



등록특허 10-2444140



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월15일  
(11) 등록번호 10-2444140  
(24) 등록일자 2022년09월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 9/08* (2006.01) *A61K 38/24* (2019.01)  
*A61K 38/27* (2019.01) *A61K 47/02* (2006.01)  
*A61K 47/12* (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)  
*C07K 14/59* (2006.01) *C07K 14/61* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 9/08* (2013.01)  
*A61K 38/24* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7030424(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년10월21일  
심사청구일자 2021년09월23일
- (85) 번역문제출일자 2021년09월23일
- (65) 공개번호 10-2021-0118490
- (43) 공개일자 2021년09월30일
- (62) 원출원 특허 10-2016-7013555  
원출원일자(국제) 2014년10월21일  
심사청구일자 2018년07월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/IL2014/050910
- (87) 국제공개번호 WO 2015/059695  
국제공개일자 2015년04월30일
- (30) 우선권주장  
14/059,134 2013년10월21일 미국(US)  
14/309,496 2014년06월19일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현  
WO2013018098 A2  
KR1020120089445 A

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 최원철

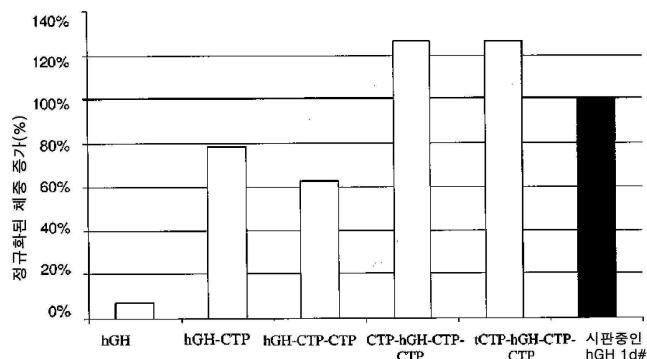
(54) 발명의 명칭 장시간-작용하는 폴리펩티드, 그의 생산 방법, 및 그의 투여 방법

**(57) 요약**

CTP-변성 인간 성장 호르몬 폴리펩티드, 이를 포함하는 약제학적 제형 및 약제학적 조성물, 이의 생산 방법, 그리고 이의 용도가 개시되어 있다.

**대 표 도** - 도2

체중 증가 비교 분석



(52) CPC특허분류

*A61K 38/27* (2013.01)  
*A61K 47/02* (2013.01)  
*A61K 47/12* (2013.01)  
*A61K 9/0019* (2013.01)  
*C07K 14/59* (2013.01)  
*C07K 14/61* (2013.01)  
*C07K 2319/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

완충액, 긴장성 제제, 및 융모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드(CTP)-변성 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리펩티드(a chorionic gonadotropin carboxy terminal peptide(CTP)-modified human growth hormone polypeptide)

를 포함하는, 약제학적 제형으로서,

상기 CTP-변성 hGH 폴리펩티드는 인간 성장 호르몬(hGH), 상기 인간 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 융모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드(CTP), 및 상기 인간 성장 호르몬의 카르복시 말단에 나란히 부착된 두 개의 융모 성선 자극 호르몬 CTP로 이루어지고,

상기 CTP-변성 hGH 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열식별번호 39의 27-301번 아미노산들로 표시되는 아미노산 서열이며,

상기 완충액은 10 mM 시트르산염이고,

상기 긴장성 제제는 147 mM 염화 나트륨이고,

상기 CTP-변성 hGH 폴리펩티드는 -20 내지 5°C에서 최대 24개월동안 안정적인,

약제학적 제형.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제형이 액체 제형인, 약제학적 제형.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 CTP-변형된 hGH 폴리펩티드의 98% 이상이 안정한 단량체인, 약제학적 제형.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 안정한 단량체가 SE-HPLC에 의해 측정된 것인, 약제학적 제형.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 CTP-변형된 hGH 폴리펩티드가 5 mg/ml 내지 40 mg/ml의 농도를 갖는 것인, 약제학적 제형.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, -20°C 내지 5°C에서 최대 24개월 동안의 상기 안정성이 RP-HPLC에 의해 측정된 것인, 약제학적 제형.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 제형은 pH가 6.2 내지 6.7인, 약제학적 제형.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 CTP 하나 이상이 글리코실화된 것인, 약제학적 제형.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 CTP 하나 이상이 링커를 통해 상기 성장 호르몬에 부착되고, 상기 링커가 펩티드 결합인, 약제학적 제형.

**청구항 10**

제1항에 있어서, 상기 CTP-변형된 hGH 폴리펩티드가 서열식별번호 45의 뉴클레오티드 89-913 또는 서열식별번호 45의 뉴클레오티드 11-913에 제시된 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인, 약제학적 제형.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제형은 성장 호르몬 요법을 필요로 하는 인간 개체를 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 것인, 약제학적 제형.

**청구항 12**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 개체에서  $\pm 2$  SDS(Standard Deviation Score; 표준편차점수)의 정상 치료 범위 내로 인슐린 유사 성장 인자(IGF-1) 수준을 증가시키거나 유지하기 위한 약제의 제조를 위한 것인, 약제학적 제형.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 IGF-1 수준이 2주 내지 6개월 동안 증가되거나 유지되는, 약제학적 제형

**청구항 14**

제12항에 있어서, 약제의 투여로 6개월 치료 후 중간 분석에 기초하여 적어도 14.37cm의 연간 신장 속도 증가를 달성하는, 약제학적 제형

**청구항 15**

제11항에 있어서, 상기 개체는 경험이 없는(naive) 개체인, 약제학적 제형

**청구항 16**

제11항에 있어서, 상기 개체가 인간 어린이인, 약제학적 제형.

**청구항 17**

제11항에 있어서, 상기 약제가 매주 1회 투여를 위한 것인, 약제학적 제형.

**청구항 18**

제11항에 있어서, 상기 제형이 0.66 mg/kg의 용량으로 주 1회 투여하기 위한 것인 약제학적 제형.

**청구항 19**

제11항에 있어서, 상기 개체가 성장 호르몬 결핍증을 갖는 개체인, 약제학적 제형.

**청구항 20**

제11항에 있어서, 상기 약제가 정맥내 또는 피하 투여용인, 약제학적 제형.

**청구항 21**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 약제학적 제형의 제조 방법으로서,

상기 약제학적 제형은 성장 호르몬 결핍증이 있는 개체에게 1주일에 1회 투여하기 위한 것이며,

상기 방법은

a) 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드(CTP)를 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착하고 2개의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드(CTP)를 상기 성장 호르몬의 카복시 말단에 나란히 부착하여 성장 호르몬을 변형시키는 단계;

b) 단계 a)에서 변형된 성장 호르몬을 완충액 및 긴장성 제제와 혼합하는 단계; 및

c) 주사기에 상기 제형을 미리 채우는 단계

를 포함하는, 제조 방법.

## 청구항 22

주사기를 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 약제학적 제형으로 채우는 방법으로서,

a) 미리 결정된 양의 CTP-변형된 hGH를 갖는 상기 CTP-변형된 hGH를 주 1회 투여량으로 제형화하는 단계; 및

b) 주사기를 상기 제형으로 채우는 단계

를 포함하는 방법.

## 청구항 23

주 1회 투여량 형태의, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 약제학적 제형.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

CTP-변성 인간 성장 호르몬 폴리펩티드, 이를 포함하는 약제학적 제형 및 약제학적 조성물, 이의 생산 방법, 및 이의 용도가 개시되어 있다.

### 배경 기술

[0002]

폴리펩티드는 혈액, 간 또는 신장에서 변성 또는 효소적 분해에 민감하다. 따라서, 폴리펩티드는 통상적으로 몇 시간의 짧은 순환 반감기를 갖는다. 그들의 낮은 안정성 때문에, 웨პ티드 약물은 일반적으로 활성 웨პ티드의 유효 플라즈마 농도를 유지하도록 지속적인 빈도로 전달된다. 또한, 웨პ티드 약물은 일반적으로 주입에 의해 투여되기 때문에, 웨პ티드 약물의 빈번한 주사는 피험자에게 상당한 불편을 유발한다.

[0003]

짧은 혈청 반감기와 같은 바람직하지 못한 약물 동력학은 많은 달리 유망한 약물 후보의 약제학적 개발을 방지 할 수 있다. 혈청 반감기는 분자의 경험적 특성이며, 각각의 새로운 잠재적 약물에 대해 실험적으로 결정되어야 한다. 예를 들면, 저 분자량 폴리펩티드 약물에 의해, 신장 여과와 같은 생리적 간극 메커니즘은 요구되는 투약 요법의 비용 또는 빈도 때문에 약물의 치료적 수준의 유지를 실행할 수 없게 한다. 반대로, 긴 혈청 반감기는 약물 또는 그의 대사산물이 독성 부작용을 갖는 경우에 바람직하지 않다.

[0004]

따라서, 그의 높은 약리학적 효능을 유지하면서 치료적 폴리펩티드의 반감기를 연장할 기술이 필요하다. 그러한 바람직한 웨პ티드 약물은 또한 피험자에게 주사될 때 증진된 혈청 안정성, 높은 활성 및 바람직하지 못한 면역 반응을 유도하는 낮은 확률의 요건을 충족해야 한다. 본 발명은 피험자에서 높은 약리학적 효능을 유지하면서, 및 증진된 혈청 안정성, 높은 활성 및 바람직하지 못한 면역 반응을 유도하는 낮은 확률을 가지면서 연장된 반감기를 갖는 CTP-변성 웨პ티드를 제공함으로써 이러한 필요성을 다룬다.

### 발명의 내용

[0005]

일 구현예에서, 본 발명은 완충제, 긴장성 제제, 및 성장 호르몬과 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨პ티드 (CTP) 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs으로 구성된 CTP-변성 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 제형에 관한 것이다. 일 구현예에서, 성장 호르몬은 인간 성장 호르몬이다. 일 구현예에서, 긴장성 제제는 염화 나트륨이다. 일 구현예에서, 긴장성 제제는 147 mM 염화 나트륨이다. 일 구현예에서, 상기 제형은 액체 제형이다. 일 구현예에서, 상기 제형은 약 6.2 내지 6.4의 pH에 있다.

[0006]

일 구현예에서, 본 발명은 성장 호르몬 결핍증인 피험자에게 1주에 1회 투여하기 위한 제형에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 성인이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 성장 호르몬 결핍 성인이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 아동이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 성장 호르몬 결핍 아동이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 성장 호르몬 결핍증인 피험자에게 1주에 1회 투여하기 위한 약제학적 제형을 제조하는 공정에 관한 것으로,

- [0007] 상기 공정은:
- [0008] a. 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs를 부착시킴으로써 성장 호르몬을 변성시키는 단계;
- [0009] b. 단계 a의 변성된 성장 호르몬을 6.2 내지 6.4의 pH에서 상기 완충제, 및 상기 긴장성 제제와 혼합하는 단계; 및
- [0010] c. 주사기를 상기 제형으로 미리-충전시키는 단계를 포함한다.
- [0011] 일 구현예에서, 본 발명은 성장 호르몬 결핍증인 피험자에게 1주에 1회 투여하기 위한 CTP-변성 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이며, 상기 CTP-변성 폴리펩티드는 성장 호르몬과 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨티드 (CTP) 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs으로 구성되어 있다. 일 구현예에서, 성장 호르몬은 인간 성장 호르몬이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 성인이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 성장 호르몬 결핍 성인이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 아동이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 성장 호르몬 결핍 아동이다.
- [0012] 일 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 약제학적 제형 또는 본 발명의 약제학적 조성물을 포함하는 1주에 1회 복용량 형태에 관한 것이다.
- [0013] 일 구현예에서, 본 발명은 주사기를 본원에 제공된 제형으로 충전시키는 공정에 관한 것으로:
- [0014] a. 소정량의 CTP-변성 hGH를 갖는 상기 CTP-변성 hGH의 1주에 1회 복용량 형태를 제형하는 단계; 및
- [0015] b. 상기 주사기를 상기 제형으로 충전시키는 단계를 포함한다.
- [0016] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 다음의 상세한 설명, 실시예 및 도면으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 본 발명의 사상 및 범위 내에서 다양한 변화 및 변형이 당업자에게 명백해질 것이기 때문에, 상세한 설명 및 본 발명의 바람직한 구현예들을 나타내는 구체적인 실시예들은 단지 예시적으로 주어진 것임이 이해되어야 한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0017] 다음 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 발명의 특정 양태를 추가로 나타내도록 포함되는 것으로, 본 발명은 본 명세서에 제공된 특정 구현예들의 상세한 설명과 조합하여 하나 이상의 이들 도면을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다. 특히 및 출원 과일은 컬러로 실행된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)이 있는 이러한 특히 또는 특히 출원 공보의 사본은 요청 및 필요한 수수료의 납부 시에 특허청에 의해 제공될 것이다.
- 도 1은 MOD-4020 (서열식별번호: 36), MOD-4021 (서열식별번호: 37), MOD-4022 (서열식별번호: 38), MOD-4023 (서열식별번호: 39) 및 MOD-4024 (서열식별번호: 40)의 문자량 및 정체성을 예시하는 웨스턴 블로트이다. A PAGE SDS 겔은 단일 클론 항-hGH 항체를 사용하여 블로팅하고 염색하였다. 사진은 시판중인 야생형 hGH처럼, MOD-7020-4 변이체이 항-hGH 항체에 의해 인식됨을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 GH-CTP 폴리펩티드의 투여후 뇌하수체 절제된 쥐들의 체중 증가를 예시하는 막대 그래프이다.
- 도 3은 (1) CTP-hGH-CTP-CTP pCI-dhfr 플라스미드의 지도 및 (2) CTP-hGH-CTP-CTP의 구조 단백질 식의 2개의 스킴을 포함한다.
- 도 4는 쥐들에서 CTP-hGH-CTP-CTP 또는 GH의 단일 정맥내 또는 피하 투약 후 평균 플라즈마 CTP-hGH-CTP-CTP 또는 GH 농도 (pg/ml)를 보여주는 그래프이다 (n은 투약량/경로 당 3 내지 6 마리).
- 도 5는 매일 GH 주사 (0.1 mg/Kg/1일)에 비교하여 뇌하수체 절제된 쥐들에서 CTP-hGH-CTP-CTP의 단일 피하 투약 (0.4, 0.8 및 4 mg/Kg) 후 평균 증분의 체중 증가를 보여주는 그래프이다 (n은 투약량당 10 마리).
- 도 6은 CTP-hGH-CTP-CTP의 단일 주사 후 곡선 아래 면적은 쥐들에서 체중 증가와 상관 관계가 있음을 보여주는 그래프이다.
- 도 7은 매일 GH 주사 (0.1 mg/Kg/1일)에 비교하여 뇌하수체 절제된 쥐들에서 4일 간격으로 CTP-hGH-CTP-CTP의 피하 투약 (0.4, 0.8 및 4 mg/Kg) 후 증분의 체중 증가를 보여주는 그래프이다 (n은 투약량당 10 마리이다).
- 도 8은 뇌하수체 절제된 쥐들에서 CTP-hGH-CTP-CTP 및 시판중인 hGH의 피하 주사 후 hGH 혈청 농도를 보여주는

그래프이다. CTP-hGH-CTP-CTP 0.6 또는 1.8 mg/Kg 및 바이오토로핀(Biotropin) 0.35 또는 1.05 mg/Kg의 단일 투약량은 PK/PD 프로필의 측정을 위해 뇌하수체 절제된 쥐들에게 피하로 주사되었다. 주사 후 혈청 hGH는 특정 ELISA 키트를 사용하여 측정되었다.

도 9는 뇌하수체 절제된 쥐들에서 CTP-hGH-CTP-CTP 및 시판중인 hGH의 피하 주사 후 IGF-1 혈청 레벨을 보여주는 그래프이다. CTP-hGH-CTP-CTP 0.6 또는 1.8 mg/Kg 및 바이오토로핀 0.35 또는 1.05 mg/Kg의 단일 투약량은 PK/PD 프로필의 측정을 위해 뇌하수체 절제된 쥐들에게 피하로 주사되었다. 주사 후 혈청 IGF-1은 특정 ELISA 키트(Roche Diagnostics)를 사용하여 측정되었다.

도 10은 단계 II 연구 설계의 예시를 보여준다.

도 11은 4주차 투약 후 IGF-1 SDS - 모든 코호트를 보여준다.

도 12는 성장 호르몬 결핍 성인에게 MOD-4023의 피하 투여 후(단계 I; 4번째 주사 후) IGF-1 플라즈마 농도에서 기준선으로부터의 평균 변화를 보여준다.

도 13은 4 개월 연장 연구 동안 평균 IGF-1 레벨(투약 후 4일째에 측정됨)을 보여준다(52명의 환자).

도 14는 MOD-4023의 단계 II 임상 연구의 개략도이다.

도 15는 (A); 평균 MOD-4023 매주 PK 프로필, 및 (B); 평균 hGH 매일 PK 프로필을 보여주는 그래프이다.

도 16은 MOD-4023 소아 단계 II, 6 개월 평균 IGF-1 SDS 프로필을 보여주는 그래프이다.

도 17은 각각의 최종 투약량에서 2주차 동안 MOD-4023 소아 단계 2, IGF-1 BP-3 프로필을 보여주는 그래프이다.

도 18은 MOD-4023 소아 단계 II-6 개월 평균 IGF-1 BP-3 프로필을 보여주는 그래프이다.

도 19는 6개월 치료를 완료한 모든 환자들에 대해 MOD-4023 소아 단계 II HV 결과 6 개월 연간 계산된 높이 속도를 보여주는 그래프이다.

도 20은 (A); MOD-4023 소아 단계 II 사전-연구 HV SDS 결과 및 (B); 6 개월 HV SDS 결과를 보여주는 그래프이다.

도 21은 각각의 최종 투약량에서 MOD-4023 소아 단계 II- PD (IGF-1 SDS) 프로필을 보여주는 그래프이다.

도 22는 Δ 높이 SDS를 보여주는 그래프이다.

도 23은 최종 투약량에서 기준선으로부터 MOD-4023 소아 단계 II- IGF-1 변화를 보여주는 그래프이다.

도 24는 pH 6에서 10 mM 시트르산염, 147 mM NaCl에서 생산된 비-GMP 및 GMP 배취를 보여주는 표이다.

도 25a는 -20°C에서 클론 2 MOD-4023 RP-HPLC 안정성을 보여주는 그래프이다.

도 25b는 5°C에서 클론 2 MOD-4023 RP-HPLC 안정성을 보여주는 그래프이다.

도 26은 25°C에서 클론 2 MOD-4023 RP-HPLC 안정성을 보여주는 그래프이다.

도 27a는 -20°C(RP-HPLC)에서 클론 28(Xcellerex) 안정성을 보여주는 그래프이다.

도 27b는 5°C(RP-HPLC)에서 클론 28(Xcellerex) 안정성을 보여주는 그래프이다.

도 28a는 25°C(RP-HPLC)에서 클론 28(Xcellerex) 안정성을 보여주는 그래프이다.

도 28b는 5°C(RP-HPLC)에서 클론 2 및 28 안정성 프로필의 비교를 보여주는 그래프이다.

도 29는 Xcellerex(XC)로부터 제조되는 MOD-4023의 Rentschler(RB)로의 전송을 보여주는 표이다.

도 30a는 Rentschler(RB)와 Xcellerex(XCLX) 사이의 RP-HPLC 안정성 결과에서의 차이 - 메인 피크를 보여주는 그래프이다.

도 30b는 GMP1(RB)의 메인 피크 안정성 결과를 보여주는 표이다.

도 30c는 XCLX(RB에서 시험됨)의 메인 피크 안정성 결과를 보여주는 표이다.

도 31a는 Rentschler(RB)와 Xcellerex(XCLX) 사이의 RP-HPLC 안정성 결과에서의 차이 - 피크 3를 보여주는 그래프이다.

도 31b는 GMP1(RB)의 피크 3 안정성 결과를 보여주는 표이다.

도 31c는 XCLX(RB에서 시험됨)의 피크 3 안정성 결과를 보여주는 표이다.

도 32a는 Rentschler(RB)와 Xcellerex(XCLX) 사이의 RP-HPLC 안정성 결과에서의 차이 - 피크 5를 보여주는 그레프이다.

도 32b는 GMP1(RB)의 피크 5 안정성 결과를 보여주는 표이다.

도 32c는 XCLX(RB에서 시험됨)의 피크 5 안정성 결과를 보여주는 표이다.

도 33a는 25°C RP-HPLC, 배추 GMP Xcellerex에서 3 개월 후 안정성 결과를 보여주는 그레프이다. 피크 7은 XC 물질에서 관찰되지 않았다.

도 33b는 RP-HPLC, 배추 GMP-1, Rentschler에서 안정성 결과를 보여주는 그레프이다. XC 물질에서 관찰되지 않은 피크 7이 25°C에서 2주 후에 나타난다.

도 34는 25°C에서 3 개월 후 RP-HPLC 안정성 GMP-1을 보여주는 그레프이다. 화살표는 XC 물질에서 관찰되지 않은 새로운 피크(7)을 지시한다.

도 35a는 MOD-4023 배추의 IEF 프로필을 보여준다. 3.5 내지 4.2의 pI-값 범위에서 유사한 밴드 패턴이 있다. 하나의 XCLX 배추에서 높은 pI 경계에서 더 적은 희미한 이소폼이 있다. RB 배추에서 낮은 pI 경계에서 더 많은 희미한 이소폼이 있다.

도 35b는 RB 및 XCLX (25°C에서 3 개월)로부터 안정성 결과 (IEF)를 보여준다. XCLX 샘플에서 더 확산된 밴드.

도 36a 내지 36d는 피크의 % (클론 2)에 대한 고온의 효과를 보여준다(도 36a-메인 피크; 도 36d). 두 피크(3 및 5)의 형성은 온도 의존적이고 고온에서 가속화된다(도 36b 및 도 36c).

도 37a 내지 37d는 피크의 %(클론 2)에 대한 pH의 효과를 보여준다(도 37a-메인 피크; 도 37d). 피크 3: pH=4에서 5일 이하 및 pH=12에서 2시간 이하 동안 인큐베이션 후 피크의 %에서 어떠한 변화도 없었다 (도 37b). 피크 5: pH=4에서 6시간 이하 동안 인큐베이션 후 피크의 %에서 어떠한 변화도 없었다. 그러나, 6시간 후 피크 %에서 급격한 증가가 관찰되었다. 2시간 이하 동안 pH 12에서 인큐베이션 후 - 피크가 사라졌다(도 37c).

도 38은 Rentschler (클론 28)에서 강제된 분해 연구를 보여준다. 천연 (위) 및 스트레스받은 (아래) MOD-4023 약물 기질의 줌의 오버레이. 피크가 스트레스받지 않은 샘플에 대해 LOQ의 아래에 있을 때 MOD-4023 (CTP-hGH-CTP-CTP) 약물 기질의 스트레스 받은 샘플이 MOD-4023 약물 기질에서 관련된 형태 5의 분석을 위해 (65°C에서 약 3일동안) 제조되었다.

도 39는 RP-HPLC 관련된 형태에 대한 pH 효과를 보여준다. 시험된 샘플: RB - 40 mg/ml, pH=5.9; RB - 10 mg/ml, pH=6.2; XCLX - 40 mg/ml, pH=6.2.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018]

본 출원은 2013년 10월 21일자로 출원된 미국 특허 출원 번호 US-2014-0113860-A1호의 이점을 청구하고, 2014년 6월 19일자로 출원된 미국 특허 출원 일련 번호 14/309,496의 이점을 청구한다. 이들 출원은 본원에 그들의 전문으로서 참고 문헌으로 이에 인용된다.

[0019]

일 구현예에서, 본 발명은 완충제, 긴장성 제제, 및 성장 호르몬과 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨პ티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs으로 구성된 CTP-변성 폴리웨პ티드를 포함하는 약제학적 제형에 관한 것이다.

[0020]

일 구현예에서, 본 발명은 성장 호르몬 결핍증인 피험자에게 1주에 1회 투여하기 위한 제형에 관한 것이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 성인이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 성장 호르몬 결핍 성인이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 아동이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 성장 호르몬 결핍 아동이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 약제학적 성장 호르몬 결핍증인 피험자에게 1주에 1회 투여하기 위한 제형을 제조하는 공정에 관한 것으로, 상기 공정은:

[0021]

a. 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨პ티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs를 부착시킴으로써 성장 호르

몬을 변성시키는 단계;

[0022] b. 단계 a의 변성된 성장 호르몬을 6.2 내지 6.4의 pH에서 상기 완충제, 및 상기 긴장성 제제와 혼합하는 단계; 및

[0023] c. 주사기를 상기 제형으로 미리-충전시키는 단계를 포함한다.

[0024] 일 구현예에서, 본 발명은 주사기를 본원에 제공된 제형으로 충전시키는 공정에 관한 것으로:

[0025] a. 소정량의 CTP-변성 hGH를 갖는 상기 CTP-변성 인간 성장 호르몬 (hGH)의 1주에 1회 복용량 형태를 제형하는 단계; 및

[0026] b. 상기 주사기를 상기 제형으로 충전시키는 단계를 포함한다.

[0027] 일 구현예에서, 본 발명은 장시간-작용하는 폴리펩티드, 그의 생산 방법 및 그의 용도를 기재한다. 또 다른 구현예에서, 장시간-작용하는 폴리펩티드는 인간 용모 성선 자극 호르몬(hCG)의 카르복시 말단 웨프티드(CTP)를 포함한다. 또 다른 구현예에서, CTP는 단백질 또는 이로부터 유도된 웨프티드의 분해에 대한 보호제로서 작용한다. 또 다른 구현예에서, CTP는 단백질 또는 이로부터 유도된 웨프티드의 순환 반감기를 연장한다. 몇몇 구현예에서, CTP는 단백질 또는 이로부터 유도된 웨프티드의 효능을 증진시킨다.

[0028] 또 다른 구현예에서, "CTP 웨프티드," "카르복시 말단 웨프티드," "CTP 서열," 및 "용모 성선 자극 호르몬 C-말단 웨프티드"는 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용된다. 또 다른 구현예에서, 카르복시 말단 웨프티드는 전체 길이 CTP이다. 또 다른 구현예에서, 카르복시 말단 웨프티드는 절삭된 CTP이다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 구현예를 나타낸다.

[0029] 또 다른 구현예에서, "신호 서열" 및 "신호 웨프티드"는 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용된다. 또 다른 구현예에서, 폴리뉴클레오티드를 참조할 때의 "서열"은 코딩 부분을 의미할 수 있다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 구현예를 나타낸다.

[0030] 또 다른 구현예에서, "관심 웨프티드" 및 "관심 폴리펩티드 서열"은 본 명세서에서 상호 교환적으로 사용된다. 또 다른 구현예에서, 관심 웨프티드는 전체 길이 단백질이다. 또 다른 구현예에서, 관심 웨프티드는 단백질 단편이다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 구현예를 나타낸다.

[0031] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 단일 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드, 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드로 구성된 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 제형을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 단일 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드, 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드, 및 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드의 아미노 말단에 부착된 신호 웨프티드로 구성된 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 제형을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 제형은 완충제 및 긴장성 제제를 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 완충제는 10mM 시트르산염이고 긴장성 제제는 147 mM NaCl이다. 일 구현예에서, 제형은 약 6.0의 pH에 있다. 또 다른 구현예에서, 제형은 약 6.2의 pH에 있다. 또 다른 구현예에서, 제형은 약 6.4의 pH에 있다. 또 다른 구현예에서, 제형은 약 6.0 내지 6.4의 pH 범위에 있다. 일 구현예에서, 완충제는 10mM 시트르산염이고, 긴장성 제제는 147 mM NaCl이며, pH는 6.0이다. 또 다른 구현예에서, 제형은 액체 제형이다.

[0032] 또 다른 구현예에서, 본원에 제공된 약제학적 제형을 포함하는 1주에 1회 복용량 형태가 본원에 제공된다.

[0033] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 단일 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드, 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드로 구성된 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 단일 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드, 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드, 및 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드의 아미노 말단에 부착된 신호 웨프티드로 구성된 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0034] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 것과 같이 CTPs를 포함하는 성장 호르몬은 CTPs가 없는 동일한 성장 호르몬에 비교하여 생체내 생물학적 활성을 증진시켰다. 또 다른 구현예에서, 그의 아미노 말단에 부착된 적어도 하나의 CTP 및 그의 카르복시 말단에 부착된 적어도 2개의 CTPs를 포함하는 성장 호르몬은 CTPs가 없는 동일한 성장

호르몬에 비교하여 생체내 생물학적 활성을 증진시켰다. 또 다른 구현예에서, 그의 아미노 말단에 부착된 하나의 CTP 및 그의 카르복시 말단에 부착된 2개의 CTPs를 포함하는 성장 호르몬은 CTPs가 없는 동일한 성장 호르몬에 비교하여 생체내 생물학적 활성을 증진시켰다.

[0035] 또 다른 구현예에서, 적어도 2개의 CTP 서열의 제1 CTP 서열이 관심 폴리펩티드 서열의 아미노 말단에 부착되고, 적어도 2개의 CTP 서열의 제2 CTP 서열이 관심 폴리펩티드 서열의 카르복시 말단에 부착되는, 관심 폴리펩티드 서열에 부착된 용모 성선 자극 호르몬의 적어도 2개의 카르복시-말단 웹티드 (CTP) 서열을 포함하는 폴리펩티드가 제공된다. 또 다른 구현예에서, 카르복시-말단 웹티드 (CTP) 서열은 인간 용모 성선 자극 호르몬이다.

[0036] 또 다른 구현예에서, 피험자는 인간 피험자이다. 일 구현예에서, 인간 피험자는 성장 호르몬 결핍이다. 일 구현예에서, 피험자는 성장 호르몬 결핍이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 애완 동물이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 포유 동물이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 농장 동물이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 개이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 고양이이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 원숭이이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 말이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 소이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 생쥐이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 쥐이다. 일 구현예에서, 피험자는 남성이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 여성이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 성장 호르몬 결핍 (GHD) 성인이다. 또 다른 구현예에서, 피험자는 사춘기 전 성장 호르몬 결핍 (GHD) 아동이다. 본원에 나타낸 것과 같이, 다양한 투약량의 MOD-4023 (CTP-hGH-CTP-CTP)는 사춘기-전 아동에서 우수한 따라 잡기 성장 반응을 제공하였다 (실시예 10 참조).

[0037] 어구 "관심 폴리펩티드 서열"은 또 다른 구현예에서 생물학적 활성을 포함하는 것과 같은 임의의 폴리펩티드 서열을 의미한다. 또 다른 구현예에서, 웹티드는 글리코실화된다. 또 다른 구현예에서, 웹티드는 글리코실화되지 않는다. 그들의 순환 반감기의 연장으로 혜택을 받는 폴리펩티드의 예는 에리트로포이에틴 (EPO), 인터페론, 인간 성장 호르몬 (hGH) 및 글루카곤-유사 웹티드-1(GLP-1)을 포함하지만, 이들로만 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 폴리펩티드는 성장 호르몬 (GH)이다. 또 다른 구현예에서, 폴리펩티드는 인간 성장 호르몬 (hGH)이다.

[0038] 일 구현예에서, 본원에 기재된 것과 같은 CTP- 성장 호르몬-CTP-CTP의 구성은 링커를 통해 적어도 하나의 CTP 단위에 연결된 성장 호르몬 또는 그의 활성 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 링커는 웹티드 결합이다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 것과 같은 CTP- 성장 호르몬-CTP-CTP의 구성은 웹티드 결합을 통해 적어도 하나의 CTP 단위에 연결된 성장 호르몬 또는 그의 활성 단편을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 것과 같은 CTP- 성장 호르몬 -CTP-CTP는 웹티드 결합을 통해 추가의 CTP 단위에 연결되는 적어도 하나의 CTP 단위에 웹티드 결합을 통해 연결된 성장 호르몬 또는 그의 활성 단편을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 그의 성장 호르몬 단편 및 CTP 단위 및/또는 그의 단편을 포함하는 본원에 기재된 것과 같은 폴리펩티드는 웹티드 결합을 통해 상호 연결된다. 또 다른 구현예에서, 하나의 핵산 분자는 성장 호르몬 및/또는 그의 단편 및 CTP 단위 및/또는 그의 단편을 포함하는 본원에 기재된 것과 같은 폴리펩티드를 인코딩한다.

[0039] 또 다른 구현예에서, 카르복시-말단 웹티드(CTP)는 링커를 통해 관심 폴리펩티드 서열에 부착된다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 CTP는 링커를 통해 상기 관심 폴리펩티드 서열에 임의로 부착된다. 또 다른 구현예에서, CTP 서열을 관심 폴리펩티드 서열에 연결하는 링커는 공유 결합이다. 또 다른 구현예에서, CTP 서열을 관심 폴리펩티드 서열에 연결하는 링커는 웹티드 결합이다. 또 다른 구현예에서, CTP 서열을 관심 폴리펩티드 서열에 연결하는 링커는 치환된 웹티드 결합이다. 또 다른 구현예에서, 카르복시-말단 웹티드 (CTP) 서열은 서열식별번호: 48에 나타낸 서열들로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0040] 또 다른 구현예에서, 서열식별번호: 48은 다음 아미노산 (AA) 서열을 포함한다: DPRFQDSSSKAPPSLPSRSLPGPSDTPILQ (서열식별번호: 48).

[0041] 또 다른 구현예에서, 인간 용모 성선 자극 호르몬 (hCG)의 카르복시 말단 웹티드 (CTP)는 단백질에 융합된다. 또 다른 구현예에서, 인간 용모 성선 자극 호르몬 (hCG)의 카르복시 말단 웹티드 (CTP)는 상기 단백질의 웹티드에 융합된다. 일 구현예에서, 단백질 또는 그의 웹티드는 성장 호르몬이다. 일 구현예에서, 단백질 또는 그의 웹티드는 인간 성장 호르몬이다. 또 다른 구현예에서, 인간 hCG의 카르복시 말단 웹티드 (CTP)은 당단백질에 융합된다. 또 다른 구현예에서, hCG의 카르복시 말단 웹티드 (CTP)는 당단백질 호르몬에 융합된다. 또 다른 구현예에서, hCG의 CTP는 당단백질 호르몬으로부터 유도된 웹티드에 융합된다. 몇몇 구현예에서, 당단백질 호르몬은 EPO, FSH, 또는 TSH 및 이들로부터 유도된 웹티드들을 포함한다.

[0042] 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단 및 폴리펩티드의 카르복시 말단 모두에서 CTP 서열은 단백질의 분

해에 대한 증진된 보호를 제공한다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단 및 폴리펩티드의 카르복시 말단 모두에서 CTP 서열은 부착된 단백질에 대한 연장된 반감기를 제공한다.

[0043] 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단에서 CTP 서열, 폴리펩티드의 카르복시 말단에서 CTP 서열, 및 카르복시 말단에서 CTP 서열에 나란히 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 단백질의 분해에 대한 증진된 보호를 제공한다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단에서 CTP 서열, 폴리펩티드의 카르복시 말단에서 CTP 서열, 및 카르복시 말단에서 CTP 서열에 나란히 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 부착된 단백질에 대한 연장된 반감기를 제공한다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단에서 CTP 서열, 폴리펩티드의 카르복시 말단에서 CTP 서열, 및 카르복시 말단에서 CTP 서열에 나란히 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 부착된 단백질의 증진된 활성을 제공한다.

[0044] 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단에서 CTP 서열, 폴리펩티드의 카르복시 말단에서 CTP 서열, 및 아미노 말단에서 CTP 서열에 나란히 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 부착된 단백질의 분해에 대한 증진된 보호를 제공한다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단에서 CTP 서열, 폴리펩티드의 카르복시 말단에서 CTP 서열, 및 아미노 말단에서 CTP 서열에 나란히 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 부착된 단백질에 대한 연장된 반감기를 제공한다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단에서 CTP 서열, 폴리펩티드의 카르복시 말단에서 CTP 서열, 및 아미노 말단에서 CTP 서열에 나란히 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 부착된 단백질의 증진된 활성을 제공한다.

[0045] 몇몇 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단 및 성장 호르몬의 카르복시 말단 모두에서 CTP 서열은 성장 호르몬의 분해에 대한 증진된 보호를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에서 적어도 하나의 CTP 서열 및 성장 호르몬의 카르복시 말단 내의 2개의 CTP 단위는 간극에 대한 증진된 보호를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에서 적어도 하나의 CTP 서열 및 성장 호르몬의 카르복시 말단 내의 2개의 CTP 단위는 연장된 간극 시간을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에서 적어도 하나의 CTP 서열 및 성장 호르몬의 카르복시 말단 내의 2개의 CTP 단위는 성장 호르몬의  $C_{max}$ 를 증진시킨다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에서 적어도 하나의 CTP 서열 및 성장 호르몬의 카르복시 말단 내의 2개의 CTP 단위는 성장 호르몬의  $T_{max}$ 를 증진시킨다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에서 적어도 하나의 CTP 서열 및 성장 호르몬의 카르복시 말단 내의 2개의 CTP 단위는  $T1/2$ 를 증진시켰다.

[0046] 몇몇 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단 및 성장 호르몬의 카르복시 말단 모두에서 CTP 서열은 변성된 성장 호르몬의 반감기를 연장시킨다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에서 적어도 단일 CTP 서열 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에서 적어도 2개의 CTP 서열은 변성된 성장 호르몬에 대한 연장된 반감기를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에서 단일 CTP 서열 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에서 2개의 CTP 서열은 부착된 성장 호르몬에 대한 연장된 반감기를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에서 단일 CTP 서열 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에서 나란히 있는 2개의 CTP 서열은 변성된 성장 호르몬에 대한 연장된 반감기를 제공한다.

[0047] 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드의 아미노 말단에서 CTP 서열, 성장 호르몬의 카르복시 말단에서 CTP 서열, 및 카르복시 말단에서 CTP 서열에 나란히 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 성장 호르몬의 분해에 대한 증진된 보호를 제공한다. 몇몇 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에서 CTP 서열, 성장 호르몬의 카르복시 말단에서 CTP 서열, 및 카르복시 말단에서 CTP 서열에 나란히 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 성장 호르몬의 반감기를 연장한다. 몇몇 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에서 CTP 서열, 성장 호르몬의 카르복시 말단에서 CTP 서열, 및 카르복시 말단에서 CTP 서열에 나란히 부착된 적어도 하나의 추가의 CTP 서열은 성장 호르몬의 생물학적 활성을 증진시킨다.

