

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011133926/10, 22.01.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
22.01.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
22.01.2009 ЕР 09151108.9;  
29.01.2009 US 61/148,119

(43) Дата публикации заявки: 27.02.2013 Бюл. № 6

(45) Опубликовано: 27.01.2015 Бюл. № 3

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: WO02055532 A2, 18.07.2002, SEQ ID  
NO:2. US6608183 B1, 19.08.2003, SEQ ID NO:  
1. WO 2006048777, A2 11.05.2006 . EA 10626  
B1, 30.10.2008 . US 0005891840 A1, 06.04.1999.  
RU 2075509 C1, 20.03.1997(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 22.08.2011(86) Заявка РСТ:  
EP 2010/050725 (22.01.2010)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2010/084173 (29.07.2010)Адрес для переписки:  
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-  
ПАТЕНТ", И.И. Липатовой

(72) Автор(ы):

ОЛСЕН Оле Хвильстед (DK),  
БРАЙНХОЛЬТ Йенс (DK),  
СЬЁДТ Кристине Бруун (DK),  
ДЕМИОТ Хелле (DK),  
НЁРСКОВ-ЛАУРИТСЕН Леиф (DK),  
ТЮГЕСЕН Петер (DK)

(73) Патентообладатель(и):

НОВО НОРДИСК ХЕЛС КЕА АГ (CH)

C 2  
2 5 3 9 7 9 7  
C 2(54) ПРОИЗВОДНОЕ ГОРМОНА РОСТА ЧЕЛОВЕКА С ПОВЫШЕННОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ К  
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОМУ РАЗРУШЕНИЮ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТАКОГО ПРОИЗВОДНОГО,  
ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ, СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области молекулярной биологии, медицины, биохимии и генетической инженерии. Предложено производное гормона роста человека, содержащее дополнительную дисульфидную связь по сравнению с hGh, определенному посредством SEQ ID No. 1, где производное содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C,

S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в SEQ ID No. 1, и обладает активностью гормона роста человека, а также способ получения такого производного, его применение, способ лечения и фармацевтическая композиция. Изобретение обладает повышенной стабильностью и устойчивостью к протеолитическому расщеплению в результате

R U  
2 5 3 9 7 9 7  
C 2

введения остатков цистеина. 5 н. и 13 з.п. ф-лы, 3 ил., 6 табл., 5 пр.

Р У 2 5 3 9 7 9 7 C 2

Р У 2 5 3 9 7 9 7 C 2

R U 2 5 3 9 7 9 7 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 539 797<sup>(13)</sup> C2

(51) Int. Cl.  
C07K 14/61 (2006.01)  
A61K 38/37 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2011133926/10, 22.01.2010

(24) Effective date for property rights:  
22.01.2010

Priority:

(30) Convention priority:  
22.01.2009 EP 09151108.9;  
29.01.2009 US 61/148,119

(43) Application published: 27.02.2013 Bull. № 6

(45) Date of publication: 27.01.2015 Bull. № 3

(85) Commencement of national phase: 22.08.2011

(86) PCT application:  
EP 2010/050725 (22.01.2010)

(87) PCT publication:  
WO 2010/084173 (29.07.2010)

Mail address:

197101, Sankt-Peterburg, a/ja 128, "ARS-PATENT",  
I.I. Lipatovoj

(72) Inventor(s):

OLSEN Ole Khvil'sted (DK),  
BRAJNKhOL'T Jens (DK),  
S'EDT Kristine Bruun (DK),  
DEMJuT Khelle (DK),  
NERSKOV-LAURITSEN Leif (DK),  
TJuGESEN Peter (DK)

(73) Proprietor(s):

NOVO NORDISK KhELS KEA AG (CH)

R U

2 5 3 9 7 9 7

C 2

(54) HUMAN GROWTH HORMONE DERIVATIVE HIGHLY RESISTANT TO PROTEOLYTIC DEGRADATION, METHOD FOR PREPARING THIS DERIVATIVE, USING IT, METHOD OF TREATING, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to molecular biology, medicine, biochemistry and gene engineering. Presented is a human growth hormone derivative containing an additional disulphide bond as compared to hGh defined by SEQ ID No. 1, wherein the derivative contains at least one pair of mutations described by H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C,

S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C and/or R94C/D107C in SEQ ID No. 1, and possesses the activity of the human growth hormone, as well as a method for preparing this derivative, using it, a method of treating and a pharmaceutical composition.

EFFECT: invention possesses high stability and resistance to proteolytic degradation as a consequence of the introduction of cysteine residues.

18 cl, 3 dwg, 6 tbl, 5 ex

## ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к стабильным соединениям гормона роста (GH), устойчивым к протеолитическому разрушению.

## ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Гормон роста (GH) представляет собой полипептидный гормон, секретируемый аденогипофизом у млекопитающих. В зависимости от вида GH представляет собой белок, состоящий приблизительно из 190 аминокислотных остатков, что соответствует молекулярной массе приблизительно 22 кДа. GH связывается с рецепторами клеточной поверхности, GH-рецепторами (GHR), и передает через них сигналы. GH играет ключевую роль в стимуляции роста, поддержании нормального состава тела, анаболизме и метаболизме липидов. Он также оказывает непосредственное влияние на промежуточный метаболизм, как, например, уменьшает поглощение глюкозы, усиливает липолиз, стимулирует поглощение аминокислот и синтез белка. Этот гормон также оказывает влияние на другие ткани, в том числе жировую ткань, ткань печени, кишечника, почек, скелета, соединительную ткань и мышечную ткань. Получен рекомбинантный hGH, и он имеется в продаже в виде, например: Genotropin<sup>TM</sup> (Pharmacia Upjohn), Nutropin<sup>TM</sup> и Protropin<sup>TM</sup> (Genentech), Humatrop<sup>TM</sup> (Eli Lilly), Serostim<sup>TM</sup> (Serono), нордитропина (Novo Nordisk), омнитропа (Sandoz), нутропин-депо (Genentech и Alkermes). Помимо этого на рынке также имеется аналог с дополнительным остатком метионина на N-конце, например: Somatonorm<sup>TM</sup> (Pharmacia Upjohn/Pfizer).

GH имеет общую топологию с другими членами GH-семейства белков, пролактином (PRL) и плацентарным лактогеном (PL). GH классифицируют как белок, имеющий структуру четырехспирального пучка (Фиг.1), демонстрирующий топологию "вверх-вверх-вниз-вниз", с двумя консервативными дисульфидными связями. Конкретно, человеческий GH (hGH) дикого типа состоит из 191 аминокислотного остатка и имеет четыре остатка цистеина в положениях 53, 165, 182 и 189, что стабилизирует пространственную структуру данного белка путем образования двух внутримолекулярных дисульфидных связей, соединяющих C53 с C165 и C182 с C189, соответственно (Фиг.1). Структура hGH была экспериментально определена рентгеновской кристаллографией в свободной форме (Chantalet L. et al. (1995) Protein and Peptide Letters 3, 333-340) и в комплексе со связывающимся с ним белком (внеклеточным доменом человеческого GHR (hGHR)) (Devos, A. M. et al. (1992) Science 255, 306-312). Эти структуры депонированы в Банк белковых структур (PDB) и находятся в открытом доступе (коды доступа в PDB 1HGU и 1HWG, соответственно). Так, среди опубликованных структур hGH можно определить остатки, существенно важные для связывания hGH с hGHR. Кроме того, динамические свойства hGH исследованы посредством спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (Kasimova M.R. et al. J. Mol. Biol. (2002) 318, 679-695). В сочетании данные рентгеноструктурного анализа и ЯМР позволяют выделить участки hGH, которые хорошо структурированы и хорошо определены, от участков, которые менее структурированы и динамичны. Ожидается, что менее структурированные и динамичные участки hGH будут особо чувствительны к протеолитическому расщеплению, и надлежащая стабилизация таких участков приведет к улучшенной протеолитической стабильности.

hGH был подвергнут обширному мутагенезу в попытках получить аналоги hGH с желаемыми химическими или биологическими свойствами. В частности, описаны цистeinовые мутанты, полученные для различных целей.

В US 2003/0162949 описаны цистeinовые варианты членов супергенного семейства GH. Приводится общий способ создания сайт-специфических, биологически активных

конъюгатов этих белков. Данный способ включает добавление остатков цистеина в несущественные участки белков или замену несущественных аминокислот в белках на остатки цистеина с использованием сайт-специфического мутагенеза и затем осуществление ковалентного связывания между реакционноспособным по цистеину 5 полимером или другой реакционноспособной по цистеину группировкой и белками через добавленный остаток цистеина.

В WO 02/055532 описываются генно-инженерные мутанты hGH, содержащие по меньшей мере одну присоединенную посредством ковалентной связи не являющуюся 10 полипептидом группировку, в частности мутанты hGH, в которых введенный остаток цистеина был использован для пэгилирования.

В US 5951972 описываются физиологически активные производные природных и рекомбинантных белков и полипептидов млекопитающих и человека, где получено производное белка с различными заместителями по меньшей мере по одному 15 природному или введенному в данный белок остатку цистеина.

Протеолитическое расщепление hGH подробно изучено. Длинная петля, в состав которой входят остатки 128-154, содержит предполагаемые сайты расщепления для различных протеаз, таких как тромбин, плазмин, коллагеназа, субтилизин и химотрипсиноподобные сериновые протеазы. Соответственно, показано, что эта часть 20 hGH особенно чувствительна к протеолитическому расщеплению (Lewis, U.J. Ann. Rev. Physiol. (1984) 46, 33-42). Ферменты, известные в качестве отвечающих за разрушение hGH, включают тромбин, плазмин, субтилизин, химотрипсиноподобные сериновые протеиназы и калликреины.

Исследовано разрушение hGH в ткани крысы (Garcia-Barros et al. J. Endocrinol. Invest. (2000) 23, 748-754).

Обнаружено, что в щитовидной железе крыс химотрипсиноподобные протеазы, 25 предпочтительно осуществляющие расщепление по объемным и липофильным аминокислотным остаткам, сначала расщепляли пептидную связь между Y143 и S144 с получением двухцепочечной молекулы, после чего расщепляли связь между Y42 и S43 с высвобождением N-концевого пептида F1-Y42. Последующая обработка 30 расщепленной петли в такой двухцепочечной молекуле выполняется путем расщепления связи между F146 и D147 под действием химотрипсиноподобных протеаз и далее под действием карбоксипептидаз.

Описаны несколько методов получения аналогов hGH, стабилизированных против протеолитического разрушения.

Используя специфические точечные мутации, Alam и соавт. (J. Biotech. 65, 183-190 35 (1998)) сконструировали мутанты hGH, устойчивые к тромбину и плазмину. Тромбин специфически расщепляет hGH между R134 и T135, и двойная мутация R134D, T135P приводила к получению варианта hGH, устойчивого к расщеплению тромбином, а тройная мутация R134D, T135P, K140A приводила к устойчивости к плазмину. Кроме 40 того, последний мутант hGH был устойчив к протеолизу под действием плазмы крови человека в течение 7 суток.

В EP534568 описываются мутанты hGH, стабилизированные против протеолитического разрушения посредством изменения R134 на аланин, лейцин, треонин, фенилаланин, пролин или гистидин.

В WO2004022593/Nutilus описываются общие высокопроизводительные способы 45 получения модифицированных цитокинов с применением направленной эволюции, в том числе вариантов GH, с повышенной протеолитической стабильностью.

В WO2006048777/Nutilus конкретно описываются модифицированные аналоги hGH

с улучшенной протеолитической стабильностью. Эти аналоги содержат от одной до пяти мутаций в положениях 1-55, 57, 58, 60-63, 67-87, 89-91, 93, 95-100, 102-128, 131-132, 135-139, 141, 142, 144, 148-182, 184, 185 и 187-191. Введение остатков цистеина теоретически может приводить к образованию нежелательных связанных

5 дисульфидными связями димеров, и в WO2006048777 замена аминокислотных остатков на цистеин особо исключена из объема изобретения; в WO2006048777 (стр.65) сформулировано: "Замена аминокислот на остатки цистеина однозначно не допускается, поскольку такая замена теоретически будет приводить к образованию межмолекулярных дисульфидных связей".

10 Существует очевидная необходимость в разработке соединений hGH, которые устойчивы к протеолитическому разрушению. Такие стабилизированные соединения будут демонстрировать повышенную стабильность к протеолитическому расщеплению при сохранении желаемых биологических свойств hGH. Такие молекулы GH будут иметь повышенную стабильность, замедленный клиренс и/или продолжительный полупериод

15 существования *in vivo*.

Кроме того, обычно необходимо, чтобы белковые терапевтические средства были введены внутривенно или подкожно, поскольку обычно они не обладают достаточной 20 пероральной доступностью. Низкая пероральная биодоступность белков частично обусловлена протеолитическим разрушением в желудочно-кишечном тракте. Поэтому также существует необходимость в разработке соединений hGH, которые можно вводить

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к соединениям hGH, содержащим дополнительные дисульфидные связи. В соединения hGH по настоящему изобретению введен по меньшей 25 мере один дополнительный остаток цистеина посредством изменения по меньшей мере одной из аминокислот в последовательности hGH дикого типа на цистеин. В соединениях hGH по настоящему изобретению сайты мутации выбраны таким образом, что (1) введенный(ые) остаток(ки) цистеина подходящим образом размещается(ются) в пространственной структуре свернутого белка, чтобы давать возможность

30 образовываться дополнительным дисульфидным связям, не присутствующим в белке дикого типа, (2) нативная структура hGH не искажается, (3) соединение hGH демонстрирует повышенную стабильность к протеолитическому расщеплению по сравнению с hGH дикого типа или другие улучшенные функциональные характеристики и (4) соединение hGH сохраняет желаемые биологические активности, ассоциированные

35 с hGH дикого типа. Такие дисульфидные варианты соединений hGH, устойчивые к протеолитическому разрушению в желудочно-кишечном тракте, могут быть разработаны в виде перорально вводимых лекарственных средств для лечения hGH-ассоциированных расстройств.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

40 Фиг.1

Структура hGH в связанном состоянии с двумя копиями hGH-связывающего белка (1HWG в PDB). Четыре основные спирали в hGH показаны темно-серым цветом и отмечены как H1-H4. Направления (N→C-конец) указаны стрелками. N- и C-концы hGH отмечены как N и C, соответственно. Две дисульфидные связи, соединяющие C53 45 с C165 и C182 с C189, соответственно, представлены черными палочками и шариками. Также отмечены остатки L128 и D154, представляющие собой первый и последний остатки, соответственно, в длинной гибкой петле, соединяющей H3 и H4.

Фиг.2

Аминокислотная последовательность hGH дикого типа с четырьмя основными спиралями (H1-H4), выделенными другим цветом и отмеченными. Также отмечены три петли (L1-L3), соединяющие основные спирали. Определения спиралей относятся к hGH в комплексе со своим связывающим белком (1HWG в PDB).

