育時間（月）	RB 40 mg/ml pH=5.9	RB 10 mg/ml pH=6.2	XCLX 40 mg/ml pH=6.2
0	1.72	1.7	1.7
0.5	4.9	2.8	3.7
1	5.8		4
3	6.9		4.6

RB % 峰7			
培育時間（月）	RB 40 mg/ml pH=5.9	RB 10 mg/ml pH=6.2	XCLX 40 mg/ml pH=6.2
0	0	0	0
0.5	0.6	0.1	0
1m	1		0
3m	1.3		0

圖39