[0048] 일 구현예에서, 적어도 하나의 CTP의 서열은 서열식별번호: 17 및 서열식별번호: 18로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성되어 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 카르복시 말단 웨티드 (CTP) 웨티드는 서열식별번호: 17에 나타낸 바와 같이 아미노산 112에서 인간 용모 성선 자극 호르몬의 위치 145까지의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 서열식별번호: 18에 나타낸 바와 같이 아미노산 118에서 인간 용모 성선 자극 호르몬의 위치 145까지의 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, CTP 서열은 또한 112 내지 118 사이의 임의의 위치에서 시작하여 인간 용모 성선 자극 호르몬의 위치 145에서 종결된다. 몇몇 구현예에서, CTP 서열 웨티드는 28, 29, 30, 31, 32, 33 또는 34 아미노산 길이이고, CTP 아미노산 서열의 위치 112, 113, 114, 115, 116, 117 또는 118에서 시작한다.

- [0049] 또 다른 구현예에서, CTP 펩티드는 미국 특허 제5,712,122호에 기재된 것과 같은 1 내지 5회의 보존적 아미노산 치환에 의해 천연 CTP와는 다른 용모 성선 자극 호르몬 CTP의 변이체이다. 또 다른 구현예에서, CTP 펩티드는 1 회의 보존적 아미노산 치환에 의해 천연 CTP와는 다른 용모 성선 자극 호르몬 CTP의 변이체이다. 또 다른 구현 예에서, CTP 펩티드는 2회의 보존적 아미노산 치환에 의해 천연 CTP와는 다른 용모 성선 자극 호르몬 CTP의 변 이체이다. 또 다른 구현예에서, CTP 펩티드는 3회의 보존적 아미노산 치환에 의해 천연 CTP와는 다른 용모 성선 자극 호르몬 CTP의 변이체이다. 또 다른 구현예에서, CTP 펩티드는 4회의 보존적 아미노산 치환에 의해 천연 CTP와는 다른 용모 성선 자극 호르몬 CTP의 변이체이다. 또 다른 구현예에서, CTP 펩티드는 5회의 보존적 아미 노산 치환에 의해 천연 CTP와는 다른 용모 성선 자극 호르몬 CTP의 변이체이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 아미노산 서열은 천연 CTP 아미노산 서열 또는 그의 펩티드에 대해 적어도 70% 상동성이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 아미노산 서열은 천연 CTP 아미노산 서열 또는 그의 펩티드에 대해 적어도 80% 상동성이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 아미노산 서열은 천연 CTP 아미노산 서열 또는 그의 펩티드에 대해 적어도 90% 상동성이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 아미노산 서열은 천연 CTP 아미노산 서열 또는 그의 펩티드에 대해 적어도 95% 상동성이다.
- [0050] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 DNA 서열은 천연 CTP DNA 서열 또는 그의 펩티드에 대해 적어도 70% 상동성이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 DNA 서열은 천연 CTP DNA 서열 또는 그의 펩티드에 대해 적어도 80% 상동성이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 DNA 서열은 천연 CTP DNA 서열 또는 그의 펩티드에 대해 적어도 90% 상동성이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 펩티드 DNA 서열은 천연 CTP DNA 서열 또는 그의 펩티드에 대해 적어도 95% 상동성이다.
- [0051] 일 구현예에서, 용모 성선 자극 호르몬 CTP 아미노산 서열들 중의 적어도 하나는 절삭된다. 또 다른 구현예에서, 용모 성선 자극 호르몬 CTP 아미노산 서열들 둘 다는 절삭된다. 또 다른 구현예에서, 용모 성선 자극 호르몬 CTP 아미노산 서열들의 2개 이상은 절삭된다. 또 다른 구현예에서, 용모 성선 자극 호르몬 CTP 아미노산 서열 모두는 절삭 된다. 일 구현예에서, 절삭된 CTP는 서열식별번호: 18의 최초 10개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절삭된 CTP는 서열식별번호: 18의 최초 11개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절삭된 CTP는 서열식별번호: 18의 최초 12개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절삭된 CTP는 서열식별번호: 18의 최초 13개의 아미노 산을 포함한다. 일 구현예에서, 절삭된 CTP는 서열식별번호: 18의 최초 14개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절삭된 CTP는 서열식별번호: 18의 최초 15개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절삭된 CTP는 서열식별번호: 18의 최초 16개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절삭된 CTP는 서열식별번호: 18의 최종 14개의 아미노산을 포함한다.
- [0052] 일 구현예에서, 용모 성선 자극 호르몬 CTP 아미노산 서열들 중의 적어도 하나는 글리코실화된다. 또 다른 구현 예에서, 용모 성선 자극 호르몬 CTP 아미노산 서열들 둘 다는 글리코실화된다. 또 다른 구현예에서, 용모 성선 자극 호르몬 CTP 아미노산 서열들 중의 2개는 글리코실화된다. 또 다른 구현예에서, 용모 성선 자극 호르몬 CTP 아미노산 서열들 모두는 글리코실화된다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 2개의 글리코실화 부위를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 3개의 글리코실화 부위를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 4개의 글리코실화 부위를 포함한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 구현예를 나타낸다.
- [0053] 몇몇 구현예에서, 본 발명에 따른 "상동성"은 또한 그의 아미노산 치환 및 그의 생물학적으로 활성 폴리펩티드 단편을 포함하여 결실, 삽입, 또는 치환 변이체를 포함한다.
- [0054] 몇몇 구현예에서, 인간 성장 호르몬(hGH)은 본 발명의 교시에 따라 이용된다. 몇몇 구현예에서, hGH 단백질의 아미노 및 카르복시 말단 모두에 대한 CTP 서열의 부착은 증가된 효능을 초래한다(도 2, 3, 5, 7 및 9). 몇몇 구현예에서, hGH 단백질의 아미노 및 카르복시 말단 모두에 대한 CTP 서열의 부착은 연장된 생체내 활성을 초래 한다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP-hGH 폴리펩티드는 서열식별번호: 39- 41에 나타낸다.
- [0055] 본원에 제공된 바와 같이, 성장 증가는 CTP-hGH의 주사 후 뇌하수체 절제된 쥐들에서 (어떠한 성장 호르몬 분비도 없음) 입증되었다. 본원에 추가로 제공된 바와 같이, 환자의 따라 잡기 성장과 우수한 상관 관계를 갖는 성장 증가는 사춘기-전 성장 호르몬 결핍 아동에서 입증되었다 (본원에서 실시예 10 참조).
- [0056] 일 구현예에서, 사춘기-전 성장 호르몬 결핍 아동의 정상적인 성장 회복을 달성하는 방법이 본원에 제공되고, 그 방법은 본원에 제공된 CTP-변성 성장 호르몬을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 또

다른 구현예에서, 사춘기-전 성장 호르몬 결핍 아동의 성장 회복을 달성하는 방법이 본원에 제공되고, 그 방법은 본원에 제공된 CTP-변성 성장 호르몬을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0057] 일 구현예에서, 어구 "인간 성장 호르몬" (hGH)은 hGH 활성(즉, 성장의 자극)을 나타내는, Genbank 수탁 번호 P01241 (서열식별번호: 47)에 나타낸 것과 같은 폴리펩티드를 의미한다.

또 다른 구현예에서, "인간 성장 호르몬" (hGH)은 hGH 활성(즉, 성장의 자극)을 나타내는, Genbank 수탁 번호 P01241에 나타낸 것과 같은 폴리펩티드를 의미한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 "GH"는 또한 상동성을 의미한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법 및 조성물의 GH 아미노산 서열은 디풀트 파라미터를 사용하는 the National Center of Biotechnology Information (NCBI)의 BlastP 소프트웨어를 사용하여 측정된 바와 같이 본원에 나타낸 GH 서열에 대해 적어도 50% 상동성이다. 또 다른 구현예에서, 상동성 백분율은 60%이다. 또 다른 구현예에서, 상동성 백분율은 70%이다. 또 다른 구현예에서, 상동성 백분율은 80%이다. 또 다른 구현예에서, 상동성 백분율은 90%이다. 또 다른 구현예에서, 상동성 백분율은 적어도 95%이다. 또 다른 구현예에서, 상동성 백분율은 95%를 초과한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 구현예를 나타낸다.

[0059] 본 발명의 예시적인 CTP-GH 폴리펩티드 및 CTP-hGH 폴리펩티드는 서열식별번호: 39, 서열식별번호: 40 및 서열식별번호: 41에 나타낸다.

또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨프티드 및 C-말단 상에 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨프티드를 갖는 성장 호르몬 (GH) 웨프티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨프티드 및 C-말단 상에 2개의 CTP 아미노산 웨프티드를 갖는 GH 웨프티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨프티드 및 C-말단 상에 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨프티드를 갖고 서열식별번호: 23에 나타낸 GH 웨프티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨프티드 및 C-말단 상에 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨프티드를 갖고 서열식별번호: 36에 나타낸 GH 웨프티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨프티드를 갖고 서열식별번호: 37에 나타낸 GH 웨프티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨프티드를 갖고 서열식별번호: 38에 나타낸 GH 웨프티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 서열식별번호: 39에 나타낸 GH 웨프티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 서열식별번호: 40에 나타낸 GH 웨프티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 서열식별번호: 41에 나타낸 GH 웨프티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 서열식별번호: 42에 나타낸 GH 웨프티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 본원에 제공된 바와 같은 CTPs에 의해 변성된 GH 웨프티드를 제공한다.

또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨프티드 및 C-말단 상에 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨프티드를 갖는 GH 웨프티드를 인코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 N-말단 상에 추가로 하나의 CTP 아미노산 웨프티드 및 C-말단 상에 2개의 CTP 아미노산 웨프티드를 갖는 GH 웨프티드를 인코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 N-말단 상에 하나의 CTP 아미노산 웨프티드 및 C-말단 상에 하나의 CTP 아미노산 웨프티드를 포함하는 GH 웨프티드를 인코딩하는 서열식별번호: 44의 핵산을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 N-말단 상에 하나의 CTP 아미노산 웨프티드 및 C-말단 상에 2개의 CTP 아미노산 웨프티드를 포함하는 GH 웨프티드를 인코딩하는 서열식별번호: 45의 핵산을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하기 위해 GH 웨프티드 및 N-말단 상의 하나의 CTP 아미노산 웨프티드 및 C-말단 상의 2개의 CTP 아미노산 웨프티드를 인코딩하는 서열식별번호: 46의 핵산을 제공한다.

[0062] 일 구현예에서, 본 발명은 피험자에서 성장 호르몬의 투약 빈도를 감소시키는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 성장 호르몬과 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs으로 구성되고, 임의로 상기 하나의 CTP의 아미노 말단에 부착된 신호 웨프티드로 구성된 폴리웨프티드의 치료학적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 단계, 및 그에 따라 상기 피험자에서 성장 호르몬의 투약 빈도를 감소시키는 단계를 포함

한다.

[0063] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 피험자에서 성장 호르몬의 곡선(AUC) 아래 면적을 개선시키는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 성장 호르몬과 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs으로 구성되고, 임의로 상기 하나의 CTP의 아미노 말단에 부착된 신호 펩티드로 구성된 폴리펩티드의 치료학적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 단계, 및 그에 따라 피험자에서 성장 호르몬의 투약 빈도를 감소시키는 단계를 포함한다.

[0064] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 성장 호르몬과, 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs으로 구성되고, 임의로 상기 하나의 CTP의 아미노 말단에 부착된 신호 펩티드로 구성된 폴리펩티드를 포함하는 제형을 제공하는 것으로, 제형은 증가된 안정성을 갖는다. 일 구현예에서, 제형은 적어도 일년 동안 안정하다. 또 다른 구현예에서, 제형은 적어도 2년 동안 안정하다.

[0065] 일 구현예에서, 본 발명은 GH 치료를 필요로 하는 피험자를 치료하는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 성장 호르몬과, 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs로 구성되고, 임의로 상기 하나의 CTP의 아미노 말단에 부착된 신호 펩티드로 구성된 폴리펩티드의 치료학적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 단계, 및 그에 따라 피험자에서 성장 호르몬의 투약 빈도를 감소시키는 단계를 포함한다.

[0066] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 피험자에서 인슐린-유사 성장 인자 (IGF-1) 레벨을 증가시키는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 성장 호르몬과, 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs으로 구성되고, 임의로 상기 하나의 CTP의 아미노 말단에 부착된 신호 펩티드로 구성된 폴리펩티드의 치료학적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 단계 및 그에 따라 피험자에서 인슐린-유사 성장 인자 (IGF-1) 레벨을 증가시키는 단계를 포함한다.

[0067] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 피험자에서 인슐린-유사 성장 인자 (IGF-1) 레벨을 유지하는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 성장 호르몬과, 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs으로 구성되고, 임의로 상기 하나의 CTP의 아미노 말단에 부착된 신호 펩티드로 구성된 폴리펩티드의 치료학적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 단계, 및 피험자에서 인슐린-유사 성장 인자 (IGF-1) 레벨을 유지하는 단계를 포함한다. 또 다른 구현예에서, IGF-1 레벨은 본원에 추가로 제공된 바와 같이 정의된 범위로 유지된다.

[0068] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 피험자에서 정의된 범위 내의 인슐린-유사 성장 인자 (IGF-1) 레벨을 증가시키고 유지하는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 성장 호르몬과, 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs으로 구성되고, 임의로 상기 하나의 CTP의 아미노 말단에 부착된 신호 펩티드로 구성된 폴리펩티드의 치료학적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 단계, 및 그에 따라 피험자에서 정의된 범위 내의 인슐린-유사 성장 인자 (IGF-1) 레벨을 증가시키고 유지하는 단계를 포함한다.

[0069] 또 다른 구현예에서, 정의된 범위는 본원에 제공된 CTP-변성 성장 호르몬을 투여함으로써 달성되는 치료학적 투약량 범위이다. 또 다른 구현예에서, 정의된 범위는 IGF-1의 사인 곡선적 행동의 Cmax 및 Cthrough가 본원에 추가로 제공된 바와 같은 CTP-변성 성장 호르몬의 연속 투여 후에 유지되는 것이다(실시예 15 참조). 또 다른 구현예에서, 정의된 범위는 피험자에서 우수한 응답성과 투약량 변형에 대한 최소 필요성으로 본원에 제공된 CTP-변성 성장 호르몬을 연속적으로 투여하기 위한 치료학적 투약량 범위이다. 또 다른 구현예에서, 정의된 범위는 정상인 것으로 간주되는 개체들에서 IGF-1 레벨의 범위에 비교할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 정의된 범위는 정상 개체들에서 IGF-1 레벨/값의 정상 범위이다. 또 하나의 다른 구현예에서, 정의된 범위는 IGF-1 SDS 값이  $\pm 2$  SDS 내에 있을 때 정상 범위 내에 있다.

[0070] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 뼈 성장을 자극하기 위해 본원에 기재된 임의의 CTP-변성 GH 펩티드를 제공한다.

[0071] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 뼈 성장을 자극하기 위해 본원에 기재된 임의의 CTP-변성 GH 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 제공한다.

[0072]

또 다른 구현예에서, 본 발명의 공액 성장 호르몬은 변성되지 않은 성장 호르몬과 동일한 방식으로 사용된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 공액 성장 호르몬은 증가된 순환 반감기 및 플라즈마 체류 시간, 감소된 간극, 및 증가된 생체내 임상 활성을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 공액 성장 호르몬의 개선된 특성으로 인해, 이를 콘주케이트는 변성되지 않은 성장 호르몬보다 더 적은 빈도로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 공액 성장 호르몬은 1주에 1회 내지 2주에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 공액 성장 호르몬은 2주에 1회 내지 3주에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 공액 성장 호르몬은 1일에 1회 내지 1주에 3회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 감소된 투여 빈도는 개선된 환자의 삶의 질 뿐만 아니라 개선된 치료 결과로 이어지는 개선된 환자 순응도를 초래할 것이다. 또 다른 구현예에서, 폴리(에틸렌 글리콜)에 연결된 성장 호르몬의 종래의 콘주케이트에 비교하여, 본 발명의 콘주케이트의 분자량 및 링커 구조를 갖는 성장 호르몬은 개선된 효능, 개선된 안정성, 상승된 AUC 레벨, 증진된 순환 반감기를 갖는 것으로 밝혀지고 있다. 또 다른 구현예에서, 폴리(에틸렌 글리콜)에 연결된 성장 호르몬의 종래의 콘주케이트에 비교하여, 본 발명의 콘주케이트의 분자량 및 링커 구조를 갖는 성장 호르몬은 개선된 효능, 개선된 안정성, 상승된 AUC 레벨, 증진된 순환 반감기를 갖는 것으로 밝혀지고 있다. 또 다른 구현예에서, 치료학적 유효량의 공액 성장 호르몬은 생체내 측정 가능한 예상 생물학적 활성에 필요한 콘주케이트의 양이다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 교시에 따라 이용되는 성장 호르몬은 증가된 효능을 나타낸다. 몇몇 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 및 카르복시 말단 모두에 대한 CTP 서열의 부착은 연장된 생체내 활성을 초래한다.

[0073]

또 다른 구현예에서, 치료학적 유효량의 공액 성장 호르몬은 조성물 내의 다른 성분들 뿐만 아니라, 치료중인 상태의 정확한 유형, 치료중인 환자의 상태와 같은 인자에 따라 측정된다. 또 다른 구현예에서, 치료학적 유효량의 공액 성장 호르몬은 kg 체중당 0.01 내지 10  $\mu\text{g}$ 으로 1주에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 치료학적 유효량의 공액 성장 호르몬은 kg 체중당 0.1 내지 1  $\mu\text{g}$ 으로 1주에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 공액 성장 호르몬을 포함하는 약제학적 조성물은 다양한 수단에 의해 인간 환자에게 투여하기에 효과적인 강도로 제형화된다.

[0074]

또 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 당업자에게 공지된 임의의 성장 호르몬이다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 인간 성장 호르몬이다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 비-인간 성장 호르몬이다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 뉴클레오티드 서열 및/또는 아미노산 서열은 유전자 은행 데이터베이스에 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 상동체이다. 또 다른 구현예에서, 상동체는 또한 그의 아미노산 치환 및 그의 생물학적으로 활성 폴리펩티드 단편을 포함하여 결실, 삽입, 또는 치환 변이체를 의미한다.

[0075]

또 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 엑손 2, 3, 4, 또는 이들의 임의의 조합이 누락된 hGH의 변이체이다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 신호 웨პ티드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 신호 절단 부위를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 재조합 GH를 포함한다.

[0076]

또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육의 질을 유지하기 위해 본 발명의 GH 웨პ티드를 제공한다.

[0077]

또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골 질을 유지하기 위해 본 발명의 GH를 제공한다.

[0078]

또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골 질을 유지하기 위해 본 발명의 GH-CTP 혼산 서열을 제공한다.

[0079]

또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 소모성 질병을 치료하기 위해 본원에 기재된 임의의 CTP-변성 GH 웨პ티드를 제공한다.

[0080]

또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 소모성 질병을 치료하기 위해 본원에 기재된 임의의 CTP-변성 GH 웨პ티드를 인코딩하는 혼산 서열을 제공한다.

[0081]

또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 심장 기능을 증가시키기 위해 본원에 기재된 임의의 CTP-변성 GH 웨პ티드를 제공한다.

[0082]

또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 심장 기능을 증가시키기 위해 본원에 기재된 임의의 CTP-변성 GH 웨პ티드를 인코딩하는 혼산 서열을 제공한다.

[0083]

또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 지방 분해를 증가시키기 위해 본원에 기재된 GH 웨პ티드를 제공한다.

[0084]

또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 지방 분해를 증가시키기 위해 본원에 기재된 임의의 CTP-변성 GH 웨პ티드

를 인코딩하는 핵산 서열을 제공한다.

[0085] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 유체 밸런스를 개선하기 위해 본원에 기재된 임의의 CTP-변성 GH 펩티드를 제공한다.

[0086] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 수탁 번호 AAA72260 하의 유전자 은행 아미노산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 수탁 번호 AAK69708 하의 유전자 은행 아미노산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 수탁 번호 CAA01435 하의 유전자 은행 아미노산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 수탁 번호 CAA01329 하의 유전자 은행 아미노산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 수탁 번호 CAA00380 하의 유전자 은행 아미노산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 수탁 번호 AAA72555 하의 유전자 은행 아미노산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 수탁 번호 NP\_000506.2 하의 유전자 은행 아미노산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 수탁 번호 NP\_072053.1 하의 유전자 은행 아미노산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 수탁 번호 NP\_072054.1 하의 유전자 은행 아미노산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 수탁 번호 NP\_072055.1 하의 유전자 은행 아미노산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 수탁 번호 NP\_072056.1 하의 유전자 은행 아미노산 기탁 서열을 포함한다.

[0087] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 유체 밸런스를 개선하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및 C-말단 상에 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 갖는 GH 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 유체 밸런스를 개선하기 위해 N-말단 상에 추가로 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및 C-말단 상에 2개의 CTP 아미노산 펩티드를 갖는 GH 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 유체 밸런스를 개선하기 위해 N-말단 상에 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및 C-말단 상에 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 포함하는 GH 펩티드를 인코딩하는 서열식별번호: 44의 핵산을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 유체 밸런스를 개선하기 위해 N-말단 상에 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및 C-말단 상에 2개의 CTP 아미노산 펩티드를 포함하는 GH 펩티드를 인코딩하는 서열식별번호: 45의 핵산을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 유체 밸런스를 개선하기 위해 GH 펩티드 및 N-말단 상의 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및 C-말단 상의 2개의 CTP 아미노산 펩티드를 인코딩하는 서열식별번호: 46의 핵산을 제공한다.

[0088] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및 C-말단 상에 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 갖는 GH 펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및 C-말단 상에 2개의 CTP 아미노산 펩티드를 갖는 GH 펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및 C-말단 상에 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 갖고 서열식별번호: 23에 나타낸 GH 펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및 C-말단 상에 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 갖고 서열식별번호: 36에 나타낸 GH 펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 갖고 서열식별번호: 37에 나타낸 GH 펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 갖고 서열식별번호: 38에 나타낸 GH 펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 갖고 서열식별번호: 39에 나타낸 GH 펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 갖고 서열식별번호: 40에 나타낸 GH 펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 갖고 서열식별번호: 41에 나타낸 GH 펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 갖고 서열식별번호: 42에 나타낸 GH 펩티드를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 본원에 제공된 바와 같은 CTPs에 의해 변성된 GH 펩티드를 제공한다.

[0089] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및 C-말단 상에 적어도 하나의 CTP 아미노산 펩티드를 갖는 GH 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 추가로 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및 C-말단 상에 2개의 CTP 아미노산 펩티드를 갖는 GH 펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 일 구현예에서, 본 발명의 방법은 골다공증을 치료하기 위해 N-말단 상에 하나의 CTP 아미노산 펩티드 및







제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 REM 수면을 복원하기 위해 GH 웨티드 및 N-말단 상의 하나의 CTP 아미노산 웨티드 및 C-말단 상의 2개의 CTP 아미노산 웨티드를 인코딩하는 서열식별번호: 46의 핵산을 제공한다.

[0102] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 본원에 기재된 바의 GH 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 근육 성장을 자극하거나, 심장 기능을 증가시키거나, 뼈 성장을 자극하거나, 근육 무결성을 유지하거나, 근육 대사를 밸런싱하거나, 근육 빌드업을 유도하거나, 테노보 근육 빌드업을 유도하거나, 근육 부하를 증진시키거나, 골다공증과 관련된 증상을 치료하거나, 소모성 질병을 치료하거나, 지방 분해를 증가시키거나, 유체 밸런스를 개선하거나, 골다공증을 치료하거나, 폐 기능을 개선하거나, 면역력을 개선하거나, 중요한 장기를 재성장시키거나, 행복감을 증가시키거나, REM 수면을 복원하기 위해, 또는 이들의 임의의 조합을 위해 CTPs에 의해 변성된 hGH를 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열을 제공한다.

[0103] 몇몇 구현예에서, 본 발명에 따른 "상동성"은 또한 그의 아미노산 치환 및 그의 생물학적으로 활성 폴리펩티드 단편을 포함하여 결실, 삽입, 또한 치환 변이체를 포함한다. 일 구현예에서 치환 변이체는 hGH의 위치 65에 있는 글루타민이 발린에 의해 치환된 것이다 [Gellerfors 등, J Pharm Biomed Anal 1989, 7:173-83].

[0104] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 성장 호르몬을 인코딩하는 핵산 분자는 당업자에게 공지된 성장 호르몬의 임의의 아미노산 서열을 인코딩한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 성장 호르몬을 인코딩하는 핵산 분자는 hGH를 인코딩한다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬을 인코딩하는 핵산 분자는 수탁 번호 NM\_000515.3 하에 유전자 은행 핵산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬을 인코딩하는 핵산 분자는 수탁 번호 NM\_022559.2 하에 유전자 은행 핵산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬을 인코딩하는 핵산 분자는 수탁 번호 NM\_022560.2 하에 유전자 은행 핵산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬을 인코딩하는 핵산 분자는 수탁 번호 NM\_022561.2 하에 유전자 은행 핵산 기탁 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬을 인코딩하는 핵산 분자는 수탁 번호 NM\_022562.2 하에 유전자 은행 핵산 기탁 서열을 포함한다.

[0105] 일 구현예에서, 상동체는 또한 그의 아미노산 치환, 및 그의 생물학적으로 활성 폴리펩티드 단편을 포함하여, 결실, 삽입, 또는 치환 변이체를 의미한다.

[0106] 또 다른 구현예에서, 관심 폴리펩티드 서열은 hGH이다. 또 다른 구현예에서, 관심 폴리펩티드 서열은 임의의 변성된 형태를 포함하는 웨티드 또는 단백질이다.

[0107] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 소모성 질병, AIDS, 약액질(cachexia), 또는 hGH 결핍증의 치료를 위해 N-말단 상에 추가로 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨티드 및 C-말단 상에 적어도 하나의 CTP 아미노산 웨티드를 갖는 hGH를 제공한다.

[0108] 일 구현예에서, 본 발명은 수의학 의약품에 사용된다. 일 구현예에서, 본 발명은 포유 동물 인간 동반자로서 유지되거나 (예, 개, 고양이, 말), 현저한 상업적 가치를 갖거나 (예, 젖소, 육우, 스포츠 동물), 현저한 과학적 가치를 갖거나 (예, 멸종 위기 종들의 고정 또는 자유 시험편), 또는 달리 가치를 가진 길들여진 포유동물의 치료를 제공한다.

[0109] 몇몇 구현예에서, CTP 서열 변형은 사용될 더 낮은 복용량을 허용하는데 유리하다.

[0110] 몇몇 구현예에서, 본원에 사용된 바의 "폴리펩티드"는 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드를 체내에서 훨씬 더 안정적이게 하거나 또는 셀 내로 더 잘 침투할 수 있게 하는 변형을 갖는 폴리펩티드 유사체인 웨피토이드 및 세미펩토이드 뿐만 아니라 천연 폴리펩티드 (분해 생성물, 합성에 의해 합성된 폴리펩티드 또는 재조합 폴리펩티드) 및 웨피도미메틱스 (통상적으로, 합성 폴리펩티드)를 포함한다.

[0111] 몇몇 구현예에서, 변형은 CH<sub>2</sub>-NH, CH<sub>2</sub>-S, CH<sub>2</sub>-S=O, O=C-NH, CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, S=C-NH, CH=CH or CF=CH, 골격 변형, 및 잔기 변형을 포함하지만 이들로만 제한되지 않는 N 말단 변형, C 말단 변형, 폴리펩티드 결합 변형을 포함하지만, 이들로만 제한되지 않는다. 웨피도미메틱 화합물의 제조 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고, 예를 들면, Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)에 명시되어 있고, 이는 본원에 완전히 나타낸 것처럼 참고 문헌으로서 인용된다. 이점에 있어서 더 상세한 사항은 이하에 제공된다.

[0112] 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드 내의 폴리펩티드 결합 (-CO-NH-)은 치환된다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드 결합

은 N-메틸화 결합 ( $-N(CH_3)-CO-$ )에 의해 치환된다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드 결합은 에스테르 결합 ( $-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-$ )에 의해 치환된다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드 결합은 케토메틸렌 결합 ( $-CO-CH_2-$ )에 의해 치환된다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드 결합은  $\alpha$ -아자 결합 ( $-NH-N(R)-CO-$ )에 의해 치환되며, 여기서 R은 임의의 알킬, 예컨대 메틸, 카바 결합 ( $-CH_2-NH-$ )이다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드 결합은 하이드록시에틸렌 결합 ( $-CH(OH)-CH_2-$ )에 의해 치환된다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드 결합은 티오아미드 결합 ( $-CS-NH-$ )에 의해 치환된다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드 결합은 레트로 아미드 결합 ( $-NH-CO-$ )에 의해 치환된다. 몇몇 구현예에서, 폴리펩티드 결합은 폴리펩티드 유도체 ( $-N(R)-CH_2-CO-$ )에 의해 치환되며, 여기서 R은 탄소 원자 상에 자연스럽게 존재하는 "정상" 측쇄이다. 몇몇 구현예에서, 이들 변형은 폴리펩티드 사슬을 따라 임의의 결합에서 및 심지어 동시에 여러 결합 (2-3 결합)에서 발생한다.

[0113] 몇몇 구현예에서, Trp, Tyr 및 Phe와 같은 폴리펩티드의 자연적 방향족 아미노산은 페닐글리신, TIC, 나프틸알라닌 (No1), Phe의 고리-메틸화 유도체, Phe 또는 o-메틸-Tyr의 할로겐화 유도체와 같은 비-자연산을 합성하기 위해 치환될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 하나 이상의 변성된 아미노산 또는 하나 이상의 비-아미노산 단량체 (예, 지방산, 복합 탄수화물 등)를 포함한다.

[0114] 일 구현예에서, "아미노산" 또는 "아미노산"은 20개의 자연적으로 발생하는 아미노산; 종종 생체내 번역-후 변성되는 아미노산, 예를 들면, 히드록시프롤린, 포스포세린 및 포스포트레오닌; 및 2-아미노 아디프산, 하이드록시리신, 이소데스모신, 노르발린, 노르류신 및 오르니틴을 포함하지만, 이들로만 제한되지 않는 다른 특별한 아미노산을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 일 구현예에서, "아미노산"은 D- 및 L-아미노산 모두를 포함한다.

[0115] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 가용성 형태인 폴리펩티드를 필요로 하는 치료에 이용된다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 이들의 하이드록실-함유 측쇄로 인해 폴리펩티드 가용성을 증가시킬 수 있는 세린 및 트레오닌을 포함하지만, 이들로만 제한되지 않는 하나 이상의 비-천연 또는 천연 극성 아미노산을 포함한다.

[0116] 몇몇 구현예에서, 고리화가 폴리펩티드 특성에 의해 심각하게 방해받지 않는 경우에 폴리펩티드의 환상 형태도 이용될 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이지만, 본 발명의 폴리펩티드는 선형 형태로 이용된다.

[0117] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 표준 고체 단계 기술을 사용함으로써 생화학적으로 합성된다. 몇몇 구현예에서, 이들 생화학적 방법은 배타적 고체 단계 합성, 부분 고체 단계 합성, 단편 축합, 또는 고전적 용액 합성을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 이를 방법은 폴리펩티드가 비교적 짧은 경우 (약 5-15kDa) 및/또는 그것이 재조합 기술에 의해 생산될 수 없고 (즉, 핵산 서열에 의해 인코딩되지 않음), 그에 따라 다른 화학체를 포함하는 경우에 사용된다.

[0118] 몇몇 구현예에서, 고체 단계 폴리펩티드 합성 절차는 당업자에게 잘 공지되어 있고, John Morrow Stewart 및 Janis Dillaha Young에 의해 Solid Phase Polypeptide Syntheses (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984)에 추가로 기재되어 있다. 몇몇 구현예에서, 합성 폴리펩티드들은 예비 고성능 액체 크로마토그래피 [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.]에 의해 정제되며, 그의 조성물은 당업자에게 공지된 방법들에 의해 아미노산 서열화를 통해 확인될 수 있다.

[0119] 몇몇 구현예에서, 재조합 단백질 기술은 본 발명의 폴리펩티드를 생성하기 위해 사용된다. 몇몇 구현예에서, 재조합 단백질 기술은 비교적 긴 폴리펩티드 (예, 18-25보다 긴 아미노산)의 생성을 위해 사용된다. 몇몇 구현예에서, 재조합 단백질 기술은 대량의 본 발명의 폴리펩티드의 생성을 위해 사용된다. 몇몇 구현예에서, 재조합 기술은 문헌 [Bitter 등, (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier 등 (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson 등 (1984) Nature 310:511-514, Takamatsu 등 (1987) EMBO J. 6:307-311, Coruzzi 등 (1984) EMBO J. 3:1671-1680 and Brogli et al, (1984) Science 224:838-843, Gurley 등 (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565 and Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463]에 기재되어 있다.

[0120] 일 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 합성된다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 cis-조절 서열 (예, 프로모터 서열) 전사 조절을 포함하는 발현 벡터에 결합된다. 몇몇 구현예에서, cis-조절 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 구성적 발현을 지시하기에 적합하다. 몇몇 구현예에서, cis-조절 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 조직 특이적 발현을 지시하기에 적합하다. 몇몇 구현예에서, cis-조절 서열은 본 발명의 폴리펩티드의 유도성 발현을 지시하

기에 적합하다.

[0121] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드를 발현하는 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID Nos: 44, 45 및 46에 나타낸 것과 같다.

[0122] 몇몇 구현예에서, 본 발명에 사용하기 적합한 조직-특이적 프로모터는 특정 세포 집단에서 기능성인 서열을 포함하고, 그 예는 간 특이적 [Pinkert 등, (1987) *Genes Dev.* 1:268-277], 림포이드 특이적 프로모터 [Calame 등, (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275]인 알부민과 같은 프로모터; 특히 T-셀 수용체의 프로모터 [Winoto 등, (1989) *EMBO J.* 8:729-733] 및 이뮤노글로불린의 프로모터 [Banerji 등 (1983) *Cell* 33:729-740]; 뉴로필라멘트 프로모터 등의 뉴런-특이적 프로모터 [Byrne 등 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477], 췌장-특이적 프로모터 [Edlunch 등 (1985) *Science* 230:912-916] 또는 우유 유장(milk whey) 프로모터 등의 유선-특이적 프로모터 (U.S. Pat. No. 4,873,316 and European Application Publication No. 264,166)를 포함하지만, 이들로만 제한되지 않는다. 본 발명에 사용하기 적합한 유도성 프로모터는 예를 들면 테트라사이클린-유도성 프로모터를 포함한다 (Srour, M.A., 등, 2003. *Thromb. Haemost.* 90: 398-405).

[0123] 일 구현예에서, 어구 "폴리뉴클레오티드"는 RNA 서열, 상보적 폴리뉴클레오티드 서열 (cDNA), 계놈 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 복합 폴리뉴클레오티드 서열 (예, 상기의 조합)의 형태로 단리되고 제공되는 단일 또는 이 중 가닥 핵산 서열을 의미한다.

[0124] 일 구현예에서, "상보적 폴리뉴클레오티드 서열"은 역 전사 효소 또는 임의의 다른 RNA 의존성 DNA 폴리머라제를 사용하여 메신저 RNA의 역전사로부터 초래된 서열을 의미한다. 일 구현예에서, 서열은 DNA 폴리머라제를 사용하여 순차로 생체내 또는 시험관내 증폭될 수 있다.

[0125] 일 구현예에서, "계놈 폴리뉴클레오티드 서열은" 염색체로부터 유도된(단리된) 서열을 의미하고, 따라서 그것은 염색체의 연속 부분을 나타낸다.

[0126] 일 구현예에서, "복합 폴리뉴클레오티드 서열"은 적어도 부분적으로 상보적이고 적어도 부분적으로 계놈인 서열을 의미한다. 일 구현예에서, 복합 서열은 사이에 개재되는 일부 인트론 서열 뿐만 아니라 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하는데 필요한 일부 엑손 서열을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 인트론 서열은 다른 유전자를 포함하는 임의의 소스일 수 있고, 통상적으로 보존된 스플라이싱 신호 서열을 포함할 것이다. 일 구현예에서, 인트론 서열은 cis 작용하는 발현 조절 요소를 포함한다.

[0127] 일 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 폴리펩티드의 분비를 위해 신호 펩티드를 인코딩하는 신호 서열을 추가로 포함한다. 몇몇 구현예에서, 신호 서열은 서열식별번호: 19에 나타낸 바의 EPO에 대한 내인성 신호 서열 또는 서열식별번호: 26에 나타낸 바의 IFN- $\beta$  1에 대한 내인성 신호 서열을 포함하지만, 이들로만 제한되지 않는다. 또 다른 구현예에서, 신호 서열은 CTP 서열에 대한 N-말단이고, 이는 다시 관심 폴리펩티드 서열에 대한 N-말단이다; 예를 들면, 서열은 (a) 신호 서열- (b) CTP- (c) 관심 서열- (d) 임의로 1개 이상의 추가의 CTP 서열이다. 또 다른 구현예에서, 1개 이상의 CTP 서열은 관심 폴리펩티드 서열의 신호 서열과 관심 폴리펩티드 서열 자체 사이에 삽입되고, 그에 따라 관심 야생형 서열을 방해한다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 구현예를 나타낸다.

[0128] 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 신호 펩티드를 추가로 포함한다. 몇몇 구현예에서, 신호 서열은 내인성 신호 서열을 포함하지만, 이것으로만 제한되지 않는다. 몇몇 구현예에서, 신호 서열은 임의의 공지된 성장 호르몬 또는 성장 호르몬의 내인성 신호 서열을 포함하지만, 이것으로만 제한되지 않는다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드 및 방법은 다음 아미노산 서열을 포함하는 신호 펩티드를 추가로 갖는 성장 호르몬을 제공한다: MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA (서열식별번호: 49).

[0129] 일 구현예에서, 발현 및 분비 후, 신호 펩티드는 성숙한 단백질에서 얻어진 전구체 단백질로부터 절단된다.

[0130] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 당업자에게 공지된 절차 및 방법을 사용하는 PCR 기술을 사용하여 제조된다. 몇몇 구현예에서, 그 절차는 2개의 다른 DNA 서열의 결합과 연관된다 (예를 들면, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel 등, John Wiley & Sons, 1992 참조).