5 Фиг.3

Зависимость протеолитического расщепления hGH дикого типа и соединений hGH с дополнительными дисульфидными связями от времени. Используют следующие протеазы: химотрипсин (панель А) и эластазу (панель В). Анализ выполняют, как описано в Примере 5. Количество интактного белка (в % относительно  $t=0$ ) отложено 10 в зависимости от времени инкубации. Величины  $T_{1/2}$  (часы), полученные аппроксимацией данных к одноэкспоненциальному зависимостям, приведены в таблицах.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к стабильным соединениям hGH, имеющим дополнительные дисульфидные связи. Дисульфидные связи образуются между парами цистеинов, из которых один или оба введены посредством точечных мутаций в последовательность hGH дикого типа. Сайты мутации выбирают таким образом, чтобы введенные остатки цистеина подходящим образом размещались в пространственной структуре свернутого белка для возможного образования дисульфидной связи. Если введен только один цистеин, то его партнер при образовании дисульфидной связи будет 20 включать один из четырех остатков цистеина, имеющихся в hGH дикого типа. Свернутый белок с дополнительной дисульфидной связью может быть получен в результате экспрессии соответствующего цистеинового мутанта hGH в растворимой форме подходящим организмом хозяина или извлечен из тела включения с использованием стандартных условий для рефолдинга соединений гормона роста, которые хорошо 25 известны специалисту в данной области (Cabrita and Bottomley, Biotechnology Annual Review 10, 31-50 (2004)). Идентификации положений, являющихся кандидатами для введения дополнительных дисульфидных связей, могут способствовать вычислительные методы, например с использованием экспериментально установленной пространственной структуры hGH (код доступа 1HWG в PDB) в комплексе с двумя 30 копиями связывающегося с ним белка. Выбор соответствующих положений для введения дисульфидной связи может быть основан на критериях расстояния и геометрии для дисульфидных связей, описанных в Dombrowski A., A., Bioinformatics 19, 1852-1853 (2003) и Petersen et al., Protein Eng. 12, 535-548 (1999).

Цистеиновые мутанты выбирают таким образом, чтобы введенные дисульфидные 35 связи неискажали нативную структуру данного белка и оказывали минимальное негативное воздействие на желаемую биологическую активность, ассоцииированную с hGH. Так, соединения конструируют таким образом, чтобы введенные дисульфидные связи не ослабляли взаимодействие с hGHR. Участки в hGH, важные для взаимодействия с рецептором, идентифицированы на основании 1HWG. Таким образом, при выборе 40 соответствующих положений для введения дисульфидных связей, нейтральных в отношении биологической активности, можно руководствоваться анализом структуры 1HWG.

Можно выбрать такие цистеиновые мутанты, чтобы введенные дисульфидные связи 45 обеспечивали повышенную стабильность к протеолитическому расщеплению. Предрасположенность белка к расщеплению протеазами отчасти определяется первичной аминокислотной последовательностью указанного белка. Протеазы могут быть относительно неспецифичны или могут распознавать, с различной степенью селективности, конкретные мотивы в первичной аминокислотной последовательности.

Однако пространственная структура и динамические свойства молекулы белка, выступающего в качестве субстрата, сильно влияют на протеолитическую стабильность. Обладающие большой гибкостью и динамичностью петлевые структуры особенно уязвимы к катализируемому протеазами расщеплению, в то время как хорошо

5 структурированные участки, как правило, в меньшей степени. Таким образом, защита против протеолитического расщепления может быть получена в результате стабилизации динамичных участков белка путем введения дисульфидных связей.

Один из аспектов изобретения относится к соединению гормона роста, содержащему дополнительные дисульфидные связи в SEQ ID No. 1. Как изложено в данном описании 10 ниже, полипептид соединения гормона роста по изобретению предпочтительно имеет высокий уровень идентичности с человеческим гормоном роста, идентифицированным посредством SEQ ID No. 1 и, соответственно, соединение гормона роста содержит одну или более чем одну дополнительную дисульфидную связь(и) по сравнению с человеческим гормоном роста, который определен в SEQ ID No. 1.

15 В соответствии с этим согласно одному из воплощений настоящего изобретения предложены стабильные соединения GH, соответствующие SEQ ID No. 1, сделанные устойчивыми к протеолитическому разрушению путем введения дополнительных дисульфидных связей.

В одном из воплощений, соответствующих изобретению, соединение гормона роста 20 содержит дополнительные дисульфидные связи между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, 25 L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C и/или V185C/S188C в SEQ ID No. 1.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста содержит дополнительные дисульфидные связи между по меньшей мере одной из пар аминокислот 30 в положениях, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C и/или V185C/S188C в SEQ ID No. 1, 35 но ими не ограничивается.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста содержит дополнительные дисульфидные связи между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих A17C/E174C, H21C/M170C, S71C/S132C, Q84C/Y143C и R94C/D107C в SEQ ID No. 1, но ими не ограничивается.

40 В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь между парой аминокислот в положениях, соответствующих Q84C/Y143C в SEQ ID No. 1.

В одном из воплощений, соответствующих изобретению, соединение гормона роста 45 содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/

S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C и/или V185C/S188C в SEQ ID No. 1.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C,

5 H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C и/или V185C/S188C в SEQ ID No. 1, но ими не ограничивается.

10 В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих A17C/E174C, H21C/M170C, S71C/S132C, Q84C/Y143C и R94C/D107C в SEQ ID No. 1, но ими не ограничивается.

15 В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста настоящего изобретения содержит одну пару мутаций, соответствующих положению Q84C/Y143C в SEQ ID No. 1.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста достигают путем введения дисульфидной связи между петлевым сегментом и спиральной структурой.

20 В одном из воплощений настоящего изобретения протеолитической стабильности соединения гормона роста достигают путем введения дисульфидной связи в пределах петлевого сегмента.

В одном из воплощений настоящего изобретения протеолитической стабильности соединения гормона роста достигают путем введения дисульфидной связи между петлевыми сегментами.

25 В одном из воплощений настоящего изобретения протеолитической стабильности соединения гормона роста достигают путем введения дисульфидной связи между спиралями.

30 В одном из воплощений настоящего изобретения по меньшей мере одна из введенных дисульфидных связей связывает два остатка цистеина в соединении гормона роста, при этом по меньшей мере один из указанных остатков цистеина не присутствует в hGH дикого типа.

В одном из воплощений настоящего изобретения введенные дисульфидные связи соединения гормона роста расположены между остатками цистеина, которые выбраны с учетом критериев расстояния и геометрии, описанных в Dombrowski A., A.,

35 Bioinformatics 19, 1852-1853 (2003) и Petersen et al., Protein Eng. 12(7), 535-548 (1999).

В одном из воплощений настоящего изобретения введенная дисульфидная связь(и) соединения гормона роста стабилизирует(ют) петлю, соединяющую H3 и H4 (L3, остатки 128-154), то есть по меньшей мере один из цистеинов во введенной дисульфидной связи располагается в сегменте, содержащем остатки 128-154 (Фиг.1 и 2).

40

Таблица 1

	Первая аминокислота, определенная путем выравнивания последовательности с SEQ ID No. 1	Вторая аминокислота, определенная путем выравнивания последовательности с SEQ ID No. 1	Соединенные сегменты вторичной структуры <sup>a</sup>
1.	16	117	H1-H3
2.	17	174	H1-H4
3.	21	170	H1-H4
4.	26	102	H1-L2
5.	26	103	H1-L2
6.	47	50	L1-L1
7.	49	161	L1-L1

8.	54	143	L1-L3
9.	54	144	L1-L3
10.	54	146	L1-L3
11.	55	143	L1-L3

5	Первая аминокислота, определенная путем выравнивания последовательности с SEQ ID No. 1	Вторая аминокислота, определенная путем выравнивания последовательности с SEQ ID No. 1	Соединенные сегменты вторичной структуры <sup>a</sup>
12.	57	143	L1-L3
13.	58	141	L1-L3
14.	58	143	L1-L3
15.	58	144	L1-L3
16.	59	137	L1-L3
17.	61	66	L1-L1
18.	61	67	L1-L1
19.	71	132	L1-L3
20.	73	132	H2-L3
21.	73	139	H2-L3
22.	77	138	H2-L3
23.	77	139	H2-L3
24.	81	141	H2-L3
25.	81	143	H2-L3
26.	84	143	H2-L3
27.	84	144	H2-L3
28.	85	143	H2-L3
29.	85	144	H2-L3
30.	89	146	H2-L3
31.	92	146	H2-L3
32.	92	148	H2-L3
33.	94	107	H2-H3
34.	102	105	L2-H3
35.	156	146	H4-L3
36.	156	148	H4-L3
37.	185	188	Ct-Ct

a) H1-H4 относится к спирали 1-4, L1-L3 относится к петлям 1-3, а Ct относится к C-концевому сегменту.

Как описано выше, изобретение относится к соединению гормона роста, содержащему дополнительную дисульфидную связь между петлевым сегментом и спиральным сегментом, или в пределах петлевого сегмента, или между петлевыми сегментами, или между спиральными сегментами полипептида. Расположение любой такой дополнительной дисульфидной связи описано, с учетом задачи данной заявки, со ссылкой на полипептид hGH, который определен в SEQ ID No. 1.

В одном из воплощений соединение гормона роста по изобретению содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C и/или V185C/S188C в SEQ ID No. 1.

В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в SEQ ID No.1.

В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих A17C/E174C, H21C/M170C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в SEQ ID No. 1.

5 Одно из воплощений, соответствующих изобретению, относится к соединению гормона роста, содержащему дополнительную дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один из цистеинов присутствует в L3 (AA (аминокислоты) 128-154 в SEQ ID No. 1) или, например, в средней части этой петли, определенной посредством AA 135-148, или в соответствующих аминокислотных остатках.

10 В одном из воплощений соединения гормона роста по меньшей мере один из цистеинов дополнительной дисульфидной связи присутствует в L3 в положении, соответствующем AA141, AA142, AA143, AA144, AA145 или AA146, предпочтительно AA143 или AA144 в SEQ ID No. 1.

15 В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C и/или F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

20 В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C и/или F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

25 В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

30 Одно из воплощений, соответствующих изобретению, относится к соединению гормона роста, содержащему дополнительную дисульфидную связь, соединяющую L3 с L1.

В одном из воплощений соединение гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь, соединяющую аминокислотный остаток, соответствующий AA54, AA55, AA56, AA57, AA58 или AA59 в L3, с аминокислотой, соответствующей AA143 или AA144 в L1 в SEQ ID No. 1.

35 В одном из воплощений соединение гормона роста по изобретению содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C и/или S71C/S132C в SEQ ID No. 1.

40 В одном из воплощений гормон роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C и/или S71C/S132C в SEQ ID No. 1.

Одно из воплощений, соответствующих изобретению, относится к соединению гормона роста, содержащему дополнительную дисульфидную связь, соединяющую L3 со спиральным сегментом, таким как спираль 2 (H2).

45 В одном из воплощений соединение гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь, соединяющую аминокислотный остаток, соответствующий AA84 или AA85 в H2, с аминокислотой, соответствующей AA143 или AA144 в L3 в SEQ ID No. 1.

В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C и F92C/T148C в SEQ ID No 1.

5 В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C и/или F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

10 В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

Одно из воплощений, соответствующих изобретению, относится к соединению гормона роста, содержащему дополнительную дисульфидную связь, соединяющую L2 со спиралью 1.

15 В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих D26C/V102C или D26C/Y103C.

Что касается дисульфидных мостиков между двумя остатками цистеина, то остатки цистеина можно ввести в любой из участков или в любое из положений, которые описаны ранее, или провести по ним замены на остатки цистеина с тем, чтобы способствовать образованию одной или более введенных дисульфидных связей, как будет необходимо.

20 Замены и вставки аминокислотных остатков могут быть выполнены стандартными методами, известными специалисту в данной области.

В соответствии с данным изобретением одну или более чем одну дополнительную дисульфидную связь(и) вводят путем осуществления аминокислотной замены по меньшей мере двух аминокислот по сравнению с SEQ ID No. 1. В следующем воплощении

25 соединение содержит точно одну дополнительную дисульфидную связь по сравнению с SEQ ID No. 1. В одном из воплощений соединение по изобретению содержит по меньшей мере 2 аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID No. 1. В одном из следующих воплощений соединение содержит точно 2 аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID No. 1. В одном из воплощений полипептид соединения гормона роста по

30 изобретению содержит по меньшей мере два дополнительных цистеина по сравнению с человеческим гормоном роста, который определен в SEQ ID No. 1. В следующем воплощении полипептид содержит точно два дополнительных цистеина по сравнению с человеческим гормоном роста, который определен в SEQ ID No. 1.

35 В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста, в дополнение к образованию дополнительных дисульфидных связей, химически модифицировано посредством присоединения таких группировок, как ПЭГ, углеводы, альбумин-связывающие вещества, жирные кислоты, алкильные цепи, липофильные группы, витамины, желчные кислоты, но ими не ограничиваясь; или спейсеров к боковой цепи или основной цепи соединения гормона роста.

40 В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста химически модифицировано по сравнению с hGH с целью облегчения транспорта сквозь эпителий.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста по настоящему изобретению химически модифицировано с целью получения пролонгированной продолжительности действия *in vivo*.

45 В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста химически модифицировано с целью получения пролонгированной продолжительности полупериода функционального существования *in vivo*.

В одном из воплощений настоящего изобретения химические модификации соединения

гормона роста также могут носить временный характер, то есть они легко могут быть удалены *in vivo*.

В одном из воплощений настоящего изобретения модификации соединения гормона роста могут быть осуществлены по любому аминокислотному остатку без влияния на связывание соединения гормона роста с hGHR.

5 В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста обладает повышенной стабильностью к протеолитическому расщеплению.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста обладает повышенной стабильностью к протеолитическому разрушению под действием 10 панкреатической протеазы.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста обладает повышенной стабильностью к протеолитическому разрушению под действием протеаз, присутствующих в желудочно-кишечном тракте.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста обладает 15 повышенной стабильностью к протеолитическому разрушению под действием протеаз, присутствующих в плазме млекопитающих.

Одно из воплощений настоящего изобретения относится к соединению гормона роста, содержащему одну или более чем одну дополнительную дисульфидную связь(и), 20 которое стабилизировано против разрушения под действием протеаз(ы), таких как пищеварительные протеазы, как, например, пепсин, трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза и/или эластазы.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста обладает повышенной стабильностью к протеолитическому разрушению под действием трипсина, химотрипсина и/или эластазы.

25 В одном из воплощений соединение гормона роста стабилизировано против разрушения под действием химотрипсина и/или эластазы.

В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих H21/M170, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, 30 S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или S85C/S144C в SEQ ID No. 1.

В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих H21/M170, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C и/или S85C/Y143C в SEQ ID No. 1.

35 В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих D26/V102C, D26/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в SEQ ID No. 1.

В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну 40 пару мутаций, соответствующих I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в SEQ ID No. 1.

В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или S85C/S144C в SEQ ID No. 1.

45 В одном из воплощений соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих Q84C/Y143C и/или S85C/Y143CB SEQ ID No. 1.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста имеет увеличенный полупериод существования *in vivo*.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста имеет увеличенный срок хранения.

В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста может представлять собой слитый белок.

5 Одно из воплощений настоящего изобретения относится к соединению гормона роста, полипептидная последовательность которого по меньшей мере на 80%, как например на 90%, или как например на 95% идентична hGH, определенному посредством SEQ ID No. 1. В следующих воплощениях полипептид на 96%, 97%, 98% или 99% идентичен hGH, определенному посредством SEQ ID No.1.

10 В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 20%, как например по меньшей мере на 30%, например по меньшей мере на 40%, как например по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 60%, как например по меньшей мере на 70%, например по меньшей мере на 15 80%, как например по меньшей мере на 90%, идентичную, например по меньшей мере на 95%, как например по меньшей мере на 96%, например по меньшей мере на 97%, как например по меньшей мере на 98%, например по меньшей мере на 99% с SEQ ID No. 1, и при этом данный полипептид обладает активностью, измеренной в анализе, описанном в Примере 3 и Примере 3А (гипофизэктомированные крысы), составляющей по меньшей мере 1%, как например по меньшей мере 5%, например по меньшей мере 20 10%, как например по меньшей мере 25% от активности hGH. Во избежание неясности следует отметить, что соединение гормона роста по изобретению также может обладать более высокой активностью в этих анализах, чем hGH. Если соединение гормона роста некоторым образом модифицировано, то активность гормона роста по отношению к 25 hGH следует измерять на немодифицированном соединении гормона роста, поскольку такая модификация может существенно менять активность. Например, в случае соединения гормона роста, модифицированного с использованием модифицирующей его свойства группы, которая пролонгирует полупериод функционального существования *in vivo* соединения гормона роста, активность такого модифицированного 30 соединения гормона роста может быть много ниже активности hGH, причем это уменьшение компенсируется пролонгированным временем удержания в организме. В одном из воплощений соединение гормона роста представляет собой фрагмент такого полипептида, и в этом фрагменте сохранено значительное количество активности гормона роста, как описано выше.