[0131] 일 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 재조합 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하도록 발현 벡터 (즉, 핵산 작제물)에 삽입된다. 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 이러한 벡터가 원핵 세포에서 복제 및 통합에 적합하게 하는 추가의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 이러한 벡터가 진핵 세포에서 복제 및 통합에 적합하게 하는 추가의 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 원핵 세포 및

진핵 세포 모두에서 복제 및 통합에 적합하게 하는 셔틀 벡터를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 클로닝 벡터는 전사 및 번역 개시 서열(예, 프로모터, 인핸서) 및 전사 및 번역 종결자(예, 폴리아데닐화 신호)를 포함한다.

[0132] 일 구현예에서, 각종 원핵 세포 또는 진핵 세포는 본 발명의 폴리펩티드를 발현하기 위한 숙주-발현 시스템으로서 사용될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 이들은 폴리펩티드 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질 전환된 박테리아; 폴리펩티드 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질 전환된 효모; 재조합 바이러스 발현 벡터(예, 퀘리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)에 의해 감염되거나 또는 폴리펩티드 코딩 서열을 함유하는 Ti 플라스미드와 같은 재조합 플라스미드 발현 벡터에 의해 형질 전환된 식물 세포 시스템과 같은 미생물을 포함하지만, 이들로만 제한되지 않는다.

[0133] 몇몇 구현예에서, 비-박테리아 발현 시스템은 본 발명의 폴리펩티드를 발현하기 위해 사용된다(예, CHO 세포와 같은 포유 동물 발현 시스템). 일 구현예에서, 포유 동물 세포에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현하기 위해 사용된 발현 벡터는 CMV 프로모터 및 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 pCI-DHFR 벡터이다. pCI-dhfr 벡터의 구성은 일 구현예에 따라, 실시예 1 및 도 3에 기재되어 있다.

[0134] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 박테리아 시스템에서, 많은 발현 벡터는 발현된 폴리펩티드를 위해 의도된 용도에 따라 유리하게 선택될 수 있다. 일 구현예에서, 대량의 폴리펩티드가 바람직하다. 일 구현예에서, 단백질 생성물의 높은 수준의 발현을 지시하고, 가능하게는 소수성 신호 서열과의 융합으로서, 단백질 생성물이 용이하게 정제되는 경우 발현된 생성물을 박테리아 또는 배양 배지의 폐리플라즘 내로 지시하는 벡터가 바람직하다. 일 구현예에서, 특정 융합 단백질은 폴리펩티드의 회복에 도움을 주는 특정 절단 부위에 의해 조작되었다. 일 구현예에서, 그러한 조작에 적응될 수 있는 벡터는 *E. coli* 발현 벡터의 pET를 포함하지만, 이들로만 제한되지 않는다 [Studier 등, *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990)].

[0135] 일 구현예에서, 효모 발현 시스템이 사용된다. 일 구현예에서, 구성적 또는 유도성 프로모터를 함유하는 많은 벡터들이 미국 특허 제 5,932,447호에 개시된 바와 같이 효모에 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 효모 염색체 내로 외래 DNA 서열의 통합을 촉진하는 벡터들이 사용된다.

[0136] 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 예를 들면, 프로모터-키메라 폴리펩티드의 계놈 통합을 위한 내부 리보솜 진입 사이트(IRES) 및 서열 등의 단일 mRNA로부터 여러 단백질의 번역을 허용하는 추가의 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0137] 몇몇 구현예에서, 포유 동물 발현 벡터는 인비트로젠으로부터 입수할 수 있는 pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, Promega로부터 입수할 수 있는 pCI, Strategene으로부터 입수할 수 있는 pMbac, pPbac, pBK-RSV 및 pBK-CMV, Clontech로부터 입수할 수 있는 pTRES 및 이들의 유도체를 포함하지만, 이들로만 제한되지 않는다.

[0138] 몇몇 구현예에서, 레트로바이러스와 같은 진핵성 바이러스로부터 조절 요소를 함유하는 발현 벡터는 본 발명에 의해 사용된다. SV40 벡터는 pSVT7 및 pMT2를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 소 유두종 바이러스에서 파생된 벡터는 pBV-1MTHA를 포함하고, 엡스타인 바(Epstein Bar) 바이러스로부터 파생된 벡터는 pHEBO 및 p205를 포함한다. 다른 예시적인 벡터는 pMSG, pAV009/A<sup>+</sup>, pMTO10/A<sup>+</sup>, pMAMneo-5, 배콜로바이러스 pDSVE, 및 SV-40 초기 프로모터, SV-40 후기 프로모터, 메탈로티오네인(metallothionein) 프로모터, 쥐의 유방 종양 바이러스 프로모터, 라우스(Rous) 육종 바이러스 프로모터, 폴리헤드린(polyhedron) 프로모터, 또는 진핵 세포에서 발현에 효과적인 다른 프로모터의 지시 하에 단백질의 발현을 허용하는 임의의 다른 벡터를 포함한다.

[0139] 몇몇 구현예에서, 재조합 바이러스 벡터는 측면 감염 및 타겟팅 특이성 등의 장점을 제공하기 때문에 본 발명의 폴리펩티드의 생체내 발현을 위해 유용하다. 일 구현예에서, 측면 감염은 예를 들면, 레트로바이러스의 라이프 사이클에서 고유하고, 단일 감염된 세포가 주변 세포들을 베드 오프하고 감염시키는 많은 자손 비리온(virion)을 생산하는 프로세스이다. 일 구현예에서, 그 결과는 큰 영역이 빠르게 감염되고, 그의 대부분이 원시 바이러스 입자들에 의해 처음에 감염되지 않았다는 것이다. 일 구현예에서, 측면으로 확산될 수 없는 바이러스 벡터가 생산된다. 일 구현예에서, 이러한 특징은 원하는 목적이 특정 유전자를 편재된 수의 표적 세포로만으로 도입하기 위한 것인 경우에 유용할 수 있다.

[0140] 일 구현예에서, 다양한 방법들이 본 발명의 발현 벡터를 세포들 내로 도입하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 방법들은 일반적으로 문헌[Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor

Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang 등, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega 등, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) and Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]]에 기재되어 있고, 예를 들면, 재조합 바이러스 벡터에 의한 안정하고 일시적 형질 감염, 리포렉션, 전기천공법 및 감염을 포함한다. 또한, 양-음 선택 방법에 대해, 미국 특히 제5,464,764호 및 제5,487,992호 참조.

[0141] 몇몇 구현예에서, 더 높은 형질 감염 효율이 바이러스의 감염성 특성으로 인해 얻어질 수 있기 때문에, 바이러스 감염에 의한 핵산의 도입은 리포렉션 및 전기천공법 등의 다른 방법들에 비해 여러가지 장점을 제공한다.

[0142] 일 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 상기 기재된 바와 같이 임의의 적절한 투여 모드를 사용하여 개인에게 투여되는 핵산 작제물로부터 발현될 수도 있다는 것이 인식될 것이다 (즉, 생체내 유전자 치료). 일 구현예에서, 핵산 작제물은 필요에 따라 적절한 유전자 전달 비히클/방법 (형질 감염, 형질 도입, 상동성 재조합, 등) 및 발현 시스템을 통해 적합한 세포 내로 도입되고, 다음으로 변성된 세포들은 배양액 중에서 확장되고 개인에게 되돌려진다 (즉, 생체외 유전자 치료).

[0143] 일 구현예에서, 식물 발현 벡터가 사용된다. 일 구현예에서, 폴리펩티드 코딩 서열의 발현은 많은 프로모터에 의해 구동된다. 몇몇 구현예에서, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터 [Brisson 등, Nature 310:511-514 (1984)], 또는 TMV로의 코팅 단백질 프로모터 [Takamatsu 등, EMBO J. 6:307-311 (1987)] 등의 바이러스 프로모터가 사용된다. 또 다른 구현예에서, 예를 들면, RUBISCO의 작은 서브 단위 [Coruzzi 등, EMBO J. 3:1671-1680 (1984); and Brogli 등, Science 224:838-843 (1984)] 또는 열 쇼크 프로모터, 예, 대두 hsp17.5-E 또는 hsp17.3-B [Gurley 등, Mol. 세포. Biol. 6:559-565 (1986)] 등의 식물 프로모터가 사용된다. 일 구현예에서, 작제물은 Ti 플라스미드, Ri 플라스미드, 식물 바이러스 벡터, 직접 DNA 형질 전환, 미세 주사, 전기천공법 및 당업자에게 잘 공지된 다른 기술을 사용하여 식물 세포 내로 도입된다. 예를 들면, Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 (1988)] 참조. 당업계에 잘 공지된 곤충 및 포유 동물 숙주 세포 시스템 등의 다른 발현 시스템이 본 발명에 의해 사용될 수도 있다.

[0144] 삽입된 코딩 서열 (폴리펩티드를 인코딩함)의 전사 및 번역을 위한 필수 요소를 함유하는 것 외에, 본 발명의 발현 작제물은 발현된 폴리펩티드의 안정성, 생산, 정제, 수율 또는 활성을 최적화하기 위해 조작된 서열을 포함할 수도 있음이 인식될 것이다.

[0145] 다양한 방법들이, 몇몇 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터를 숙주 세포 시스템 내로 도입하기 위해 사용될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 그러한 방법들은 일반적으로 문헌 [Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang 등, Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega 등, Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) and Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]]에 기재되어 있고, 예를 들면, 재조합 바이러스 벡터에 의한 안정하고 일시적인 형질 감염, 리포렉션, 전기 천공법 및 감염을 포함한다. 또한, 양-음 선택 방법을 위해 미국 특히 제5,464,764호 및 제5,487,992호 참조.

[0146] 몇몇 구현예에서, 형질 전환된 세포들 다량의 재조합 폴리펩티드의 발현을 허용하는 효과적인 조건 하에 배양된다. 몇몇 구현예에서, 효과적인 배양 조건은 단백질 생산을 허용하는 효과적인 배지, 생물 반응기, 온도, pH 및 산소 조건을 포함하지만, 이들로만 제한되지 않는다. 일 구현예에서, 효과적인 배지는 세포가 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 생산하기 위해 배양되는 임의의 배지를 의미한다. 몇몇 구현예에서, 배지는 통상적으로 동화성 탄소, 질소 및 인산염 제공원, 및 적절한 염, 미네랄, 금속, 비타민 등의 기타 영양소를 갖는 수용액을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 세포들은 종래의 발효 생물 반응기, 진탕 플라스크, 시험관, 마이크로 적정 접시 및 페트리 판에 사용될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 배양은 재조합 세포에 적합한 온도, pH 및 산소 함량에서 수행된다. 몇몇 구현예에서, 배양 조건은 당업자의 전문 지식 내에 있다.

[0147] 몇몇 구현예에서, 생산에 사용되는 벡터 및 숙주 시스템에 따라, 본 발명의 생성된 폴리펩티드는 재조합 세포 내에 남겨지거나, 발효 배지 내로 분비되거나, *E. coli* 내의 주변 세포질 공간과 같은 2개의 세포막 사이의 공간 내로 분비되거나; 또는 세포막 또는 바이러스막의 외부 표면 상에 유지되었다.

- [0148] 일 구현예에서, 소정 시간의 배양 후, 재조합 폴리펩티드의 회복이 이루어진다.
- [0149] 일 구현예에서, 본원에 사용된 어구 "재조합 폴리펩티드를 회수하는"은 폴리펩티드를 함유하는 전체 발효 배지를 수집하는 것을 의미하며, 분리 또는 정제의 추가 단계를 내포할 필요는 없다.
- [0150] 일 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 여과, 전기 영동, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 젤 여과 크로마토그래피, 역상 크로마토그래피, 콘카나발린(concanavalin) A 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing) 및 차동 가용화(differential solubilization)를 포함하지만 이들로만 제한되지 않는 각종 표준 단백질 정제 기술을 사용하여 정제된다.
- [0151] 일 구현예에서, 회복을 촉진하기 위해, 발현된 코딩 서열은 본 발명의 폴리펩티드를 인코딩하도록 조작될 수 있고 절단 가능한 모이어티와 융합될 수 있다. 일 구현예에서, 융합 단백질은 폴리펩티드가 친화성 크로마토그래피에 의해; 예, 절단 가능한 모이어티에 특이적인 컬럼 상에 고정시킴으로써 용이하게 단리될 수 있도록 설계될 수 있다. 일 구현예에서, 절단 부위는 폴리펩티드와 절단 가능한 모이어티 사이에서 조작되고, 폴리펩티드는 이 부위에서 융합 단백질을 특정하게 절단하는 적절한 효소 또는 시약에 의한 처리에 의해 크로마토그래피 컬럼으로부터 방출될 수 있다[예, Booth 등, Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); and Gardella 등, J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990) 참조].
- [0152] 일 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 "실질적으로 순수한" 형태로 검색된다.
- [0153] 일 구현예에서, 어구 "실질적으로 순수한"은 본원에 기재된 용도에서 단백질의 효과적인 사용을 허용하는 순도를 의미한다.
- [0154] 일 구현예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 시험관내 발현 시스템을 사용하여 합성될 수도 있다. 일 구현예에서, 시험관내 합성 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고, 시스템의 부품들은 상업적으로 입수할 수 있다.
- [0155] 몇몇 구현예에서, 재조합 폴리펩티드는 합성되고 정제되며; 그들의 치료 효능은 생체내 또는 시험관내 분석될 수 있다. 일 구현예에서, 재조합 DNA 기술을 사용하는 CTPs에 의해 변성된 GH의 생산이 수행된다.
- [0156] 몇몇 구현예에서, 재조합 폴리펩티드는 합성되고 정제되며; 그들의 치료 효능은 생체내 또는 시험관내 분석될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTPs에 의해 변성된 재조합 GH의 결합 활성은 각종 분석을 사용하여 확인될 수 있다.
- [0157] 일 구현예에서, 본 발명은 CTP-GH-CTP 폴리펩티드를 포함한다. 일 구현예에서, 재조합 DNA 기술 방법은 CTP-GH-CTP 폴리펩티드의 생산을 위해 사용된다. 일 구현예에서, 본 발명은 CTP-GH-CTP-CTP 폴리펩티드를 포함한다. 일 구현예에서, 재조합 DNA 기술 방법은 실시예 1 및 도 1에 예시된 바와 같이 CTP-GH-CTP-CTP 폴리펩티드의 생산을 위해 사용된다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP-GH-CTP 폴리펩티드 또는 CTP-GH-CTP-CTP 폴리펩티드의 치료 효능은 생체내 분석된다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP-GH-CTP 또는 CTP-GH-CTP-CTP 폴리펩티드의 치료 효능은 시험관내 분석된다. 일 구현예에서, 본 발명의 재조합 GH 폴리펩티드의 결합 활성은 인간 성장 호르몬 수용체에 의해 이전에 형질 감염된 Nb2 (프로락틴-의존형 쥐의 림프종 세포주 (ECACC 세포 Bank)) 또는 FCD-P1 뮤린 세포주를 사용하여 측정된다. 일 구현예에서, 이들 수용체에 대한 GH의 결합은 일 구현예에서 GH 활성의 기능으로서 MTT 세포 염색 래벨에 의해 측정되는 세포 증식을 유도한다. 일 구현예에서, 생체내 활성은 치료받은 성장 호르몬 결핍 동물들에서 시간 경과에 따른 체중 증가를 측정함으로써 도출된다.
- [0158] 일 구현예에서, 본 발명은 피험자에서 성장 또는 체중 증가를 유도하는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 성장 호르몬과, 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 융모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드 (CTP), 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 융모 성선 자극 호르몬 CTPs를 포함하는 폴리펩티드의 치료학적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 단계, 및 그에 따라 피험자에서 성장 또는 체중 증가를 유도하는 단계를 포함한다.
- [0159] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 비-인간 피험자에서 성장 또는 체중 증가를 유도하는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 비-인간 성장 호르몬과, 상기 비-인간 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 융모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨프티드 (CTP), 및 상기 비-인간 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 융모 성선 자극 호르몬 CTPs로 구성되고, 임의로 상기 하나의 CTP의 아미노 말단에 부착된 신호 웨프티드로 구성된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산으로 구성된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터의 치료학적 유효량을 비-인간 피험자에게 투여하는 단계, 및 그에 따라 비-인간 피험자에서 성장 또는 체중 증가를 유도하는 단계를 포함한다.
- [0160] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 피험자에서 체중 감소를 유도하거나 또는 체지방을 감소시키는 방법을 제공하는

것으로, 그 방법은 성장 호르몬과, 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨პ티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs을 포함하는 폴리웨პ티드의 치료학적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 단계, 및 그에 따라 상기 피험자에서 체중 감소를 유도하거나 또는 체지방을 감소시키는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 상기 피험자는 비만이다. 또 다른 구현예에서, 상기 피험자는 과체중이다.

[0161] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 비-인간 피험자에서 체지방을 감소시키는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 비-인간 성장 호르몬과, 상기 비-인간 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 웨პ티드 (CTP), 및 상기 비-인간 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs로 구성되고, 임의로 상기 하나의 CTP의 아미노 말단에 부착된 신호 웨პ티드로 구성된 폴리웨პ티드를 인코딩하는 핵산으로 구성된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터의 치료학적 유효량을 비-인간 피험자에게 투여하는 단계, 및 그에 따라 비-인간 피험자에서 성장 또는 체중 증가를 유도하는 단계를 포함한다.

[0162] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 피험자에서 지방 침착을 감소시키는 방법을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 피험자에서 근육량을 증가시키는 방법을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 피험자에서 근육 성장을 촉진시키는 방법을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 지방에 대한 근육 비율을 증가시키는 방법을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명은 체질량 지수 (BMI) 또는 Quetelet 지수를 감소시키는 방법을 제공한다.

[0163] 또 다른 구현예에서, 성장은 체중 증가에 의해 측정된다. 또 다른 구현예에서, 성장은 신장 증가에 의해 측정된다. 또 다른 구현예에서, 성장은 체중 증가에 의해 측정된다. 또 다른 구현예에서, 성장은 근육량 증가에 의해 측정된다. 또 다른 구현예에서, 성장은 체중 증가에 의해 측정된다. 또 다른 구현예에서, 성장은 뼈 질량 증가에 의해 측정된다. 또 다른 구현예에서, 성장은 체중 증가에 의해 측정된다. 또 다른 구현예에서, 성장은 근육량 증가에 의해 측정된다. 또 다른 구현예에서, 체중 증가는 뼈 및/또는 근육량 증가에 기인한다. 또 다른 구현예에서, 성장은 당업자에게 공지된 임의의 공지된 측정법에 의해 측정된다.

[0164] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 인간 성장 호르몬 폴리웨პ티드는 성장 결핍 장애, AIDS 쇠약, 노화, HIV-감염 피험자의 손상된 면역 기능, 이화성 질환, 수술 후 회복, 울혈성 심근병증, 간 이식, 간 절제술 후 간 재생, 만성 신부전, 신장 골 이영양증, 골다공증, 연골 무형성증/연골형성저하증(hypochondroplasia), 골격 이형성증, 크론 병 등의 만성 염증성 또는 영양 장애, 짧은 창자 증후군, 소아 만성 관절염, 낭포성 섬유증, 남성 불임, X-연결된 저인산혈증성 구루병, 다운 증후군, 척추 갈림 증, 누난 증후군, 비만, 손상된 근육의 강도 및 섬유 근육통 등의 성장 및 체중과 관련된 조건에 따라 피험자를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 인터페론 폴리웨პ티드는 모양 세포성 백혈병 (HCL), 카포시 육종 (KS), 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 C 형 간염 (CHC), 첨규 콘딜로마(condylomata acuminata) (CA), 만성 B 형 간염, 악성 흑색 종, 여포성 비호 지킨 림프종, 다발성 경화증, 만성 육아종성 질환, 미코박테리움 아비움 합병증 (MAC), 폐 섬유증 및 골다공증 등의 다양한 조건에 따라 피험자를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0165] 일 구현예에서, 본 발명의 폴리웨პ티드 그 자체로 개체에게 제공될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 폴리웨პ티드는 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합되는 경우에 약제학적 조성물의 일부로서 개체에게 제공될 수 있다.

[0166] 일 구현예에서, "약제학적 조성물"은 본원에 기재된 하나 이상의 활성 성분과 생리학적으로 적합한 담체 및 부형제 등의 다른 화학적 성분의 제제를 의미한다. 약제학적 조성물의 목적은 유기체로의 화합물의 투여를 촉진시키는 것이다.

[0167] 일 구현예에서, "활성 성분"은 생물학적 효과에 대한 책임이 있는 관심 폴리웨პ티드 서열을 의미한다.

[0168] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 임의의 조성물은 임의의 형태로 관심 단백질에 결합된 적어도 2개의 CTP 서열을 포함할 것이다. 일 구현예에서, 본 발명은 복합 제제를 제공한다. 일 구현예에서, "복합 제제"는 상기 정의된 바와 같은 조합 파트너들이 독립적으로 투약될 수 있거나 또는 구별되는 양의 조합 파트너와 함께 상이한 고정된 조합물을 사용함으로써, 즉 동시에, 공동으로, 개별적으로 또는 순차적으로 투약될 수 있다는 점에서, 특히 "부품들의 키트"를 정의한다. 몇몇 구현예에서, 부품들의 키트의 일부는 예를 들어, 동시에 투여되거나 또는 만성적으로 스탠더드될 수 있으며, 즉 상이한 시점에 부품들의 키트의 임의의 부분에 대하여 동일하거나 상이한 시간 간격으로 투여될 수 있다. 조합 파트너의 총량의 비율은 몇몇 구현예에서, 복합 제제로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 복합 제제는 예를 들면, 치료해야 할 환자 하위 집단의 요구 또는 단일 환자의 요구에 대처하기 위해 다양해질 수 있고, 다양한 요구는 당업자에 의해 용이하게 만들어질 수 있는 특정

질병, 질병의 중증도, 연령, 성별 또는 체중으로 인해 다양할 수 있다.

[0169] 일 구현예에서, 교환 가능하게 사용될 수 있는 어구 "생리학적으로 허용되는 담체" 및 "약제학적으로 허용되는 담체"는 유기체에 현저한 자극을 유발하지 않고, 투여된 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 폐기하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다. 보조제가 이들 어구 하에 포함된다. 일 구현예에서, 약제학적으로 허용되는 담체에 포함된 성분들 중의 하나는 예를 들면 유기 및 수성 배지 모두에서 광범위한 가용성을 갖는 생체 적합성 중합체인 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)일 수 있다 (Mutter 등 (1979)).

[0170] 일 구현예에서, "부형제"는 활성 성분의 투여를 추가로 촉진하기 위해 약제학적 조성물에 첨가된 불활성 물질을 의미한다. 일 구현예에서, 부형제는 탄산 칼슘, 프탈산 칼슘, 다양한 당 및 유형의 전분, 셀룰로스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0171] 제형화 기술 및 약물의 투여는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition]에서 발견되며, 이는 본원에 참고 문헌으로 인용된다.

[0172] 일 구현예에서, 적합한 투여 경로는, 예를 들면, 경구, 직장, 경 점막, 경 비강, 장내 또는 근육 내, 피하 및 척수강내 뿐만 아니라 골수내 주사, 직접 심실내, 정맥 내, 복강 내, 비강 내, 또는 안내 주사를 포함하는 비경구 전달을 포함한다.

[0173] 일 구현예에서, 제제는 예를 들면, 환자 신체의 특정 영역으로 제제를 직접적으로 주사함으로써 전신보다는 국소 방식으로 투여된다.

[0174] 일 구현예에서, 약제학적 제형 또는 약제학적 조성물이 주사를 통해 피험자에게 투여되는 경우, 그것은 주사기 또는 PEN 장치를 사용하여 행해진다.

[0175] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 0.1 내지 5 ml 용액 중의 1 내지 90  $\mu$ g의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 0.1 내지 5 ml 용액 중의 1 내지 50  $\mu$ g의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 0.1 내지 5 ml 용액 중의 1 내지 25  $\mu$ g의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 0.1 내지 5 ml 용액 중의 50 내지 90  $\mu$ g의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 0.1 내지 5 ml 용액 중의 10 내지 50  $\mu$ g의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 1 ml 용액 중의 5 milligrams (mg), 또는 1 ml 용액 중의 10 mg, 또는 1 ml 용액 중의 20 mg, 또는 1 ml 용액 중의 40 mg의 투약량으로 투여된다.

[0176] 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 0.1 내지 5 ml 용액 중의 1 내지 90  $\mu$ g의 투약량으로 근육내 (IM) 주사, 피하 (SC) 주사, 또는 정맥내 (IV) 주사에 의해 1주에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 0.1 내지 5 ml 용액 중의 1 내지 90  $\mu$ g의 투약량으로 근육내 (IM) 주사, 피하 (SC) 주사, 또는 정맥내 (IV) 주사에 의해 1주에 2회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 0.1 내지 5 ml 용액 중의 1 내지 90  $\mu$ g의 투약량으로 근육내 (IM) 주사, 피하 (SC) 주사, 또는 정맥내 (IV) 주사에 의해 1주에 3회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 0.1 내지 5 ml 용액 중의 1 내지 90  $\mu$ g의 투약량으로 근육내 (IM) 주사, 피하 (SC) 주사, 또는 정맥내 (IV) 주사에 의해 2주마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 0.1 내지 5 ml 용액 중의 1 내지 90  $\mu$ g의 투약량으로 근육내 (IM) 주사, 피하 (SC) 주사, 또는 정맥내 (IV) 주사에 의해 17일마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 0.1 내지 5 ml 용액 중의 1 내지 90  $\mu$ g의 투약량으로 근육내 (IM) 주사, 피하 (SC) 주사, 또는 정맥내 (IV) 주사에 의해 19일마다 1회 투여된다. 일 구현예에서, 투여는 근육내 (IM) 주사에 의한 것이다. 일 구현예에서, 투여는 피하 (SC) 주사에 의한 것이다. 일 구현예에서, 투여는 정맥내 (IV) 주사에 의한 것이다.

[0177] 복용량 범위의 다양한 구현예가 본 발명에 의해 예상된다. 본 발명의 폴리펩티드의 복용량은, 일 구현예에서, 0.05 내지 80 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.05 내지 50 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.1 내지 20 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.1 내지 10 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.1 내지 5 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.5 내지 5 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.5 내지 50 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 5 내지 80 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 35 내지 65 mg/일의 범위

내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 35 내지 65 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 20 내지 60 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 40 내지 60 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 45 내지 60 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 40 내지 60 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 60 내지 120 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 120 내지 240 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 40 내지 60 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 240 내지 400 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 45 내지 60 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 15 내지 25 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 5 내지 10 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 55 내지 65 mg/일의 범위 내이다.

[0178] 일 구현예에서, 복용량은 20 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 30 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 40 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 50 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 60 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 70 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 80 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 90 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 100 mg/일이다.

[0179] 본 발명의 CTPs에 의해 변성된 GH의 복용량은, 일 구현예에서 0.005 내지 100 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.005 내지 5 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.01 내지 50 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.1 내지 20 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.1 내지 10 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.01 내지 5 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.001 내지 0.01 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.001 내지 0.1 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.1 내지 5 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.5 내지 50 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.2 내지 15 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.8 내지 65 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 50 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 5 내지 10 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 8 내지 15 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 10 내지 20 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 20 내지 40 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 60 내지 120 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 12 내지 40 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 40 내지 60 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 50 내지 100 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 60 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 15 내지 25 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 5 내지 10 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 55 내지 65 mg/주의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 5 mg/주의 범위 내이다.

[0180] 또 다른 구현예에서, 피험자에게 주어진 GH 복용량은 동일한 피험자 집단 (예, 아동, 노인, 남자, 여자, GH 결핍, 특정 국적 등)으로부터 참조 피험자에게 주어진 표준 복용량의 50%이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 특정 피험자 집단으로부터 피험자에게 주어진 복용량의 30%이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 특정 피험자 집단으로부터 피험자에게 주어진 복용량의 45%이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 특정 피험자 집단으로부터 피험자에게 주어진 복용량의 100%이다.

[0181] 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 5 mg/주이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 2 mg/주이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 4 mg/주이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1.2 mg/주이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1.8 mg/주이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 대략적으로 본원에 기재된 복용량이다.

[0182] 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 5 mg/투여이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 2 mg/투여이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 4 mg/투여이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1.2 mg/투여이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1.8 mg/투여이다. 일 구현예에서, 조성물은 1주에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 2주에 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 매월 투여된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 매일 투여된다.

[0183] 일 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 액체 제형으로 제형화된다.

[0184] 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 비강내 복용량 형태로 제형화된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 주사 가능한 복용량 형태로 제형화된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 0.0001 mg 내지 0.6 mg 범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 0.001 mg 내지 0.005 mg 범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 0.005 mg 내지 0.01 mg 범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 0.01 mg 내지 0.3 mg 범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 0.2 mg 내지 0.6 mg 범위의 투약량으로 투여된다.

- [0185] 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 1 내지 100  $\mu\text{g}$  범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 10 내지 80  $\mu\text{g}$  범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 20 내지 60  $\mu\text{g}$  범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 10 내지 50  $\mu\text{g}$  범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 40 내지 80  $\mu\text{g}$  범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 10 내지 30  $\mu\text{g}$  범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 30 내지 60  $\mu\text{g}$  범위의 투약량으로 투여된다.
- [0186] 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 0.2 mg 내지 2 mg 범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 2 mg 내지 6 mg 범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 4 mg 내지 10 mg 범위의 투약량으로 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 5 mg 내지 15 mg 범위의 투약량으로 투여된다.
- [0187] 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 근육 내로 주사된다 (근육내 주사). 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피부 아래로 주사된다 (피하 주사). 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 근육 내로 주사된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피부 아래로 주사된다.
- [0188] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 치료를 필요로 하는 피험자에게 CTPs에 의해 변성된 GH를 제공하는 단계, 및 그에 따라 성장 호르몬 요법의 사용에서 순응도를 증가시키는 단계를 포함하는, GH 요법의 사용에서 순응도를 증가시키는 것을 포함한다.
- [0189] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTPs에 의해 변성된 GH 등의 50,000 달톤 미만의 분자량의 단백질 약물은 일반적으로 몇시간의 짧은 순환 반감기를 갖는 생체내 짧은 수명의 종이다. 또 다른 구현예에서, 피하 투여 경로는 일반적으로 순환기 내로 더 느린 방출을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 변성된 폴리펩티드는 GH 와 같이 50,000 달톤 미만의 분자량의 단백질 약물의 반감기를 연장한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 변성된 폴리펩티드는 인터페론이 더 긴 기간 동안 그들의 유리한 효과를 발휘하게 한다.
- [0190] 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 CTP 변성된 폴리펩티드의 면역원성은 단리된 GH에 대해서와 동일하다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 CTP 변성된 폴리펩티드의 면역원성은 단리된 GH에 대해 비교할만하다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 GH를 CTP 펩티드로 변성시키는 것은 GH의 면역원성을 감소시킨다. 또 다른 구현예에서, GH를 포함하는 CTP 변성된 폴리펩티드는 단리된 GH 단백질만큼 활성이다. 또 다른 구현예에서, GH를 포함하는 CTP 변성된 폴리펩티드는 단리된 GH보다 더 활성이다. 또 다른 구현예에서, GH를 포함하는 CTP 변성된 폴리펩티드는 생물 활성의 감소를 최소화하면서 분해에 대한 성장 호르몬의 보호 능력을 최소화한다.
- [0191] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 GH 요법을 필요로 하는 만성 질환으로 고통받는 피험자의 순응도를 증가시키는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 상기 기재된 바의 CTPs에 의해 GH를 변성시킴으로써 GH의 투여 빈도의 감소를 가능케 한다. 또 다른 구현예에서, 용어 순응도는 준수를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 GH의 투여 빈도를 감소시킴으로써 GH 요법을 필요로 하는 환자의 순응도를 증가시키는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, GH의 투여 빈도의 감소는 CTP-변성 GH를 더 안정되게 하는 CTP 변형으로 인해 달성된다. 또 다른 구현예에서, GH의 투여 빈도의 감소는 성장 호르몬의 T1/2를 증가시킨 결과로서 달성된다. 또 다른 구현예에서, GH의 투여 빈도의 감소는 GH의 간극 시간을 증가시킨 결과로서 달성된다. 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 투여 빈도의 감소는 성장 호르몬의 AUC 척도를 증가시킨 결과로서 달성된다.
- [0192] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 비-인간 피험자에서 체지방을 감소시키는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 비-인간 성장 호르몬과, 상기 비-인간 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드 (CTP), 및 상기 비-인간 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs로 구성되고, 임의로 상기 하나의 CTP의 아미노 말단에 부착된 신호 펩티드로 구성된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터의 치료학적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 단계, 및 그에 따라 비-인간 피험자에서 성장 또는 체중 증가를 유도하는 단계를 포함한다.
- [0193] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 인간 피험자에서 인슐린-유사 성장 인자 (IGF-1) 레벨을 증가시키는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 성장 호르몬과, 상기 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 용모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드 (CTP), 및 상기 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 용모 성선 자극 호르몬 CTPs를 포함하는 폴리펩티드의 치료학적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 단계, 및 그에 따라 상기 피

험자에서 IGF-1 레벨을 증가시키는 단계를 포함한다.

[0194] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 비-인간 피험자에서 인슐린-유사 성장 인자 (IGF-1) 레벨을 증가시키는 방법을 제공하는 것으로, 그 방법은 비-인간 성장 호르몬과, 상기 비-인간 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 융모 성선 자극 호르몬 카르복시 말단 펩티드 (CTP), 및 상기 비-인간 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 두 개의 융모 성선 자극 호르몬 CTPs로 구성되고, 임의로 상기 하나의 CTP의 아미노 말단에 부착된 신호 펩티드로 구성된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터의 치료학적 유효량을 상기 피험자에게 투여하는 단계, 및 그에 따라 비-인간 피험자에서 성장 또는 체중 증가를 유도하는 단계를 포함한다.

[0195] 일 구현예에서, 인간 피험자에서 IGF-1 레벨을 증가시키는 것은 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 근위축성 측삭 경화증 (ALS, "루게릭 병"으로도 알려짐), 심한 화상 부상 및 근간장성 근이영양증 (MMD)을 치료하거나, 예방하거나 또는 억제하는데 효과적일 수 있다.

[0196] 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 하루에 한 번 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 폴리펩티드는 피험자에게 2일마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 3일마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 4일마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 5일마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 6일마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 매주마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 7 내지 14일마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 10 내지 20일마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 5 내지 15일마다 1회 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 피험자에게 15 내지 30일마다 1회 투여된다.

[0197] 또 다른 구현예에서, 복용량은 50 내지 500 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 50 내지 150 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 100 내지 200 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 150 내지 250 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 200 내지 300 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 250 내지 400 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 300 내지 500 mg/일의 범위 내이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 350 내지 500 mg/일의 범위 내이다.

[0198] 일 구현예에서, 복용량은 20 mg/일이다. 일 구현예에서, 복용량은 30 mg/일이다. 일 구현예에서, 복용량은 40 mg/일이다. 일 구현예에서, 복용량은 50 mg/일이다. 일 구현예에서, 복용량은 0.01 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.1 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.530 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 0.05 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 50 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 10 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 20 내지 70 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 5 mg/일이다.

[0199] 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 90 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 90 mg/2일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1-90 mg/3일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 90 mg/4 일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 90 mg/5 일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 90 mg/6 일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 90 mg/주이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 90 mg/9일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 90 mg/11일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 1 내지 90 mg/14일이다.

[0200] 또 다른 구현예에서, 성장 호르몬 복용량은 10 내지 50 mg/일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 10 내지 50 mg/2일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 10 내지 50 mg/3 일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 10 내지 50 mg/4일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 10 내지 50 μg mg/5일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 10 내지 50 mg/6 일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 10 내지 50 mg/주이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 10 내지 50 mg/9일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 10 내지 50 mg/11일이다. 또 다른 구현예에서, 복용량은 10 내지 50 mg/14 일이다.

[0201] 경구 투여는 일 구현예에서, 정제, 캡슐제, 로젠지제, 씹을 수 있는 정제, 혼탁액제, 에멀전제 등을 포함하는 단위 복용량 형태를 포함한다. 그러한 단위 복용량 형태는 안정하고 효과적인 양의 목적 화합물 또는 화합물들을 포함하고, 그들 각각은 일 구현예에서, 약 0.7 또는 3.5 mg 내지 약 280 mg/70 kg이거나, 또는 또 다른 구현예에서, 약 0.5 또는 10 mg 내지 약 210 mg/70kg이다. 경구 투여를 위한 단위 복용량 형태의 제조에 적합한 약제학적으로-허용가능한 담체는 당업계에 잘 공지되어 있다. 몇몇 구현예에서, 정제는 통상적으로 탄산 칼슘, 탄산 나트륨, 만니톨, 락토스 및 셀룰로오스 등의 불활성 희석제; 전분, 젤라틴 및 수크로오스 등의 결합제;

전분, 알긴산 및 크로스카르멜로스(croscarmelose) 등의 봉해제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 및 탈크 등의 윤활제로서 종래의 약제학적으로-호환가능한 보조제를 포함한다. 일 구현예에서, 이산화 규소와 같은 활택제는 분말-혼합물의 유동 특성을 개선하기 위해 사용될 수 있다. 일 구현예에서, FD&C 염료와 같은 착색제는 외양을 위해 첨가될 수 있다. 아스파탐, 사카린, 멘톨, 페퍼민트, 과일 풍미와 같은 감미료 및 착향제는 씹을 수 있는 정제에 유용한 보조제이다. 캡슐제는 통상적으로 상기 개시된 하나 이상의 고체 희석제를 포함한다. 몇몇 구현예에서, 담체 성분의 선택은 본 발명의 목적 상 중요하지 않을 수 있는 맛, 비용 및 보존 안정성과 같은 부수적인 고려 사항에 의존하고, 당업자에 의해 용이하게 이루어질 수 있다.

[0202] 일 구현예에서, 경구 복용량 형태는 소정의 방출 프로필을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 경구 복용량 형태는 확장된 방출 정제, 캡슐제, 로젠지제 또는 씹을 수 있는 정제를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 경구 복용량 형태는 서방형 정제, 캡슐제, 로젠지제 또는 씹을 수 있는 정제를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 경구 복용량 형태는 즉각 방출형 정제, 캡슐제, 로젠지제 또는 씹을 수 있는 정제를 포함한다. 일 구현예에서, 경구 복용량 형태는 당업자에게 공지된 바의 약제학적 활성 성분의 원하는 방출 프로필에 따라 제형화된다.

[0203] 경구용 조성물은, 몇몇 구현예에서 액상 용액, 에멀전제, 혼탁액제, 등을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 그러한 조성물을 제조하기에 적합한 약제학적으로-허용되는 담체는 당업자에게 잘 공지되어 있다. 몇몇 구현예에서, 액상 경구 조성물은 원하는 화합물 또는 화합물들의 약 0.012% 내지 약 0.933%를 포함하거나, 또는 또 다른 구현예에서, 약 0.033% 내지 약 0.7%를 포함한다.

[0204] 몇몇 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물은 용액 또는 에멀전제를 포함하고, 몇몇 구현예에서 이들은 안정하고 효과적인 양의 본발명의 화합물을 포함하고, 임의로 국소 비강내 투여용으로 의도된 다른 화합물을 포함하는 수용액 또는 에멀전제이다. 몇몇 구현예에서, 그 조성물은 대상 화합물의 약 0.01% 내지 약 10.0% w/v, 더욱 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 2.0을 포함하고, 이는 비강내 경로에 의해 화합물을 전신 전달하기 위해 사용된다.

[0205] 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 액체 제제의 정맥내, 동맥내, 또는 근육내 주사에 의해 투여된다. 몇몇 구현예에서, 액체 제형은 용액제, 혼탁액제, 분산액제, 에멀전제, 오일 등을 포함한다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 정맥내로 투여되고, 그에 따라 정맥내 투여에 적합한 형태로 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 동맥내로 투여되고, 그에 따라 동맥내 투여에 적합한 형태로 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 근육내로 투여되고, 그에 따라 근육내 투여에 적합한 형태로 제형화된다.

[0206] 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 신체 표면에 국소로 투여되고, 그에 따라 국소 투여에 적합한 형태로 된다. 적합한 국소 제형은 젤제, 연고제, 크림제, 로션제, 점적제 등을 포함한다. 국소 투여를 위해, 본 발명의 화합물은 약제학적 담체의 존재 또는 부재 하에 추가의 적절한 치료제 또는 작용제와 배합되고, 생리학적으로 허용되는 희석제 중에서 용액제, 혼탁액제, 또는 에멀전제로서 제조되고 도포된다.

[0207] 일 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 당업계에 잘 공지된 공정에 의해, 예를 들면 종래의 혼합, 용해, 과립화, 당의정-제조, 가루화(levigating), 유화, 캡슐화, 포괄법(entraping) 또는 동결 건조 공정에 의해 제조된다.

[0208] 일 구현예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 약제학적 조성물은 약제학적으로 사용될 수 있는 제제로 활성 성분의 가공을 촉진시키는 통상적인 방식으로 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체를 사용하여 제형화된다. 일 구현예에서, 제형은 선택된 투여 경로에 의존한다.

[0209] 일 구현예에서, 본 발명의 주사제는 수용액으로 제형화된다. 일 구현예에서, 본 발명의 주사제는 헹크 용액, 링거액, 또는 생리적 염 완충제와 같은 생리학적으로 적합한 완충제로 제형화된다. 몇몇 구현예에서, 경점막 투여를 위해, 배리어를 침투하기에 적절한 침투제가 제형에 사용된다. 그러한 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.

[0210] 일 구현예에서, 본원에 기재된 제제는 비경구 투여를 위해, 예를 들면, 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의해 제형화된다. 몇몇 구현예에서, 주사용 제형은 단위 복용량 형태로, 예를 들면, 임의로 보존제가 첨가된 앰풀로 또는 다크 투약량 용기로 제공된다. 몇몇 구현예에서, 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 혼탁액제, 용액제 또는 에멀전제이고, 혼탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유한다.

[0211] 상기 조성물은 또한 몇몇 구현예에서, 염화 벤잘코늄 및 티메로살 등과 같은 보존제; 에테트산 나트륨 등과 같은 퀼레이트제; 인산염, 시트르산염 및 아세테이트와 같은 완충제; 염화 나트륨, 염화 칼륨, 글리세린, 만니톨 등과 같은 긴장성 제제; 아스코르브산, 아세틸시스틴, 나트륨 메타바이설파이트 등과 같은 항산화제; 방향제;

셀룰로스 및 그의 유도체를 포함하는 중합체 등의 점도 조절제; 필요에 따라 이들 수성 조성물의 pH를 조절하기 위한 폴리비닐 알콜 및 산 및 염기를 포함한다. 상기 조성물은 또한 몇몇 구현예에서, 국소 마취제 또는 다른 활성 성분을 포함한다. 상기 조성물은 분무제, 연무제, 점적제, 등으로서 사용될 수 있다.

[0212] 몇몇 구현예에서, 비경구 투여를 위한 약제학적 조성물은 수용성 형태로 활성 제제의 수용액을 포함한다. 추가로, 활성 성분의 혼탁액제는 몇몇 구현예에서, 적절한 오일계 또는 수계(수계) 주사 혼탁액제로서 제조된다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 몇몇 구현예에서, 참기름과 같은 지방 오일, 또는 에틸 올레아이트, 트리글리세리드 또는 리포좀과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 수성 주사 혼탁액제는 몇몇 구현예에서, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란과 같이 혼탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유한다. 또 다른 구현예에서, 상기 혼탁액은 고농축 용액의 제조를 허용하도록 활성 성분의 용해도를 증가시키는 적합한 안정 화제 또는 작용제를 함유하기도 한다.

[0213] 또 다른 구현예에서, 활성 화합물 비히클, 특히 리포좀으로 전달될 수 있다 (Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat 등, in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez- Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, 앞의 책, pp. 317-327 참조; 일반적으로 앞의 책 참조).

[0214] 또 다른 구현예에서, 조절된 방출 시스템으로 전달되는 약제학적 조성물은 정맥내 주입, 이식 가능한 삼투성 펌프, 경피 패치, 주사기, 리포좀, 또는 다른 투여 모드를 위해 제형화된다. 일 구현예에서, 펌프가 사용된다 (Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. *Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald 등, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek 등, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989) 참조). 또 다른 구현예에서, 중합성 물질이 사용될 수 있다. 또 다른 하나의 구현예에서, 조절된 방출 시스템이 치료 표적, 즉, 뇌에 근접하게 배치될 수 있고, 그에 따라 전신 복용량의 분획만을 필요로 한다 (예, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 참조). 다른 조절된 방출 시스템이 Langer의 문헌 (*Science* 249:1527-1533 (1990)의 리뷰에서 고찰되었다.

[0215] 몇몇 구현예에서, 활성 성분은 사용 전에 적합한 비히클과의 구성을 위해 분말 형태로, 예를 들면, 멸균, 무발열원성 수계 용액으로 존재한다. 조성물은 몇몇 구현예에서, 분무 및 흡입 투여를 위해 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 부착된 분무 수단에 의해 용기에 포함된다.

[0216] 일 구현예에서, 본 발명의 제제는 예를 들면, 코코아 버터 또는 다른 글리세리드와 같은 종래의 좌약 기재를 사용하여 좌약 또는 보류 관장(retention enema)과 같은 직장 조성물로 제형화된다.

[0217] 일 구현예에서, 본 발명의 제제는 주사기 또는 펜 장치를 통해 주사용 액체 제형으로 제형화된다. 몇몇 구현예에서, 본 발명의 맥락에서 사용하기 적합한 약제학적 조성물은 활성 성분이 의도된 목적을 달성하기에 효과적인 양으로 포함된 조성물을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 치료학적 유효량은 질병의 증상을 예방, 완화 또는 개선하거나 치료중인 피험자의 생존을 연장하기에 효과적인 활성 성분의 양을 의미한다.

[0218] 일 구현예에서, 치료학적 유효량의 결정은 당업자의 능력 내에 있다.

[0219] 일 구현예에서, 본원에 제공된 제형은 염화 벤잘코늄 및 티메로살 등의 보존제; 에테트산 나트륨 등의 킬레이트제; 인산염, 시트르산염 및 아세테이트 등의 완충제; 염화 나트륨, 염화 칼륨, 글리세린, 만니톨 등의 긴장성 제제; 아스코르브산, 아세틸시스틴, 나트륨 메타바이설파이트 등의 항산화제; 방향제; 셀룰로스 및 그의 유도체를 포함하는 중합체와 같은 점도 조절제; 및 필요에 따라 이들 수성 조성물의 pH를 조절하기 위한 폴리비닐 알콜 및 산 및 염기를 포함하기도 한다. 상기 조성물은 국소 마취제 또는 기타 활성 성분을 포함하기도 한다. 상기 조성물은 분무제, 연무제, 점적제, 등으로서 사용될 수 있다.

[0220] 약제학적으로-허용되는 담체 또는 그의 성분으로서 작용할 수 있는 물질의 일부 예는 락토스, 글루코스 및 수크로스와 같은 당류; 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분류; 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 및 메틸 셀룰로스와 같은 셀룰로스 및 그의 유도체; 분말 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 활석; 스테아르산 및 스테아르산 마그네슘 등의 고체 윤활제; 황산 칼슘; 땅콩유, 면실유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 테오브로마유와 같은 식물성 오일; 프로필렌 글리콜, 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; 알긴산; 트윈™ 브랜드 유화제 등의 유화제; 나트륨 라우릴 설페이트와 같은 습윤제; 착색제; 착향제; 정제화제, 안정화제; 항산화제; 보존제; 무발열원성 물; 등장성 식염수; 인산염 완충 용액이다. 화합물과 관련하여 사용될 약제학적으로-허용되는 담체의 선택은 기본적으로 화합물이 투여되어야 하는 방식에 의해 결정된다. 대상 화합물이 주사되어야 하는 경우, 일 구현예에서, 약제학적으로-허용되는 담체는 pH가 약 7.4로 조절된 혈액-호환되

는 혼탁액제인 멸균, 생리적 식염수이다.

[0221] 또한, 상기 제형은 결합제 (예, 아카시아, 옥수수 전분, 젤라틴, 카보머(carbomer), 에틸 셀룰로스, 구아르 검, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스, 포비돈), 봉해제 (예, 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산, 이산화 규소, 크로스 카르멜로스 나트륨, 크로스포비돈, 구아르 검, 나트륨 전분 글리콜레이트), 다양한 pH 및 이온 강도의 완충제 (예, 트리스-HCl, 아세테이트, 포스페이트), 표면으로의 흡수를 방지하기 위한 알부민 또는 젤라틴과 같은 첨가제, 세제 (예, 트윈 20, 트윈 80, 플루로닉 F68, 담즙산 염), 프로테아제 저해제, 계면 활성제 (예, 나트륨 라우릴 설페이트), 투과 증진제, 가용화제 (예, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리세롤), 항산화제 (예, 아스코르브 산, 메타 바이설파이트, 부틸화된 하이드록시아니솔), 안정화제 (예, 히드록시프로필 셀룰로오스 히드록시프로필메틸 셀룰로오스), 점도 증가제(예, 카보머, 콜로이드성 이산화 규소, 에틸 셀룰로스, 구아르 검), 감미료 (예, 아스파르탐, 시트르산), 보존제 (예, 티메로살, 벤질 알코올, 파라벤), 윤활제 (예, 스테아르산, 스테아르산 마그네슘, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 설페이트), 유동 보조제 (예, 콜로이드성 이산화 규소), 가소제 (예, 디에틸 프탈레이트, 트리에틸 시트레이트), 유화제 (예, 카보머, 히드록시프로필 셀룰로오스, 나트륨 라우릴 설페이트), 중합체 코팅 (예, 폴록사머 또는 폴록사민류), 코팅 및 필름 형성제 (예, 에틸 셀룰로오스, 아크릴레이트, 폴리메타크릴 레이트) 및/또는 보존제를 추가로 포함한다.

[0222] 시럽제, 엘릭서, 에멀전제 및 혼탁액제를 위한 담체의 통상적인 성분은 에탄올, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 액체 수크로스, 소르비톨 및 물을 포함한다. 혼탁액을 위한 통상적인 혼탁제는 메틸 셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 셀룰로스 (예, Avicel™, RC-591), 트라가칸트 및 알긴산 나트륨을 포함하고; 전형적인 습윤제는 레시틴 및 산화 폴리에틸렌 소르비탄 (예, 폴리소르베이트 80)을 포함한다. 전형적인 보존제는 메틸 파라벤 및 나트륨 벤조에이트를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 경구용 액체 조성물은 또한 상기 개시된 바의 감미제, 착향제 및 착색제와 같은 하나 이상의 구성 성분을 포함한다.

[0223] 본원에 제공된 제형은 폴리락트산, 폴리글리콜산, 하이드로겔 등의 중합성 화합물의 미립자 제제 내로 또는 그 위로, 또는 리포좀, 마이크로에멀젼, 마이셀, 단층 또는 다중층 비히클, 파열 적혈구(erythrocyte ghost) 또는 스페로플라스트(spheroplast) 상으로 활성 물질의 흡입을 포함하기도 한다. 이러한 조성물은 물리적 상태, 용해도, 안정성, 생체 내 방출 속도 및 생체내 제거율에 영향을 미칠 것이다

[0224] 또한 본 발명에 의해 포괄되는 것은 중합체 (예, 폴록사머 또는 폴록사민류)로 코팅된 미립자 조성물 및 조직-특이적 수용체에 대해 지향된 항체, 리간드 또는 항원에 결합되거나, 또는 조직-특이적 수용체의 리간드에 결합된 화합물이다.

[0225] 몇몇 구현예에서, 화합물은 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜, 카르복시 메틸 셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐파리돈 또는 폴리프로필렌 글리콜, 카르복시 메틸 셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐파리돈 또는 폴리프로필렌 글리콜과 같은 수용성 중합체의 공유부착에 의해 변성된다. 또 다른 구현예에서, 변성된 화합물은 대응하는 변성되지 않은 화합물보다 정맥내 주사 후에 실질적으로 더 긴 혈액중 반감기를 나타낸다. 일 구현예에서, 변형은 또한 수용액 중의 화합물의 용해도를 증가시키고, 응집을 제거하고, 화합물의 물리적 및 화학적 안정성을 증진시키고, 화합물의 면역원성 및 반응성을 크게 감소시킨다. 또 다른 구현예에서, 원하는 생체내 생물학적 활성을 그러한 중합체-화합물 첨가물을 더 적은 빈도로 투여하거나 또는 변성되지 않은 화합물보다 더 적은 복용량으로 투여함으로써 달성된다.

[0226] 몇몇 구현예에서, 유효량 또는 복용량의 제제는 시험관내 분석으로 초기에 추정될 수 있다. 일 구현예에서, 복용량은 동물 모델에서 제형화될 수 있고, 그러한 정보는 인간에서 유용한 복용량을 보다 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다.

[0227] 일 구현예에서, 본원에 기재된 활성 성분의 독성 및 치료 효능은 세포 배양 또는 실험 동물에서 시험관내 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 일 구현예에서, 이를 시험관내 및 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에서 사용하기 위한 복용량 범위를 제형화하는데 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 복용량은 사용된 복용량 형태 및 이용된 투여 경로에 따라 변화한다. 일 구현예에서, 정확한 제형, 투여 경로 및 복용량은 환자의 상태를 고려하여 개개의 의사에 의해 선택될 수 있다 [예, Fingl, 등, (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1 참조].

[0228] 일 구현예에서, 치료해야 할 상태의 심각도 및 응답도에 따라, 투약은 치료 과정이 며칠 내 몇주 지속되거나 또는 치료가 실시되거나 또는 질병 상태의 감소가 달성되는 단일 투여 또는 복수 투여일 수 있다.

[0229] 일 구현예에서, 투여될 조성물 또는 제형의 양은 물론 치료중인 피험자, 고통의 심각도, 투여 방식, 처방 의사의 판단 등에 의존할 것이다.

- [0230] 일 구현예에서, 호환가능한 약제학적 담체로 제형화된 본 발명의 제제를 포함하는 조성물은 또한 제조하여, 적절한 용기에 넣고, 지시된 상태의 치료를 위해 라벨링하였다.
- [0231] 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 전신 투여를 통해 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 성장 호르몬은 정맥내, 근육내 또는 피하 주사에 의해 투여된다. 또 다른 구현예에서, CTPs에 의해 변성된 GH는 비이온성 계면 활성제 (즉, 계면 활성제류), 다양한 당류, 유기 폴리올 및/또는 인간 혈청 알부민과 같은 복합 유기 부형제 및 안정화제와 함께 조합하여 동결 건조된 (즉, 냉동 건조된) 제제이다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 주사용 멸균수에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 동결 건조된 GH를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 주사용 멸균 PBS에 기재된 바와 같이 동결 건조된 성장 호르몬을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 주사용 멸균 0.9% NaCl에 기재된 바의 동결 건조된 성장 호르몬을 포함한다.
- [0232] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 인간 혈청 알부민, 폴리올, 당, 및 음이온성 표면 활성 완정화제 등의 복합 담체를 포함하도록 추가로 제형화된다. 예를 들면, WO 89/10756 (Hara 등- 폴리올 및 p-히드록시벤조에이트를 함유함) 참조. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 기재된 바의 성장 호르몬을 포함하고 락토비온산(lactobionic acid) 및 아세테이트/글리신 완충제를 포함하도록 추가로 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 인터페론 조성물의 수중 용해도를 증가시키는 아르기닌 또는 글루타메이트 등의 아미노산을 포함하도록 추가로 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 동결 건조된 GH를 포함하고, 글리신 또는 인간 혈청 알부민 (HSA), 완충제 (예, 아세테이트) 및 등장제 (예, NaCl)를 포함하도록 추가로 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 동결 건조된 GH를 포함하고, 인산염 완충제, 글리신 및 HSA를 포함하도록 추가로 제형화된다.
- [0233] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 약 4 내지 7.2의 pH를 갖는 완충된 용액에 놓일 때 안정화된다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 약 6 내지 6.4의 pH를 갖는 완충된 용액에 놓일 때 안정화된다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 6.0의 pH를 갖는 완충된 용액에 놓일 때 안정화된다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 6.2의 pH를 갖는 완충된 용액에 놓일 때 안정화된다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 6.4의 pH를 갖는 완충된 용액에 놓일 때 안정화된다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 안정제와 같은 아미노산으로, 어떤 경우에는 염(아미노산이 충전된 측쇄를 포함하지 않는 경우)으로 안정화된다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 실온에서 안정화된다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 4°C에서 안정화된다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 5°C에서 안정화된다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 -20°C에서 안정화된다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 3 개월 동안 안정화된다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 일년 동안 안정화된다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 적어도 2년 동안 안정화된다.
- [0234] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 아미노산인 안정화제를 약 0.3% 내지 5중량% 포함하는 액체 조성물로 제형화된다.
- [0235] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 투약 정확도 및 생성물 안정성을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 주사용 용도로 사용하기 위해 생물학적으로 활성인 안정한 액체 제형을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 동결 건조되지 않은 GH를 포함한다.
- [0236] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 투여하기에 앞서 저장 및 선적을 용이하게 하는 액체 상태로 장기간 동안 저장을 허용하는 액체 제형을 제공한다.
- [0237] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 매트릭스 물질로서 고체 지질을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 주사 가능한 약제학적 조성물은 매트릭스 물질로서 고체 지질을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 분무 콘질링(congealing)에 의한 지질 미립자의 생산은 Speiser (Speiser and al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54)에 의해 기재되어 있고, 경구 투여용 지질 나노펠렛이 후속된다 (Speiser EP 0167825 (1990)). 또 다른 구현예에서, 사용되는 지질은 신체에 의해 잘 용납된다 (예, 비경구 영양용 에멀전제 중에 존재하는 지방산으로 구성된 글리세

리드)

[0238] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 리포좀 형태로 존재한다 (J. E. Diederichs and al., Pharm./nd. 56 (1994) 267- 275).

[0239] 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 중합성 미립자를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 주사 가능한 약제학적 조성물은 중합성 미립자를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 나노 입자를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 리포좀을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 지질 에멀전을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 미소구체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 지질 나노 입자를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 양쪽 친매성(amphiphilic) 지질을 포함하는 지질 나노 입자를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바의 CTPs에 의해 변성된 GH를 포함하는 약제학적 조성물은 약물, 지질 매트릭스 및 계면활성제를 포함하는 지질 나노 입자를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 지질 매트릭스는 적어도 50% w/w인 모노글리세리드 함량을 갖는다.

[0240] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 복용량 형태를 함유하는 FDA 승인 키트와 같은 팩 또는 디스펜서 장치에 제공된다. 일 구현예에서, 팩은 예를 들면, 블리스터 팩과 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함한다. 일 구현예에서, 팩 또는 디스펜서 장치는 투여를 위한 지시 사항이 수반된다. 일 구현예에서, 팩 또는 디스펜서는 의약품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 용기와 관련된 통지에 의해 수용되고, 그 통지는 인간 또는 동물 투여용 조성물의 형태의 기관에 의한 승인을 반영한다. 이러한 통지는 일 구현예에서, 처방 약물 또는 승인된 제품 삽입물에 대해 미국 식품 의약청에 의해 승인된 대로 라벨링된다.

[0241] 일 구현예에서, 본 발명의 CTPs에 의해 변성된 GH는 각각의 작용제 자체에 의한 치료와 비교하여 개선된 치료 효과를 달성하기 위해 추가의 활성제와 함께 개체에 제공될 수 있음이 이해될 것이다. 또 다른 구현예에서, 병용 요법과 연관된 부작용을 최소화하기 위한 조치 (예, 상보적 작용제의 투약 및 선택)가 취해진다.

[0242] 본 발명의 추가의 목적, 이점 및 신규한 특징은 제한적이도록 의도되지 않는 하기 실시예들을 검토함에 따라 당업자에게 명백해질 것이다. 추가로, 상기 기술되고 아래 청구의 범위 부분에 청구된 바의 본 발명의 다양한 구현예들 및 양태들 각각은 다음 실시예들에서 실험적 지원을 발견하게 된다.

#### 실시예

[0244] 일반적으로, 본원에서 사용된 명명법 및 본 발명에서 사용된 실험 절차는 문자, 생화학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 이러한 기술은 문헌에 철저하게 설명되어 있다. 예를 들면, 문헌["Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook 등, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel 등, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 등, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren 등 (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); methodologies as set forth in U.S. Pat. Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 and 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites 등 (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); available immunoassays are extensively described in the patent and scientific literature, see, for example, U.S. Pat. Nos. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 and 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press,

(1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak 등, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996)]를 참조하며; 이들 모두는 참고 문헌으로서 인용된다. 다른 일반적 참조 문헌은 본 명세서 전반에 제공되어 있다.

[0245] **실시예 1**

[0246] ***hGH* 작제물의 생성**

[0247] **재료 및 방법**

[0248] 4개의 *hGH* 클론 (20kD 단백질의 변이체)을 합성하였다. 4개의 변이체로부터 *hGH* 서열을 함유하는 *Xba*I -*Not* I 단편은 *Xba*I-*Not* I에 의해 이전에 소화된 진핵 생물의 발현 벡터 pCI-dhfr에 결합되었다. 4 클론 (401-0, 1, 2, 3 및 4)으로부터 DNA를 제조하였다. 22kD 단백질로부터 또 다른 부분 *hGH* 클론 (1-242 bp)도 합성하였다 (0606114). 프라이머는 Sigma-Genosys로부터 주문하였다. 본 발명의 *hGH-CTP* 폴리펩티드를 생성하기 위해 사용된 프라이머 서열은 이하 표 1에 요약되어 있다.

[0249] **표 1**

프라이머 번호	서열식 별번호	서열	제한 부위 (서열 중에 밀줄그어짐)
25	27	5' CTCTAGAGGACATGGCAC 3'	<i>Xba</i> I
32 <sup>R</sup>	28	5' ACAGGGAGGTCTGGGGTTCTGCA 3'	
33	29	5' TGCAGAACCCCCAGACCTCCCTGTGC 3'	
4 <sup>R</sup>	30	5' CCAAACTCATCAATGTATCTTA 3'	
25	31	5' CTCTAGAGGACATGGCAC 3'	<i>Xba</i> I
35 <sup>R</sup>	32	5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3'	
34	33	5' GCCTTGACACCTACCAGGAGTCG 3'	
37 <sup>R</sup>	34	5'ACGGCCGCGCATCCAGACCTTCATCACTGAGGC 3'	<i>Not</i> I
39 <sup>R</sup>	35	5' GCGGCCGCGGACTCATCAGAAGCCGCAGCTGCC 3'	

[0250]

[0251] **402-0-p69-1 (*hGH*) 서열식별번호: 36 의 작제:** MOD-4020은 후술하는 실험에서 대조군으로서 사용하기 위해 제조된 야생형 재조합 인간 성장 호르몬 (CTP 없음)이다

[0252] 3개의 PCR 반응을 수행하였다. 첫 번째 반응은 템플릿으로서 0606114 (*hGH* 1-242 bp의 부분 클론)의 프라이머 25 및 프라이머 32<sup>R</sup> 및 플라스미드 DNA에 의해 수행하였고; PCR 증폭의 결과로서, 245 bp 생성물이 형성되었다.

[0253] 두 번째 반응은 템플릿으로서 401-0-p57-2의 프라이머 33 및 프라이머 4<sup>R</sup> 및 플라스미드 DNA에 의해 수행하였고; PCR 증폭의 결과로서, 542 bp 생성물이 형성되었다.

[0254] 마지막 반응은 템플릿으로서 이전의 두 반응의 생성물의 프라이머 25 및 4<sup>R</sup> 및 혼합물에 의해 수행하였고; PCR 증폭의 결과로서, 705 bp 생성물이 형성되었고 TA 클로닝 벡터 (Invitrogen, 카탈로그 K2000-01) 내로 결합되었다. *hGH-0* 서열을 함유하는 *Xba*I -*Not* I 단편은 진핵 생물의 발현 벡터 pCI-dhfr 내로 결합되었다. 벡터는 DG-44 CHO 세포 내로 형질 감염되었다. 세포는 무단백질 배지에서 성장하였다.

[0255] **402-1-p83-5 (*hGH-CTP*) - 서열식별번호: 37 및 402-2-p72-3(*hGH-CTPx2*) - 서열식별번호: 38 의 작제:** MOD-4021은 인간 용모 성선 자극 호르몬 (CTP)의 베타 사슬의 C-말단 웨프티드의 1개의 사분에 용합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. MOD-4021의 CTP 카세트는 C-말단 (1개의 카세트)에 부착되었다. MOD-4022는 인간 용모 성선 자극 호르몬 (CTP)의 베타 사슬의 C-말단 웨프티드의 2개의 사분에 용합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. MOD-4022의 2

개의 CTP 카세트는 C-말단 (2개의 카세트)에 부착되었다.

- [0256] hGH-CTP 및 hGH-CTP-CTP의 작제는 hGH-0의 작제와 동일한 방식으로 수행하였다. pCI-dhfr-401-1-p20-1 (hGH\*-ctp) 및 pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH\*-ctp x2)는 두 번째 PCR 반응에서 템플릿으로서 사용되었다.
- [0257] MOD-4021 및 MOD-4022는 DG-44 CHO 세포에서 발현되었다. 세포를 무단백질 배지에서 성장시켰다. 각각의 "CTP 카세트"는 8.5 Kd 내지 전체적인 분자량에 기여하면서 hGH는 22 Kd의 MW를 갖기 때문에 MOD-4021의 분자량은 ~30.5Kd이다 (도 1 참조). MOD-4022의 분자량은 ~39 Kd이다 (도 1 참조).
- [0258] **402-3-p81-4 (CTP-hGH-CTP-CTP) - 서열식별번호: 39 및 402-4-p82-9(CTP\*hGH-CTP-CTP) - 서열식별번호: 40 의 작제:** MOD-4023은 인간 용모 성선 자극 호르몬 (CTP)의 베타 사슬의 C-말단 웨티드의 3개의 사분에 융합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. MOD-4023의 3개의 CTP 카세트는 N-말단 (1개의 카세트) 및 C-말단 (2개의 카세트) 모두에 부착되었다. MOD-4024는 인간 용모 성선 자극 호르몬(CTP)의 베타 사슬의 C-말단 웨티드의 1개의 절삭된 및 2개의 완전한 사분에 융합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. MOD-4024의 절삭된 CTP 카세트는 N-말단에 부착되었고, 2개의 CTP 카세트는 C-말단 (2개의 카세트)에 부착되었다.
- [0259] 3개의 PCR 반응을 수행하였다. 첫 번째 반응은 템플릿으로서 p401-3-p12-5 또는 401-4-p22-1의 프라이머 25 및 프라이머 35<sup>R</sup> 및 플라스미드 DNA에 의해 수행하였고; PCR 증폭의 결과로서, 265 또는 220 bp 생성물이 형성되었다. 두 번째 반응은 템플릿으로서 TA-hGH-2-q65-1의 프라이머 34 및 프라이머 37<sup>R</sup> 및 플라스미드 DNA에 의해 수행하였고; PCR 증폭의 결과로서, 695 bp 생성물이 형성되었다. 마지막 반응은 템플릿으로서 이전의 두 반응의 생성물들의 프라이머 25 및 37<sup>R</sup> 및 혼합물에 의해 수행하였고; PCR 증폭의 결과로서, 938 또는 891bp 생성물이 형성되었고 TA 클로닝 벡터 (Invitrogen, 카탈로그 K2000-01) 내로 결찰되었다. hGH 서열을 함유하는 Xba I -Not I 단편은 진핵 생물의 발현 벡터 pCI-dhfr 내로 결찰되었다(도 3).
- [0260] MOD-4023 및 MOD-4024가 DG-44 CHO 세포에서 발현되었다. 세포는 무단백질 배지에서 성장시켰다. MOD-4023의 분자량은 ~47.5Kd이고 (도 1 참조) MOD-4024의 분자량은 ~43.25Kd이다 (도 1).
- [0261] **402-6-p95a-8 (CTP-hGH-CTP) - 서열식별번호: 41 의 작제:** hGH-6의 작제는 hGH-3의 작제와 동일한 방식으로 수행되었다. pCI-dhfr-402-1-p83-5 (hGH-ctp)는 두 번째 PCR 반응에서 템플릿으로서 사용되었다.
- [0262] **402-5-p96-4 (CTP-hGH) - 서열식별번호: 42의 작제:** PCR 반응은 템플릿으로서 pCI-dhfr- ctp-EPO-ctp (402-6-p95a-8)의 프라이머 25 및 프라이머 39<sup>R</sup> 및 플라스미드 DNA를 사용하여 수행하였고; PCR 증폭의 결과로서, 763 bp 생성물이 형성되었고, TA 클로닝 벡터 (Invitrogen, 카탈로그 K2000-01)에 결찰되었다. ctp-hGH 서열을 함유하는 Xba I -Not I 단편이 우리의 진핵 생물의 발현 벡터 pCI-dhfr에 결찰되어 402-5-p96-4 클론을 수득하였다.
- [0263] **실시예 2**
- [0264] **본 발명의 hGH-CTP 폴리펩티드의 생체내 생물 활성 시험**
- [0265] 다음 실험은 시판중인 재조합 인간 GH 및 MOD-4020과 비교하여 hGH-CTP 폴리펩티드의 잠재적으로 오랫동안 작용하는 생물학적 활성을 시험하기 위해 수행하였다.
- [0266] **재료 및 방법**
- [0267] 암컷 뇌하수체 절제된 쥐들 (60 -100 g)은 hGH-CTP 폴리펩티드를 매주 21.7  $\mu$ g 또는 대조군인 시판 rhGH를 매일 1회 5  $\mu$ g 피하 주사받았다.
- [0268] 체중은 모든 동물에서 치료 전에, 첫 번째 주사한 후 24시간에 및 21일째에 연구를 종료하기까지 격일로 측정하였다. 각각의 점은 그룹의 평균 체중 증가 백분율 ((0일 체중 -마지막날 체중)/0일 체중)로 나타낸다. 평균 체중 증가는 시판중인 hGH의 매일 1회 주사에 대해 정규화되었다. 치료 스케줄은 표 2에 요약되어 있다.

[0269]

## 표 2

번호	약물	N	경로	치료 스케줄	동물 투약 ( $\mu\text{g/rat}$ )	누적 복용량 ( $\mu\text{g/rat}$ )	투약 부피(ml)
1	비히클	7	피하	1, 7 및 13 일; 1/W	NA	NA	0.25
2	Mock	7	피하	1, 7 및 13 일; 1/W	NA	NA	0.25
3	MOD-4020 서열식별번호: 36	7	피하	1, 7 및 13 일; 1/W	21.7	65	0.25
4	MOD-4021 서열식별번호: 37	7	피하	1, 7 및 13 일; 1/W	21.7	65	0.25
5	MOD-4022 서열식별번호: 38	7	피하	1, 7 및 13 일; 1/W	21.7	65	0.25
6	MOD-4023 서열식별번호: 39	7	피하	1, 7 및 13 일; 1/W	21.7	65	0.25
7	MOD-4024 서열식별번호: 40	7	피하	1, 7 및 13 일; 1/W	21.7	65	0.25
8	시판중인 hGH v.1	7	피하	1, 7 및 13 일; 1/W	21.7	65	0.25
9	시판중인 hGH v.1	7	피하	1 내지 13 일; d/W	5	65	0.25

[0270]

## 결과

[0271]

결과는 도 2에 요약되어 있다. 이들 결과는 100% 체중 증가를 유도한 시판중인 rhGH에 비교하여 MOD-4023 (서열식별번호: 39) 및 MOD-4024 (서열식별번호: 40)는 120% 체중 증가를 유도하였음을 보여준다.

[0272]

## 결론

[0273]

21.7  $\mu\text{g}$ 의 MOD-4023 (서열식별번호: 39) 및 MOD-4024 (서열식별번호: 40)의 3주간의 복용량 (주사 일: 1, 7, 및 13일)은 13일 동안 5  $\mu\text{g}$ 의 복용량으로 하루에 한 번 투여받은 동일한 누적 복용량을 주사받은 시판중인 rhGH에 비교하여 뇌하수체 절제된 쥐들에서 30%를 초과하는 체중 증가를 유도하였다.

[0274]

## 실시예 3

[0275]

## CTP-변성 GH의 약물 동력학 연구

[0276]

단일-투약량 약물 동력학 연구는 Sprague-Dawley 쥐들로 수행하였다. 모든 동물 실험은 동물 복지법, 실험실 동물의 관리 및 사용에 대한 지침에 따라 Modigene, Biotechnology General Ltd.의 the Institutional Animal Care and Use Committees의 감독 및 승인 하에 수행하였다. 쥐들은 12시간 명/암 주기의 방에서 케이지당 개별적으로 또는 2마리씩 수용되었다. 물 (시 공급) 및 인증되지 않은 설치류 먹이에 대한 접근은 자유롭게 제공되었다.

[0277]

쥐들에서 CTP-hGH-CTP-CTP 및 GH의 약물 동력학을 비교하기 위해, Sprague-Dawley 쥐들 (270-290 g)의 4개의

그룹으로, 그룹당 3 내지 6마리의 수컷 쥐들로 나누었다. 쥐들은 4개의 치료 그룹에 무작위로 할당되었다 (표 3 참조). 쥐들은 GH (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  정맥내 또는 피하) 또는 CTP-hGH-CTP-CTP (108  $\mu\text{g}/\text{kg}$  정맥내 또는 피하)를 단일 피하 또는 정맥내 주사로 투여받았다. 이소플루란 마취 하에 수집된 프레도스(predose) 샘플을 제외하고, 혈액 수집은 마취되지 않은 동물들에서 수행되었다. 혈액 샘플(대략적으로 0.25 ml)는 표 11에 개략된 시간에 CTP-hGH-CTP-CTP 플라즈마 농도의 ELISA 분석을 위해 EDTA-코팅된 microtainer로 수집하였다. 각각의 샘플링 후, 혈액 부피는 동일 부피의 멸균 0.9% 식염수로 대체하였다. 샘플은 원심 분리 및 플라즈마 수확 전에 1시간까지 얼음 위에 저장하였다. 플라즈마 샘플은 분석에 앞서 대략적으로  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 저장하였다.

표 3. 쥐의 약물 동력학 연구의 실험 설계

치료 그룹	시험 물품	그룹당 동물들의 수/시점	투약 경로	성별	투약 레벨 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	주사된 부피 ( $\mu\text{l}$ )	농도 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )/전체 부피 (ml)	시점* (투약 후 시간)
1	바이오토로핀	6#	피하	수컷	50	500	20/5	0 (전-용량) 0.5, 2, 4, 8, 24, 48
2	CTP-hGH-CTP-CTP	6#	피하	수컷	108	500	43.2/5	0.5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
3	바이오토로핀	6#	IV	수컷	50	300	20/3	0, 0.12, 2, 4, 8, 24
4	CTP-hGH-CTP-CTP	6#	IV	수컷	108	300	43.2/3	0.12, 2, 4, 8, 24, 48, 72
혈액 시료의 부피/시점 - 500 $\mu\text{l}$								말단 혈액 시료s

# 시점당 3마리의 쥐

[0280] [0281] 인간 성장 호르몬 (Roche Diagnostics)을 검출하는데 특이적인 시판중인 샌드위치 ELISA 키트는 쥐의 플라즈마 샘플의 평가를 위해 사용하였다. 이 키트는 항체 샌드위치 ELISA 포맷에 의해 플라즈마 중의 인간 성장 호르몬을 검출한다. 이 키트는 쥐의 플라즈마에서 CTP-hGH-CTP-CTP의 농도를 측정하기 위해 초기에 사용하였다. 이들 플라즈마 샘플에 대해, CTP-hGH-CTP-CTP 표준 곡선 (1.2-100 ng/ml)이 사용되었고, 쥐의 플라즈마에서 CTP-hGH-CTP-CTP의 농도는 이 곡선으로부터 보간되었다.

[0282] [0283] 간극 (CL 또는 CL/F), 분배 부피 (Vd 또는 Vd/F), 반감기 ( $t_{1/2}$ ), 플라즈마 농도 대 시간 곡선 아래 면적 (AUC), 최대 관찰 플라즈마 농도 ( $C_{\max}$ ) 및 최대 관찰 플라즈마 농도까지의 시간 ( $T_{\max}$ )을 포함하는 표준 약물 동력학 파라미터는 모델링 프로그램 WinNonlin (Pharsight, 버전 3.1)을 사용하여 비구획적 분석에 의해 플라즈마 알부트로핀(albutropin) 또는 GH 농도/시간 곡선으로부터 얻었다. 플라즈마 CTP-hGH-CTP-CTP 또는 GH 농도 데이터는 이 분석을 위해 균일하게 칭량되었다. AUC는 정맥내 데이터에 대해 로그-선형 사다리꼴 분석을 사용하고 피하 데이터에 대해 선형-업/로그-다운 사다리꼴 방법을 사용하여 계산하였다. 각각의 쥐 (피하 알부트로핀 데이터 제외) 또는 원숭이에 대한 플라즈마 농도 프로필을 개별적으로 분석하고, 약물 동력학 파라미터에 대한 평균±평균의 표준 오차 (S.E.M.) 값들은 표 4 및 도 4에 보고되어 있다.