35 В одном из воплощений настоящего изобретения соединение гормона роста представляет собой укороченный вариант hGH, то есть один или более аминокислотных остатков с N- и/или C-концов соответствующей SEQ No. 1 делегированы при сохранении указанным соединением желаемых биологических свойств hGH дикого типа.

Одно из воплощений настоящего изобретения относится к соединению гормона 40 роста, содержащему дополнительные дисульфидные связи в SEQ ID No. 1 или содержащему одну или более чем одну дополнительную дисульфидную связь(и) по сравнению с человеческим гормоном роста, который определен в SEQ ID No. 1, при этом указанное соединение обладает активностью *in vitro*, сравнимой с активностью *in vitro* hGH, определенного посредством SEQ ID No. 1. Активность *in vitro* соединений 45 гормона роста предпочтительно измеряют в BAF-анализе, который изложен в данном описании в Примере 3. В одном из воплощений соединение по изобретению может иметь активность *in vitro*, отличающуюся от активности *in vitro* hGH. Как описано выше, более низкая активность *in vitro* может быть скомпенсирована другими

функциональными свойствами *in vivo*. В одном из воплощений активность *in vitro* может составлять, например, по меньшей мере 1%, как например по меньшей мере 5%, например по меньшей мере 10%, как например по меньшей мере 25% от активности hGH. В следующем воплощении отношение EC<sub>50</sub> для соединения к EC<sub>50</sub> для hGH дикого типа, определенного посредством SEQ ID No. 1, составляет не более 10, не более 8, не более 6, не более 4, не более 2. В одном из воплощений отношение EC<sub>50</sub> для указанного соединения к EC<sub>50</sub> для hGH дикого типа, определенного посредством SEQ ID No. 1, составляет 5-0,01 или, например, 3-0,01, или составляет, например, 2-0,01. В 5 альтернативном случае EC<sub>50</sub> в соответствии с данным изобретением может быть измерена в анализе с использованием поверхностного плазменного резонанса (Biacore), как описано в Примере 4. В соответствующих воплощениях активность *in vitro*, определенная с помощью Biacore, может составлять, например, по меньшей мере 1%, как например по меньшей мере 5%, например по меньшей мере 10%, как например по 10 меньшей мере 25% от активности hGH. В следующих воплощениях отношение EC<sub>50</sub> для 15 соединения к EC<sub>50</sub> для hGH дикого типа, определенного посредством SEQ ID No. 1, определенное с помощью Biacore, составляет не более 10, не более 8, не более 6, не более 4, не более 2. В одном из воплощений отношение EC<sub>50</sub> для указанного соединения 20 к EC<sub>50</sub> для hGH дикого типа, определенного посредством SEQ ID No. 1, составляет 5-0,01, или, например, 3-0,01, или, например, 2-0,01.

Другие примеры соединений GH, в которые могут быть введены дополнительные дисульфидные мостики, включают соединения, описаные в WO 92/09690 (Genentech), US 6004931 (Genentech), US 6143523 (Genentech), US 613636 (Genentech), US 6057292 (Genentech), US 5849535 (Genentech), WO 97/11178 (Genentech), WO 90/04788 (Genentech), 25 WO 02/055532 (Maxygen APS и Maxygen Holdings), US 5951972 (American Cyanamid Corporation), US 2003/0162949 (Bolder Biotechnologies, Inc.), которые включены в данное описание посредством ссылки. Также включены природные варианты hGH, как например вариант с молекулярной массой 20 кДа, описанный в Masuda, N. et all., *Biochim. Biophys. Acta* 949 (1), 125-131 (1988).

Во всех воплощениях, изложенных в данном описании, также существует возможность того, что соединение гормона роста имеет остаток Gly в положении, соответствующем положению 120 в SEQ ID No. 1.

В контексте настоящего изобретения слова "человеческий гормон роста (hGH)", "hGH wt" и "hGH дикого типа (wtGH)" используются взаимозаменяющими и все относятся к белку с аминокислотной последовательностью SEQ ID No. 1.

В контексте настоящего изобретения термины "пептид" и "полипептид" используются взаимозаменяющими и предназначены для обозначения одного и того же. Подразумевается, что термины "пептид" или "полипептид" обозначают последовательность из двух или 40 более аминокислот, соединенных пептидными связями, при этом указанные аминокислоты могут быть природными или неприродными. Входящие в состав аминокислоты могут быть из группы аминокислот, кодируемых генетическим кодом, и они могут быть природными аминокислотами, которые не кодируются генетическим кодом, а также синтетическими аминокислотами. Природными аминокислотами, 45 которые не кодируются генетическим кодом, являются, например, Нур (гидроксипролин), Y-карбоксиглутамат, Orn (орнитин), фосфосерин, D-аланин и D-глутамин. Синтетические аминокислоты включают аминокислоты, полученные химическим синтезом, такие как D-изомеры аминокислот, кодируемых генетическим кодом, как например D-аланин и

Д-лейцин, Aad ( $\alpha$ -аминоадипиновая кислота), Aib ( $\alpha$ -аминоизомасляная кислота), Abu ( $\alpha$ -аминомасляная кислота), Agl ( $\alpha$ -аминоглицин), Asu ( $\alpha$ -аминосубериновая кислота), Cha ( $\beta$ -цикlopентилаланин), Chg (циклогексилглицин), Dab ( $\alpha, \gamma$ -диаминомасляная кислота), Dap ( $\alpha, \beta$ -диаминопропановая кислота), Hcy (гомоцистеин), Hpr (гомопролин),  
 5 Nle (норлейцин), Phg (фенилглицин), Hph (гомофенилаланин), 1Nal ( $\beta$ -(1-нафтил-аланин)), 2Nal ( $\beta$ -(2-нафтил-аланин)), 2Pal ( $\beta$ -(2-пиридинил)-аланин), 3Pal ( $\beta$ -(3-пиридинил)-аланин),  
 10 Pip (4-аминопиридин-4-карбоновая кислота), Pra (пропаргил-глицин), Pug (пироглутаминовая кислота), Gla ( $\gamma$ -карбоксиглутаминовая кислота), Hci (гомоцитрулин), Nva (норвалин), Tle (трет-бутил глицин),  $\beta$ -аланин, 3-аминометил-бензойная кислота и  
 ортоаминобензойная кислота.

Данный термин также охватывает термин "белки", которые могут состоять из одной полипептидной цепи либо двух или более полипептидных цепей, удерживаемых вместе посредством нековалентных или ковалентных взаимодействий, таких как, например, цистеиновые мостики.

15 Следует понимать, что данный термин также предназначен для включения пептидов, на основании которых получены производные, например путем присоединения таких группировок, как ПЭГ, углеводы, жирные кислоты, альбумин-связывающие вещества, алкильные цепи, липофильные группы, витамины, желчные кислоты, но этим не ограничиваясь; или спейсеров к боковой цепи или основной цепи пептида в дополнение

20 к имеющимся дополнительным дисульфидным связям. Термин "пептид" включает в себя любой подходящий пептид и может быть использован в качестве синонима терминам "полипептид" и "белок", если не указано иное или нет противоречий по контексту, при условии, что читателю известно, что каждый тип соответствующей молекулы, содержащей аминокислотный полимер, может быть ассоциирован с

25 существенными различиями и тем самым образовывать индивидуальные воплощения настоящего изобретения (например, такой пептид, как антитело, который состоит из нескольких полипептидных цепей, существенно отличается, например, от одноцепочечного антитела, пептидного иммуноадгезина или одноцепочечного иммуногенного пептида). Поэтому используемый в данном описании термин "пептид"

30 в общем случае следует понимать как ссылку на любой подходящий пептид любого подходящего размера и состава (касательно количества аминокислот и количества связанных цепей в молекуле белка). Более того, пептиды, изложенные в данном описании, могут содержать неприродные и/или не являющиеся L-аминокислотными остатки, если не указано иное или нет противоречий по контексту.

35 Термин "пептид", если не указано иное или нет противоречий по контексту (и если рассматривается как индивидуальные воплощения термина(ов) "полипептид" и/или "белок"), также охватывает производные пептидной молекулы. Производное пептидной молекулы представляет собой пептид, в котором один или более аминокислотных остатков данного пептида химически модифицированы (например, путем алкилирования,

40 ацилирования, образования сложного эфира или образования амида) или связаны с одним или более чем одним не являющимся аминокислотой органическим и/или неорганическим атомарным или молекулярным заместителем (например, группой полиэтиленгликоля (ПЭГ), липофильным заместителем (который, возможно, может быть связан с аминокислотной последовательностью пептида через остаток или группу

45 спейсера, такого как  $\beta$ -аланин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота (GABA), L/D-глутаминовая кислота, янтарная кислота и тому подобное), флуорофором, биотином, радионуклидом и т.д.), и который (пептид) может также или альтернативно содержать несущественные, неприродные и/или не являющиеся L-аминокислотными остатки, если не указано иное

или нет противоречий по контексту (однако вновь следует признать, что такие производные сами по себе могут рассматриваться как независимые признаки настоящего изобретения, и включение таких молекул в понятие пептида скорее делается из соображений удобства при описании настоящего изобретения, чем для того, чтобы 5 подразумевать какую-либо эквивалентность между неизмененными пептидами и такими производными).

Неограничивающие примеры таких аминокислотных остатков включают, например, остатки 2-аминоадипиновой кислоты, 3-аминоадипиновой кислоты,  $\beta$ -аланина,  $\beta$ -аминопропионовой кислоты, 2-аминомасляной кислоты, 4-аминомасляной кислоты, 10 6-аминокапроновой кислоты, 2-аминогептановой кислоты, 2-аминоизомасляной кислоты, 3-аминоизомасляной кислоты, 2-аминопимелиновой кислоты, 2,4-диаминомасляной кислоты, десмозина, 2,2'-диаминопимелиновой кислоты, 2,3-диаминопропионовой кислоты, N-этилглицина, N-этиласпарагина, гидроксилизина, аллогидроксилизина, 3-гидроксипролина, 4-гидроксипролина, изодесмозина, 15 аллоизолейцина, N-метилглицина, N-метилизолейцина, 6-N-метиллизина, N-метилвалина, норвалина, норлейцина, орнитина, пропаргилглицина и галогенированных аминокислот статинов.

"Соединение", описанное в настоящем изобретении, может представлять собой "белок", или "пептид", или "полипептид", который может представлять собой "аналог", 20 или "производное", или "вариант", сохраняющие желаемые биологические активности, аналогичные таковым у wthGH, независимо от того, каким образом оно было модифицировано.

Термин "аналог" или "вариант", как он использован в данном описании, относящийся к полипептиду, означает модифицированный вариант указанного пептида, где один 25 или более аминокислотных остатков пептида заменены на другие аминокислотные остатки, и/или где один или более аминокислотных остатков делегированы из пептида, и/или где один или более аминокислотных остатков добавлены к пептиду. Такая замена, или вставка, или делеция аминокислотных остатков может происходить на N-конце пептида, и/или на C-конце пептида, и/или между N- или C-концами пептида. Следует 30 понимать, что все аминокислоты, для которых не указан оптический изомер, представляют собой L-изомер.

Термины "дисульфидная связь" или "дисульфидный мостик" используются взаимозаменяемо и предназначены для обозначения одного и того же. "Дисульфидная связь" или "дисульфидный мостик" в белках образуется между тиольными группами 35 остатков цистеина.

Термины "дополнительный цистеин" или "введенный цистеин" используются взаимозаменяемо и предназначены для обозначения одного и того же. Подразумевается, что эти термины включают в себя остаток цистеина, не присутствующий в hGH дикого типа. Чтобы свести к минимуму структурные изменения, остаток(ки) цистеина обычно 40 вводят путем замены аминокислотного остатка(ов), тем самым длина hGH сохраняется. Вставку дополнительного остатка Cys можно допустить в участках петель или в приграничных спиралей участках, тогда как введение остатков Cys в пределах спиралей является менее привлекательным.

Термины "дополнительная дисульфидная связь" или "введенная дисульфидная связь" 45 используются взаимозаменяемо и предназначены для обозначения одного и того же. Подразумевается, что эти термины включают в себя дисульфидные связи, образованные между двумя остатками цистеина, по меньшей мере один из которых не присутствует в hGH дикого типа.

5 Термин "производное", как он использован в данном описании, относится к пептиду или полипептиду, в котором один или более аминокислотных остатков данного пептида химически модифицированы путем введения полимера, такого как ПЭГ, углеводных группировок, альбумин-связывающих веществ, жирных кислот, липофильных групп, витаминов, желчных кислот или спейсеров в боковые цепи или основную цепь соединения гормона роста. Химические модификации также могут носить временный характер, то есть они легко могут быть удалены *in vivo*. Химические модификации могут быть введены посттрансляционно, например самой клеткой, или могут представлять собой химические модификации, осуществляемые в пептиде после экспрессии.

10 10 Термин "идентичность", который известен в данной области техники, относится к взаимосвязи между последовательностями двух или более пептидов, которая определяется путем сравнения этих последовательностей. В данной области "идентичность" также обозначает степень сходства последовательностей пептидов, которая определяется количеством сходных пар в цепях, состоящих из двух или более 15 аминокислотных остатков. "Идентичность" является мерой процента идентичных пар для двух или более последовательностей с использованием выравнивания с учетом разрывов (если таковые имеются) и с обращением к конкретной математической модели или компьютерной программе (т.е. "алгоритмам"). Идентичность родственных пептидов можно легко рассчитать известными методами. Такие методы включают, но этим не 20 ограничиваются, методы, описанные в Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M. and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, 25 M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; и Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

Предпочтительные методы определения идентичности разработаны таким образом, чтобы привести к наибольшему совпадению между тестируемыми 30 последовательностями. Методы определения идентичности описаны в компьютерных программах, находящихся в открытом доступе. Предпочтительные методы с использованием компьютерных программ для определения идентичности между двумя последовательностями включают пакет программ GCG, в том числе GAP (Devereux et al., Nucl. Acid Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group (GCG), University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). 35 Программа BLASTX находится в открытом доступе в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI) и других источниках (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul и соавт., выше). Для определения идентичности также можно использовать хорошо известный алгоритм Smith Waterman.

Например, используя компьютерный алгоритм GAP (Genetics Computer Group, 40 University of Wisconsin, Madison, Wis.), два пептида, для которых должен быть определен процент идентичности последовательностей, выравнивают с целью получения оптимального совпадения соответствующих аминокислот ("сходного участка", который определяется этим алгоритмом). Вместе с данным алгоритмом используют "штраф за разрыв" (который рассчитывают в виде умноженной на 3 средней диагонали; "средняя 45 диагональ" представляет собой среднюю величину диагонали используемой матрицы сравнения; "диагональ" представляет собой балл или количественный показатель, назначаемый за каждое полное совпадение аминокислот в соответствии с конкретной матрицей сравнения) и штраф за длину разрыва (который обычно представляет собой

1/10 долю от штрафа за разрыв), а также матрицу сравнения, такую как PAM (protein weight matrix) 250 или BLOSUM 62. Стандартная матрица сравнения (см. Dayhoff et al., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5, (1978) для матрицы сравнения PAM 250; Henikoff et al., *PNAS USA* 89, 10915-10919 (1992) для матрицы сравнения BLOSUM 62) также

5 используется данным алгоритмом.