CTP-hGH-CTP-CTP는 12개까지의 0-결합된 탄수화물과 함께 275 아미노산의 단일 쇄 단백질이다. 그 구조는 인간 용모 성선 자극 호르몬 (hCG)의 베타 사슬의 C-말단 웨티드 (CTP)의 3개의 사분; N-말단에서 1개의 사분 및 C 말단에서 2개의 사분 (직렬로) 부착된 변성된 인간 성장 호르몬 (Somatropin)으로 구성되어 있다. 인간 성장 호르몬은 191개의 아미노산으로 구성되어 있다. CTP는 28개의 아미노산 및 4개의 0-결합된 당 사슬로 구성되어 있다.

[0284] **실시예 4**[0285] **SD 쥐들에서 CTP-변성 GH의 약물 동력학**

CTP-hGH-CTP-CTP의 약물 동력학을 평가하고, 시판중인 hGH (바이오토로핀)의 그것과 비교하였다.

표 4. Sprague-Dawley 쥐들에서 CTP-hGH-CTP-CTP 및 GH (바이오토로핀)의 단일-복용량의 정맥내 및 피하 투여 후 평균 약물 동력학 파라미터

PK 통계		피하		IV	
파라미터	단위	바이오토로핀	CTP-hGH-CTP-CTP	바이오토로핀	CTP-hGH-CTP-CTP
Dose	mg/Kg	50	50	50	50
AUClast	hr*ng/mL	41	680	162.7	1568.3
Cmax	ng/ml	13	36.8	275.8	926
Tmax	hr	0.5	8	0	0
MRT	hr	2.5	12.9	0.5	9.9
T1/2 알파	hr		1.58		0.74
T1/2 베타	hr	1.73	9	0.5	6.9

[0288]

[0289] **데이터 통계적 분석**

혈청 샘플의 분석은 각각의 샘플에 대한 특정 농도 레벨을 측정하기 위해 사용되었다. 농도 및 시점 데이터는 WinNonLin 비구획적 분석을 사용하여 처리되었다.

측정된 파라미터들은 다음: AUC, MRT, t1/2, Cmax, 및 Tmax를 포함한다. 표 4는 쥐들에서 CTP-hGH-CTP-CTP 또는 GH의 단일 정맥내 또는 피하 투약 후 GH 농도 (pg/ml)에 비교하여 CTP-hGH-CTP-CTP 플라즈마 농도의 우수한 약물 동력학 프로필을 보여준다 (n은 투약량/경로 당 3 내지 6 마리).

50  $\mu$ g/kg의 단일 피하 주사 후, SD 쥐의 혈액으로부터 CTP-hGH-CTP-CTP의 간극은 CTP-hGH-CTP의 그것 및 바이오토로핀의 그것보다 현저하게 더 느려졌다. 대응하는 계산된 반감기 시간 및 AUCs는 다음과 같았다:

[0293] 바이오토로핀 T1/2 1.7h, AUC 41 hr\*ng/mL

[0294] CTP-hGH-CTP T1/2 8.5h, AUC 424 hr\*ng/mL

[0295] CTP-hGH-CTP-CTP T1/2 9.0h, AUC 680 hr\*ng/mL

결론: CTP-hGH-CTP-CTP는 6개의 다른 변이체들 중에서 최종 후보로서 선택되었다. CTP-hGH-CTP-CTP는 생물학적 활성 및 약물 동력학의 견지에서 우수한 성능을 나타냈다.

[0297] **실시예 5**[0298] **CTP-변성 GH의 단일 투약/반복 투약에 대한 체중 증가 분석 (WGA)**

3 내지 4주령의 뇌하수체 절제된 (양이(interaural) 방법) 수컷 쥐들은 CRL 실험실로부터 얻었다. 3주의 수술-후 순응 기간 동안, 쥐들을 검사하고, 삼 조작된(sham-operated) 쥐들의 그것과 유사한 체중 증가로 입증되는 불완전한 뇌절제술을 받은 것으로 보이는 동물들을 제거하기 위해 매주 2회 칭량하였다. 불완전한 뇌하수체 절제된 쥐들은 연구에서 제외하였다. 뇌하수체 절제된 쥐들의 평균 체중은 실험 시에 70 내지 90 g이었다. 이것이 hGH에 대한 표준 USP 및 EP 생물 분석이다. 뇌하수체 절제된 쥐들 (뇌하수체가 제거된 쥐들)은 체중을 증가시키는 능력을 상실한다. 이를 쥐로의 hGH (및 CTP-hGH-CTP-CTP)의 주사는 체중 증가를 초래한다. 소정의 시간 및 주사된 hGH의 양에 따라 측정된 체중 증가를 기준으로, hGH (및 CTP-hGH-CTP-CTP)의 특정 활성을 측정한다. 쥐들은 0.4, 0.8 및 4 mg/Kg의 단일 피하 투약이나 3주동안 4일 간격으로 0.6 및 1.8 mg/Kg의 반복된 피하 투약으로 투약하였다. 모든 동물들의 개별 체중은 최초의 투약에 앞서, 이후 2일마다 또는 사망 시점에 사망한 쥐들의 경우에 및 희생에 앞서 무작위로 측정한다.

[0300] 단일 투약 및 반복 투약 체중 증가 분석

[0301] 뇌하수체 절제된 쥐들에서 CTP-hGH-CTP-CTP의 다른 투약 패턴 후 몸 전체 성장 응답을 비교한 결과는 도 5에 나타낸다. 그 결과는 hGH-CTP의 0.4 & 0.8 mg/Kg/일 투약량의 단일 주사가 바이오토로핀의 0.1 mg/Kg/일의 4회의 매일 주사와 동가였음을 나타낸다. hGH-CTP 효과의 피크는 2일 후였다.

[0302] 도 6은 쥐들에서 CTP-hGH-CTP-CTP의 단일 주사 후 곡선 아래 면적의 체중 증가와 상관 관계가 있음을 추가로 나타낸다. 따라서, 집단적인 테이타는 체중 증가가 누적 AUC와 밀접하게 상관 관계가 있음을 나타낸다.

[0303] 4일 간격으로 투여된 hGH-CTP 작제물은 도 7에 나타낸 바의 바이오토로핀의 매일 주사와 동일한 체중 증가를 촉진한다. 인간에서 hGH의 반감기는 하나의 단일 주사에 대해 10일 후 인간에서 잠재적 피크를 나타내고 - 쥐들에서 5배 더 나은 것으로 예상된다. 이를 결과는 인간에서 매주 또는 격주로 1회 hGH-CTP 작제물, CTP-hGH-CTP-CTP의 투여를 지원한다.

#### 실시예 6

##### CTP-변성 GH의 약력학/약물 동력학 연구

[0306] 3 내지 4주령의 뇌하수체 절제된 (양이 방법) 수컷 쥐들은 CRL 실험실에서 얻었다. 3주의 수술-후 순응 기간 동안, 쥐들을 검사하고, 삼 조작된 쥐들의 그것과 유사한 체중 증가로 입증되는 불완전한 뇌절제술을 받은 것으로 보이는 동물들을 제거하기 위해 매주 2회 칭량하였다. 불완전한 뇌하수체 절제된 쥐들은 연구에서 제외하였다. 뇌하수체 절제된 삼 쥐들의 평균 체중은 실험 시에 각각 70 내지 90 g이었다.

[0307] 쥐들은 CTP-hGH-CTP-CTP, 비히클, 인간 성장 호르몬 CTP-hGH-CTP-CTP을 단일 피하 투여 받았거나 또는 인간 성장 호르몬 (20  $\mu$ g/쥐)은 0.2 ml/쥐의 주사 부피로 피하 투여되었다. GH의 투약량은 0.35 및 1.05  $\mu$ g/Kg이었고, 성장 호르몬의 투약량은 CTP-hGH-CTP-CTP의 대응하는 0.6 및 1.8  $\mu$ g/Kg 투약량에서 GH의 양과 동물이었다. 치료 그룹은 표 5에 요약된다. 주사 후, IGF-1 분석을 위한 폴리프로필렌 샘플은 표 5에 기재된 시간에 얻어졌다. 샘플은 시판중인 ELISA (R&D 시스템)을 사용하여 IGF-1 농도에 대해 분석되었다.

[0308] 표 5. 뇌하수체 절제된 쥐 연구를 위한 치료 스케줄

치료 그룹	시험 물품	그룹당 동물들의 수/시점	투약 경로	등량 투약 (mg/쥐)	등량 복용량 (mg/Kg)	CTP-hGH-CTP-CTP Conc. mg/ml	투약 부피 (ml)	시점 * (투약-후 시간)
M7	바이오토로핀	9	피하	0.032	0.35	<b>0.16</b>	0.2	0 (전-용량) 0.5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
M8	바이오토로핀	9	피하	0.095	1.05	<b>0.475</b>	0.2	0 (전-용량) 0.5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
M9	EN648-01-08-005	12	피하	0.032 (0.055)	0.35 (0.6)	<b>0.275</b>	0.2	1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
M10	EN648-01-08-005	12	피하	0.095 (0.165)	1.05 (1.8)	<b>0.825</b>	0.2	1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
혈액 시료의 부피/시점 - 500 $\mu$ l								말단 혈액 시료

[0309]

[0310] 비구획적 약물 동력학 분석은 각각의 그룹에 대해 평균 혈청 농도 대 시간 곡선 상에서 수행하였다. CTP-hGH-CTP-CTP Cmax는 바이오토로핀 Cmax보다 상당히 더 높았다. CTP-hGH-CTP-CTP의 말단 반감기는 바이오토로핀보다 6배 길었다.

[0311] 표 6. 뇌하수체 절제된 쥐들에서 단일 피하 주사 후 CTP-hGH-CTP-CTP 및 바이오토로핀의 약물 동력학 파라미터 추정치

그룹	투약량	성별	Cmax	Tmax	AUC <sub>0-<math>\infty</math></sub>	AUC <sub>0-t</sub>	CL/F	T <sub>1/2</sub>
	mg/kg		ng/mL	hr	ng·hr/mL	ng·hr/mL	mL/hr/kg	hr
[0312]	CTP-hGH-CTP-CTP	1.8	M	2,150	8	37,713	37,695	0.928
		0.6	M	681	8	11,505	11,489	3.042
	hGH	1.05	M	1,078	0.5	3,541	3,540	9.884
		0.35	M	439	0.5	1,279	1,279	27.36

[0313] AUC<sub>0-t</sub> 및 AUC<sub>0-8</sub>는 매우 유사하였고, 샘플링 기간이 약물 동력학 프로필을 특성화하기에 충분했음을 제안한다.

CTP-hGH-CTP-CTP의 AUC는 바이오토로핀보다 10배 더 높았다. 또한, Cmax는 일반적으로 CTP-hGH-CTP-CTP에 대한 복용량에 비례하였고, 그것은 바이오토로핀의 Cmax보다 2배 더 높았다. 그러나, 도 8에 도시된 바와 같이, 0.5 시간의 바이오토로핀에 비교하여 CTP-hGH-CTP-CTP의 Tmax는 8시간이었고, 말단 반감기는 투약량 레벨에 의해 변화하는 것으로 보이지 않았다. CTP-hGH-CTP-CTP의 T<sub>1/2</sub>는 바이오토로핀보다 6.8배 길었다.

[0314] GH의 간접 효과는 성장 호르몬에 반응하여 간 및 다른 조직으로부터 분비되는 호르몬인 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-1)에 의해 주로 매개된다. 성장 호르몬의 성장 촉진 효과의 대부분은 실제로 그의 표적 세포에 작용하는 IGF-1에 기인한다. 따라서, 뇌하수체 절제된 쥐들에서 IGF-1 혈청 레벨에 대한 CTP-hGH 작제물, CTP-hGH-CTP-CTP의 효과가 측정되었다. 도 9는 뇌하수체 절제된 쥐들에서 CTP-hGH-CTP-CTP 및 시판중인 hGH의 피하 주사 후 IGF-1 혈청 레벨 결과를 나타낸다.

[0315] CTP-hGH-CTP-CTP 0.6 또는 1.8 mg/Kg 및 바이오토로핀 0.35 또는 1.05 mg/Kg의 단일 투약량이 PK/PD 프로필의 측정을 위해 뇌하수체 절제된 쥐들에게 피하로 주사되었다. 주사후 혈청 IGF-1는 특정 ELISA 키트 (Roche Diagnostics)를 사용하여 측정되었다.

[0316] CTP-hGH-CTP-CTP의 주사 후 IGF-1의 누적 혈청 레벨은 바이오토로핀의 주사후보다 상당히 높았다. Cmax는 일반적으로 CTP-hGH-CTP-CTP에 대한 복용량에 비례하였고, 그것은 바이오토로핀의 Cmax보다 3 내지 4배 높았다. 20 내지 24시간의 바이오토로핀에 비교하여 CTP-hGH-CTP-CTP의 Tmax는 36 내지 48시간이었다. 결론적으로, 혈청에서 더 높은 hGH 레벨 및 더 긴 존재는 IGF-1 레벨의 상당한 증가를 초래한다.

### 실시예 7

#### CTP-변성 GH의 탄수화물 함량 및 시알산 함량

[0319] 0-글리칸의 분석은 프로자임(Prozyme) 키트를 기반으로 한다. 0-글리칸은 페이퍼 크로마토그래피를 사용하여 단백질로부터 화학적으로 및 효소적으로 절단되고 펩티드로부터 분리된다. 0-글리칸 푸울의 시퀀싱은 표준과 비교하여 HPLC 분석이 이어지는 순차 효소 소화(엑소-글리코시다 아제)에 의해 수행된다.

#### 서열 분석에 의한 글리코프로파일링

[0321] 글리코프로파일링은 Ludger Ltd에 의해 수행되었다. 2개의 샘플 (EN648 및 RS0708)를 삼중 릴리스를 통해 취하였고 각각의 릴리스는 또한 HPLC에 의해 삼중으로 분석되었다. EN648 및 RS0708의 삼중 300  $\mu$ g 샘플 및 시트르산염/염화 나트륨 완충제의 단일 100  $\mu$ l 샘플에 더하여 양성 대조군 페루인 (250  $\mu$ g) 및 음성 대조군인 물 100  $\mu$ l를 10,000Da의 분자량 절단 막을 사용하여 원심 분리에 의해 원심 분리하여 완충제를 물로 대체하고, 다음으로 0-모드 조건 (60°C에서 6시간) 하에 헤드라진 분해를 통해 취하였다. 방출된 글리칸은 쟈-N-아세틸화되고, LudgerClean CEX 카트리지에 의해 정리되었다. 다음으로, 방출된 글리칸의 분취량은 2-아미노벤즈아미드 (2AB)에 의해 라벨링되었고, Ludger Clean S 카트리지에 의해 정리되었고, LudgerSep-N2 HILIC-HPLC에 의해 분석되었다.

#### 단당류 함량

[0323] 중성 단당류의 분석은 그들의 구성 단당류 성분에 대해 글리칸의 가수분해를 필요로 한다. 가수분해는 Ludger Ltd에 의해, 고유의 당단백질 샘플에 대해 수행되었다. 구체적으로, 50  $\mu$ g의 고유의 당단백질이 산 가수분해되었고, 2-AB (2-아미노벤즈아미드)가 라벨링되었고 역상 HPLC 컬럼 상에서 실행되었다. 이 방법은 N 및 O 연결된 유형을 포함하는 당단백질 상에 제공된 모든 글리칸을 가수분해한다.

[0324] 시알산 프로파일링

[0325] 2개의 샘플 (EN648 및 RS0708) 및 완충제 대조군을 분석하였다. 시알산 분석은 단당류의 약산 방출을 필요로 하고, LudgerSep-R1 컬럼 상에서 DMB 형광단 라벨링 및 HPLC 분석이 이어졌다. 50  $\mu$ g의 고유의 당단백질이 각각의 분석을 위해 산 가수분해되었다.

[0326] CTP-hGH-CTP-CTP의 당 분석

[0327] 표 7. 글리칸 분석. 피크의 구조적 할당 및 백분율은 HPLC 및 효소 배열 소화를 기반으로 한다.

피크 ID <sup>a</sup>	GU <sup>b</sup>	구조 <sup>c</sup>	명칭	전체 글리칸으로부터 백분율 <sup>d</sup>			
				Und <sup>d</sup>	NAN1	ABS	ABS BTG
1 <sup>e</sup>	0.92		GalNAc	0.4	0.4	0.6	53.0
2 <sup>f</sup>	1.02		갈락토스	1.9	9.7	23.8	26.5
*	1.72			4.3	4.6	2.3	
3	1.79		Gal $\beta$ 1-3GalNAc	2.3	67.7	69.4	17.1 <sup>h</sup>
4 <sup>g</sup>	2.25		NeuNAc $\alpha$ 2-3Gal	19.8	13.0 <sup>h</sup>		
*	2.57			1.5	1.9	1.1	1.1
5	2.90		NeuNAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc	70.6			
*	3.58			0.6	0.7	0.6	
6	3.22		Gal $\beta$ 1-3[NeuNAc $\alpha$ 2-6]GalNAc	0.9	2.3		
7	4.42		NeuNAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3[NeuNAc $\alpha$ 2-6]GalNAc	1.8			

[0328]

단당류 프로필은 CTP-hGH-CTP-CTP 당단백질 샘플이 지배적으로 0-연결형 글리칸을 함유하는 것을 지시한다. 주요 0-글리칸 피크 시알릴화된 코어 1 (Neu5Ac  $\alpha$ 2-3Gal  $\beta$ 1-3GalNAc)이다. 주요 시알산은 Neu5Ac이고, 3 내지 4%의 디-아세틸화된 시알산 N-아세틸-9-O-아세틸뉴라민산(Neu5, 9Ac2) 및 1% 미만의 N-글리콜뉴라민산의 존재를 제안하는 몇몇 작은 피크들이 있다. 또한 소량의 Neu5Ac  $\alpha$ 2-6(Gal  $\beta$ 1-3)GalNAc가 있다.

[0330] 실시예 8

[0331] 붉은 털 원숭이들에서 CTP-변성 GH의 약물 동력학/독성 동태학적 분석

[0332] 혈청 농도 대 시간 곡선이 각각의 동물에 대해 생성되었다. 비구획적 분석은 WinNonlin 전문 버전 5.2.1에 의해 수행되었다 (Pharsight Corporation, Mt View CA.). 추정된 약물 동력학 파라미터는 아래 표 8에 나타낸다:

[0333] 표 8. 붉은 털 원숭이에서 단일 피하 주사후 비구획적 분석으로부터 CTP-hGH-CTP-CTP 약물 동력학 파라미터 (평균  $\pm$  SD)의 추정치

파라미터	1.8 mg/kg	90 mg/kg
Cmax ( $\mu$ g/mL)	$2.073 \pm 0.417$	$108.7 \pm 46.0$
Tmax (hr)	$4 \pm 0$	$11 \pm 7$
AUC <sub>0-t</sub> ( $\mu$ g·hr/mL)	$38.7 \pm 7.4$	$2,444 \pm 394$
AUC <sub>0-<math>\infty</math></sub> ( $\mu$ g·hr/mL)	$39.0 \pm 7.3$	$2,472 \pm 388$
CL/F (mL/hr/kg)	$47.5 \pm 9.0$	$37.04 \pm 4.78$
T <sub>1/2</sub> (hr)	$10.00 \pm 1.47$	$9.85 \pm 1.07$
Vz/F (mL/kg)	$701 \pm 236$	$529 \pm 104$

[0334]

AUC<sub>0-t</sub> 및 AUC<sub>0- $\infty$</sub> 는 매우 유사하였고, 샘플링 기간이 약물 동력학 프로필을 특성화하기에 충분했음을 제안한다.

$C_{max}$ 는 복용량에 비례하였다.  $T_{max}$ 는 이후에 더 큰 복용량이었다.  $T_{max}$ 는 낮은 투약량 그룹에서 모든 동물에 대해 4시간이었고, 높은 투약량 그룹에서 8 또는 24시간이었다. 말단 반감기는 2개의 복용량 그룹에 대해 유사하다.

[0336] AUC는 더 낮은 투약량에 비교하여  $CL/F$  및  $V_z/F$ 에 대한 약간 더 낮은 추정치를 생산하는 더 높은 투약량에서 비례하는 AUC보다 약간 더 큰 투약량에 대략적으로 비례하였다.  $CL$  및  $V_z$ 가 더 큰 투약량에서 더 낮은 경우 또는  $F$ 가 더 낮은 투약량에서 더 낮은 경우를 말하는 것은 불가능하다. 그룹들 간에 그것이 의문의 여지가 있어서 그것이  $CL/F$  및  $V_z/F$ 에서 의미있는 차이를 나타내도록 하는 중복이 있었다.

[0337] 모델에 의해 추정된 약물 동력학 파라미터는 비구획 분석으로부터의 것들과 매우 유사하였다. 흡수 및 제거 반감기는 아래 표 9에 나타낸다:

[0338] 표 9. 붉은 텔 원숭이에서 약물 동력학 모델링으로부터 유도된 피하 주사 후 CTP-hGH-CTP-CTP 흡수 및 제거 반감기 (평균  $\pm$  SD)의 추정치

투약량	$T_{1/2 \text{ abs}} (\text{hr})$	$T_{1/2 \text{ el}} (\text{hr})$
1.8 mg/kg	1.17 $\pm$ 0.40	10.41 $\pm$ 2.36
90 mg/kg	6.49 $\pm$ 1.87	7.26 $\pm$ 1.85

[0339]

데이타는 제거율이 더 낮은 투약량 그룹에서 약간 더 긴  $T_{1/2 \text{ el}}$ 을 갖는 그룹들 사이에서 상당히 유사함을 지시한다. 그러나, 흡수는 다음 1.8 mg/kg에 비교하여 90 mg/kg의 피하 투여 후 5배 더 느린 것보다 많다. 비구획적 분석의 경우와 마찬가지로, 모델링은 더 큰 투약량에서 더 느린  $T_{max}$ 를 지시한다.

[0340]

GH 보충이 아동 및 성인에서 GH 결핍증의 치료에 효과적이더라도, 연장된 기간에 걸쳐 매일 주사의 단점은 투약 오류의 위험, 보호자의 수, 치료 비용 및/비순응도를 증가시킬 뿐만 아니라 특정 환자 집단에서 의사에 의해 그의 용도를 제한한다. 규정된 GH 투약 요법에 따르지 않음의 함축은 GH 요법으로부터 최적의 이익을 달성하기 위한 순응도의 필요성임을 이해하지 못할지도 모르는 단신의 아동과 같은 특정 집단에서 특히 중요하다. 매일 GH 주사 및 후속 순응도에 대한 더욱 적합한 대안을 찾는 문제는 GH-결핍 아동에서 GH 치료가 계속 요구되는 성인으로의 전이에 있어서 더 중요성을 얻는다. 매일 치료의 요건은 주로 재조합 GH의 짧은 플라즈마 반감기에 기인하고 GH의 지속된 방출 형태의 발전으로 이어진다(Reiter EO, Attire KM., Mashing TJ, Silverman BL, Kemp SF, Neolith RB, Ford KM, and Sanger P. A multimember 연구 of the efficacy and safety of sustained 방출 GH in the treatment of naive pediatric patients with GH 결핍증. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86 (2001), pp. 4700-4706.).

[0341]

본원에 기재된 바의 재조합 인간 성장 호르몬-CTP 융합 단백질인 GH-CTP는 GH의 그것보다 기간이 더 긴 쥐에서 약물 동력학 프로필을 갖는다. 이러한 독특한 약물 동력학 프로필은 성장 및 플라즈마 IGF-1 레벨의 증가 각각에 의해 입증되는 바의 성장-호르몬-결핍 쥐에서 약력학적 효과를 달성하기 위해 GH-CTP의 간헐적 투여를 허용한다.

[0342]

GH-CTP는 쥐에서 피하로 투여될 때 GH의 그것에 비해 우수한 약물 동력학 프로필을 제공한다. GH에 비교하여 GH-CTP의 플라즈마 간극에서 실질적인 차이가 있다. 구체적으로, 플라즈마는 피하 투약 후 GH보다 6배 이상 더 느리게 GH-CTP로 정리된다. GH-CTP의 말단 반감기 및 평균 체류 시간은 피하 투여 후 GH 쥐들에서의 그것보다 대략적으로 6배 더 길었다. 또한, 피하 투약 후  $C1/F$ 는 GH에 대해서보다 GH-CTP에 대해서 10배 더 낮았다.

[0343]

GH-CTP는 쥐에서 피하로 투여될 때 GH의 그것에 비해 우수한 약물 동력학 프로필을 제공한다. GH에 비교하여 GH-CTP의 플라즈마 간극에서 실질적인 차이가 있다. 구체적으로, 플라즈마는 피하 투약 후 GH보다 6배 이상 더 느리게 GH-CTP로 정리된다. GH-CTP의 말단 반감기 및 평균 체류 시간은 피하 투여 후 GH 쥐들에서의 그것보다 대략적으로 6배 더 길었다. 또한, 피하 투약 후  $C1/F$ 는 GH에 대해서보다 GH-CTP에 대해서 10배 더 낮았다.

[0344]

쥐들에서 약물 동력학 장점이 약물 동력학적 이점으로 번역되는지 여부를 검사하려는 노력으로, 매일보다 적은 빈도의 투약 요법에 의해 GH-결핍 뇌하수체 절제된 쥐에서 성장을 자극할지도 모를 가능성은 등물의 CTP-hGH-CTP-CTP 및 GH 투약량 레벨에서 시험되었다. GH-CTP의 단일 피하 주사는 GH의 4회의 매일 연속 주사와 동일한 증분의 체중 증가를 촉진했다. 또한, GH-CTP에 대한 4일마다의 투여 스케줄은 GH에 비해 증진된 체중 증가를 보여준다.

[0345]

약물 동력학적으로, 뇌하수체 절제된 쥐들에서 GH에 대해 상대적인 GH-CTP의 긴 순환 시간은 단일 피하 주사 후 혈액 플라즈마에서 측정된 연장된 IGF-1 응답을 초래하였다. GH-CTP의 단일 투약의 피하 투여는 뇌하수체 절제된 쥐들에서 투약량-의존 방식으로 순환 IGF-1 농도를 증가시켰다. 최고 알부트로핀 투약량에서, IGF-1 농도는 단일 투여 후 75시간 동안 기준 이상으로 증가되었다. 따라서, GH-CTP의 단일 투약의 증진된 순환 시간은 GH의 단일 투약에 비해 실질적인 약물 동력학적 개선을 초래하였고, GH-CTP가 표준 GH 치료 요법에 비해 감소된 투약 빈도로 유사한 성장 증진을 제공할 가능성을 높인다.

- [0346] 붉은 털 원숭이에서 90 mg/kg 및 쥐들에서 180mg/kg의 단일 CTPs 변성된 hGH-투약량은 두 종들에서 잘 허용되었다. 쥐와 영장류 사이의 상대 성장 인자는 대략적으로 이를 동물에서 단백질의 예상 간극에 기초하여 X2이다. 종들 간의 치료 단백질의 반감기 증가에 대한 업계-허용되는 외삽법 모델과 비슷하게 (FDA 지침), 영장류에서 90 mg/kg은 쥐에서 CTPs 변성된 hGH의 180mg/kg보다 약간 더 나은 PK 프로필을 갖는다. 따라서, 인간에 대한 상대 성장 외삽법은 매주 또는 2주당 1회 주사를 지원한다.
- [0347] CTP-GH 자체물을 이용하는 본 발명의 개념은 시판중인 GH 재조합 생성물에 비교하여 투약 빈도를 감소시켰다. Nutropin Depot<sup>®</sup>는 소아 집단에서 사용하기 위해 승인된 GH의 서방형 제형이지만; 역사적인 대조군들에 대한 비교는 1- 및 2-년 성장한 쥐들이 GH로 치료받은 아동에서 (1년 성장을  $10.1 \pm 2.8$  cm/연) (Silverman BL, 등 *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 15 (2002), pp. 715-722.)보다 Nutropin Depot<sup>®</sup>를 제공받은 아동에서 (1년 성장을  $8.2 \pm 1.8$  cm/연) 현저하게 ( $p < 0.001$ ) 더 낮은 것을 드러냈다. 피하로 투여된 Nutropin Depot<sup>®</sup>의 국소 효과는 결절, 홍반, 주사 부위 통증, 두통 및 구토를 포함한다. 쥐 및 원숭이 모두에서 전임상 독성학 연구는 CTP-hGH-CTP-CTP의 피하 투여가 비히클에 비교하여 어떠한 국소 반응도 생산하지 않음을 보여준다. GH의 빈번하지 못한 투여 형태에 대한 의료적 필요를 고려할 때, 쥐들에서 이 연구에서 CTP-hGH-CTP-CTP의 약리학적 특성은 이 생성물이 독성학 및 환자 순응도의 견지에서 또한 바람직함을 제안한다. 쥐에서 CTP-hGH-CTP-CTP의 지연된 활성은 현재 매일 투약에 의해 달성된 치료 이점을 달성하기 위해 간헐적 투여만을 필요로 하는 작용제로서 그의 잠재적 이용을 지원한다.
- [0348] 실시예 9
- [0349] 인간 성장 호르몬 (hGH-CTP)의 장시간-작용하는 CTP-변성 버전은 성장 호르몬 결핍 성인에서 매우 효과적이다 - 단계 II 임상 시험
- [0350] 무작위, 오픈-라밸, 단계 II 임상 시험은 현재 성장 호르몬을 매일 주사받은 환자에서 매주 또는 월 2회 주사받은 hGH-CTP의 안정성, 내약성, 약물 동력학 및 약물 동력학적 특성을 평가하기 위해 수행되었다. 시험은 6개국에서 다수의 지역에서 수행되었다. 시험에서 3개의 주요 코호트는 hGH-CTP의 단일 매주 투약량을 수용하고, 이는 성장 호르몬-결핍 성인 환자가 매일 주사의 형태로 7일 과정에 걸쳐 수용하도록 등가의 누적된 시판중인 hGH 투약량의 30%, 45% 또는 100%를 함유한다 (각각 "30%", "45%" 및 "100%" 코호트라 지칭됨). 데이터는 39명의 환자로부터, 각각의 코호트에서 13명으로부터의 결과를 반영한다. 2마리 암컷이 각각의 코호트에 포함되었다.
- [0351] 3개의 주요 코호트 외에, 성장 호르몬 결핍 성인은 공식적 단계 II 시험의 외부에서 수행된 실험적인 4번째 코호트에 등록되었다. 실험적인 4번째 코호트에서 환자들은 성장 호르몬-결핍 성인 환자가 매일 주사 형태로 2주 기간에 걸쳐 수용하는 누적성의 시판중인 투약량의 50%를 함유하는 hGH-CTP의 단일 주사를 격주로 2회 수용한다.
- [0352] hGH-CTP의 단일 매주 주사를 수용한 3개의 주요 코호트에 대한 효능은 7일의 기간에 걸쳐 (연구에서 치료 마지막 주 동안) 원하는 치료 범위에서 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) 레벨을 매일 측정함으로써 정의된다. 원하는 치료 범위는 연령 그룹과 성별로 충화된 정상 집단에서 예상되는 평균 IGF-1 레벨로부터 +2 표준 편차 내지 -2 표준 편차 사이로서 정의된다. 또한, 시험은 정상 범위 내에서 환자의 분산을 관찰할 목적으로  $+/- 1.5$  표준 편차의 더 좁은 범위 내에서 IGF-1 레벨을 측정하였다.
- [0353] 결과:
- [0354] 표 10은 치료 마지막 주 동안 측정되고, 정상적인 집단 평균 IGF-1 레벨로부터 표준 편차로 표현된, 수컷에 대해 IGF-1의 정상적인 치료 범위 ( $+/- 2$  SD) 내의 평균 백분율의 일수, 더 좁은 정상적인 치료 범위 ( $+/- 1.5$  SD) 내의 평균 백분율의 일수, 및 평균 Cmax (최고 농도 레벨)을 포함한다.

표 10. 인간 단계 II 임상 시험 결과.

코호트	IGF-1 의 좁은 정상적인 범위 내의 일수 % (+/- 1.5 SD)	IGF-1 의 정상적인 범위 내의 일수 % (+/- 2 SD)	IGF-1 의 평균 Cmax (바람직한 +2 SD 미만)
30%	57%	100%	-0.9
45%	100%	100%	0.1
100%	86%	100%	0.4

성인 환자가 일반적으로 초기 치료 투약량으로서 규정하는 누적성의 매주 hGH 투약량의 50%를 함유하는 hGH-CTP의 주당 2 mg은 성인 단계 III에서 남성 및 여성을 위한 출발 투약량으로서 정의되는 높은 가능성을 갖는다.

안정성 및/또는 내약성 문제에 대한 어떠한 증거도 없었고, 높은 투약량으로 사용될 때 hGH-CTP가 환자에서 과도한 레벨의 IGF-1 또는 심지어 정상적인 범위 이상의 레벨을 유도하였다는 어떠한 징후도 없었다.

단계 II -IGF-1 요약 및 전망

#### MOD-4023 단계 II 연구 설계 및 목적:

CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023) 매주 투여 요법을 확인하는 2 단계의 단계 II 연구가 완료되었다(도 10 참조). 시험은 정상적인 범위 ( $\pm 2SD$ ) 내의 IGF-1 SDS 레벨에 의해 반영된 바와 같이, MOD-4023 투여에 앞서 이들의 매일 치료법으로 정규화된 것으로 간주된 매일 hGH 치료법으로 현재 성장 호르몬 결핍 (GHD) 환자들에서 수행되는 연구로 스위치되었다. 연구의 단계 I은 MOD-4023의 4번째 투약후 주 동안 전체 약물 동력학-약력학 (PK-PD) 분석에 의해 지원되는 4주 투약량-찾기 연구 (4 주사)였다. 이 부분의 주요 목적은 IGF-1 레벨이 정의된 범위 내에서 유지되는 치료학적 투약량 범위를 확인하기 위한 것이다. 또 다른 목적은 3개의 상이한 투약량/멀티플라이어에서 of MOD-4023의 PK-PD 프로필을 평가하고, 투약량-의존적 응답을 확인하는 것이다. 연구의 두 번째 단계 (단계 II)는 16-주 MOD-4023 치료 및 투약 적정 기간이었다. 단계 II까지 계속한 모든 환자는 동일한 MOD-4023 투약량 레벨로 시작하였지만 (그들의 개인적인 최적화된 주간 누적 r-hGH 투약량의 61.7%), 그들의 모니터링된 IGF-1 레벨에 기초하여 변성된 그들의 투약량을 가질 수 있다.

연구의 최초의 부분에서 투약량은 MOD-4023의 매주 요법후 초기 반응을 평가하기 위해 매주 누적된 hGH의 백분율에 기초하여 투여되었다. 예를 들면: 55% 코호트로 무작위화된 hGH의 1mg/일을 수용한 환자는 매주 기준으로  $1_{\text{mg}} * 7_{\text{일}} * 0.55$ 의 MOD-4023 투약량으로 주사되었다.

#### 결과

본 연구의 주요 효능 종말점 포인트는 단계 I 동안 최종 투약량 투여 후 정상적인 범위 내에 놓인 IGF-1 레벨의 평균 시간 간격이었고, 시간으로 표현되었다. 최종 분석에서 그 주 동안 환자들 대부분의 IGF-1 레벨은 전체 주 (표 11)에 대해 정상적인 범위내였다. 최종 시점에 지정된 SDS 범위 내에 있는 환자는 168시간의 시간 간격으로 할당되었다. 환자의 어느 누구도 Cmax에서 +2 SDS를 초과하지 않았고, 어떠한 과도한 IGF-1 레벨도 없음을 나타낸다. 수컷들의 85% (수컷들 28/33)는 정상적인 범위 ( $\pm 2 SDS$ ) 내에서 평균 IGF-1 SDS를 가졌다 (도 11). 모두 3개의 코호트의  $\pm$  정상적인 범위 내에 놓인 IGF-1 레벨의 평균 시간 간격은 모든 평균 시간이 서로 1 표준 편차 내에 속함에 따라 현저한 변화를 보이지 않았다.

표 11. 단계 I 동안 4번째 투여후  $\pm 2SDS$  내에 놓인 IGF-1의 시간 간격

코호트 2	코호트 3	코호트 1a
매주 hGH 의 37%	매주 hGH 의 55%	매주 hGH 의 123.4%
<b>156.37hr</b> 120.9 $\pm$ 66.24 (hr)	<b>168hr</b> 146.49 $\pm$ 50.62(hr)	<b>151.17hr</b> 119.9 $\pm$ 66.51(hr)

예상되는 바와 같이, 매주 hGH의 37%의 투여는 정상적인 범위의 하위 부분 및 정상적인 범위 내의 더 짧은 기간에 IGF-1 SDS 값으로 이어졌다. 정상적인 범위 내의 기간에 의해 반영된 바의 IGF-1 레벨에서 현저한 개선은 더 높은 투약량(매주의 누적된 hGH 투약량의 55%)이 투여되었을 때 관찰되었다.

[0368] 기준선에 비교한 바 투약량 의존성 IGF-1 응답은 도 12에 나타낸다. 도 12에 제시된 결과는 IGF-1 레벨이 IGF-1 매주 프로필의 조절을 가능케 하는 MOD-4023 투약량 의존성 방식으로 증가한다는 개념을 지지한다. 추가로, 투약 후 120 내지 168시간에 IGF-1 값의 기준선으로부터의 평균 변화는 기준선으로 복귀하고, IGF-1 전반 레벨들이 이러한 정규화된 성장 호르몬 결핍 성인 (GHDA) 집단에서 어떠한 악화도 없이 안정함을 제안한다 (도 12).

[0369] 매일 치료받은 정규화된 환자의 평균 IGF-1 노출을 나타내는 Cavg (AUC /시간)은 동일한 환자의 매주 MOD-4023 치료의 그것에 비교되었다 (AUC 0 내지 24/24시간 대 AUC 0 내지 168/168시간 각각). 누적성 매주 hGH 투약량의 55 내지 123.4%의 매주 투약량은 Cavg에 의해 반영된 바의 비교할만한 IGF-1 노출을 제공한 한편, 매주 투약량의 37%로 치료받은 환자들에 대해 감소된 Cavg가 관찰되었고, 이는 상대적으로 낮은 매주 투약량으로 인해 우리의 예상치로 할당받았다 (표 12 및 13).

[0370] 표 12. MOD-4023 투여에 앞서 성장 호르몬 결핍 성인에게 r-hGH의 피하 투여후 IGF-1에 대한 약물 동력학적 파라미터의 요약 (단계 1; 4w)

파라미터	코호트* (최적화된 hGH 치료)		
	2	3	1a
C <sub>avg</sub> (ng/mL)	174 ± 57.0 (11)	178 ± 43.1 (11)	154 ± 28.5 (11)

\*평균 ± 표준 편차 (N).

[0371]

표 13. 성장 호르몬 결핍 성인에게 MOD-4023의 피하 투여후 IGF-1에 대한 약물 동력학적 파라미터의 요약 (단계 1; 4w)

파라미터	코호트* (MOD-4023 치료)		
	2 (37%)	3 (55.5%)	1a (123.4%)
C <sub>avg</sub> (ng/mL)	117 ± 32.5 (11)	147 ± 50.9 (11)	50.4 132 (11)

[0373]

[0374] 단계 II의 단계 I의 PD 분석에 기초하여 다음이 수행되었다: 1) 연구 목적이 환자 IGF-1 레벨, 즉, IGF-1 SDS 값을 0으로 표적화하는 레벨을 최적화하지 않더라도, (IGF-1 SDS 최적화는 비교적 긴 적정 기간을 필요로하기 때문에), MOD-4023의 매주 투여를 위한 여전한 치료학적 투약량 범위는 매일 hGH의 주간 누적성 투약량의 약 56% 내지 123%로 확립될 수 있다. 2) 매주 MOD-4023 투여후 IGF-1 프로필은 Cmax와 Ctrough 사이의 상당히 작은 차이에 의해 반영된 바와 같이 상대적으로 편평하다. 3) 평균 매주 IGF-1 노출을 나타내는 Cavg (AUC 0-168/168hr)은 4일째 값과 상관되었다. 따라서, MOD-4023 투여후 4일째가 IGF-1 레벨에 대해 모니터링하는 날로 선택되었다.

[0375]

단계 II의 단계 II (4 개월 연장) 결과 및 전망:

[0376]

더 긴 시간 동안 최적 투약량으로 정상적인 범위 내에 IGF-1를 유지하기 위한 MOD-4023의 매주 투여 능력은 연구의 두번째 부분 동안 다루어졌다 (단계 II- 4 개월 연장 기간; 도 10). 이 연구에서, 첫번째 단계와 동일한 환자 집단이 그들의 hGH 매주 투약량의 61.7%를 투여받았고, IGF-1이 2주마다 모니터링되었다. 환자들의 대부분은 주사후 4일 째에 모니터링된 바의 연구 전반에서 정상적인 범위 내로 IGF-1 SDS 값을 유지한다. 정상적인 범위 미만의 IGF-1 레벨을 나타낸 환자들은 추가로 적정되었고, 이들의 MOD-4023 투약량이 증가되었다 (임상 실습에 의해 정렬됨).

[0377]

정상적인 범위 미만의 IGF-1 SDS 값을 갖는 소수의 환자들은 추가의 적정을 필요로 하지만 IGF-1 SDS의 현저한 개선을 나타냈고, 이는 IGF-1 프로필이 MOD-4023 투약량 증가/감소에 의해 최적화될 수 있음을 나타낸다. 우수한 반응성 및 최소 투약량 변형은 필요에 따라 도 13에 제시되었고, 이하 표 14에 요약되어 있다.

[0378]

표 14. 단계 II 동안 요구되는 투약량 변형의 요약.

투약량 변형의 수	남성	여성
투약량 변형 없음	22 (34 명 중)	3 (8 명 중)
1 투약량 변형	6 (34 명 중)	1 (8 명 중)
2 투약량 변형	3 (34 명 중)	3 (8 명 중)
3 투약량 변형	3 (34 명 중)	1 (8 명 중)

[0379]

4일째에 IGF-1 SDS 값 (Cavg와 상관됨)에 기초하여, 연구의 단계 I에 비교한 바 IGF-1 레벨의 현저한 개선이 개개의 환자들에 대해 관찰되었다. 이러한 관찰은 조정 기간이 최적의 IGF-1 레벨 및 프로필에 도달하는데 필수적이라는 개념을 추가로 지원한다. 암컷들은 hGH 대체 치료 (MOD-4023도 마찬가지)에 덜 민감한 것으로 알려져 있고, 일반적으로 더 높은 투약량 및 더 긴 적정 기간을 필요로 한다. 또한, 4일째에 측정된 IGF-1 SDS 레벨은 4개월의 연장 기간 동안 정상적인 범위 내에서 유사한 값으로 일정하게 유지되었고, 이는 MOD-4023이 매주 요법에 투여될 수 있음을 나타낸다. MOD-4023의 연속 투여후 4일 째에 IGF-1 레벨에서 어떠한 큰 감소도 관찰되지 않았고, 이는 IGF-1의 "사인파" 행동의 Cmax 및 Ctrough가 연구를 따라 유지되었음을 나타내고, MOD-4023의 매주 요법을 다시 확인하였다.

[0380]

결론적으로, MOD-4023은 GHD의 치료를 위해 현재 요구되는 수많은 주사에 대한 필요성을 제거해야 한다. 이러한 연구의 결과는 MOD-4023이 주당 1회 주입될 수 있고, 바람직한 안정성 프로필을 유지하면서 평가된 임상 효능 종말점을 달성함을 나타냈다. 덜 빈번한 주사를 필요로 하는 GH 치료 요법은 순응도 및 잠재적으로 전반적인 성과를 개선할 수 있다.

[0381]

따라서, 달성된 IGF-1 프로필 및 단계 II의 안정성 및 내약성 결과에 기초하여, 단계 III 연구에 대한 권장되는 주사 빈도 및 투약은 다음과 같다: 누적성 매주 hGH 투약량의 61.7%를 함유하는 MOD-4023의 단일 매주 주사는 각각의 환자에 대해 개별화되었다.

[0382]

### 실시예 10

[0383]

#### 사춘기-전 성장 호르몬 결핍 (GHD) 아동에서 인간 성장 호르몬 (hGH-CTP) 개선된 약물 동력학의 CTP-변성 버전의 투여

[0384]

무작위, 오픈-라벨, 단계 II 임상 시험은 시판중인 표준 매일 재조합 인간 성장 호르몬의 그것에 대해 3개의 MOD-4023 투약량의 안정성, 내약성 약물 동력학 및 약력학 특성을 평가하기 위해 수행되었다. 이 연구는 6개월 선별 및 2 활성 치료 기간으로 구성되었고: 6 개월 치료는 도 14에 개략된 바와 같이 추가의 6 개월 연속 반복 투약 기간이 후속되는 PK/PD 샘플링을 포함한다. 2차 목적은 사춘기-전 성장 호르몬 결핍 (GHD) 아동에서 MOD-4023의 3개의 상이한 투약량의 약물 동력학 (PK) 및 약력학 (PD) 프로필을 평가하고, 안정성 및 효능에 기초하여 후속 단계 3 연구에 대한 MOD-4023의 최적 투약량을 선택하기 위한 것이다.

[0385]

나이브 환자에게 할당된 MOD-4023 투약량(표 15 참조)을 점진적인 방식으로 도입하기 위해, 단계적 투약량 증가가 구현되었다. 모든 환자들은 낮은 MOD-4023 투약량 (0.25 mg/kg)으로 2주 동안 3회 MOD-4023 투약량 시작된 치료 중의 하나를 수용하도록 무작위화되었다. 환자의 투약량 할당에 기초하여, 이것은 최종 할당된 투약량에 도달할 때까지 2주마다 다음 투약량 레벨까지 투약량 증가가 이어졌다.

[0387]

표 15. 투약량 코호트

코호트	MOD-4023/제노트로핀 투약량
1	0.18 mg hGH/kg 매주 주사와 등가인 0.25 mg MOD-4023 단백질/kg/주.
2	0.35 mg hGH/kg 매주 주사와 등가인 0.48 mg MOD-4023 단백질/kg/주.
3	0.48 mg hGH/kg 매주 주사와 등가인 0.66 mg MOD-4023 단백질/kg/주.
4	제노트로핀: 0.034 mg/kg/일.

[0388]

표적 투약량의 2차 투약량 투여에 후속하여, 제한된 (집단 기준) PK 및 PD 샘플링은 표 16에 기재된 바와 같이 수행되었다.

[0389]

표 16. MOD-4023 코호트에 대한 투약량 증가 도식

코호트	투약 스Kim					
	1 주	2 주	3 주	4 주	5 주	6 주
코호트 1  0.25 mg 단백질/kg/주 PK/PD 샘플링						
코호트 2  0.25 mg 단백질/kg/주	0.48 mg 단백질/kg/주 PK/PD 샘플링					
코호트 3  0.25 mg 단백질/kg/주	0.48 mg 단백질/kg/주		0.66 mg 단백질/kg/주 PK/PD 샘플링			

[0391]

MOD-4023 투약량 코호트에 할당된 환자들은 3개의 블록들 중의 하나로 코호트 내에서 무작위화되었고, 아래 표 17에 따라 제한된 PK/PD 샘플링 (1주일의 기간에 걸쳐 환자당 4개의 샘플)을 겪었다.

[0393]

표 17. MOD-4023 집단 PK 및 PD 샘플링 도식

방문 (V2, V3, V4)	a			b	c	d	e	f	g
투약후 시간(h)/ 블록 번호	0h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	120h	168h
블록 1									
블록 2									
블록 3									

[0394]

코호트 1에 할당된 환자들은 MOD-4023의 2차 투약 후 (V2a-g - 2주) 제한된 PK/PD 샘플링을 겪었고 6주 동안 투약 후 단일 방문 4 일 동안 의료 센터로 복귀하였다 (V4h).

[0396]

코호트 2에 할당된 환자들은 2주 (V2h) 동안 투약 후 단일 방문 4일 동안 의료 센터로 와서, MOD-4023의 4차 투약 후 (4주: 할당된 투약량 레벨에서 2차 투약; V3a-g) 제한된 PK/PD 샘플링을 겪었고 6주 동안 투약 후 (V4h) 단일 방문 4일 동안 의료 센터로 복귀하였다.

[0397] 코호트 3에 할당된 환자들은 2주 및 4주 동안 투약 후 (V2h 및 V3h) 단일 방문 4일 동안 의료 센터에 와서 MOD-4023의 6차 투약 후 제한된 샘플링을 겪었다 (6주: 할당된 투약량 레벨에서 2차 투약량, V4a-g).

[0398] 방문 2a 및 2h, 3a 및 3h, 및 4a 및 4h에서, 환자들은 신체 검사, 활력 징후, AEs, 국소 내약성, 오염 의약품, 글루코스 대사의 파라미터 (공복 혈당 및 인슐린; V4에서 유일한 HbA1C), 다른 호르몬 레벨 (TSH, fT4, T3, 코르티솔), 루틴 안정성 생화학 및 혈액학 (방문 2a 및 2h, 4a 및 4h), 환자의 신장 및 체중, 지질 대사의 파라미터, 및 IGF-1 및 IGFBP-3 혈청 레벨을 겪었다.

[0399] 제노트로핀 코호트 (코호트 4)에 할당된 환자들은 치료의 2주차 및 6주차 동안 방문 2 및 4 동안 의료 센터에 복귀하였다. 다음 절차가 수행되었다: 신체 검사, 활력 징후, AEs, 국소 내약성, 오염 의약품, 글루코스 대사의 파라미터 (공복 혈당 및 인슐린; V4에서 유일한 HbA1C), 다른 호르몬 레벨 (TSH, fT4, T3, 코르티솔), 루틴 안정성 생화학 및 혈액학, 환자의 신장 및 체중, 지질 대사의 파라미터, IGF-1 및 IGF-1 BP-3 혈청 레벨 (도 17).

[0400] 또한, 8차 제노트로핀 투약 후 (2주의 투약 시작), 제노트로핀 코호트에 할당된 환자들은 3개의 블록들 중의 하나로 무작위화되었고, 아래 표 18에 따라 제한된 PK/PD 샘플링 (24시간의 기간에 걸쳐 환자당 4개의 샘플)을 겪었다:

표 18. 제노트로핀 집단 PK 및 PD 샘플링 스케줄 (방문 2)

투약후 시간(h)/ 블록 번호	0h	1h	2h	4h	6h	12h	16h	20h	24h
블록 1									
블록 2									
블록 3									

[0402]

[0403] 연구의 첫 6주 후에, 모든 환자는 매월 기준으로 (10, 14, 18, 22 및 26주) 병원을 방문했다. MOD-4023 투약량 코호트 (코호트 1-3)에 할당된 환자들은 MOD-4023, IGF-1 및 IGFBP-3 레벨을 얻기 위해 MOD-4023 투약후 4일에 복귀하고 루틴 안정성 평가를 수행하도록 요청받았다. 또한, 투약 5 개월 후에, MOD-4023 투약에 할당된 환자들은 전체적인 레벨 MOD-4023 및 PD (IGF-1 and IGF-1BP-3) 샘플을 얻기 위해 투약 전에 모니터링 시간에 의료 센터에 복귀하도록 요청받았다. 제노트로핀 투약량 코호트 (코호트 4)에 할당된 환자들은 관련 투약 주 동안 어느 하루에 복귀하도록 요청받았다.

[0404] 결과:

[0405] 인구통계적 연구를 아래 표 19에서 모든 환자들에게 제시한다:

표 19. 단계 2 시험 기준선 인구 통계:

	코호트 1	코호트 2	코호트 3	코호트 4
용량	0.25 mg/kg/w MOD-4023	0.48 mg/kg/w MOD-4023	0.66 mg/kg/w MOD-4023	0.034 µg/kg/d 제노트로핀
N	9	9	10	7
	평균	SD	평균	SD
연령 (y)	6.44	2.3	6.33	2.1
피크 GH (ng/ml)*	2.84	2.9	3.58	1.7
HV SDS	-3.05	2.0	-2.82	1.1
HT SDS	-3.99	0.9	-3.82	0.8
Ht SDS - TH SDS	-3.47	0.9	-3.23	0.7
선택 IGF-1 SDS	-2.48	0.8	-2.28	0.7
성별 (%)	F 1 (11.1)	M 8 (88.8)	F 4 (44.4)	M 5 (55.6)
			3 (30)	7 (70)
				3 (42.9)
				4 (57.1)

[0407]

[0408] 그들의 최종 투여된 투약량으로 나이브 GHD에 투여된 MOD-4023의 평균 PK 프로필은 PK 파라미터가 아래 표 20

에 제공되는 동안 도 15에 제공된다:

[0409] 표 20. 비교 평균 PK 파라미터

	단위	MOD-4023				hGH
		C1 (n=13)	C2 (n=12)	C3 (n=13)	C4 (n=11)	
T <sub>1/2</sub>	hr	36.1	29.2	29.1	3.6	
T <sub>max</sub>	hr	12	12	12	2	
C <sub>max</sub>	ng/ml	459.9	810.2	795.5	17.3	
AUC 0-inf_obs	ng/ml*hr	10943.4	20050.3	25503.1	135.7	
Cl/F_obs	(mg/kg)/(ng/ml)/hr	2.28E-05	2.39E-05	2.59E-05	2.51E-04	

[0410] [0411] 매주 1회 투여된 예상된 MOD-4023은 매일 hGH에 비교하여 8배 더 높은 것으로 보인 연장된 반감기를 나타냈다. 또한, 투약량 의존성 응답은 각각의 MOD-4023 투약량의 AUC 값에 의해 반영된 바와 같이 관찰되었다.

[0412] 투약량 의존성 응답은 MOD-4023의 매주 투여의 최초의 6 개월에 걸쳐 유지되었다 (데이터는 도시되지 않음).

[0413] hGH 활성에 대해 겹증된 대리 마커인 IGF-1은 과도한 레벨 없이(>2SDS, 도 21) 일주일의 대부분 동안 표적 값 (상기 -2 높이 SD 스코어 [SDS])를 유지하는 투약량 의존성 레벨 (도 23)에서 증가되었다. IGF-1 SDS 레벨은 2SDS 이상인 과량의 레벨에 도달하지 않고 연구의 최초 6개월 동안 투약량 의존성 방식으로 절절히 계속 상승하였다 (도 16).

[0414] hGH 치료된 팔(코호트 4)은 또한 MOD-4023의 2개의 최고 코호트에 의해 관찰된 경향과 매우 유사한 IGF-1 SDS 값의 증가를 나타냈다. 또한, IGF-1 BP-3 값은 15주 동안 정상-상태 값에 도달한 MOD-4023 투여에 따른 투약량 의존성 방식으로 증가되었다 (도 17 및 18 각각). 또한, IGF-1 및 IGF1BP-3의 2개의 약력학 프로필은 MOD-4023 단일 매주 주사 유사한 투약량 범위에서 7회의 매일 주사를 대체할 수 있음을 확인한다.

[0415] 높이 속도는 MOD-4023의 투약 전 및 매주 투약후 6개월에 또는 hGH의 매일 투약 시에 모니터링되었다. 모든 코호트에 대해, 우수한 성장 반응이 상이한 코호트 사이의 어떠한 통계학적 차이도 없이 얻어졌다 (표 21 및 도 19), MOD-4023의 매주 주사가 매일 hGH로서 적절한 성장을 가능하게 할 수 있음을 추가로 확인하였다.

[0416] 표 21. MOD-4023 6m 연간 계산된 높이 속도 - 모든 환자는 6개월 치료를 완료함

코호트	투약량	N	평균 (CM)	Std Dev
코호트 1	0.25 mg/kg/w MOD-4023	9	13.48	2.71
코호트 2	0.48 mg/kg/w MOD-4023	9	12.25	2.64
코호트 3	0.66 mg/kg/w MOD-4023	10	14.37	5.26
코호트 4	0.034 µg/kg/d 제노트로핀	7	15.46	2.68
	이력 데이터 - 매일 hGH		~10	

[0417] [0418] 병행하여, 높이 속도 SDS에서 우수한 증가가 또한 얻어졌다(표 22, 표 23, 및 도 20). 마지막으로, 델타 높이 SDS는 환자의 따라 잡기 성장과의 우수한 상관 관계를 나타냈다 (도 22).

[0419]

표 22. MOD-4023 Ped. 단계 2 - 사전-연구 HV SDS 결과

코호트	투약량	N	평균	Std Dev	SE 평균
코호트 1	0.25 mg/kg/w MOD-4023	8	-3.21	2.05	0.72
코호트 2	0.48 mg/kg/w MOD-4023	8	-2.94	1.14	0.40
코호트 3	0.66 mg/kg/w MOD-4023	10	-3.11	1.79	0.56
코호트 4	0.034 µg/kg/d 제노트로핀	7	-3.36	1.98	0.75

[0420]

표 23. MOD-4023 Ped. 단계 2 - 6m HV SDS 결과

코호트	투약량	N	평균	Std Dev	SE 평균
코호트 1	0.25 mg/kg/w MOD-4023	8	5.03	1.23	0.44
코호트 2	0.48 mg/kg/w MOD-4023	8	3.23	1.88	0.67
코호트 3	0.66 mg/kg/w MOD-4023	10	5.73	3.72	1.18
코호트 4	0.034 µg/kg/d 제노트로핀	7	5.67	1.53	0.58

[0422]

모든 투약량은 우수한 따라 잡기 성장 반응을 제공하였다. 예비 통계적 분석은 코호트 사이에 어떠한 실질적으로 현저한 차이도 없지만, 코호트 당 제한된 수의 환자들 및 상대적으로 심각한 GHD 환자에 관한 몇몇 제한 사항이 있음을 나타낸다.

[0423]

## 실시예 11

[0424]

### MOD-4023의 제형 개발

[0425]

**단백질:** MOD-4023은 피하 투여를 위한 장시간-작용하는 재조합 인간 성장 호르몬 (hGH)이다. MOD-4023은 인간 용모 성선 자극 호르몬 (hCG)의 베타 사슬의 C-말단 웨티드 (CTP)의 3개의 사분에 융합된 hGH로 구성되어 있고; CTP는 4개의 O-글리코실화 부위를 포함하고, 따라서, 단백질은 12개 이하의 O-연결된 탄수화물을 갖는 275개 아미노산의 단일 사슬이다. 단백질은 생산되는 클론으로부터 CHO 세포에서 제조된다.

[0426]

**클론 생산:** 클론#2는 초기 독성학 연구, 단계 I 및 단계 II (성인)에 대해 사용된 원시 클론이었다. 이 클론을 위한 DS 및 DP에 대한 안정성 데이터는 -20°C 및 5°C에서 최대 2년 동안 사용될 수 있다. 새로운 생산 클론 (클론 #28)으로의 변환은 생산성 및 클론 안정성을 개선하기 위해 수행되었다. 클론 #28 DP는 아동에서 장기간 독성학적 연구 및 단계 II를 지원하였고, 모든 추가의 임상 활성 및 상업적 제조를 지원할 것이다. 이 클론을 위한 DP에 대한 안정성 데이터는 -20°C 및 5°C에서 최대 1년 동안 이용될 수 있다.

[0427]

**CMO의 제조:** MOD-4023의 제법은 초기 단계에서 Xcellerex (미국)에 의해 수행되었고, 단계 II까지 비-임상 연구를 지원하였다. 공정은 Rentschler Biotechnologie (RB), (독일)로 옮겨졌다. 2개의 GMP 배취가 RB에서 이미 생산되었다.

[0428]

## 추가 정보

[0429]

물리화학적 특성 -

[0430]

pI = 3-4.5에 의해 고도로 글리코실화되고 음으로 하전됨

[0431]

밀도: 1.0216 g/ml

[0432]

수용액에 가용성

[0433]

DS 및 DP 모두에 액체 제형: 10mM 시트르산염, 147 mM NaCl pH 6.

[0434]

DS의 최종 농도: 40 mg/ml

[0435]

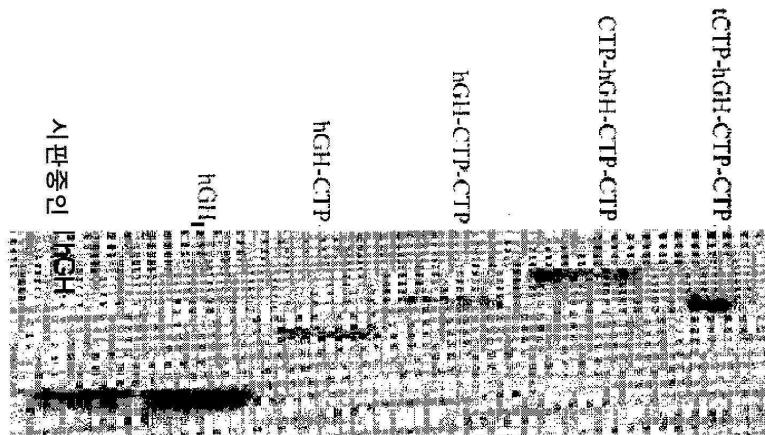
DP의 최종 농도: 5, 10, 20 및 40 mg/ml

- [0437] 1차 포장 -
- [0438] 2R 바이알 (Schott)
- [0439] 스토퍼 (West)
- [0440] 알루미늄 시일 (West)
- [0441] 미래 1차 포장 - PEN 장치
- [0442] **제형 최적화의 목적**
- [0443] **MOD-4023에 대한 안정한 액체 제형 개발하기:**
1. 첫 번째 목적: 바이알 내에서 5°C에서 2 년 안정성
  2. 두 번째 목적: 카트리지 내에서 5°C에서 2 년 안정성
- [0446] **필요한 분석 시험:**
- [0447] RP-HPLC (검증된 방법)
- [0448] SEC-HPLC (검증된 방법)
- [0449] CZE (TBD) (확립된 방법)
- [0450] **타임 라인:**
- [0451] 안정성 데이터에 기초하여, 25°C에서 2w는 포괄적인 매트릭스 제형 연구를 위한 초기 평가를 가능하게 하도록 5°C에서 생성물 안정성을 예측하기 위해 사용될 수 있다.
- [0452] **안정성 데이터**
- [0453] 데이터는 비-GMP 및 GMP 배취가 10 mM 시트로산염, 147 mM NaCl pH 6 (도 24)에서 생산되었음을 나타낸다. 데이터는 또한 MOD-4023 클론 2가 5°C에서 24 개월 동안 20 mg/ml로 안정하고, 5mg/ml와 20mg/ml 사이에 유사한 안정성 프로필이 존재함을 보여준다 (도 25A 및 25B 참조). 또한, MOD-4023 클론 2는 3 개월 동안 실온에서 안정하다 (도 26 참조). MOD-4023 클론 28은 5°C에서 12 개월 동안 20 mg/ml 또는 40mg/ml로 안정하고; DP 메인 피크 특성화 >88% (도 27a 및 도 27b). MOD-4023 클론 28은 실온에서 적어도 한 달 동안 안정하다 (도 28a).
- [0454] 5°C에서 24분 동안 안정한 클론 28과 클론 2 사이의 유사성에 기초하여, Xcellerex (XC)에서 생산된 클론 28은 5°C에서 24분 동안 안정할 것으로 예상되었다; DP 메인 피크 특성화 >88% (도 28b).
- [0455] **MOD-4023의 제조**
- [0456] T=0에서 Xcellerex (XC)와 Rent Rentschler (RB) DS (도 29) 사이의 비교 프로필. 도 30 내지 34는 XC와 RB에서 안정성의 차이를 보여준다. 등전점 초점(IEF)은 3.5 내지 4.2의 pI-값 범위에서 유사한 대역 패턴이 존재함을 나타낸다. 하나의 XC 배취에서, 높은 pI 경계에서 및 RB 배취에서 덜 희미한 이소형태가 존재하고, 낮은 pI 경계에서 더 희미한 이소형태가 존재한다 (도 35a). 또한, RB 샘플에 비교하여 XC 샘플에서 더 많은 확산 대역이 존재한다 (도 35b).
- [0457] 추가 관찰은 두 피크 (3 및 5 - 피크 정의를 위해 아래 참조)의 형성이 온도 의존성이고 고온에서 가속화되었음을 보였다 (도 36a-d)). 또한, pH=4에서 최대 5일 동안 및 pH=12에서 최대 2시간 동안 인큐베이션 후 피크 3의 %에서 어떠한 변화도 없었고 (도 37b, 37d), pH=4에서 최대 6시간 동안 인큐베이션 후 %에서 어떠한 변화도 없었다. 그러나, 6시간 후 피크 %에서 예리한 증가가 관찰되었고; pH 12에서 최대 2 시간 동안 인큐베이션 - 피크가 사라진다 (도 37a-d).
- [0458] **RB (클론 28)에서 강제 분해 연구**
- [0459] MOD-4023 약물 기질의 스트레스받은 샘플은 피크가 스트레스받지 않은 샘플에 대해 LOQ 이하임에 따라 MOD-4023 약물 기질에서 관련된 형태 5의 분석을 위해 (65°C에서 약 3일 동안) 제조되었다.
- [0460] RP-HPLC 관련된 형태에 대한 pH 효과를 시험하기 위해, 3개의 샘플이 시험되었다:
- [0461] RB - 40 mg/ml, pH=5.9.

- [0462] RB - 10 mg/ml, pH=6.2.
- [0463] XC- 40 mg/ml, pH=6.2.
- [0464] 결과는 도 38 및 39에 제공된다.
- [0465] **관련된 형태 피크 (1-7)의 단리 및 특성화 - M-스캔**
- [0466] 피크 1 -탈아미드화된 MOD-4023의 산화
- [0467] 피크 2- MOD-4023의 탈아미드화
- [0468] 피크 3- 부분적으로 산화 of MOD-4023
- [0469] 피크 5- MOD-4023, 이황화물의 아미노산 잔기 167과 168 사이 및 아미노산 잔기 171과 172 사이의 펩티드 결합 절단.
- [0470] 피크 6 및 피크 7- 절삭된 형태
- [0471] 결론 (도 24-39 참조)
- [0472] **안정성**
- [0473] 클론 2 유래된 제품은 5°C에서 2년 이하 동안 안정하다.
- [0474] XC에서 제조된 클론 28 유래된 제품은 클론 2와 유사한 프로필을 갖고 5°C에서 적어도 1년 동안 안정하다.
- [0475] RB에서 제조된 클론 28 유래된 제품은 이전에 관찰되지 않은 관련된 형태 (주로 피크 5)의 가속화된 기간 및 새로운 피크 (피크 7)의 기간을 갖는 변경된 안정성 프로필을 갖는다.
- [0476] 이전의 연구는 피크 3 및 5가 메인 피크로서 유사한  $M_w$ 를 갖고, MOD-4023 랜드에 대응하는 항-hGH와 반응함을 보여준다.
- [0477] 두 피크: 3 및 5는 온도 의존성이다 (피크의 %는 온도가 증가될 때 증가한다).
- [0478] HMW 형태의 백분율에서 어떠한 변화도 -20°C 및 5°C에서 인큐베이션 동안 관찰되지 않았다.
- [0479] 상이한 온도: 5, 25, 37, 50 및 65°C에서 RB 생성물 GMP1(2주의 인큐베이션 후)의 안정성은 피크 7 제형이 25°C 및 37°C에서 가속화되지만 50 및 65°C에서 관찰되지 않음을 나타냈다.
- [0480] 25°C에서 인큐베이션이 이어지는 65°C에서 10분 동안 RB 샘플의 인큐베이션은 피크 7의 발생을 근절시켰다 (25°C에서 2주 후).
- [0481] 본 발명의 바람직한 구현예들을 수반되는 도면을 참조하여 설명하였지만, 본 발명은 정확한 구현예들로만 제한되지 않고, 다양한 변화 및 변형들이 첨부된 특허 청구의 범위에 정의된 바의 본 발명의 범위 또는 정신에서 벗어남이 없이 당업자들에 의해 실시될 수 있음이 이해되어야 한다.