Предпочтительные параметры для сравнения пептидных последовательностей включают следующие:

- алгоритм: Needleman et al., *J. Mol. Biol.* 48, 443-453 (1970);
- матрица сравнения: BLOSUM 62 из Henikoff et al., *PNAS USA* 89, 10915-10919 (1992);
- 10 - штраф за разрыв: 12;
- штраф за длину разрыва: 4;
- порог схожести.

Программа GAP полезна при работе с приведенными выше параметрами.

Вышеупомянутые параметры являются параметрами по умолчанию для сравнений 15 пептидов (наряду с отсутствием штрафа за конечные разрывы) с использованием алгоритма GAP.

Считается, что термины "протеаза или протеазы" включают в себя все ферменты, обладающие способностью катализировать гидролитическое расщепление пептидной связи. Протеазы могут быть внутриклеточными, внеклеточными или

20 мембранные связанные протеазами, протеиназами или пептидазами и включают протеазы, находящиеся в просвете кишечника млекопитающих, и протеазы, присутствующие в плазме млекопитающих. Протеазы могут представлять собой протеазы двух типов: эндопротеазы и экзопротеазы. Протеазы могут представлять собой протеазы следующих типов: сериновые, цистеиновые, аспартатные или металлопротеазы, но этим не 25 ограничиваться. Конкретными примерами протеаз являются трипсин, химотрипсин, пепсин, эластаза, фактор VIIa, фактор Xa, протеиназа K, карбоксипептидаза, DPPIV (дипептидилпептидаза-IV), нейтральная эндопептидаза, гранзим B, пролин-эндопептидаза, стафилококковая пептидаза I, термолизин, тромбин, Arg-C-протеиназа, Asp-N-эндопептидаза, каспаза 1-10, кластрипин, энтерокиназа, глутамилэндопептидаза, 30 гранзим B, LysC, LysN, пролин-эндопептидаза и стафилококковая пептидаза I.

Термины "устойчивый к протеолитическому разрушению", или "повышенная стабильность к протеолитическому разрушению", или "повышенная стабильность к протеолитическому расщеплению", или "улучшенная протеолитическая стабильность", или "протеолитическая стабильность" используются взаимозаменяющими и предназначены 35 для обозначения одного и того же. В применении к соединению hGH по изобретению подразумевается, что данные термины обозначают то, что полипептидная цепь указанного соединения hGH расщепляется под действием протеаз в конкретных условиях с более низкой скоростью, чем hGH дикого типа.

Скорость протеолитического расщепления белка можно измерить несколькими 40 методами, известными специалисту в данной области техники. Пример анализа, в котором измеряют скорость разрушения hGH или соединения hGH, описан в Примере 5.

Изобретение также относится к способам, полезным для улучшения 45 фармакологических свойств соединений hGH. Эти фармакологические свойства могут представлять собой, например, увеличение полупериода функционального существования *in vivo*, полупериод существования в плазме крови *in vivo*, среднего времени удержания в организме, уменьшение почечного клиренса.

Термин "полупериод функционального существования *in vivo*" используется в своем

обычном значении, т.е. это время, при котором сохраняется 50% биологической активности пептида, например соединения гормона роста, при этом соединение гормона роста еще присутствует в организме/органе-мишени, или время, при котором активность пептида, например соединения гормона роста, составляет 50% от своей исходной

5 величины. В качестве альтернативы определению полупериода функционального существования *in vivo* можно определить "полупериод существования в плазме крови *in vivo*" и продолжительность действия, т.е. время, при котором в кровотоке циркулирует 50% пептида перед тем, как будет выведен. Зачастую проще выполнить определение полупериода существования в плазме крови, чем полупериода функционального существования, и обычно величина полупериода существования в плазме крови является 10 хорошим показателем величины полупериода функционального существования *in vivo*.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим соединения гормона роста, которые определены или изложены в данном описании.

15 В одном из воплощений фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в различных лекарственных формах, например, в виде растворов, суспензий, эмульсий, микроэмульсий, множественных эмульсий, пенок, бальзамов, паст, гипсов, мазей, таблеток, таблеток с покрытием, таблеток, изготовленных вместе с усиливающими всасывание соединениями, средств для полоскания, капсул, например 20 твердых желатиновых капсул и мягких желатиновых капсул, капсул с покрытием, суппозиториев, капель, гелей, спреев, порошка, микрочастиц, наночастиц, аэрозолей, средств для ингаляции, раствора для инъекций, растворов для превращений *in situ*, например гелеобразования *in situ*, отвердевания *in situ*, осаждения *in situ*, кристаллизации *in situ*, раствора для инфузии и имплантатов.

25 В одном из воплощений настоящего изобретения фармацевтические композиции могут быть введены посредством перорального, подкожного, внутримышечного, назального и в/в (внутривенного) введения.

30 В одном из воплощений настоящего изобретения пероральные фармацевтические композиции могут быть введены несколькими путями введения, например лингвальным, сублингвальным, трансбуккальным, в ротовую полость, в желудок и кишечник.

35 В одном из воплощений фармацевтические композиции по настоящему изобретению полезны в изготовлении твердых веществ, полутвердых веществ, порошка и растворов для введения пептидного конъюгата в легкие, такого как, например, конъюгат на основе GH, с использованием, например, дозирующего ингалятора, сухого порошкового ингалятора и небулайзера, причем все эти устройства хорошо известны специалистам в данной области техники.

40 Кроме того, в одном из воплощений фармацевтическая композиция по изобретению может быть смешана с носителем лекарственного средства, системой доставки лекарственных средств и усовершенствованной системой доставки лекарственных средств или присоединена к ним, например, посредством ковалентных, гидрофобных и электростатических взаимодействий, с целью дальнейшего повышения стабильности конъюгата на основе GH, повышения биодоступности, увеличения растворимости, ослабления неблагоприятных эффектов, достижения хронотерапии, хорошо известной специалистам в данной области, и улучшения соблюдения больным режима и схемы 45 лечения или любой их комбинации. Примеры носителей, систем доставки лекарственных средств и усовершенствованных систем доставки лекарственных средств включают, но этим не ограничиваются, полимеры, например целлюлозу и производные, полисахариды, например декстран и производные, крахмал и производные, поли

(виниловый спирт), акрилатные и метакрилатные полимеры, полимолочную и полигликолевую кислоту и их блок-сополимеры, полиэтиленгликоли, белки-носители, например альбумин, гели, например термогелеобразующие системы, например блок-сополимерные системы, хорошо известные специалистам в данной области, мицеллы, 5 липосомы, микросфера, наночастицы, жидкие кристаллы и их дисперсии, кристаллы фазы L2 и их дисперсии, хорошо известные специалистам в области фазового поведения в системах липид-вода, полимерные мицеллы, множественные эмульсии, самоэмульгирующие агенты, самомикроэмульгирующие агенты, циклодекстрины и их производные и дендримеры.

- 10 Различные примеры систем доставки для пероральной композиции, включенной в данное описание посредством ссылки, включают неионные поверхностно-активные вещества, которые, как известно, увеличивают проникновение гидрофильных соединений. Примерами неионных поверхностно-активных веществ являются: каприновокислый натрий, винная кислота, Br<sup>ij</sup>56, Br<sup>ij</sup>58, Br<sup>ij</sup>35, Br<sup>ij</sup>30, эфиры сахаров 15 и жирных кислот, тауродезоксихолат натрия, додецилсульфат натрия, п-трет-октилфенол-полиоксиэтилен-9.5 (Тритон X-100), как описано в Takatsuka et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 62, 52-58 (2006). Пероральная система доставки также может включать в себя ингибиторы протеаз и муколитические вещества. Примерами ингибиторов протеаз являются соевый ингибитор трипсина, апратинин и химостатин. Примерами 20 муколитических веществ являются дитиотрейт и N-ацетилцистеин. Усиление всасывания в кишечнике слабоабсорбируемых гидрофильных соединений обеспечивается одновременным применением муколитического агента и неионного поверхностно-активного вещества. Кроме того, Emisphere разработала 5-CNAC и аналогичные соединения (WO2008101240, WO200811283687, WO2008027854, WO2008014430, 25 US20080095837).

Системы доставки пероральных композиций также могут включать модуляторы клаудинов, которые функционируют в качестве специфических веществ, открывающих плотные контакты эпителиальных клеток. Эти модуляторы клаудинов функционируют как время от времени, так и постоянно и служат препятствием для белковых комплексов, 30 которые удерживают эпителиальные клетки в плотных контактах (Kondoh et al., Mol. Pharmacology, 67, 749-756 (2005)). Другие примеры системы доставки пероральной композиции включают мукоадгезивные агенты, например, тиолсодержащие вспомогательные вещества (совместно входящие в состав композиции) или ковалентно присоединенные боковые цепи могут повысить адгезию к слизистой оболочке, хитозан 35 и молекулы карбомера, полиакрилаты, ПЭГ и его производные (Palmerger et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 66, 405-412 (2007); Leitner, V.M. et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 56, 207-214 (2003); H.L Leußen et al., Pharm. Res. 13, 1668-1672 (1996); H.L. Leußen et al., Int. J. Pharmaceuticals 141, 39-52 (1996); Takatsuka et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 62, 52-58 (2006)). Дополнительные примеры систем доставки пероральной композиции включают кавеолы/ 40 липидные рафты, SMVT (натрий-зависимый транспортер для мультивитаминов). Другие примеры композиций для пероральной доставки включают рецептор-опосредованный трансцитоз, например с участием IRF (рецептора внутреннего фактора), использующего витамин B12 (кобаламин) в качестве субстрата, FcRn (неонатального Fc-рецептора) и трансферрина (M. Gumbleton, Adv. Drug Del. Rev. 49, 281-300 (2001); K.C. Partlow et al., 45 Biomaterials 29, 3367-3375 (2008); Lee et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 46, 211-217 (2007); S.Y. Chae et al., Bioconjugate Chem. 19, 334-341 (2008); Russell-Jones G.: Chapter 17 in Membrane Transporters as Drug Targets (1999); Said and Mohammed, Curr. Opin. Gastroent. 22, 140-146 (2006); Chalasani et al., J. Con. Release 117, 421-429 (2007); H. Li & Z.M. Qian Med.

Res. Rev. 22, 225-250 (2002); Liang & Yang Biochem. Biophys. Res. Comm. 225, 734-738 (2005)).

- В одном из воплощений соединения GH по настоящему изобретению проявляют активность гормона роста и могут быть использованы для лечения заболеваний или состояний, при которых будет полезно увеличение количества циркулирующего в крови гормона роста. Такие заболевания или состояния включают дефицит гормона роста (GHD); синдром Тернера; синдром Прадера-Вилли (PWS); синдром Нунан; синдром Дауна; хроническую почечную недостаточность, ювенильный ревматоидный артрит; кистозный фиброз, ВИЧ-инфекцию у детей, получающих лечение по программе HAART (высокоактивной антиретровирусной терапии (high active anti-retrovirus therapy) (детей с диагнозом HIV/HALS); небольших (по размеру) детей, рожденных малыми для гестационного срока (SGA); низкорослость у детей, рожденных с очень низкой массой (VLBW), но SGA; дисплазию скелета; гипохондроплазию; ахондроплазию; идиопатическую низкорослость (ISS); GHD у взрослых; переломы в трубчатых костях или трубчатых костях, таких как большеберцовая кость, малоберцовая кость, бедренная кость, плечевая кость, лучевая кость, локтевая кость, ключица, пястная кость, плюсневая кость и кости пальцев ног; переломы в губчатых костях или губчатых костях, таких как череп, основание кисти и основание стопы; пациентов после операции на сухожилиях или связках, например кисти, колена или плеча; пациентов, имеющих или испытывающих дистракционный остеогенез; пациентов после замены тазобедренного сустава или (суставного) диска, восстановления мениска, сращений позвонков или фиксации протезов, например на колене, тазобедренном суставе, плече, локте, запястье или челюсти; пациентов с зафиксированным в них материалом для остеосинтеза, таким как штифты, винты и пластинки; пациентов с несрастанием или неправильным срастанием переломов; пациентов после остеотомии, например большеберцовой кости или 1-го пальца ноги; пациентов после пересадки трансплантата; дегенерацию суставного хряща в колене, вызванную травмой или артритом; остеопороз у пациентов с синдромом Тернера; остеопороз у мужчин; взрослых пациентов, находящихся на постоянном диализе (APCD); ассоциированное с недоеданием сердечно-сосудистое заболевание на фоне APCD; реверсирование кахексии на фоне APCD; рак на фоне APCD; хроническую обструктивную болезнь легких на фоне APCD; ВИЧ на фоне APCD; пожилой возраст у APCD; хроническую болезнь печени на фоне APCD, синдром усталости на фоне APCD; болезнь Крона; ослабление функции печени; особей мужского пола с ВИЧ-инфекцией; синдром укороченной тонкой кишки; центральное ожирение; синдром ВИЧ-ассоциированной липодистрофии (HALS); мужское бесплодие; пациентов после главной плановой операции, алкогольной/лекарственной детоксикации или неврологической травмы; старение; ослабленных пожилых людей; остеоартрит; травматическое повреждение хряща; эректильную дисфункцию; фибромиалгию; расстройства памяти; депрессию; травматическое поражение головного мозга; субарахноидальное кровоизлияние; очень низкую массу при рождении; метаболический синдром; глюкокортикоидную миопатию; или низкорослость вследствие лечения глюкокортикоидами в детском возрасте. Гормоны роста также применяют для ускорения заживления мышечной ткани, нервной ткани или ран; ускорения или улучшения тока крови к поврежденной ткани; или уменьшения степени инфицирования в поврежденной ткани.

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к способу лечения заболеваний, где активность соединения гормона роста может быть использована для лечения заболеваний или состояний, при которых будет полезно увеличение количества

циркулирующего в крови соединения гормона роста, причем указанный способ включает введение пациенту эффективного количества фармацевтической композиции соединения гормона роста или его коньюгата с SEQ ID No.1.

В одном из воплощений настоящее изобретение относится к способу, включающему

5 введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества терапевтически эффективного количества соединения гормона роста по изобретению. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен способ лечения этих заболеваний или состояний, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения гормона роста по настоящему изобретению.

10 Термин "терапевтически эффективное количество" соединения по изобретению, как он использован в данном описании, обозначает количество, достаточное для излечения, ослабления или частичного подавления клинических проявлений определенного заболевания и его осложнений. Количество, достаточное для этого осуществления, определяется как "терапевтически эффективное количество". Эффективные количества 15 для каждой задачи будут зависеть, например, от тяжести заболевания или поражения, а также массы, пола, возраста и общего состояния здоровья субъекта. Очевидно, что определение соответствующей дозировки может быть достигнуто с использованием рутинного экспериментирования, все это находится в компетенции дипломированного врача или ветеринара.

20 В одном из воплощений изобретения предложено применение соединения гормона роста или его коньюгата в изготовлении лекарственного средства, используемого в лечении вышеупомянутого заболевания или состояния.

25 Предполагается, что соединения гормона роста, которые определены и изложены в описании настоящего изобретения, будут использованы в качестве терапевтического белка.

Способы получения полипептидов хорошо известны в данной области техники. Например, полипептиды можно получить классическим пептидным синтезом, например твердофазным пептидным синтезом, используя химию с применением трет-Вос (трет-бутилоксикарбонила) или Fmoc (флуоренилметокси-карбонила), или другими 30 общепризнанными методами, см., например, Greene and Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 2006.

35 Полипептиды также могут быть получены способом, который включает культивирование клетки хозяина, содержащей последовательность ДНК, кодирующую данный полипептид, и способной экспрессировать полипептид в подходящей питательной среде в условиях, допускающих экспрессию пептида. Что касается полипептидов, содержащих неприродные аминокислотные остатки, то рекомбинантная клетка должна быть модифицирована таким образом, чтобы неприродные аминокислоты оказывались включенными в полипептид, например, путем использования мутантов тРНК.

40 Кроме того, полипептиды могут быть получены с использованием бесклеточных систем транскрипции/трансляции *in vitro*. Полипептид, содержащий новые неприродные аминокислоты, также может быть получен с использованием систем супрессии мутаций сдвига рамки считывания и нонсенс-мутаций, например, как описано в J. Am. Chem. Soc. 125, 11782-11783 (2003); Science 301, 964-967 (2003); Science 292, 498-500 (2001); 45 Science 303, 371-373 (2004) и приведенных там ссылках.

Среда, используемая для культивирования клеток, может представлять собой любую традиционную среду, подходящую для выращивания клеток хозяина, как например, минимальные или комплексные среды, содержащие соответствующие добавки.

Подходящие среды доступны от коммерческих поставщиков или могут быть приготовлены согласно опубликованным прописям (например, в каталогах Американской коллекции типовых культур). Пептид, продуцируемый клетками, затем может быть извлечен из культуральной среды с использованием традиционных методик, включая отделение клеток хозяина от среды центрифугированием или фильтрацией. Что касается внеклеточных продуктов, то белковые компоненты супернатанта выделяют фильтрацией, колоночной хроматографией или осаждением, например микрофильтрацией, ультрафильтрацией, изоэлектрическим осаждением, очисткой с использованием разнообразных хроматографических процедур, например ионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия, гельфильтрационной хроматографии, аффинной хроматографии или тому подобного, в зависимости от типа рассматриваемого полипептида. В случае внутриклеточных или периплазматических продуктов клетки, выделенные из культуральной среды, подвергают разрушению или пермеабилизации и экстракции для извлечения продукта - полипептида или его предшественника.

Последовательность ДНК, кодирующая полипептид, по происхождению может быть соответственно геномной или кДНК, например, полученной в результате приготовления библиотеки геномной или кДНК и скрининга на предмет последовательностей ДНК, кодирующих пептид целиком или его часть, посредством гибридизации с использованием специфических зондов ДНК или РНК в соответствии со стандартными методиками (см., например, Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989). Последовательность ДНК, кодирующая данный полипептид, также может быть получена путем синтеза с использованием общепризнанных стандартных методов, например фосфорамидитного метода, описанного в Beauchage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1859-1869 (1981), или метода, описанного в Matthes et al., EMBO Journal, 3, 801-805 (1984). Последовательность ДНК также можно получить с использованием полимеразной цепной реакции, применяя специфические праймеры, например, как описано в US 4683202 или Saiki et al., Science 239, 487-491 (1988).

Последовательность ДНК, кодирующая пептид, подлежащий экспрессии, может быть встроена в любой вектор, который удобно можно подвергнуть процедурам рекомбинантной ДНК, и выбор вектора зачастую будет зависеть от клетки хозяина, в которую его предполагается ввести. Так, вектор может быть автономно реплицирующимся вектором, то есть вектором, который существует в виде внхромосомной структурной единицы, репликация которой не зависит от хромосомной репликации, например, в виде плазиды. Альтернативно, вектор может быть таким, что при введении в клетку хозяина интегрируется в геном клетки хозяина и реплицируется совместно с хромосомой(ами), в которую(ые) он интегрирован.

Вектор может представлять собой экспрессирующую вектор, в котором последовательность ДНК, кодирующая полипептид, функциональным образом связана с дополнительными сегментами, необходимыми для транскрипции ДНК, такими как промотор. Промотором может быть любая последовательность ДНК, которая демонстрирует транскрипционную активность в выбранной клетке хозяина и может происходить из генов, кодирующих белки либо гомологичные, либо гетерологичные белкам клетки хозяина. Примеры подходящих промоторов для направления транскрипции ДНК, кодирующей пептид, который необходимо экспрессировать в ряде клеток хозяина, хорошо известны в данной области, для сравнения см., например, Sambrook и соавт., выше.

Последовательность ДНК, кодирующая пептид, подлежащий экспрессии, при необходимости также может быть функциональным образом соединена с подходящим терминатором, сигналами полиаденилирования, транскрипционными энхансерными последовательностями и трансляционными энхансерными последовательностями.

5 Рекомбинантный вектор по изобретению дополнительно может содержать последовательность ДНК, позволяющую вектор реплицироваться в рассматриваемой клетке хозяина.

Вектор также может содержать селектируемый маркер, например генный продукт, который дополняет до нормы дефект в клетке хозяина или который придает

10 устойчивость к лекарственному средству, например ампициллину, канамицину, тетрациклину, хлорамфениколу, неомицину, гигромицину или метотрексату. В случае крупносерийного производства селектируемый маркер, например, может не обладать устойчивостью к антибиотикам, например гены устойчивости к антибиотикам в векторе могут быть удалены, когда вектор используется для крупносерийного производства.

15 Методы элиминирования генов устойчивости к антибиотикам из векторов известны в данной области, см., например, US 6358705, который включен в данное описание посредством ссылки.

Чтобы направить экспрессию пептида по секреторному пути клеток хозяина, в рекомбинантном векторе может быть предусмотрена секреторная сигнальная

20 последовательность (также известная как лидерная последовательность, препро-последовательность или пре-последовательность). Секреторную сигнальную последовательность присоединяют к последовательности ДНК, кодирующей пептид, в корректной рамке считывания. Секреторная сигнальная последовательности обычно располагается в 5'-положении по отношению к последовательности ДНК, кодирующей 25 пептид. Секреторная сигнальная последовательность может представлять собой последовательность, в норме ассоциированную с пептидом, или может быть последовательностью из гена, кодирующего другой секрецируемый белок.

Процедуры, используемые для лигирования последовательностей ДНК, кодирующих пептид, подлежащий экспрессии, промотор и/или секреторную 30 сигнальную последовательность, соответственно, и процедуры для введения их в подходящие векторы, содержащие информацию, необходимую для репликации, хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Sambrook и соавт., выше).

Клетка-хозяин, в которую вводят последовательность ДНК или рекомбинантный вектор, может быть любой клеткой, способной продуцировать данный пептид, и 35 включает бактерии, дрожжи, грибы и клетки высших эукариот. Примерами подходящих клеток хозяина, хорошо известных и используемых в данной области, являются, без ограничения, *E.coli*, *Saccharomyces cerevisiae* или клетки линий млекопитающих, ВНК (почки детеныша хомячка) или СНО (яичников китайского хомячка). Пептид, подлежащий экспрессии, также может быть получен с использованием системы 40 транскрипции/трансляции *in vitro*, общеизвестной в данной области.

Все ссылки, включая публикации, заявки на патент и патенты, приведенные в данном описании, были включены тем самым во всей своей полноте посредством ссылки и в той же степени, как если бы каждая ссылка была конкретно и отдельно указана для включения посредством ссылки и была приведена в данном описании во всей своей 45 полноте (в максимально возможной степени, разрешенной законом).

Все заголовки и подзаголовки использованы в данном описании только для удобства, и их не следует истолковывать как каким-либо образом ограничивающие данное изобретение.

Применение любого и всех примеров или типичного языкового стиля (например, "такой как"), принятого в данном описании, предусматривается главным образом для лучшего освещения изобретения и не предполагает ограничения объема изобретения, если не утверждается иное. Никакую формулировку в данном описании не следует истолковывать как указание на любой не заявленный элемент, который является существенным для применения данного изобретения на практике.

Цитирование и включение в данное описание патентных документов выполнено только для удобства и не отражает какого-либо мнения относительно действительности, патентоспособности и/или правового обеспечения таких патентных документов.

10 Данное изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, приведенные в прилагаемой к описанию формуле изобретения, как допускается надлежащим законом.

Изобретение, изложенное в данном описании, без ограничения на этот документ, далее описывается следующими воплощениями.

15 Воплощение 1. Соединение гормона роста, содержащее дополнительные дисульфидные связи в SEQ ID No. 1.

Воплощение 2. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 1, содержащее дополнительные дисульфидные связи между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/L138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C и/или V185C/S188C в SEQ ID No. 1.

25 Воплощение 3. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 2, где соединение гормона роста содержит дополнительные дисульфидные связи между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих A17C/E174C, H21C/M170C, Q84C/Y143C, S71C/S132C и/или R94C/D107C в SEQ ID No. 1.

30 Воплощение 4. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 1, где соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C и/или V185C/S188C в SEQ ID No. 1.

35 Воплощение 5. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 4, где соединение гормона роста содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих A17C/E174C, H21C/M170C, S71C/S132C, Q84C/Y143C и R94C/D107C в SEQ ID No. 1.

40 Воплощение 6. Соединение гормона роста, содержащее одну или более чем одну дополнительную дисульфидную связь(и) по сравнению с человеческим гормоном роста, который определен в SEQ ID No. 1.

45 Воплощение 7. Соединение гормона роста, соответствующее любому из предшествующих воплощений, где соединение гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь между петлевым сегментом и спиральным сегментом, или в пределах петлевого сегмента, или между петлевыми сегментами, или между спиральными сегментами.

Воплощение 8. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 6 или 7,

где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C,

5 L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C и/или V185C/S188C в SEQ ID No. 1.

Воплощение 9. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 8, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих A17C/E174C, H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C,

10 S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в SEQ ID No. 1.

Воплощение 10. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 9, где

15 соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих A17C/E174C, H21C/M170C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в SEQ ID No. 1.

Воплощение 11. Соединение гормона роста, соответствующее любому из

20 предшествующих воплощений, где соединение гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один из цистеинов присутствует в L3, соответствующей AA 128-154 в SEQ ID No. 1, или, например, в участке, соответствующем AA 135-148 в SEQ ID No. 1.

Воплощение 12. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 11, где

25 по меньшей мере один из цистеинов дополнительной дисульфидной связи присутствует в L3 в положении, соответствующем AA141, AA142, AA143, AA144, AA145 или AA146, предпочтительно AA143 или AA144 в SEQ ID No. 1.

Воплощение 13. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 12, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C,

30 I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/I138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C и/или F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

Воплощение 14. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 13, где

35 соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C и/или F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

Воплощение 15. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 14, где

40 соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

Воплощение 16. Соединение гормона роста по любому из предшествующих пунктов, где соединение гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь,

45 соединяющую L3 с L1.

Воплощение 17. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 16, где соединение содержит дополнительную дисульфидную связь, соединяющую аминокислотный остаток, соответствующий AA54, AA55, AA56, AA57, AA58 или AA59

в L3, с аминокислотой, соответствующей AA143 или AA144 в L1, в SEQ ID No. 1.

Воплощение 18. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 16, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C,

5 I58C/S144C, P59C/Q137C и/или S71C/S132C в SEQ ID No. 1.

Воплощение 19. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 18, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C и/или S71C/S132C в SEQ ID No. 1.

10 Воплощение 20. Соединение гормона роста, соответствующее любому из воплощений 1-15, где соединение гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь, соединяющую L3 со спиральным сегментом.

Воплощение 21. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 20, где соединение гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь, 15 соединяющую L3 со спиралью 2.

Воплощение 22. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 21, где соединение содержит дополнительную дисульфидную связь, соединяющую аминокислотный остаток, соответствующий AA84 или AA85 в H2, с аминокислотой, соответствующей AA143 или AA144 в L3, в SEQ ID No. 1.

20 Воплощение 23. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 21, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/L138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C и F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

25 Воплощение 24. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 23, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C и/или F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

Воплощение 25. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 24, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих L81C/

30 Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

Воплощение 26. Соединение гормона роста, соответствующее любому из воплощений 1-10, где соединение гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь, соединяющую L2 со спиралью 1.

Воплощение 27. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 26, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих D26C/V102C или D26C/Y103C.

Воплощение 28. Соединение гормона роста, соответствующее любому из предыдущих воплощений, где полипептидная последовательность по меньшей мере на 80%, например на 90%, например на 95%, например на 96%, например на 97%, например на 98% или, 40 например на 99% идентична hGH, определенному посредством SEQ ID No. 1.

Воплощение 29. Соединение гормона роста, соответствующее любому из предыдущих воплощений, где активность *in vitro* указанного соединения составляет по меньшей мере 5% от активности hGH дикого типа, определенного посредством SEQ ID No. 1.

Воплощение 30. Соединение гормона роста, соответствующее любому из 45 предшествующих воплощений, где полуperiод функционального существования полипептида *in vivo* в 2 или более раз выше по сравнению с человеческим гормоном роста.

Воплощение 31. Соединение гормона роста, соответствующее любому из

предшествующих воплощений, где полупериод функционального существования полипептида *in vivo* в 2-10 раз выше по сравнению с человеческим гормоном роста.

Воплощение 32. Соединение гормона роста, соответствующее любому из предыдущих воплощений, где соединение гормона роста стабилизировано против разрушения под действием протеаз(ы), таких как пищеварительные протеазы, такие как пепсин, трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза и/или эластазы.

Воплощение 33. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 32, где соединение стабилизировано против разрушения под действием химотрипсина и/или эластазы.

10 Воплощение 34. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 33, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих H21/M170, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или S85C/S144C в SEQ ID No. 1.

15 Воплощение 35. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 33, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих H21/M170, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C и/или S85C/Y143C в SEQ ID No. 1.

20 Воплощение 36. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 33, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих D26/V102C, D26/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в SEQ ID No. 1.

25 Воплощение 37. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 33, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в SEQ ID No. 1.

30 Воплощение 38. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 33, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или S85C/S144C в SEQ ID No. 1.

35 Воплощение 39. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 33, где соединение содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих Q84C/Y143C и/или S85C/Y143CB SEQ ID No. 1.

40 Воплощение 40. Соединение гормона роста, соответствующее любому из предшествующих воплощений, где одну или более чем одну дополнительную

45 дисульфидную связь получают аминокислотной заменой по меньшей мере двух аминокислот по сравнению с SEQ ID No. 1.

Воплощение 41. Соединение гормона роста, соответствующее любому из предшествующих воплощений, где соединение содержит точно одну дополнительную дисульфидную связь по сравнению с SEQ ID No. 1.

40 Воплощение 42. Соединение гормона роста, соответствующее любому из предшествующих воплощений, где соединение содержит точно 2 аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID No. 1.

45 Воплощение 43. Соединение гормона роста, соответствующее любому из предшествующих воплощений, содержащее по меньшей мере два дополнительных цистеина по сравнению с человеческим гормоном роста, который определен в SEQ ID No. 1.

Воплощение 44. Соединение гормона роста, соответствующее любому из предшествующих воплощений, содержащее точно два дополнительных цистеина по

сравнению с человеческим гормоном роста, который определен в SEQ ID No. 1.

Воплощение 45. Соединение гормона роста, соответствующее любому из предыдущих воплощений, где соединение гормона роста химически модифицировано посредством пэглирования, посредством присоединения полимеров, таких как сахарные

5 группировки, жирные кислоты, липофильные группы, альбумин-связывающие вещества, витамины, желчные кислоты, но ими не ограничиваясь, спейсеров к боковым цепям или основной цепи пептида.

Воплощение 46. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 45, где химическая модификация соединения гормона роста носит временный характер, то 10 есть они легко могут быть удалены *in vivo*.

Воплощение 47. Соединение гормона роста, соответствующее любому из воплощений 45-46, где химические модификации аминокислотных остатков могут происходить на N-конце пептида, на C-конце пептида и/или между N- и C-концами пептида.