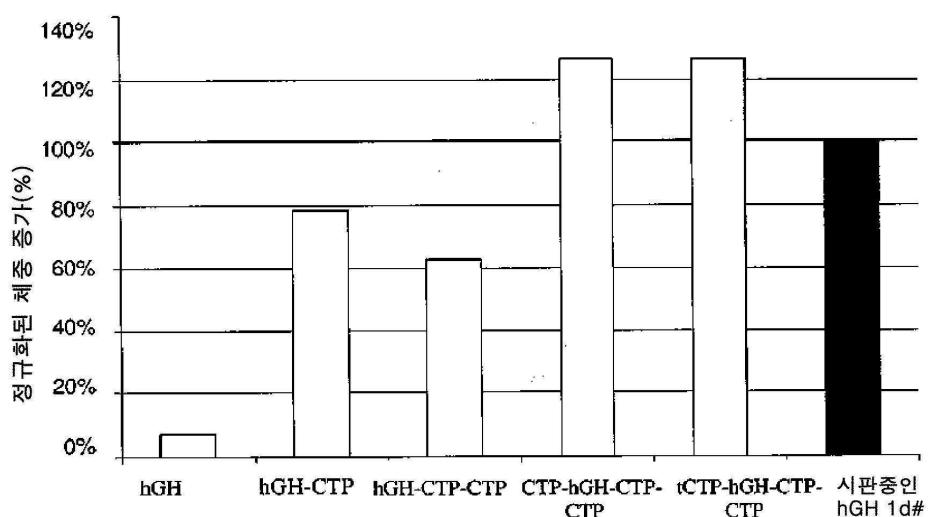
## 도면

## 도면1

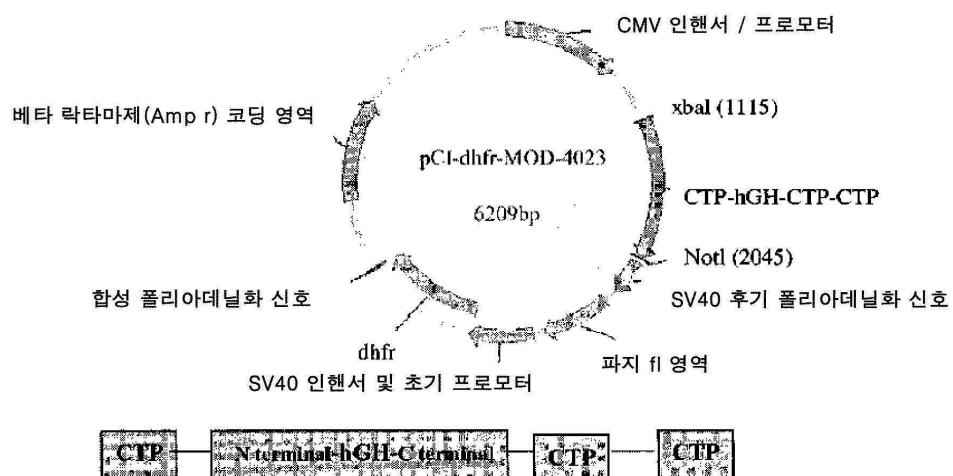


## 도면2

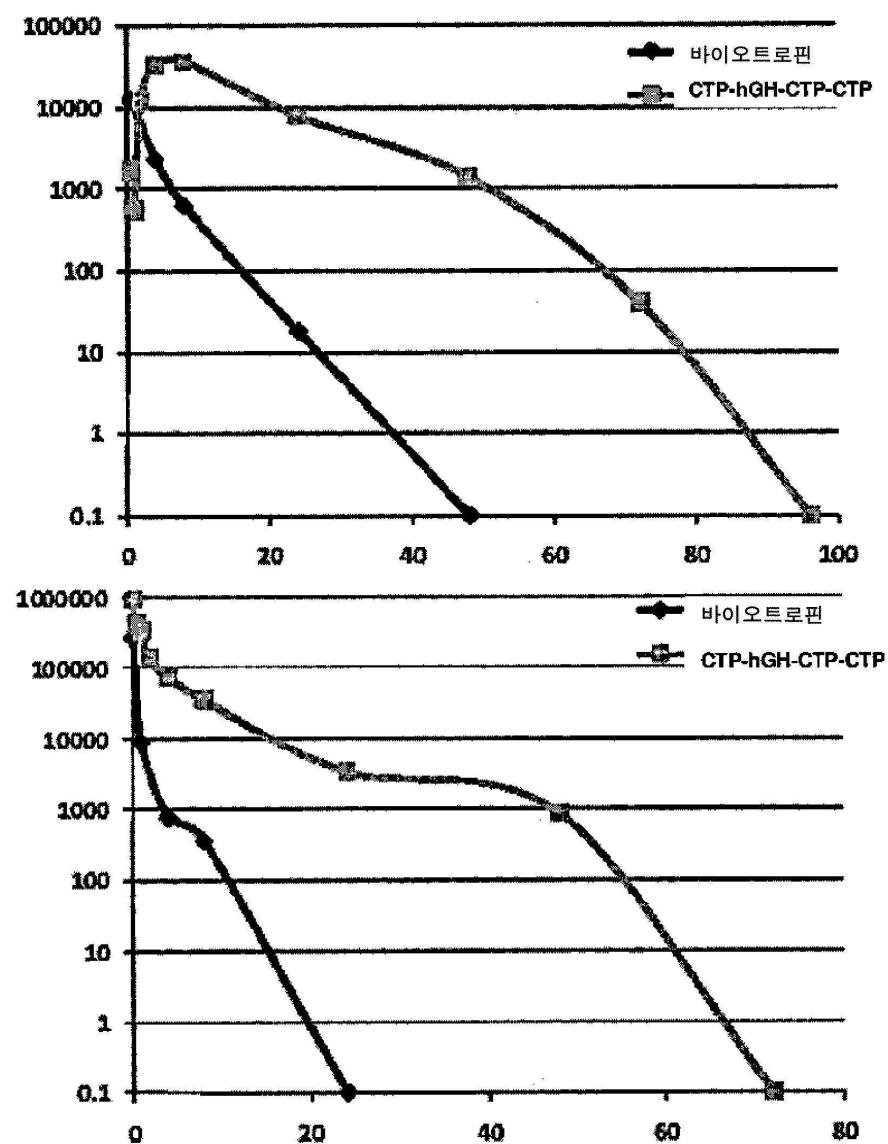
체중 증가 비교 분석



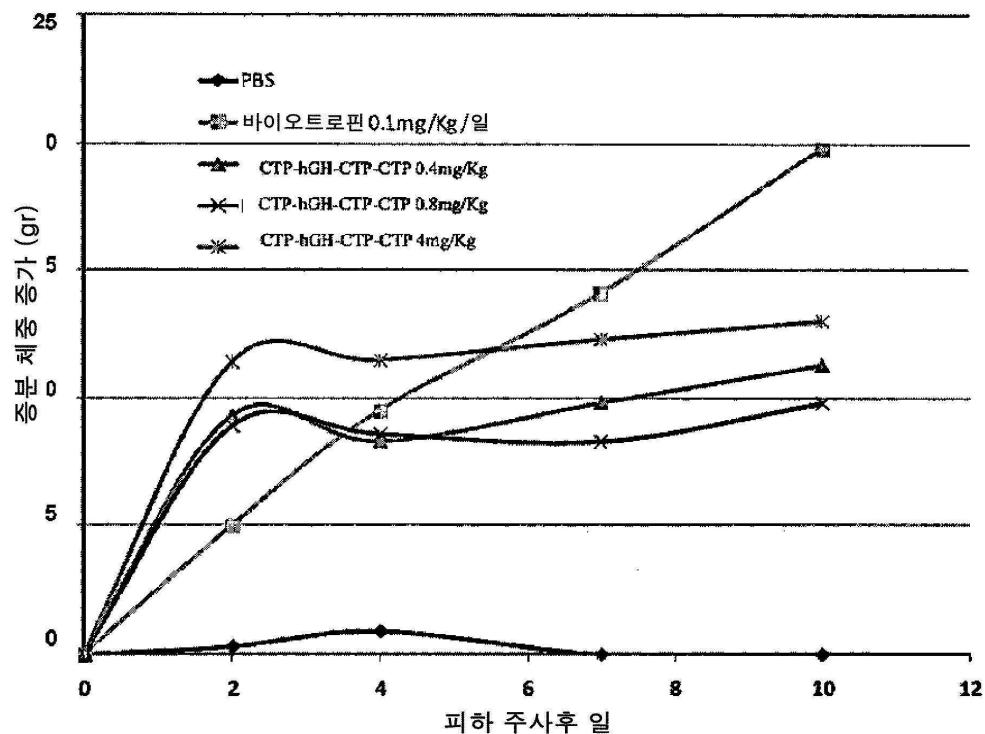
## 도면3



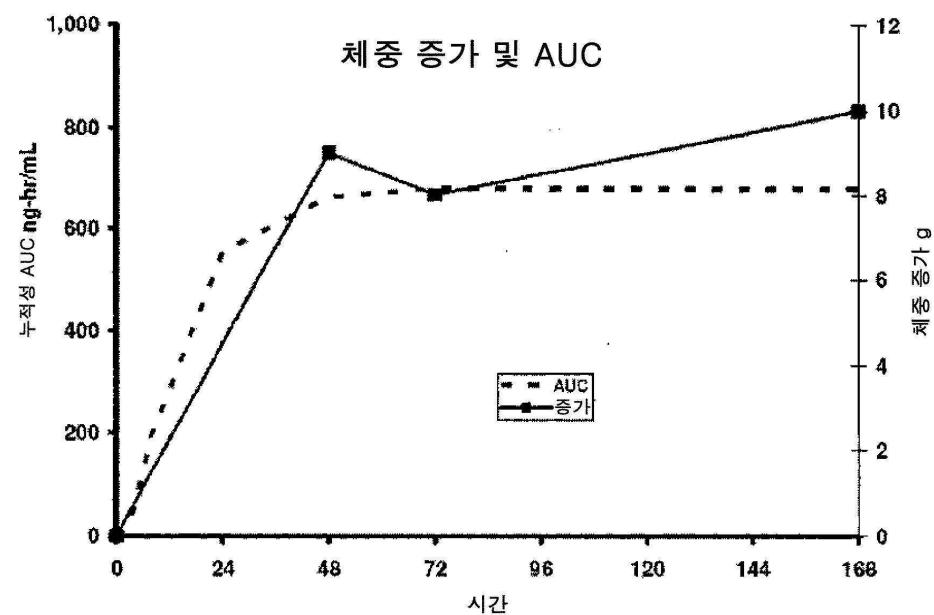
## 도면4



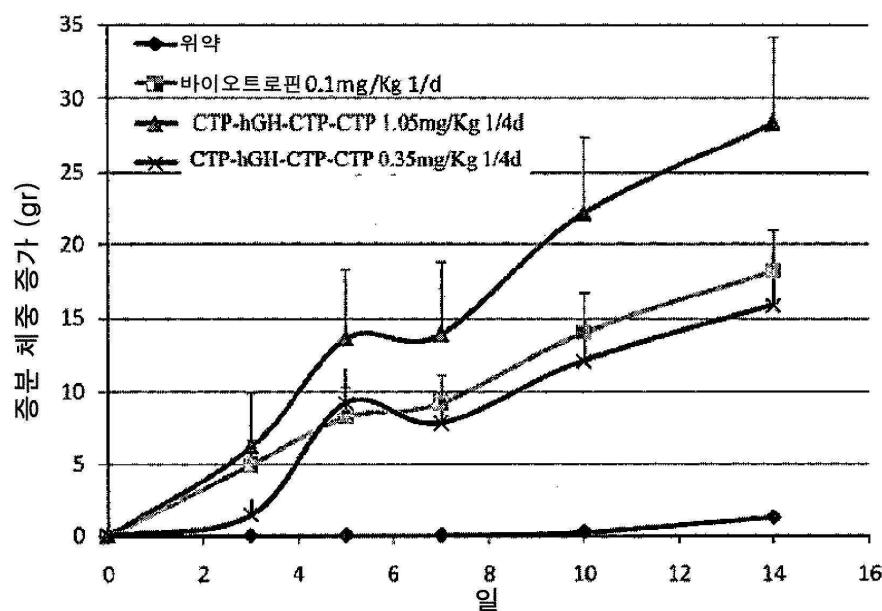
도면5



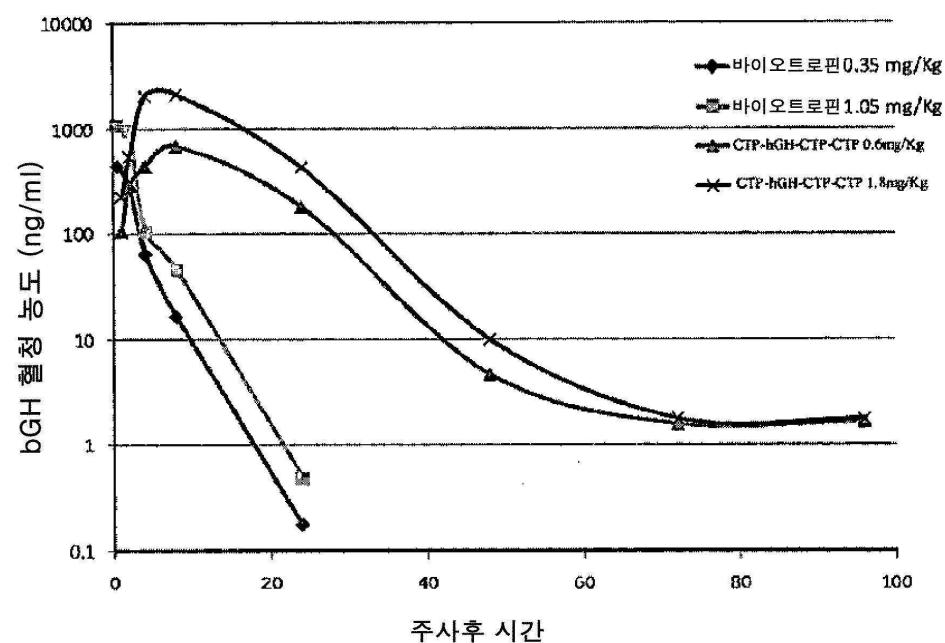
도면6



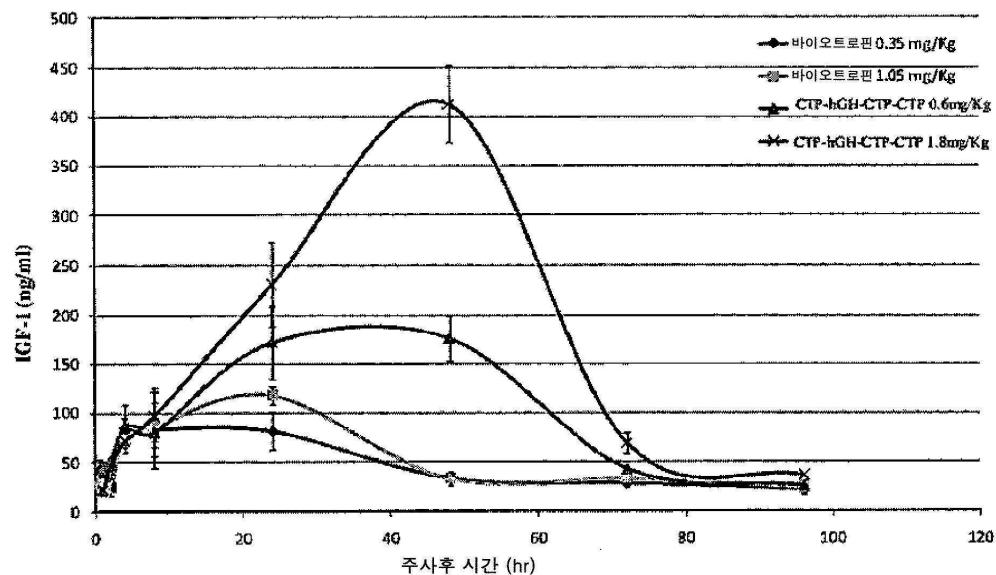
## 도면7



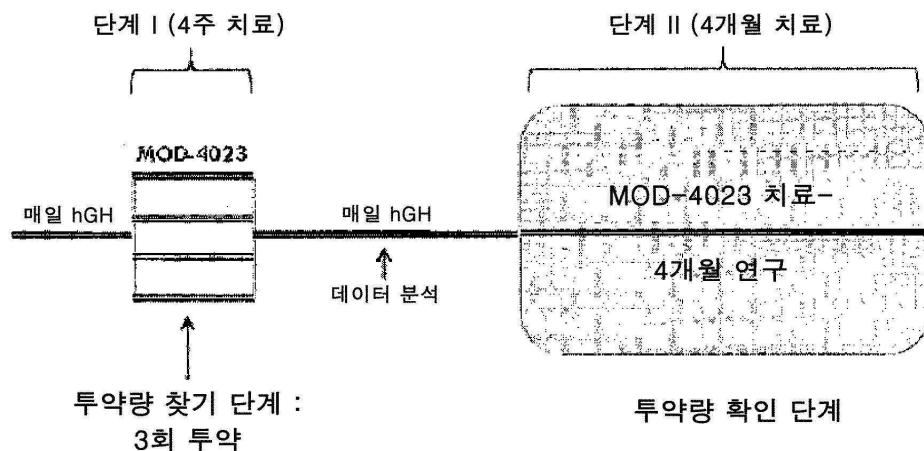
## 도면8



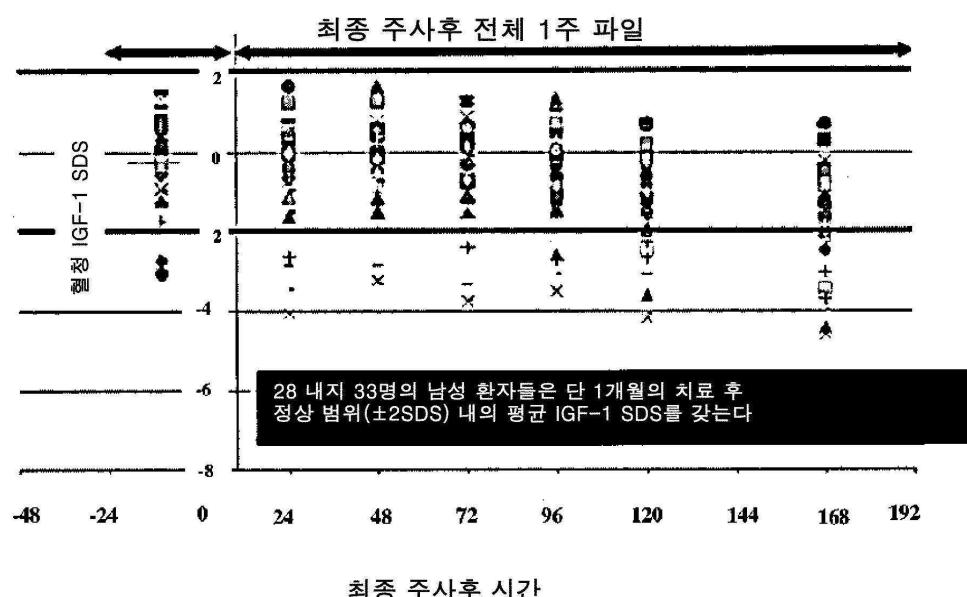
도면9



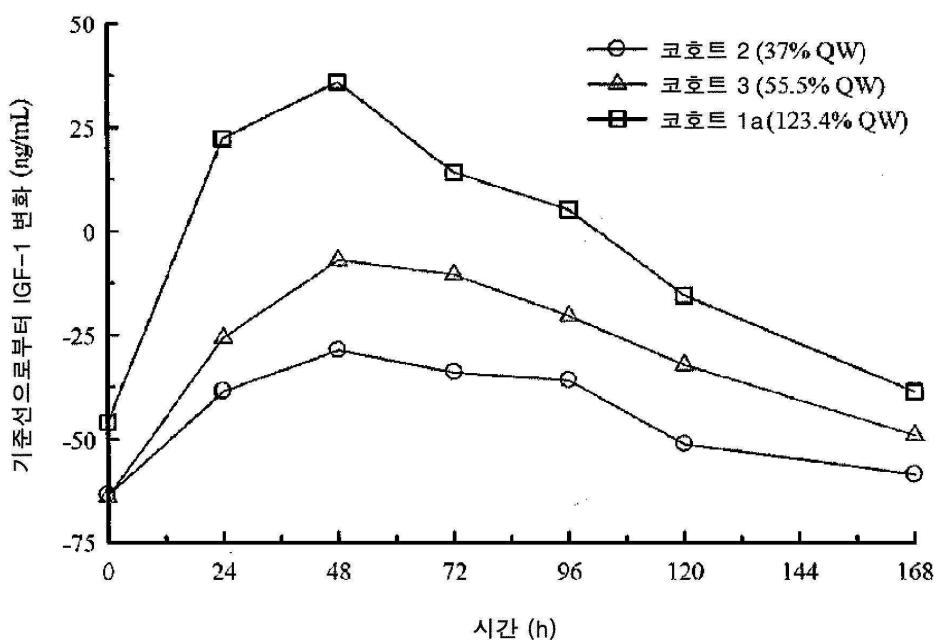
도면10



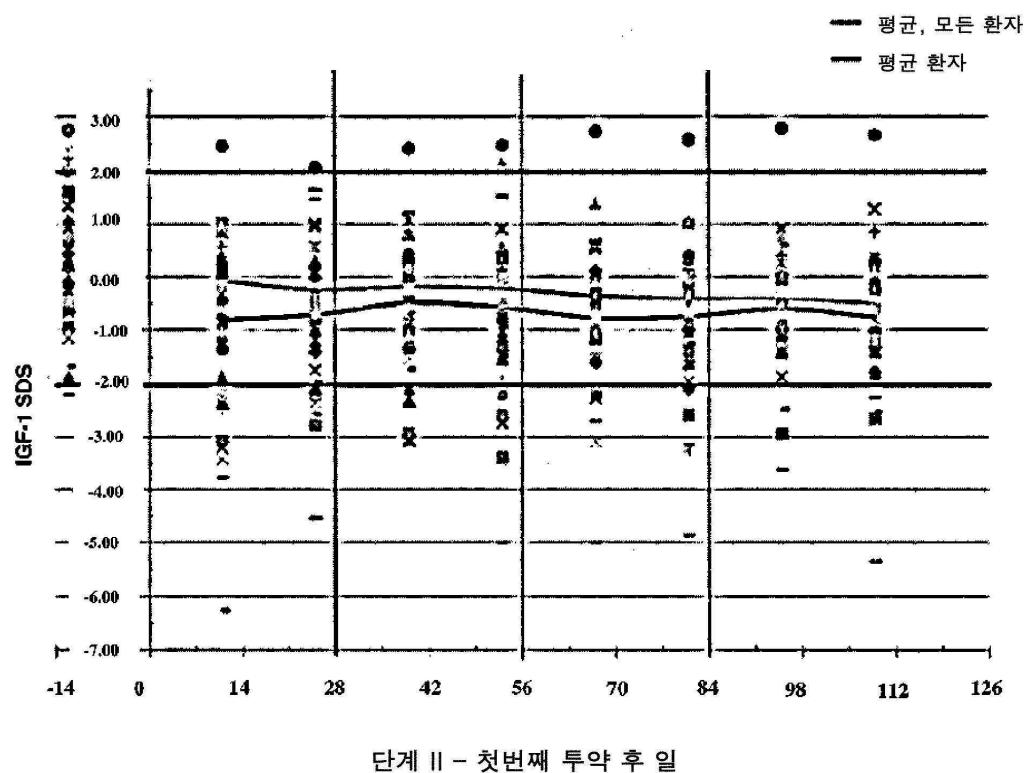
도면11



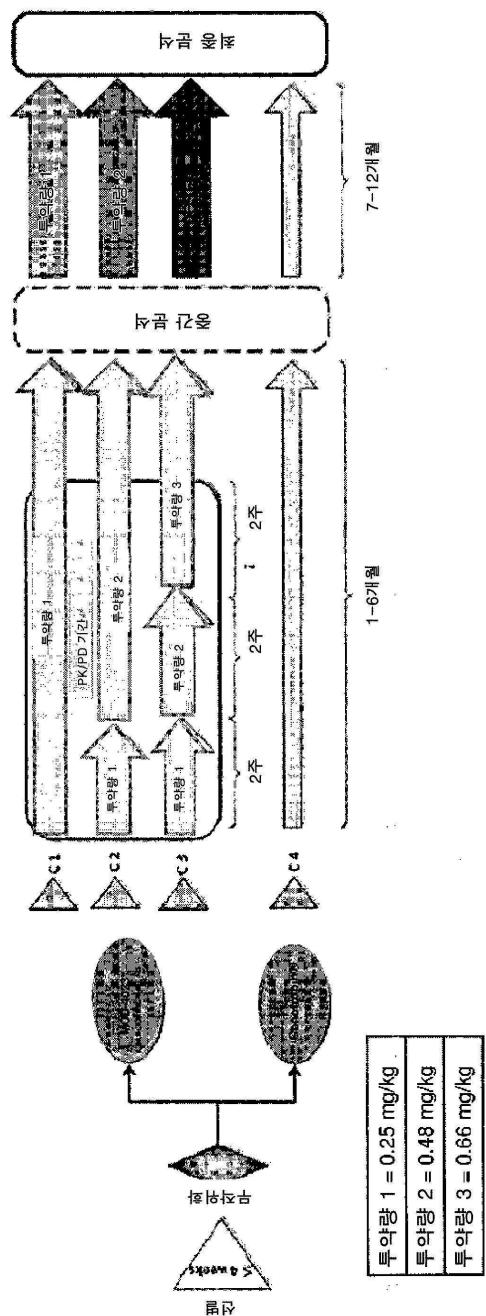
도면12



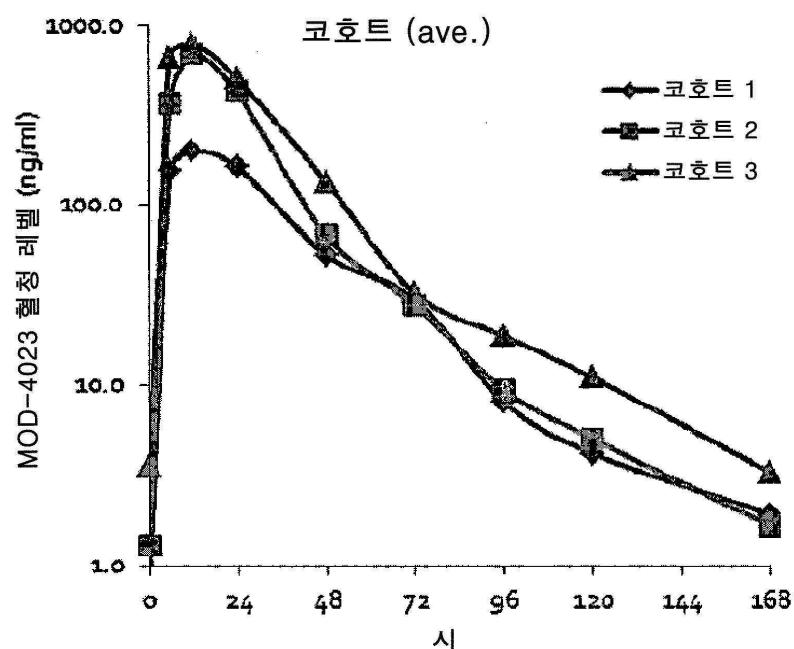
## 도면13



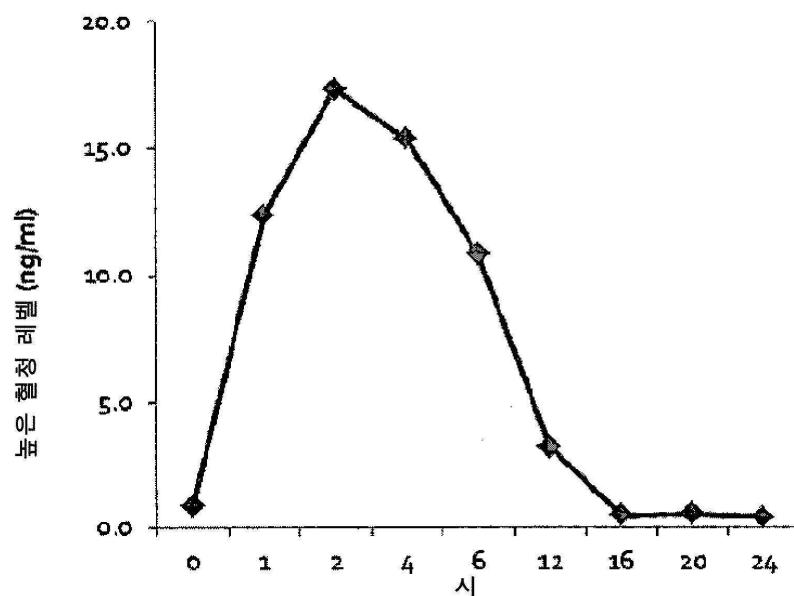
도면14



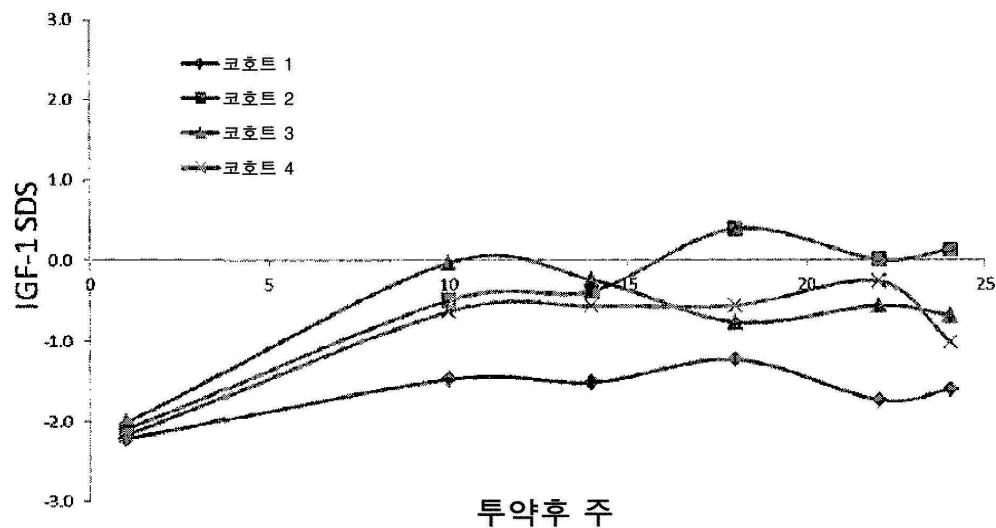
도면 15a



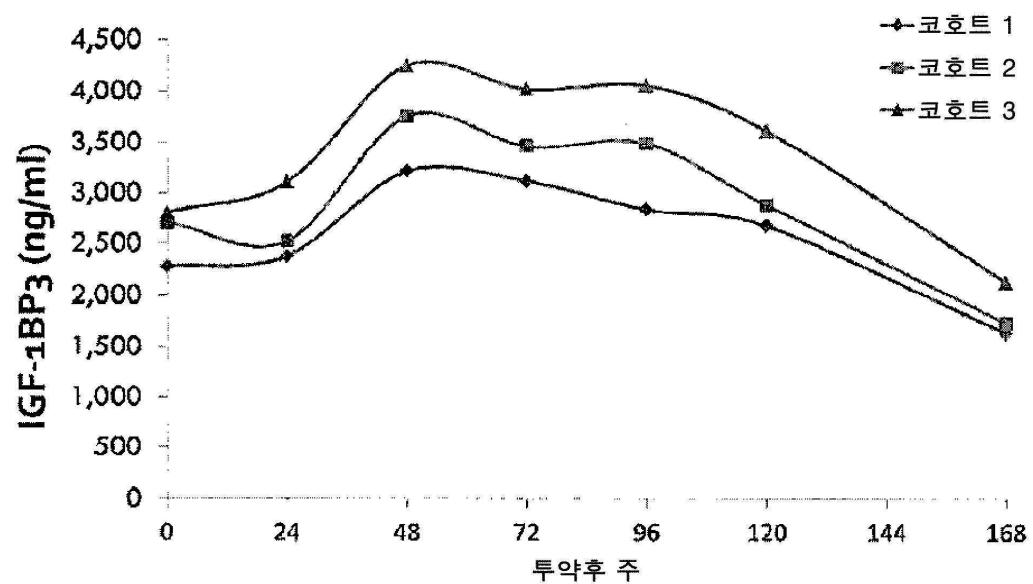
도면 15b



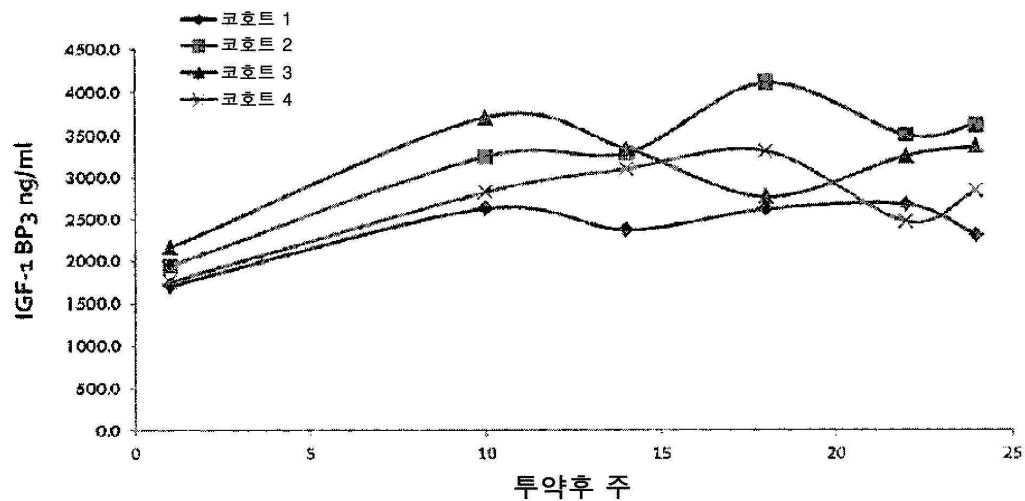
도면16



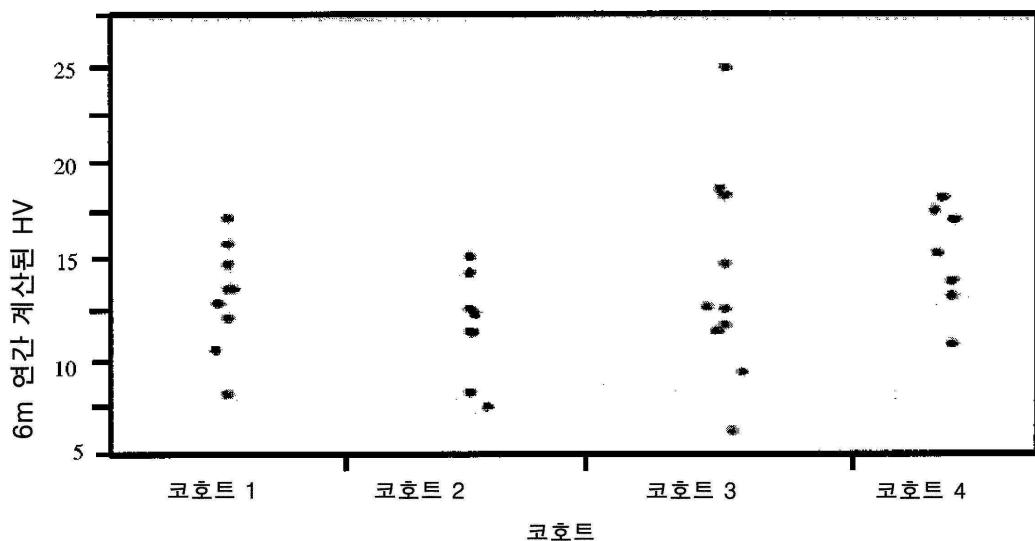
도면17



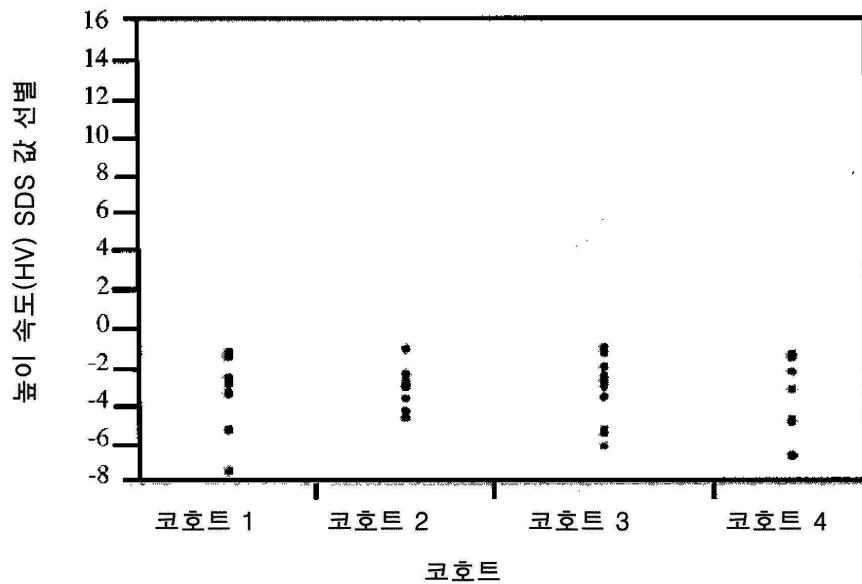
도면18



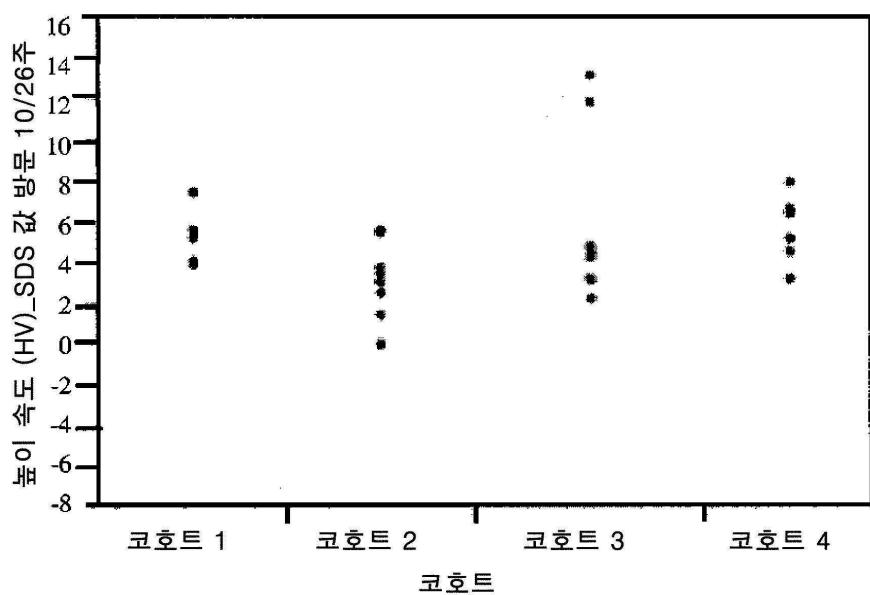
도면19



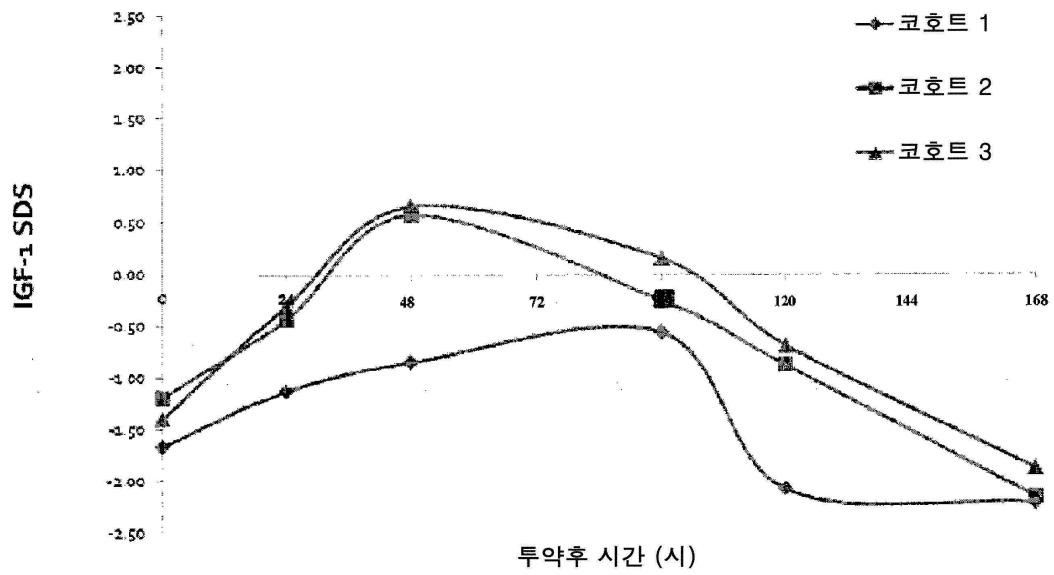
도면20a



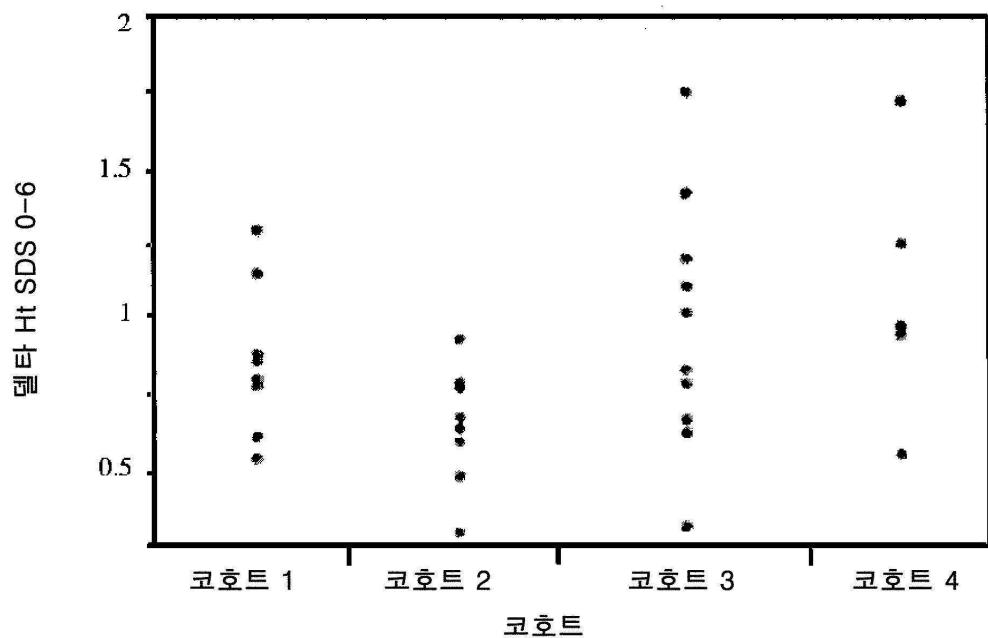
도면20b



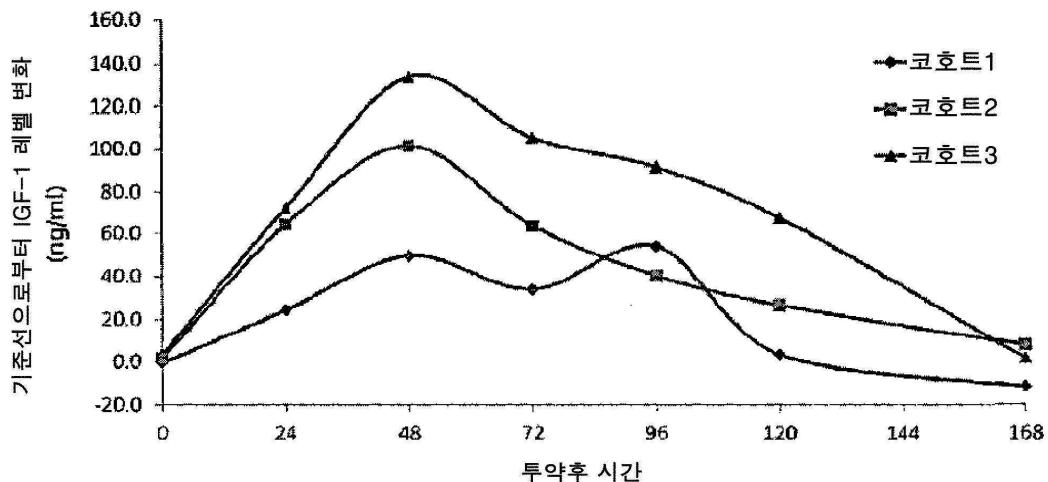
도면21



도면22



## 도면23

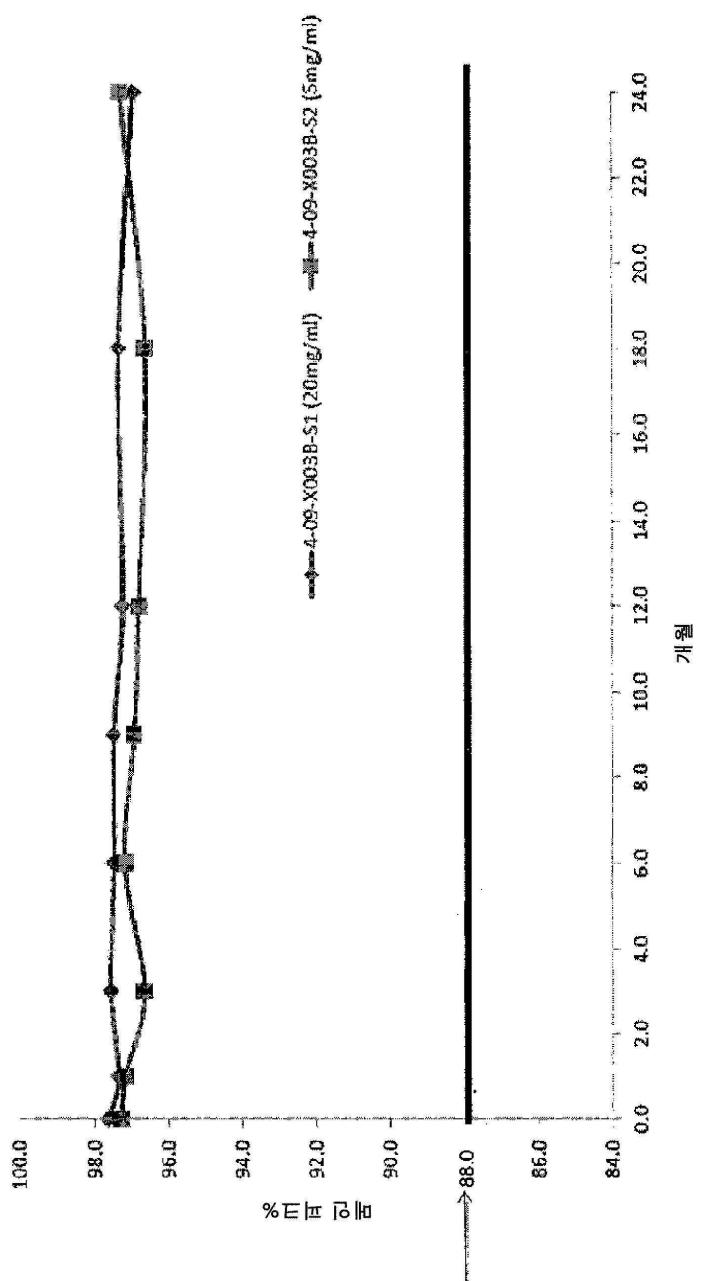


## 도면24

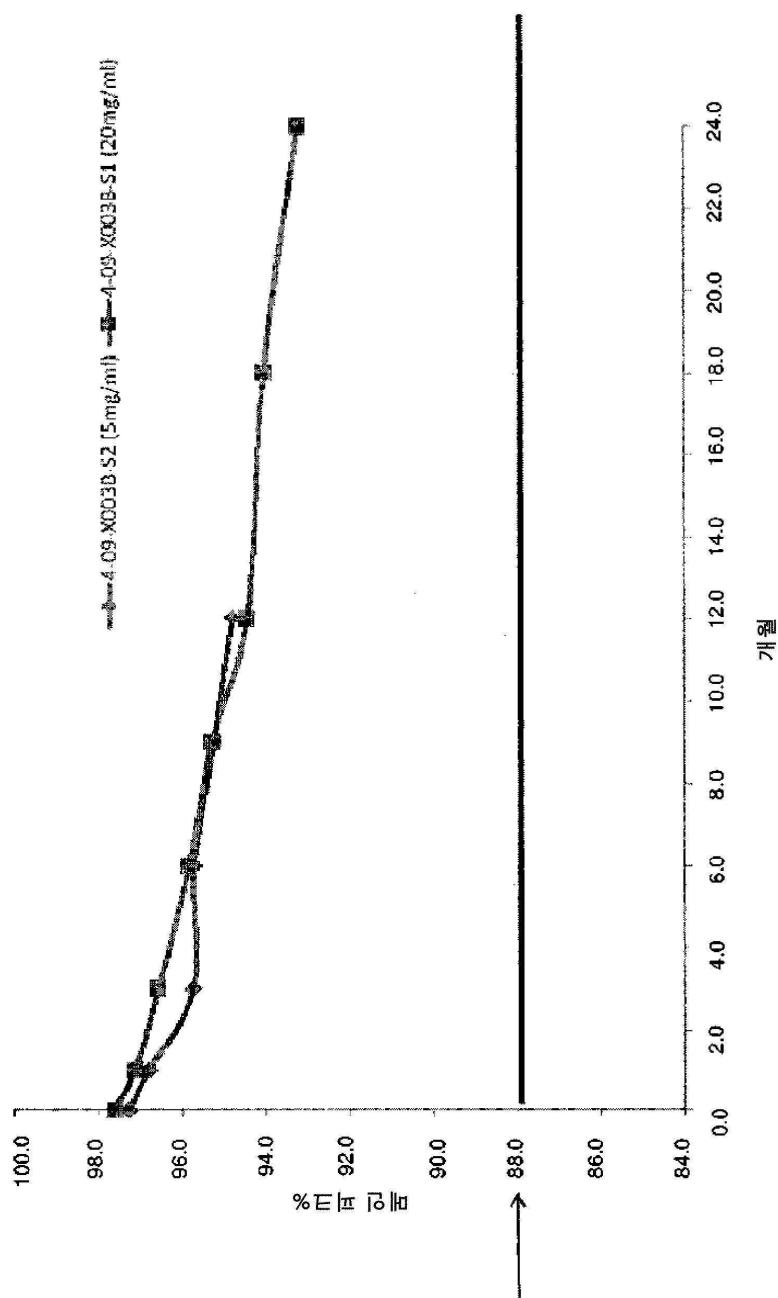
DS 배치 번호	제조		클론	배치 크기 (net)	용도
	사이트	일자			
EN648-01-08-005	Xcellerex	2008년 10월	2	200L	급성 독성 및 PK 연구 1592-001 및 1592-002, 기준 표준 RS0809를 제조하기 위해 사용됨
EN648-01-09-002	Xcellerex	2009년 2월	2	500L	4-주 독성 연구 1592-003 및 1592-004
648-01-09-003B	Xcellerex	2009년 4월	2	700L	단계 I 임상 시험 CP-4-001 단계 II 임상 시험 CP-4-003
EN648-01-10-014A	Xcellerex	2010년 10월	28	200L	원숭이들에서 26주 만성 독성 연구 (1592-006). 쥐들에서 재생성/발달성 독성 (1592-007, 1592-008, 1592-009)
EN648-01-10-019A	Xcellerex	2010년 12월	28	700L	원숭이들에서 26주 만성 독성 연구 (1592-006). 쥐들에서 재생성/발달성 독성 (1592-007, 1592-008, 1592-009) 기준 표준 RS0911을 제조하기 위해 사용됨