Воплощение 48. Соединение гормона роста, соответствующее любому из воплощений 15 45-47, где химическую модификацию проводят по аминокислотным остаткам Phe1, Gln40, Gln141 или Phe191.

Воплощение 49. Соединение гормона роста, соответствующее любому из воплощений 45-48, где химическую модификацию осуществляют с использованием ПЭГ и где молекулярная масса ПЭГ составляет от 500 Да до 50 кДа.

20 Воплощение 50. Соединение гормона роста, соответствующее любому из воплощений 1-49, где соединение гормона роста химически модифицировано с целью облегчения транспорта сквозь эпителий.

Воплощение 51. Соединение гормона роста, соответствующее любому из воплощений 1-49, где соединение гормона роста химически модифицировано с целью облегчения 25 транспорта сквозь эпителий по сравнению с wthGH.

Воплощение 52. Соединение гормона роста, соответствующее любому из воплощений 1-49, где соединение гормона роста химически модифицировано с целью получения пролонгированной продолжительности полупериода функционального существования *in vivo* по сравнению с wthGH.

30 Воплощение 53. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 52, где полупериод функционального существования *in vivo* указанного соединения гормона роста в 2 или более раз выше по сравнению с hGH.

Воплощение 54. Соединение гормона роста, соответствующее воплощению 53, где 35 полупериод функционального существования *in vivo* в 2-10 раз выше по сравнению с hGH.

Воплощение 55. Соединение гормона роста, соответствующее любому из воплощений 45-49, где химическую модификацию проводят по аминокислотным остаткам без влияния на связывание соединения гормона роста с hGHR.

Воплощение 56. Соединение гормона роста, соответствующее любому из воплощений 40 49-55, где соединение гормона роста стабилизировано против протеолитического разрушения под действием протеаз(ы), таких как пищеварительные протеазы, такие как пепсин, трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза и/или эластазы.

Воплощение 57. Способ получения соединения гормона роста с повышенной стабильностью к протеолитическому разрушению, включающий стадию 45 а) введения дополнительных дисульфидных связей в hGH.

Воплощение 58. Способ получения соединения гормона роста с повышенной стабильностью к протеолитическому разрушению, соответствующего любому из воплощений 1-14, включающий стадию

а) введения дополнительных дисульфидных связей в hGH путем замены одного или более аминокислотных остатков в hGH на один или более чем один цистеин.

Воплощение 59. Способ получения соединения гормона роста с повышенной стабильностью к протеолитическому разрушению, соответствующего воплощению

5 1-14, включающий стадию

а) введения дополнительных дисульфидных связей в hGH путем добавления одного или более остатков цистеина.

Воплощение 60. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение гормона роста, соответствующее любому из воплощений 1-56, и фармацевтически приемлемый

10 носитель(и).

Воплощение 61. Фармацевтическая композиция, соответствующая воплощению 60, где указанная композиция может быть введена пациентам лингвально, сублингвально, трансбуккалько, в ротовую полость, перорально, в желудок и кишечник, назально, в легкие, эпидермально, дермально, трансдермально и парентерально.

15 Воплощение 62. Фармацевтическая композиция, соответствующая воплощению 60 или 61, где указанная композиция представляет собой перорально вводимую композицию.

20 Воплощение 63. Способ изготовления фармацевтической композиции, где указанная композиция содержит соединение гормона роста, соответствующее любому из

воплощений 1-56, и фармацевтически приемлемый носитель(и).

25 Воплощение 64. Способ лечения заболевания, где активность гормона роста можно использовать для лечения заболеваний или состояний, при которых будет полезно увеличение количества циркулирующего в крови соединения гормона роста, где указанный способ включает введение пациенту эффективного количества соединения

25 1-56, или фармацевтической композиции, соответствующей любому из воплощений 60-62.

30 Воплощение 65. Способ лечения заболевания, соответствующий воплощению 63 или 64, где заболевание выбрано из дефицита гормона роста (GHD); синдрома Тернера; синдрома Прадера-Вилли (PWS); синдрома Нунан; синдрома Дауна; хронической почечной недостаточности, ювенильного ревматоидного артрита; кистозного фиброза, ВИЧ-инфекции у детей, получающих лечение по программе НААРТ (детей с диагнозом HIV/HALS); небольших по размеру детей, рожденных малыми для гестационного срока (SGA); низкорослости у детей, рожденных с очень низкой массой (VLBW), но SGA; дисплазии скелета; гипохондроплазии; ахондроплазии; идиопатической низкорослости (ISS); GHD у взрослых; переломов в трубчатых костях или трубчатых костях, таких как большеберцовая кость, малоберцовая кость, бедренная кость, плечевая кость, лучевая кость, локтевая кость, ключица, пястная кость, плюсневая кость и кости пальцев ног; переломов в губчатых костях или губчатых костях, таких как череп, основание кисти и основание стопы; пациентов после операции на сухожилиях или связках,

40 например кисти, колена или плеча; пациентов, имеющих или испытывающих дистракционный остеогенез; пациентов после замены тазобедренного сустава или суставного диска, восстановления мениска, сращений позвонков или фиксации протезов, как например, на колене, тазобедренном суставе, плече, локте, запястье или челюсти; пациентов с зафиксированным в них материалом для остеосинтеза, таким как штифты,

45 винты и пластиинки; пациентов с несрастанием или неправильным срастанием переломов; пациентов после остеотомии, например большеберцовой кости или 1-го пальца ноги; пациентов после пересадки трансплантата; дегенерации суставного хряща в колене, вызванной травмой или артритом; остеопороза у пациентов с синдромом Тернера;

- остеопороза у мужчин; взрослых пациентов, находящихся на постоянном диализе (APCD); ассоциированного с недоеданием сердечно-сосудистого заболевания на фоне APCD; реверсирования кахексии на фоне APCD; рака на фоне APCD; хронической обструктивной болезни легких на фоне APCD; ВИЧ на фоне APCD; пожилого возраста у APCD; хронической болезни печени на фоне APCD, синдрома усталости на фоне APCD; болезни Крона; ослабления функции печени; особей мужского пола с ВИЧ-инфекцией; синдрома укороченной тонкой кишки; центрального ожирения; синдрома ВИЧ-ассоциированной липодистрофии (HALS); мужского бесплодия; пациентов после главной плановой операции, алкогольной/лекарственной детоксикации или неврологической травмы; старения; ослабленных пожилых людей; остеоартрита; травматического повреждения хряща; эректильной дисфункции; фибромиалгии; расстройств памяти; депрессии; травматического поражения головного мозга; субарахноидального кровоизлияния; очень низкой массы при рождении; метаболического синдрома; глюкокортикоидной миопатии; или низкорослости вследствие лечения глюкокортикоидами у детей.

Воплощение 66. Гормон роста, соответствующий любому из воплощений 1-56, для применения в качестве лекарственного средства.

Воплощение 67. Применение гормона роста, соответствующего любому из воплощений 1-56, в качестве лекарственного средства.

- Воплощение 68. Применение соединения гормона роста, соответствующего любому из воплощений 1-56, в лечении заболевания.

- Воплощение 69. Применение, соответствующее воплощению 67 или воплощению 68, где заболевание выбрано из дефицита гормона роста (GHD); синдрома Тернера; синдрома Прадера-Вилли (PWS); синдрома Нунан; синдрома Дауна; хронической почечной недостаточности, ювенильного ревматоидного артрита; кистозного фиброза, ВИЧ-инфекции у детей, получающих лечение по программе HAART (детей с диагнозом HIV/HALS); небольших по размеру детей, рожденных малыми для гестационного срока (SGA); низкорослости у детей, рожденных с очень низкой массой (VLBW), но SGA; дисплазии скелета; гипохондроплазии; ахондроплазии; идиопатической низкорослости (ISS); GHD у взрослых; переломов в трубчатых костях или трубчатых костях, таких как большеберцовая кость, малоберцовая кость, бедренная кость, плечевая кость, лучевая кость, локтевая кость, ключица, пястная кость, плюсневая кость и кости пальцев ног; переломов в губчатых костях или губчатых костях, таких как череп, основание кисти и основание стопы; пациентов после операции на сухожилиях или связках, например кисти, колена или плеча; пациентов, имеющих или испытывающих дистракционный остеогенез; пациентов после замены тазобедренного сустава или суставного диска, восстановления мениска, сращений позвонков или фиксации протезов, как например, на колене, тазобедренном суставе, плече, локте, запястье или челюсти; пациентов с зафиксированным в них материалом для остеосинтеза, таким как штифты, винты и пластинки; пациентов с несрастанием или неправильным срастанием переломов; пациентов после остеотомии, например большеберцовой кости или 1-го пальца ноги; пациентов после пересадки трансплантата; дегенерации суставного хряща в колене, вызванной травмой или артритом; остеопороза у пациентов с синдромом Тернера; остеопороза у мужчин; взрослых пациентов, находящихся на постоянном диализе (APCD); ассоциированного с недоеданием сердечно-сосудистого заболевания на фоне APCD; реверсирования кахексии на фоне APCD; рака на фоне APCD; хронической обструктивной болезни легких на фоне APCD; ВИЧ на фоне APCD; пожилого возраста у APCD; хронической болезни печени на фоне APCD, синдрома усталости на фоне

APCD; болезни Крона; ослабления функции печени; особей мужского пола с ВИЧ-инфекциами; синдрома укороченной тонкой кишки; центрального ожирения; синдрома ВИЧ-ассоциированной липодистрофии (HALS); мужского бесплодия; пациентов после главной плановой операции, алкогольной/лекарственной детоксикации или

- 5 неврологической травмы; старения; ослабленных пожилых людей; остеоартрита; травматического повреждения хряща; эректильной дисфункции; фибромиалгии; расстройств памяти; депрессии; травматического поражения головного мозга; субарахноидального кровоизлияния; очень низкой массы при рождении; метаболического синдрома; глюкокортикоидной миопатии; или низкорослости
- 10 вследствие лечения глюкокортикоидами у детей.

Воплощение 70. Применение соединения гормона роста, соответствующего любому из воплощений 1-56, в изготовлении лекарственного средства, которое будет

использовано в лечении дефицита гормона роста (GHD); синдрома Тернера; синдрома Прадера-Вилли (PWS); синдрома Нунан; синдрома Дауна; хронической почечной

- 15 недостаточности, ювенильного ревматоидного артрита; кистозного фиброза, ВИЧ-инфекции у детей, получающих лечение по программе НААРТ (детей с диагнозом HIV/ HALS); небольших по размеру детей, рожденных малыми для гестационного срока (SGA); низкорослости у детей, рожденных с очень низкой массой (VLBW), но SGA; дисплазии скелета; гипохондроплазии; ахондроплазии; идиопатической низкорослости (ISS); GHD у взрослых; переломов в трубчатых костях или трубчатых костей, таких как большеберцовая кость, малоберцовая кость, бедренная кость, плечевая кость, лучевая кость, локтевая кость, ключица, пястная кость, плюсневая кость и кости пальцев ног; переломов в губчатых костях или губчатых костях, таких как череп, основание кисти и основание стопы; пациентов после операции на сухожилиях или связках,
- 20 25 например кисти, колена или плеча; пациентов, имеющих или испытывающих дистракционный остеогенез; пациентов после замены тазобедренного сустава или суставного диска, восстановления мениска, сращений позвонков или фиксации протезов, как например, на колене, тазобедренном суставе, плече, локте, запястье или челюсти; пациентов с зафиксированным в них материалом для остеосинтеза, таким как штифты, винты и пластинки; пациентов с несрастанием или неправильным срастанием переломов; пациентов после остеотомии, например большеберцовой кости или 1-го пальца ноги; пациентов после пересадки трансплантата; дегенерации суставного хряща в колене, вызванной травмой или артритом; остеопороза у пациентов с синдромом Тернера; остеопороза у мужчин; взрослых пациентов, находящихся на постоянном диализе

- 30 35 (APCD); ассоциированного с недоеданием сердечно-сосудистого заболевания на фоне APCD; реверсирования кахексии на фоне APCD; рака на фоне APCD; хронической обструктивной болезни легких на фоне APCD; ВИЧ на фоне APCD; пожилого возраста у APCD; хронической болезни печени на фоне APCD, синдрома усталости на фоне APCD; болезни Крона; ослабления функции печени; особей мужского пола с ВИЧ-инфекциами; синдрома укороченной тонкой кишки; центрального ожирения; синдрома ВИЧ-ассоциированной липодистрофии (HALS); мужского бесплодия; пациентов после главной плановой операции, алкогольной/лекарственной детоксикации или неврологической травмы; старения; ослабленных пожилых людей; остеоартрита; травматического повреждения хряща; эректильной дисфункции; фибромиалгии; расстройств памяти; депрессии; травматического поражения головного мозга; субарахноидального кровоизлияния; очень низкой массы при рождении; метаболического синдрома; глюкокортикоидной миопатии; или низкорослости вследствие лечения глюкокортикоидами у детей.

## Примеры

Данное изобретение будет дополнительно определено посредством ссылки на следующие далее примеры, в которых описаны получение и характеристика различных соединений, изложенных в данном описании, и методы анализа их биологической активности. Специалистам в данной области будет очевидно, что на практике могут быть применены многие модификации, относящиеся как к материалам, так и способам, без отклонения от объема изобретения.

Используемая в примерах ТГаза представляет собой микробную трансглутаминазу из *Streptoverticillium moharaense* согласно US5156956.

### 10 Пример 1. Общий способ получения соединений hGH

Ген, кодирующий соединения гормона роста, встраивали рекомбинантным способом в плазмидный вектор. Цистeinовые мутации вводили, используя набор QuikChange для сайт-специфического мутагенеза (Stratagene). Затем подходящий штамм *E.coli* подвергали трансформации, используя этот плазмидный вектор. Белок экспрессировали в виде 15 растворимого белка с N-концевой богатой гистидином пептидной меткой, подходящей для очистки аффинной хроматографией с иммобилизованными металлами.

Готовили концентрированную суспензию клеток в 50%-ном глицерине и хранили при -80°C. Концентрированным штаммом в глицерине инокулировали чашки с LBA (агаризированной средой Лурия-Бергани (LB)) и после этого инкубировали при 37°C 20 в течение ночи. Содержимое каждой чашки промывали средой LB и разбавляли в 500 мл среды LB+AMP (ампициллин) для осуществления экспрессии. Культуры инкубировали при 37°C со встряхиванием при 220 об/мин до достижения оптической плотности OD<sub>600</sub>, равной 0,6. Последующую индукцию проводили, используя 0,2 mM IPTG (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид), при 30°C в течение 6 часов, получая в 25 конце OD<sub>600</sub> 2,0. Окончательно клетки собирали центрифугированием.

После этого клетки суспендировали в 20 mM Трис-HCl, pH 8,5 и разрушали, используя клеточный дезинтегратор, при 30 кф/кв. дюйм (207 МПа). Супернатант собирали центрифугированием и после этого подвергали хроматографической очистке.

30 Очистку проводили, используя аффинную хроматографию с иммобилизованными металлами в качестве стадии захвата, после чего удаляли пептидную метку с применением диаминопептидазы от Unizyme. Окончательной очистки достигали с применением ионообменной хроматографии. Очистки также можно достичь с использованием, но не ограничиваясь этим, ионообменной хроматографии, 35 хроматографии гидрофобного взаимодействия, аффинной хроматографии, стерической эксклюзационной хроматографии и методов разделения с использованием мембран, известных специалисту в данной области.

Группы ПЭГ присоединяли к N-концу, осуществляя взаимодействие соединения hGH с 2 эквивалентами, например, ПЭГ-5000-альдегида (RAPP Polymere, 12 5000-6). Реакцию инициировали добавлением NaCNBH<sub>3</sub> в 0,5 мл MeCN за 10 стадий. Реакционную смесь 40 отставляли на 20 ч.

Группы ПЭГ присоединяли к Q40, первоначально осуществляя взаимодействие соединения hGH с 1,3-диамино-2-пропанолом (Fluka 33262) с применением микробной трансглутаминазы в качестве катализатора.

45 Реакция сочетания трансаминированного и окисленного соединения hGH (I) с группой МПЭГ

Готовили следующие растворы:

буфер А: триэтаноламин (119 мг; 0,8 ммоль) растворяли в воде (40 мл) и pH подводили

до 8,5;

буфер В: 20 мМ триэтаноламин; 0,2 М NaCl.

(А) Трансаминирование hGH (III) с использованием 1,3-диамино-2-пропанола hGH (8,64 г) растворяли в буфере А (500 мл) при перемешивании. К этому раствору

5 медленно добавляли смесь 1,3-диамино-2-пропанола (DAP) (8,1 г; Fluka 33262) в буфере А (50 мл). pH полученной смеси подводили до 8,5 путем добавления водн. HCl.

Добавляли микробную ТГазу (2,8 мл; 1,3 мг/мл) при перемешивании. Конечную смесь перемешивали в течение ночи при КТ (комнатной температуре).

10 Реакционную смесь разбавляли буфером А (1,2 л) и продукт очищали ионообменной хроматографией. 100 мл/мин - 200 мл/фракция.

Стадия: буфер В - 40%; градиент 40-100% буфера В в размере 15 CV (объемов колонки) в течение 225 мин.

(В) Окисление трансаминированного hGH

15 Буфер А: триэтаноламин (119 мг; 0,8 ммоль) растворяли в воде (40 мл) и pH подводили до 8,5.

Буфер В: 3-метилтио-1-пропанол (725 мг; 7,1 ммоль) растворяли в буфере А (10 мл).

Буфер С: HEPES (N-2-гидроксиэтил-пиперазин-N-2-этансульфоновую кислоту) (5,96 г) растворяли в воде (1,0 л) и pH подводили до 7,0.

Периодат: NaIO<sub>4</sub> (48,1 мг; 0,225 ммоль) растворяли в воде (1,0 мл).

20 К раствору hGH после взаимодействия с DAP (10 мг; 0,5 мкмоль) добавляли буфер В (0,2 мл), затем раствор периода (0,03 мл). Через 20 мин инкубации на холода смесь дилизовали 4 раза, используя буфер С. Остаток концентрировали до 1 мл.

(С) Восстановительное аминирование окисленного hGH с использованием реагента на основе ПЭГ

25 Конечный раствор со стадии (В) (1 мл; 0,45 мкмоль) смешивали с раствором ПЭГ-амина (2 мл; 0,3 мкмоль) в 25 мМ HEPES-буфере, pH 7,0, и полученную смесь медленно перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Через 1 ч порциями (10×) добавляли NaCNBH<sub>3</sub> (100 мкл раствора NaCNBH<sub>3</sub> (20 мг) в воде (0,5 мл)). Смесь оставляли при комнатной температуре в темноте на 18-24 часа. Смесь очищали на MonoQ, заменяли буфер и концентрировали. Реагенты мПЭГ-амина имеются в продаже.

30 Пример 2. Химическая характеристика белка очищенных соединений гормона роста

Исходный очищенный белок анализировали, используя MALDI-MS (масс-спектрометрию с ионизацией посредством лазерной десорбции ионов из матрицы).

35 Обнаруженная масса соответствовала теоретической массе, установленной на основании аминокислотной последовательности.

Ожидаемое образование трех дисульфидных связей в каждом соединении было продемонстрировано с применением пептидного картирования с использованием расщепления под действием трипсина и AspN с последующим MALDI-MS-анализом гидролизата до и после восстановления дисульфидных связей с помощью DTT (дитиотреита).

40 Пример 3. Анализ биологической активности очищенных соединений гормона роста

Биологическую активность соединений hGH измеряли в анализе эффективности их взаимодействия с рецептором, основанном на пролиферации клеток, а именно BAF-анализе. Этот способ является общепризнанным для соединений hGH.

45 Клеткам BAF-3 (линия В-лимфоидных клеток-предшественников мышей или крыс, выделенная из костного мозга) для своего роста и выживаемости необходимо присутствие IL-3 (интерлейкина-3). IL-3 активирует JAK-2 (янус-киназу 2) и STAT (транскрипционный фактор, от англ. signal transducer and activator of transcription), которые

представляют собой те же медиаторы GH, которые активируются под действием GH в результате стимуляции.

Клетки BAF-3 трансфицировали плазмидой, содержащей рецептор hGH. Клоны, способные к пролиферации после стимуляции hGH, превращались в hGH-зависимые 5 клеточные линии, далее обозначаемые как BAF3-GHR. Клеточные линии давали дозозависимый ответ на GH, и поэтому их можно было использовать для оценки влияния различных соединений hGH в анализе пролиферации.

BAF-3GHR-клетки растут на минимальной среде (культуральной среде без GH) в течение 24 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки центрифугируют, среду удаляют и клетки

10 ресуспенсируют в минимальной среде до  $2,22 \times 10^5$  клеток/мл. Порции по 90 мкл клеточного супернатанта рассеивают в титрационные микропланшеты (96-луночные, NUNC-clone). К клеткам добавляют соединение гормона роста в различных концентрациях и планшеты инкубируют в течение 72 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

15 AlamarBlue представляет собой индикатор окислительно-восстановительного потенциала клеток, AlamarBlue® (№ по каталогу BioSource Dal 1025), который восстанавливается в реакциях, характерных для клеточного метаболизма, и таким образом обеспечивает возможность опосредованного измерения количества жизнеспособных клеток. AlamarBlue® разбавляют в 6 раз (5 мкл AlamarBlue® + 25 мкл минимальной среды) и в каждую лунку добавляют по 30 мкл разбавленного AlamarBlue®. 20 Затем клетки инкубируют в течение следующих 4 часов. И наконец, метаболическую активность клеток измеряют во флуоресцентном планшетном ридере, используя фильтр возбуждения 544 нМ и эмиссионный фильтр 590 нМ.

25 Результат для заданного соединения выражают в виде соотношения между величиной EC<sub>50</sub> для указанного соединения и величиной EC<sub>50</sub> для wthGH, полученной в параллельном опыте. Другие результаты приведены ниже в Таблице 6.

Таблица 2

Соотношение между EC<sub>50</sub> для соединений hGH и EC<sub>50</sub> для wthGH

Cys-содержащее соединение	Средняя величина	Отклонение
A17C-E174C	0,6	0,1
H21C-M170C	0,4	0,3
R94C-D107C	0,8	0,4
Q84C-Y143C	0,3	0,1
S71C-S132C	0,24	0,02

35 Все протестированные соединения hGH были равноэффективны или более эффективны по сравнению с wthGH.

Таблица 2А

Соотношение между EC<sub>50</sub> для соединений hGH с группой ПЭГ и EC<sub>50</sub> для wthGH

СОЕДИНЕНИЕ	Соотношение (соединение EC <sub>50</sub> (BAF) hGH/wthGH wt)
HGH	1,0
HGH (Q84C, Y143C) 040-ПЭГ5000	0,75
HGH (Q84C, Y143C) ПЭГ750 с N-КОНЦА	0,475
HGH (Q84C, Y143C) ПЭГ5000 с N-КОНЦА	1,1475

40 Пример 3А. Исследование зависимости "доза-ответ" in vivo на крысах линии Sprague Dawley с удаленным гипофизом (анализ 3А)

45 Зависимость "доза-ответ" in vivo изучали на самцах крыс линии Sprague Dawley с удаленным гипофизом. Крыса с удаленным гипофизом представляет собой хорошо известную и общепризнанную животную модель дефицита гормона роста, когда после

хирургического удаления гипофиза никакого образования гормона роста не происходит. Это также приводит к низким уровням инсулиноподобного ростового фактора-1 (IGF-1) в крови, другому важному клиническому признаку дефицита гормона роста у людей.

Удаление гипофиза выполняли на самцах крыс в возрасте 4 недель массой 90-100 г.

5 Масса животных, взятых на исследование через 3-4 недели после хирургического вмешательства, составляла 100-110 г. Животных с увеличением массы тела более чем на 10% в течение 3-4 недель после хирургического вмешательства в данном исследовании не использовали.

Семьдесят крыс линии Sprague Dawley с удаленным гипофизом разделяли случайным 10 образом на семь групп для введения препарата, по десять животных в каждой группе. Одна группа получала только разбавитель и служила в качестве не подвергаемой лечению контрольной группы. Три группы получали тестируемое соединение (hGH Q84C, Y143C) в количестве 33, 3,3 и 0,33 нмоль, соответственно, и три группы получали hGH в виде препарата сравнения в количестве 50, 5,0 и 0,5 нмоль, соответственно. И 15 соединения, и разбавитель вводили в виде разовой подкожной дозы в область шеи. Массу тела измеряли каждый день в промежутке между 8-10 утра в течение одной недели.

Как hGH Q84C, Y143C, так и hGH оба индуцировали дозозависимое увеличение массы тела, когда массу тела на 0-е сутки сравнивали с таковой на 7-е сутки.

20 Сигмоидальное уравнение зависимости доза-ответ подгоняли к экспериментальным данным (увеличение массы тела в промежутке 0-7 суток), используя нелинейный регрессионный анализ, чтобы оценить значения параметров  $E_{max}$ ,  $E_0$  и  $ED_{50}$ . Данное уравнение представляло собой сигмоидальное уравнение зависимости "доза-ответ", 25 встроенное в программу GraphPad Prism, версию 4.00 для Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Данные, включающие оценки значений параметров и 95%-ные доверительные интервалы, представлены в Таблице 3.

30 Никакого различия в оценках значений параметров  $E_0$  и  $E_{max}$  не наблюдали для hGH Q84C, Y143C и hGH. Однако значение  $ED_{50}$  оказалось существенно ниже для hGH Q84C, Y143C, чем для hGH, что указывает на увеличение эффективности hGH Q84C, Y143C *in vivo*.

Таблица 3

Результаты подгонки ответа в виде увеличения массы тела на 7-е сутки по сравнению с 0-ми сутками к сигмоидальному уравнению зависимости "доза-ответ" для оценки  $E_{max}$ ,  $E_0$  и  $ED_{50}$

	hGH Q84C, Y143C	hGHwt
$E_0$ (г)	0,0 (-1,9-1,8)	0,2 (-1,7-2,0)
$ED_{50}$ (нмоль)	0,29 (0,20-0,41)	0,70 (0,50-0,99)
$E_{max}$ (г)	26,3 (24,8-27,9)	27,5 (25,9-29,1)

Среднее значение (95%-ный доверительный интервал).

40 Пример 4. Изучение взаимодействия с рецептором в анализе с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса

Взаимодействие соединений hGH с рецептором анализировали, применяя анализ с использованием поверхностного плазмонного резонанса. Это общий метод для соединений hGH, и он продемонстрирован на примере соединения hGH Q84C/Y143C.

45 Взаимодействие hGH и аналогов с hGH-связывающим белком (hGHBP) изучали методом поверхностного плазмонного резонанса, используя прибор Biacore T100 (GE Healthcare, Sweden). mAb (моноклональное антитело) против hGH (Fitzgerald Industries International, USA, №10G05B) иммобилизовали на CM-5-чипе в соответствии с инструкцией производителя, обычно на уровне 5000 RU (единиц резонанса). wthGH или

аналоги захватывали в концентрации 10-25 мкг/мл в рабочем буфере (10 мМ HEPES, 0,15 М NaCl, 30 мМ EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), 0,05% поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4), что приводило к получению 250-400 RU для захваченного лиганда. Затем hGHBP в концентрации 0-800 нМ пропускали над 5 поверхностью со скоростью 30 мкл/мин. Поверхность с иммобилизованным mAb против hGH, но без захваченного hGH, использовали в качестве сравнения.

Кинетические данные анализировали, используя аналитическое программное обеспечение (Evaluation Software) 2,0 Biacore™ с применением модели связывания 1:1 по Ленгмюру.

10 Анализ показал (Таблица 4), что соединение hGH Q84C, Y143C обладало аналогичной или слегка более высокой аффинностью к белку, связывающему гормон роста, чем wthGH.

Таблица 4

	ka (1/Mc)	kd (1/c)	KD (нМ)
hGH wt	$1,9 \times 10^5$	$6,1 \times 10^{-4}$	3,3
hGH Q84C, Y143C	$2,0 \times 10^5$	$4,8 \times 10^{-4}$	2,5

Анализ показал (Таблица 4А), что соединение hGH Q84C, Y143C было 20 равноэффективно по сравнению с hGH дикого типа в пределах ошибки эксперимента.

Таблица 4А

	$E_{50} \pm \text{std dev. (нМ)}$
hGH wt	$0,7 \pm 0,3$
hGH Q84C, Y143C	$0,3 \pm 0,1$

std dev. = стандартное отклонение.

25 Пример 5. Анализ скорости разрушения hGH дикого типа и соединения hGH под действием протеаз

Представляющее интерес соединение подвергают перевариванию релевантной протеазой (трипсином, химотрипсином, пепсином, эластазой, фактором VIIa, фактором Xa, протеиназой K, карбоксипептидазой, DPPIV, нейтральной эндопептидазой, гранзимом B, пролин-эндопептидазой, стафилококковой пептидазой I, термолизином, тромбином, Arg-C-протеиназой, Asp-N-эндопептидазой, каспазой 1-10, клострипайном, энтерокиназой, глутамил-эндопептидазой, гранзимом B, LysC, LysN, пролин-эндопептидазой и стафилококковой пептидазой I или тканевыми экстрактами) в 30 соответствующем буфере (например, PBS (забуференным фосфатом физиологическом растворе) или бикарбонате аммония) при 37°C в течение до 24 часов включительно. Протеолитическое разрушение оценивают анализом с использованием HPLC 35 (высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Общий метод

Протеолитическое расщепление:

40 100 мкл раствора тестируемого соединения в концентрации 1 мг/мл в аммоний-бикарбонатном буфере подвергают разрушающему действию фермента в течение до 24 часов включительно при 37°C. В различные моменты времени отбирают образцы и реакцию протеолиза останавливают путем подкисления образца, разбавляя его в 10 раз в 1%-ной TFA (трифторуксусной кислоте). Эти разбавленные образцы анализируют 45 обращенно-фазовой HPLC для оценки степени протеолитического расщепления.

Метод с использованием HPLC:

10 мкл вышеупомянутого раствора вводят в колонку Vydac C4 (2×150 мм) для обращенно-фазовой хроматографии, элюирующую линейным градиентом от 0,1%-ной

TFA в воде до 100%-ного ацетонитрила, содержащего 0,1% TFA, в течение 30 мин при скорости потока 0,2 мл/мин. Детекцию пиков осуществляют, используя поглощение в УФ (ультрафиолете) при 214 нм. % интактного соединения в момент времени  $t=T$  рассчитывают, исходя из площади пика в момент времени  $t=T$  ( $A_T$ ) и площади пика в момент времени  $t=0$  ( $A_0$ ) в виде  $(A_T/A_0) \times 100\%$ . Результаты, приведенные в данном описании ниже в Таблице 6, были получены через 4 часа (в вышеупомянутом уравнении  $T=4$ ).

Кривую зависимости % интактного соединения от времени строят, используя 10 программное обеспечение GraphPad Prism, версию 5,01.  $T_{1/2}$  рассчитывают из спада однофазной кривой также с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

В данном примере используют ферменты эластазу (Sigma, из поджелудочной железы свиньи) и химотрипсин (Roche, степень чистоты для секвенирования). В качестве буфера используют 50 мМ бикарбонат аммония pH 8,5.

#### Пример 5.1

15 100 мкг wthGH инкубировали в 100 мкл буфера вместе с 13 нг химотрипсина.  $T_{1/2}=3,6$  часа.

#### Пример 5.2

100 мкг wthGH инкубировали в 100 мкл буфера вместе с 135 нг эластазы.  $T_{1/2}=1,6$  часа.

#### Пример 5.3

20 100 мкг hGH Q84C, Y143C инкубировали в 100 мкл буфера вместе с 135 нг эластазы.  $T_{1/2}=6,2$  часа.

#### Пример 5.4

25 100 мкг hGH A17C, E174C инкубировали в 100 мкл буфера вместе с 13 нг химотрипсина.  $T_{1/2}=7,5$  часа.

#### Пример 5.5

30 100 мкг hGH H21C, M170C инкубировали в 100 мкл буфера вместе с 13 нг химотрипсина.  $T_{1/2}=22$  часа.

#### Пример 5.6

35 100 мкг hGH R94C, D107C инкубировали в 100 мкл буфера вместе с 13 нг химотрипсина.  $T_{1/2}=2,5$  часа.

#### Пример 5.7

40 100 мкг hGH Q84C, Y143C инкубировали в 100 мкл 50 мМ аммоний-бикарбонатного буфера pH 8,5 вместе с 13 нг химотрипсина.  $T_{1/2}$  рассчитать невозможно, поскольку никакого разрушения не наблюдается.

Таблица 4

Величина  $T_{1/2}$  (часы) для разрушения hGH дикого типа и соединений под действием химотрипсина

Соединение	$T_{1/2}$
hGH wt	3,6
hGH A17C, E174C	7,5
hGH H21C, M170C	22
hGH R94C, D107C	2,5
hGH Q84, Y143C	N/A

N/A = данные отсутствуют (от англ. not available).

Таблица 5

Величина  $T_{1/2}$  (часы) для разрушения hGH дикого типа и соединения hGH Q84C, Y143C под действием эластазы

Соединение	$T_{1/2}$
hGH wt	1,6
hGH Q84C, Y143C	6,2

Пример 6. Анализ выбранных соединений с применением BAF-метода и протеолитического расщепления, как описано в Примере 3 и Примере 5

Таблица 6					
Анализ соединений гормона роста, содержащих дополнительные дисульфидные связи					
	Соединение	Соотношение EC <sub>50</sub> (BAF) (соединение hGH/hGH)	Стабильность к химотрипсину, % интактного соединения	Стабильность к эластазе, % интактного соединения	Домены, связанные дополнительн. дисульфидной связью
5	HGH	1,0	42	25	
HGH (A17C, E174C)	0,6	45	10	H1-H4	
10	HGH (H21C, M170C)	0,5	72	10	H1-H4
HGH (D26C, V102C)	0,5	55	65	H1-L2	
HGH (D26C, Y103C)	0,5	55	45	H1-L2	
HGH (F54C, Y143C)	0,6	55	20	L1-L3	
HGH (F54C, S144C)	0,5	60	20	L1-L3	
15	HGH (F54C, F146C)	0,6	40	25	L1-L3
HGH (S55C, Y143C)	0,5	90	25	L1-L3	
HGH (S57C, Y143C)	0,3	75	50	L1-L3	
HGH (I58C, Q141C)	0,7	70	25	L1-L3	
HGH (I58C, Y143C)	0,6	55	20	L1-L3	
20	HGH (I58C, S144C)	1,2	65	30	L1-L3
HGH (P59C, Q137C)	0,7	72	35	L1-L3	
HGH (S71C, S132C)	0,2	90	45	L1-L3	
HGH (L81C, Y143C)	0,7	85	15	H2-L3	
HGH (Q84C, Y143C)	0,5	100	80	H2-L3	
25	HGH (S85C, Y143C)	0,5	80	70	H2-L3
HGH (S85C, S144C)	0,7	81	60	H2-L3	
HGH (F92C, T148C)	0,6	40	55	H2-L3	
HGH (R94C, D107C)	0,8	38	70	H2-H3	

### Формула изобретения

1. Производное гормона роста человека, содержащее дополнительную дисульфидную связь по сравнению с hGH, определенному посредством SEQ ID No. 1, где производное содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих H21C/M170C, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в SEQ ID No. 1, и обладающее активностью гормона роста человека.

2. Производное гормона роста по п.1, где полипептидная последовательность по меньшей мере на 95% идентична hGH, определенному посредством SEQ ID No. 1.

3. Производное гормона роста по п.1, где производное гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один из цистеинов присутствует в петле 3 (L3), соответствующей AA 128-154 в SEQ ID No. 1.

4. Производное гормона роста по п.3, где производное гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один из цистеинов присутствует в участке, соответствующем AA 135-148 в SEQ ID No. 1.

5. Производное гормона роста по п.3, где производное гормона роста содержит дополнительную дисульфидную связь, соединяющую L3 со спиралью 2 (H2) или петлей 1 (L1).

6. Производное гормона роста по п.5, где производное содержит по меньшей мере одну пару мутаций, соответствующих F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/

Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C и/или F92C/T148C в SEQ ID No. 1.

7. Производное гормона роста по п.1, где производное гормона роста стабилизировано против разрушения под действием протеаз(ы), выбранной(ых) из пищеварительных протеаз.

8. Производное гормона роста по п.7, где производное гормона роста стабилизировано против разрушения под действием протеаз(ы), выбранной(ых) из: пепсина, трипсина, химотрипсина, карбоксипептидазы и/или эластазы.

9. Производное гормона роста по п.1, содержащее точно два дополнительных цистеина по сравнению с человеческим гормоном роста, который определен в SEQ ID No. 1.

10. Производное гормона роста по п.1, где производное гормона роста представляет собой гибридный белок.

11. Производное гормона роста по п.1, где производное гормона роста химически модифицировано.

12. Производное гормона роста по п.11, где производное гормона роста химически модифицировано посредством присоединения группировок, таких как: ПЭГ, углеводы, альбумин-связывающие группы, жирные кислоты, алкильные цепи, липофильные группы, витамины, желчные кислоты или спейсеры, присоединяющиеся к боковой или 20 к главной цепи производного гормона роста.

13. Производное по пп.1-12 для применения в качестве лекарственного средства.

14. Производное гормона роста по пп.1-12 для применения в способе лечения заболеваний или состояний, при котором пациенту увеличивают количество циркулирующего производного гормона роста.

15. Способ получения производного гормона роста с повышенной стабильностью к протеолитическому разрушению, включающий стадию введения дополнительной дисульфидной связи путем включения по меньшей мере одной пары мутаций, соответствующих H21/M170, D26/V102C, D26/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, 30 L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в SEQ ID No. 1, в производное гормона роста, с получением производного гормона роста, содержащего дополнительную дисульфидную связь по сравнению с hGH, который определен в SEQ ID No. 1.

16. Фармацевтическая композиция, обладающая активностью гормона роста, 35 содержащая производное гормона роста по любому из пп.1-12 в эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель(и).

17. Применение производного гормона роста по пп.1-12 в эффективном количестве для приготовления фармацевтической композиции для лечения заболеваний или состояний, при котором пациенту увеличивают количество циркулирующего гормона 40 роста.

18. Способ лечения заболеваний, где активность гормона роста может быть использована для лечения заболеваний или состояний, при которых пациенту будет полезно повышение количества циркулирующего в крови производного гормона роста, включающий введение пациенту эффективного количества производного гормона 45 роста по любому из пп.1-12 или фармацевтической композиции по п.16.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Novo Nordisk A/S  
 Demuth, Helle  
 Schiødt, Christine B  
 Breinholt, Jens  
 Olsen, Ole H  
 Thygesen, Peter  
 Norskov-Lauritsen, Leif

<120> Stable Growth Hormone Compounds

<130> 7878.204-WO

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(35)  
 <223> Helix 1

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (36)..(71)  
 <223> Loop 1

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (72)..(98)  
 <223> Helix 2

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (99)..(106)  
 <223> Loop 2

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (107)..(127)  
 <223> Helix 3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (128)..(154)  
 <223> Loop 3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (155)..(184)  
 <223> Helix 4

<400> 1

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

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu  
 20 25 30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro  
 35 40 45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg  
 50 55 60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu  
 65 70 75 80

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val  
 85 90 95

Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp  
 100 105 110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu  
 115 120 125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser  
 130 135 140

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr  
 145 150 155 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe  
 165 170 175

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
 180 185 190

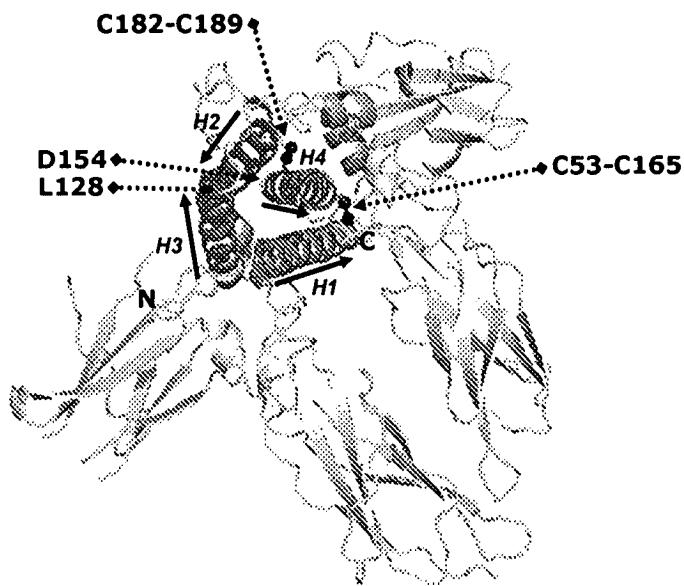
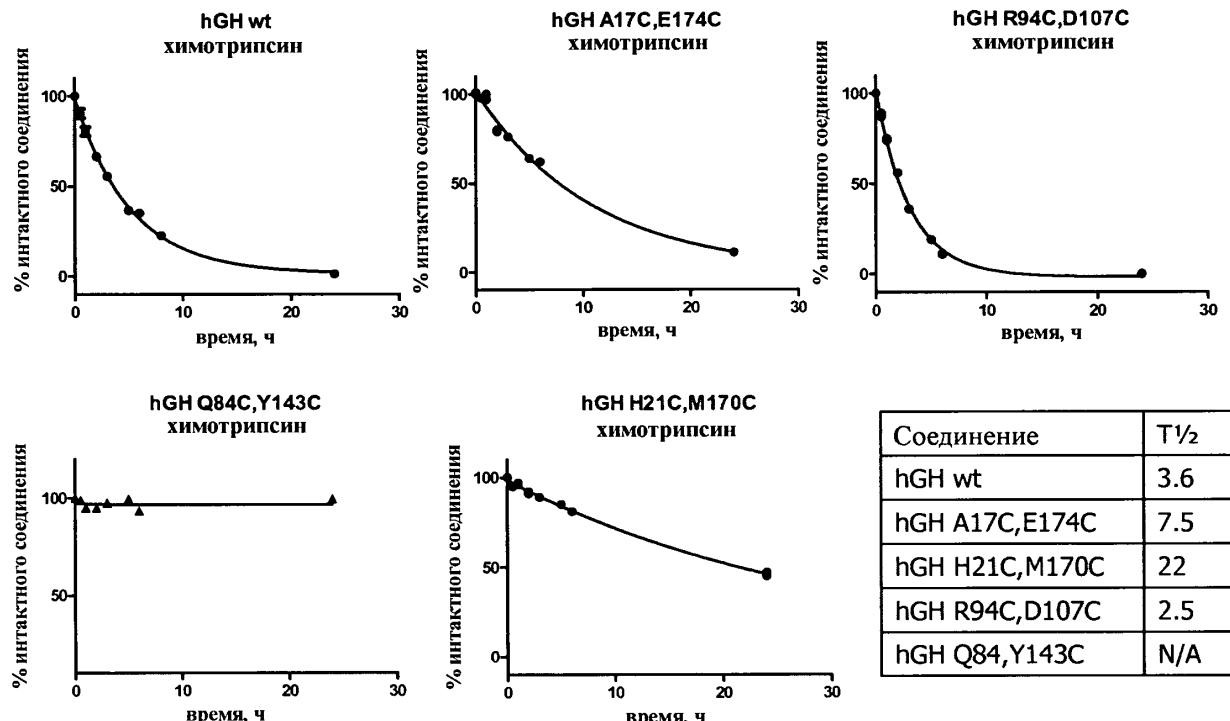


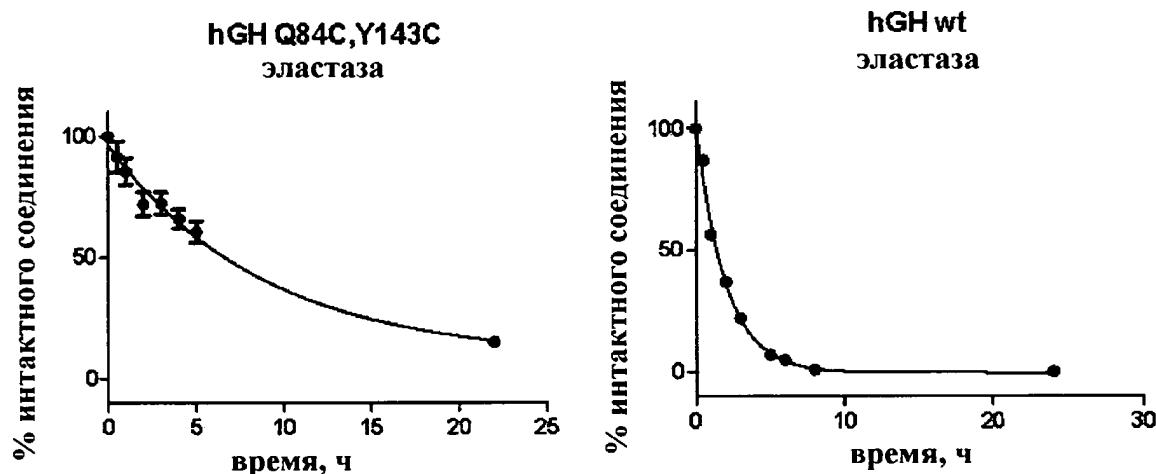
Fig. 1

1 FPTIP~~I~~SHIF~~I~~ DNAMRAHRL~~H~~ HOLAPDTYCE~~F~~ EEM~~H~~IPKEQ KYSFLQNPQT SLCFSEIPT  
 H1 L1  
 61 PSNREETQQK S~~N~~ E~~N~~ R~~E~~ T~~Q~~ Q~~K~~ K~~Q~~ L~~N~~ Q~~S~~ H~~R~~ L~~P~~ D~~T~~ Y~~C~~ E~~I~~ P~~K~~ E~~Q~~ K~~Y~~ S~~N~~ P~~G~~  
 H2 L2 H3  
 121 I~~O~~T~~T~~ M~~G~~ R~~E~~ L~~D~~ G~~S~~ P~~R~~ T~~G~~ Q~~I~~ F~~K~~ Q~~T~~ Y~~S~~ K~~F~~ D~~T~~ N~~S~~ H~~N~~ D~~A~~ L~~E~~ K~~N~~ Y~~G~~ I~~C~~ G~~P~~ R~~K~~ D~~M~~ K~~Y~~ E~~T~~ F~~L~~ R~~I~~ V~~Y~~  
 L3 H4  
 181 Q~~G~~ R~~S~~ V~~E~~ G~~S~~ C~~G~~ F

Фиг. 2



Фиг. 3A



Фиг. 3B