648-01-11-008	Xcellerex	June 2011	28	700L	Phase II Pediatric Clinical Trial
648-01-11-003A	Xcellerex	June 2011	28	700L	Phase II Pediatric Clinical Trial
GMP-1	Rentschler	2012년 1월	28	700L	단계 II 소아 임상 시험
GMP-2	Rentschler	2012년 5월	28	700L	단계 II 소아 임상 시험

회색 표시: 20 내지 40mg/ml에서 DS 배치는 동일한 GMP 700L 규모 배치로부터 제조됨

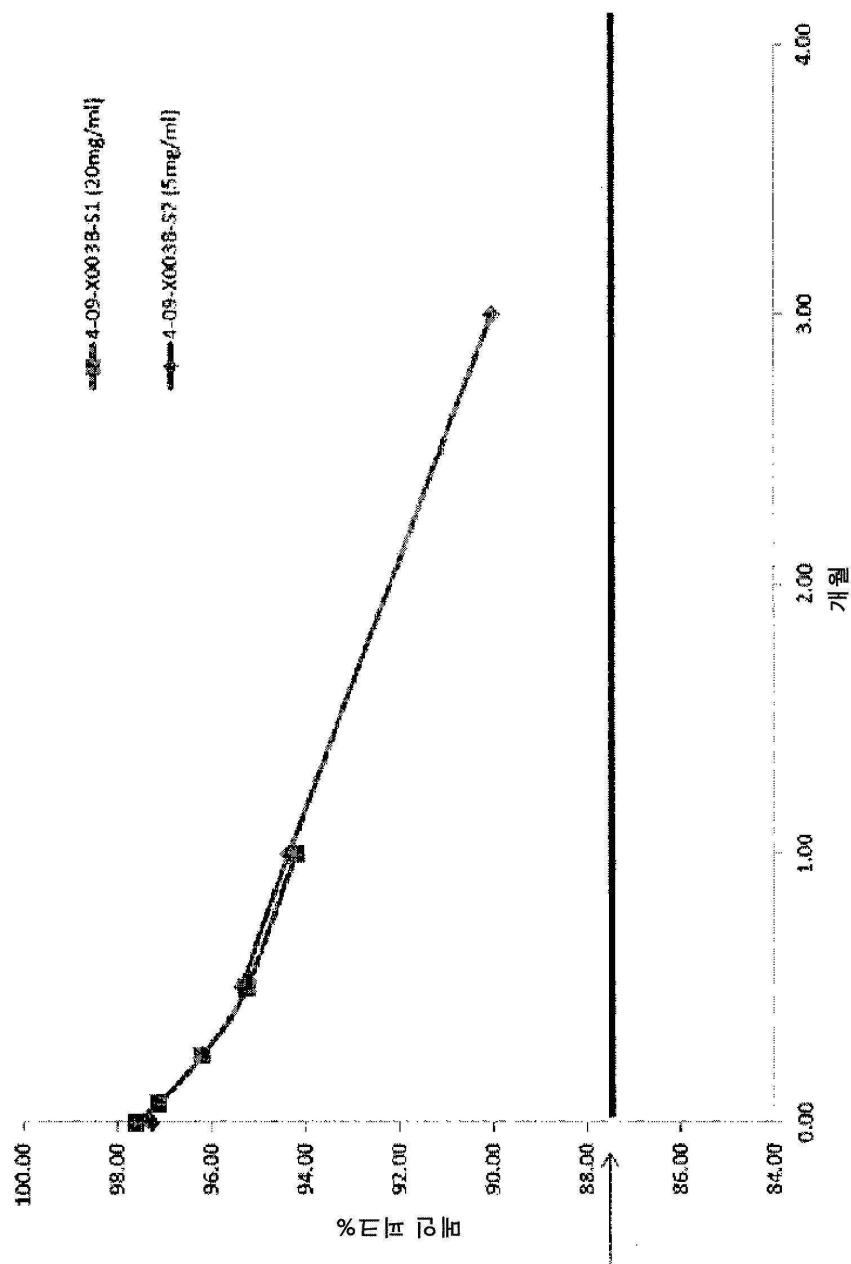
도면25a



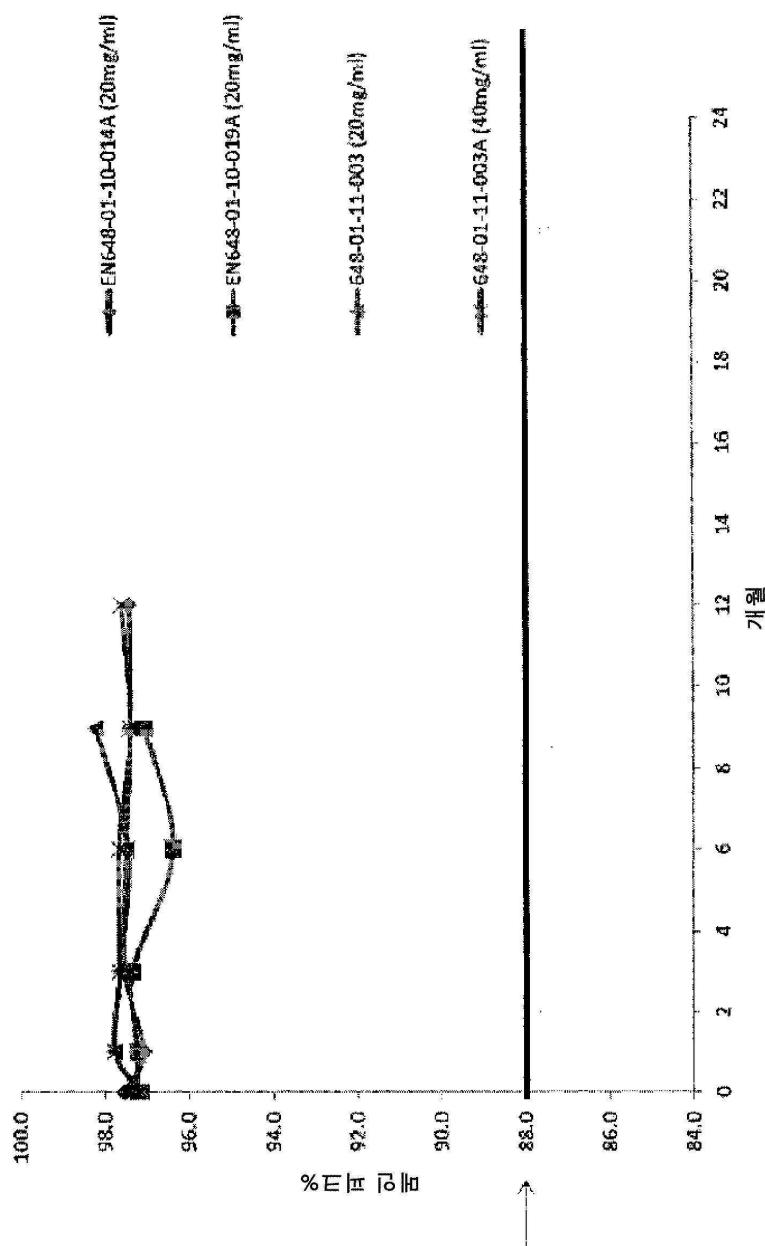
도면 25b



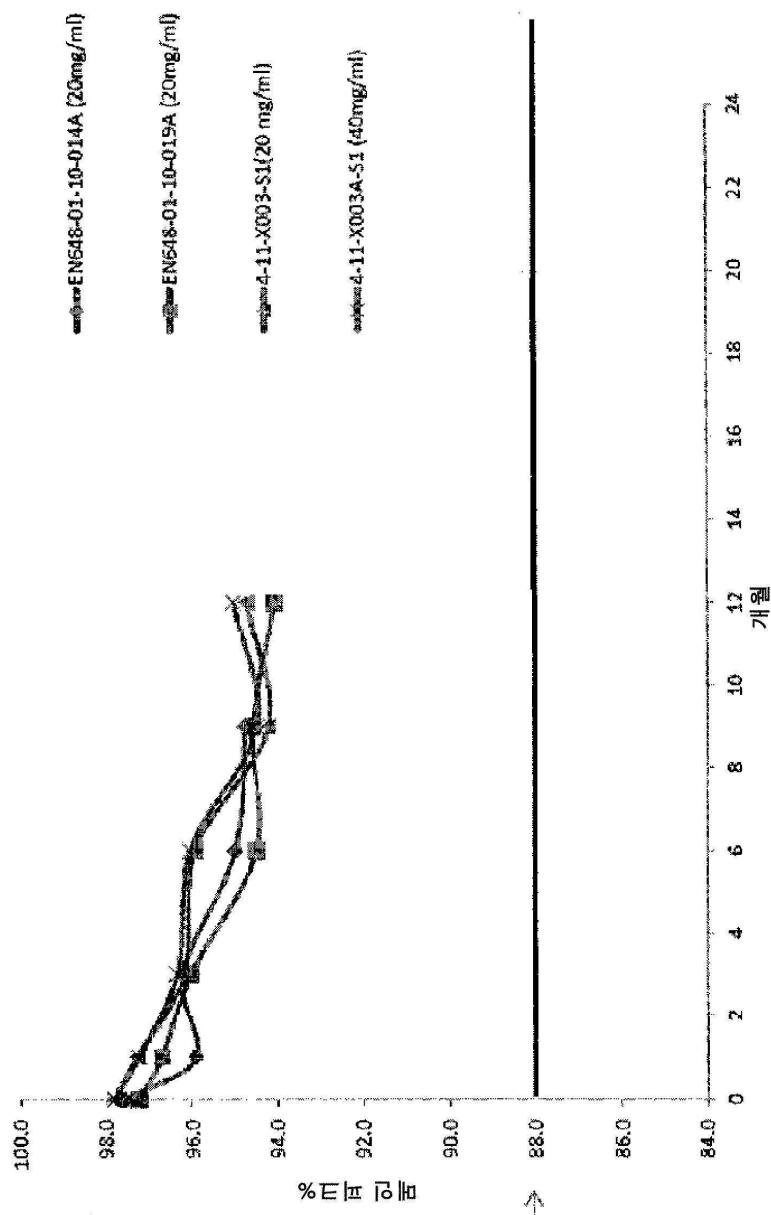
도면26



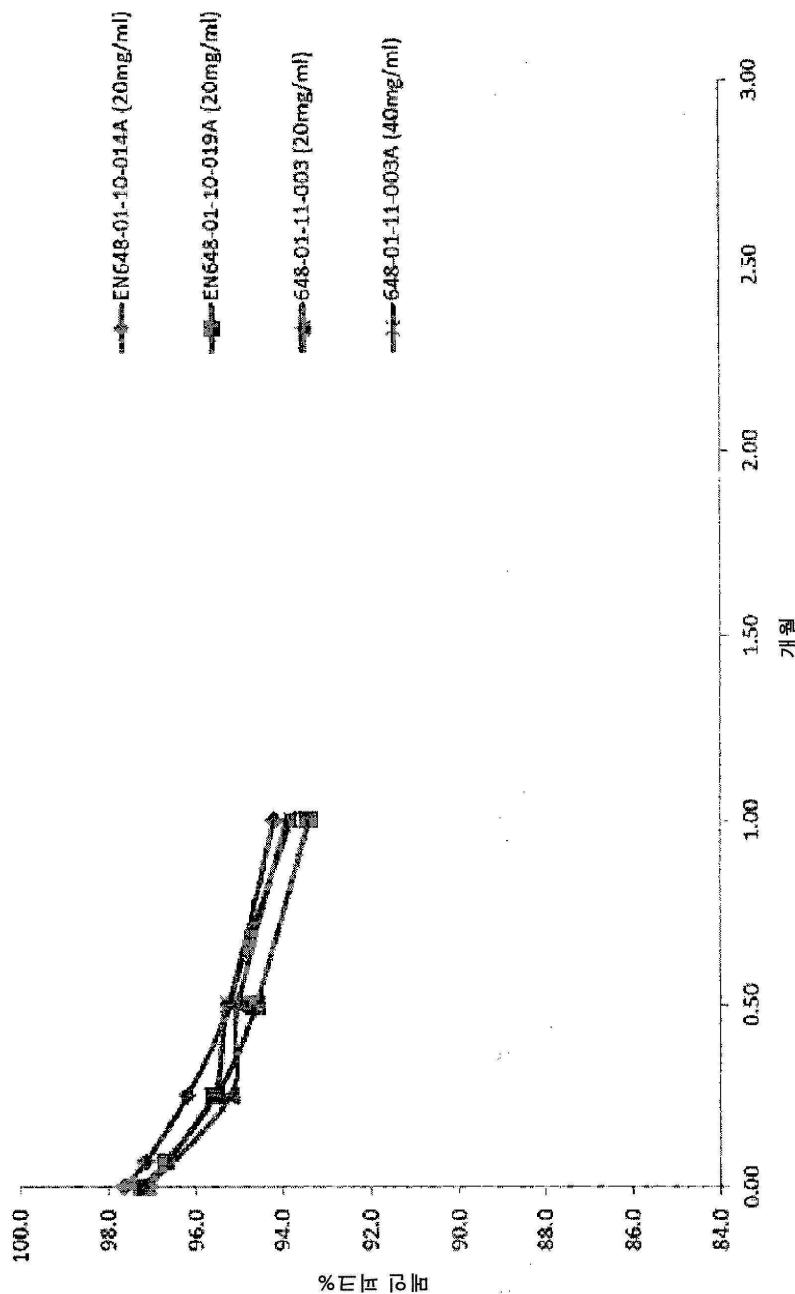
도면27a



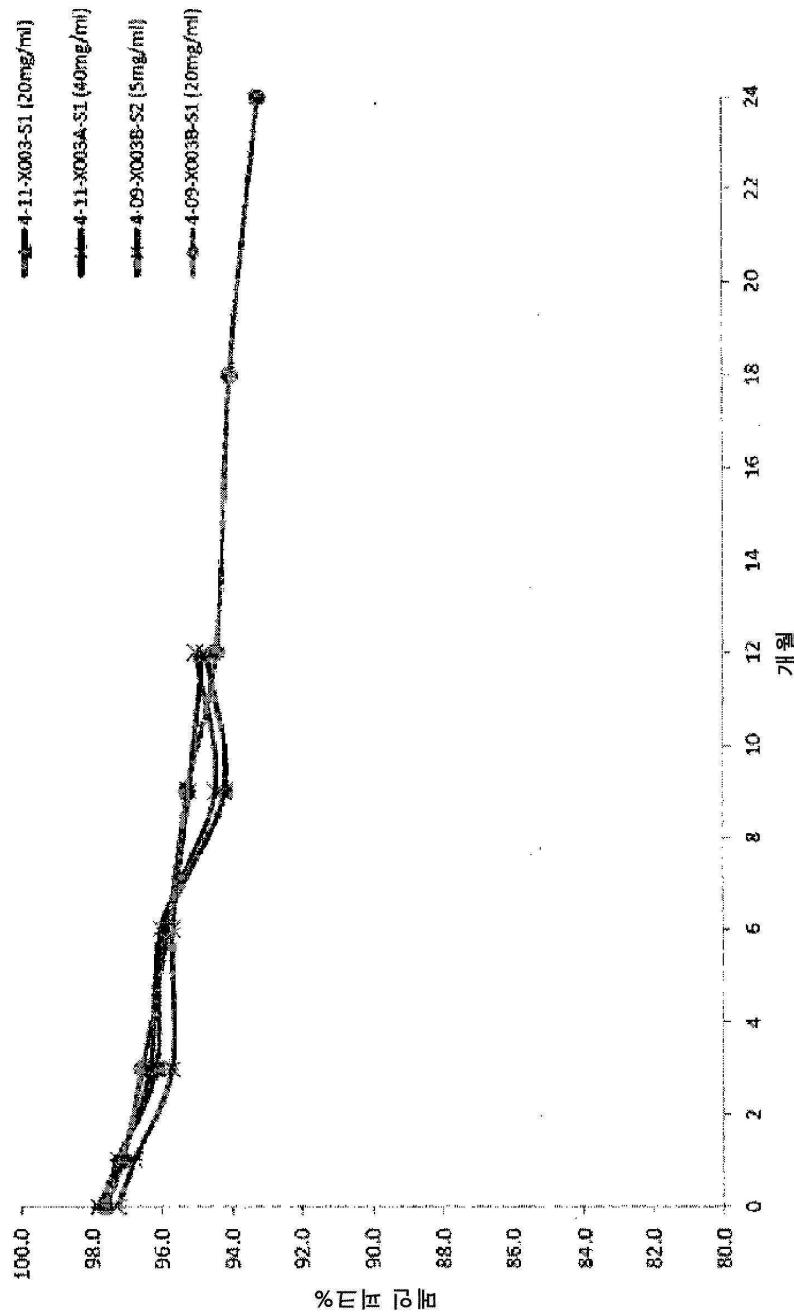
도면27b



도면28a



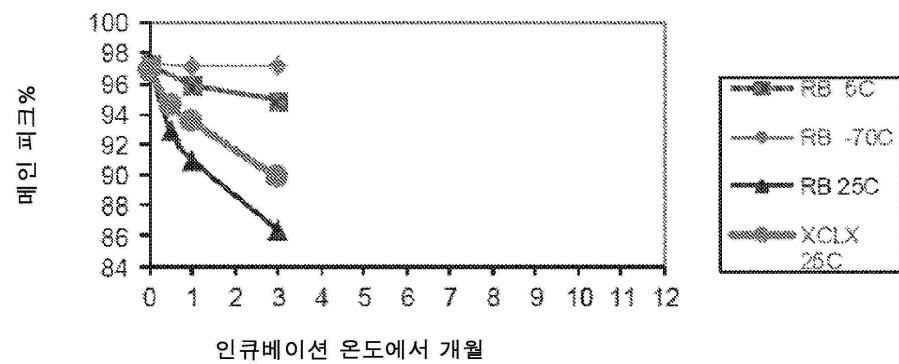
## 도면28b



도면29

분석 방법	허용 기준	Xc. (DS)/Sc. (DP)		RB (DS) 155C011001
		4-11-X003A-S1		
SE-HPLC (area-%)	HMWS ≤ 8.0%	1.7		<0.9
	단량체 ≥ 92%	98.3		>99.1
	이량체: 보고 결과	0.9	0.3	
	중합체: 보고 결과	0.8	<0.6	
RP-HPLC (area-%)	전체 관련 형태: ≤ 6 면적%	3.1	2.7	
	메인 피크: ≥ 94 면적%	96.9	97.3	
	임의의 관련 형태 > 1.0 면적%: 보고 결과	2.8	1.7	(관련 형태 3: 1.1 관련 형태 4: 1.7)

도면30a



## 도면30b

GMP1(RB)의 안정성 결과

메인 피크%

인큐베이션 시간 (m)	-70C	5C	25C
0	97.25	97.25	97.25
0.5			92.9
1	97.1	95.9	91
3	97.2	94.9	86.4

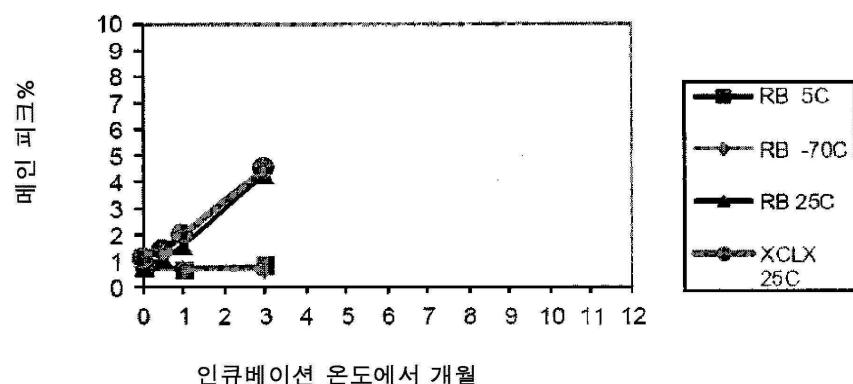
## 도면30c

XCLX의 안정성 결과 (RB에서 시험됨)

메인 피크%

인큐베이션 시간 (m)	-70C	5C	25C
0	96.9	96.9	96.9
0.5			94.5
1			83.5
3			89.8

## 도면31a



## 도면31b

피크3 %

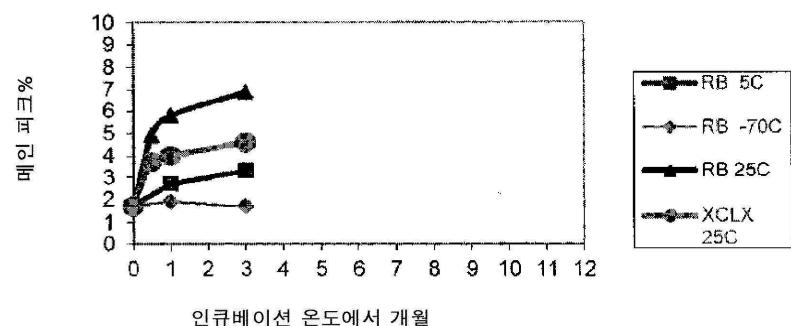
인큐베이션 시간 (m)	-70C	5C	25C
0	0.72	0.72	0.72
0.5			1.1
1m	0.7	0.7	1.6
3m	0.7	0.8	4.3

## 도면31c

피크3 %

인큐베이션 시간 (m)	-70C	5C	25C
0	1.1	1.1	1.1
0.5			1.4
1			2
3			4.5

## 도면32a



## 도면32b

피크5 %

인큐베이션 시간 (m)	-70C	5C	25C
0	1.72	1.72	1.72
0.5			4.9
1m	1.9	2.7	5.8
3m	1.7	3.3	6.9

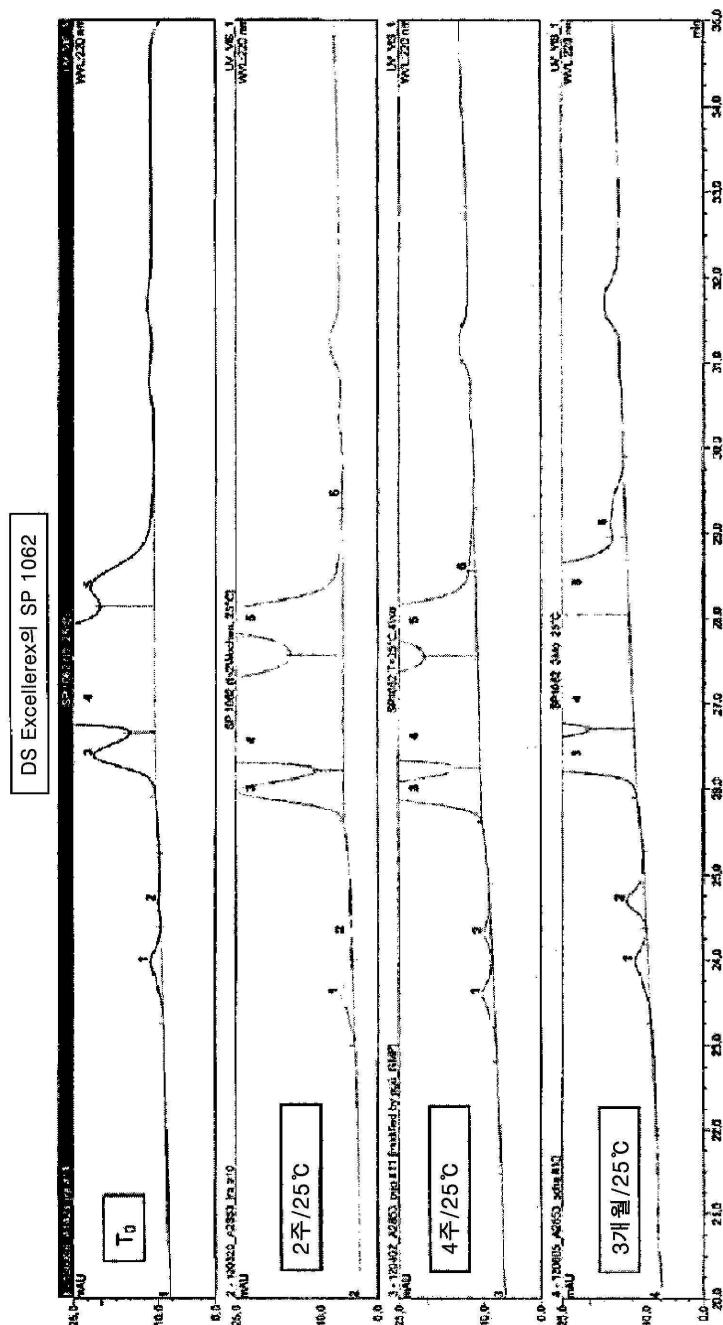
## 도면32c

XCLX

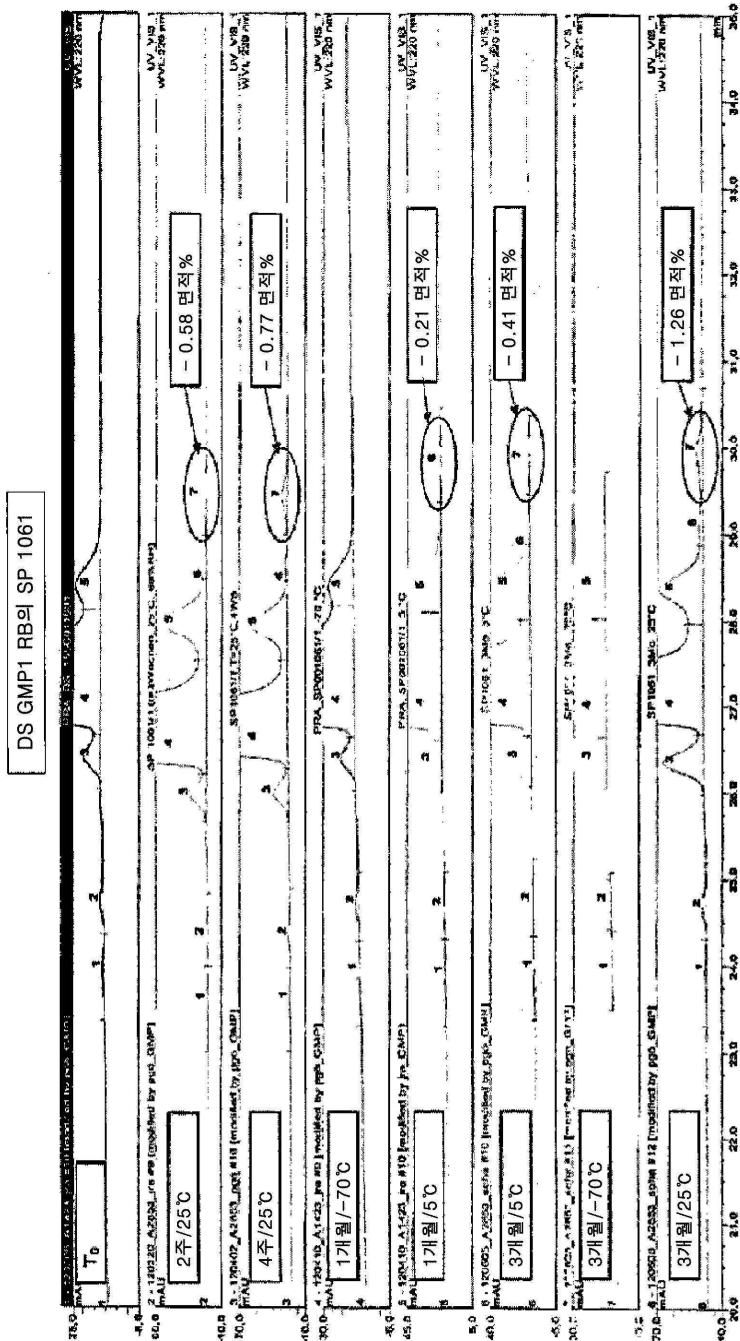
피크5 %

인큐베이션 시간 (m)	-70C	5C	25C
0	1.7	1.7	1.7
0.5			3.7
1m			4
3m			4.6

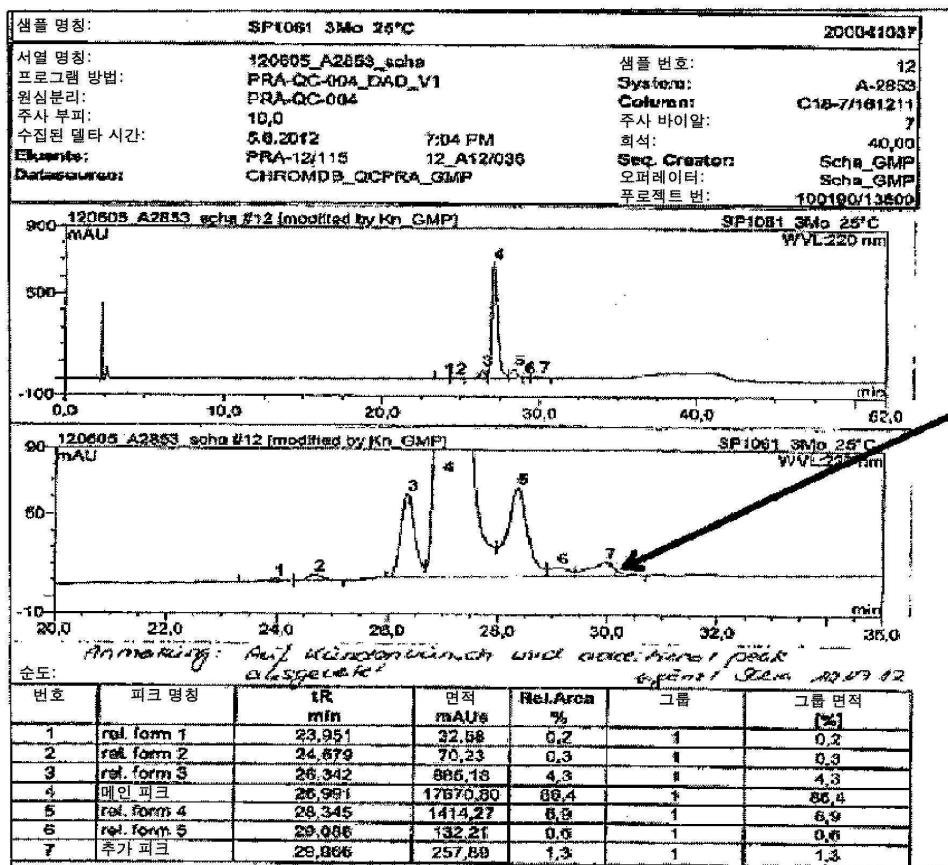
도면33a



### 도면33b

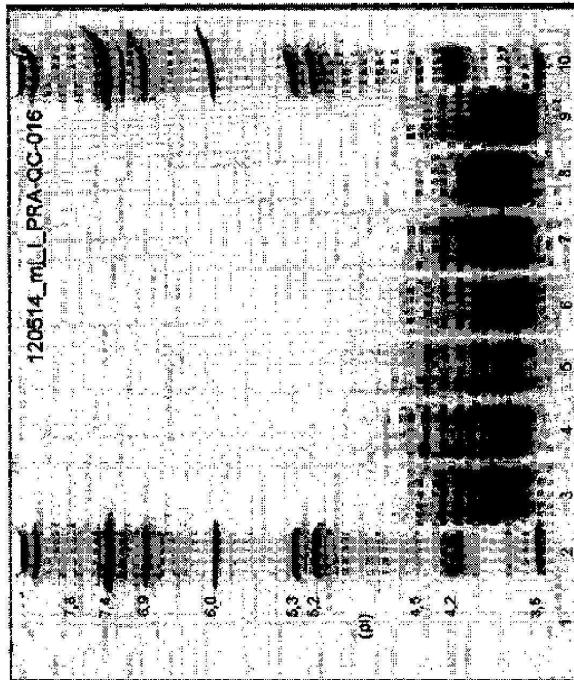


## 도면34



도면35a

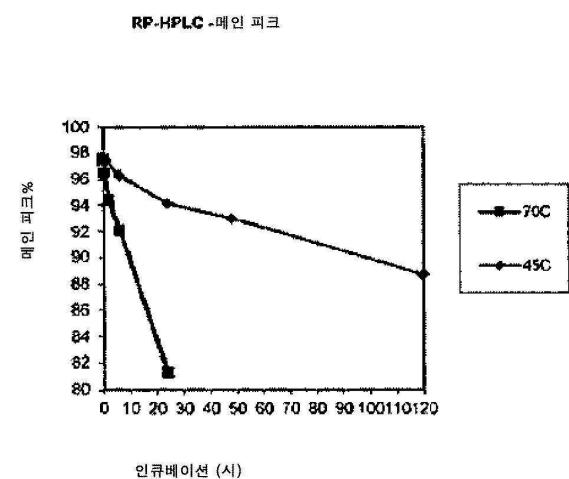
레인	샘플 명칭	[ $\mu$ g]	결
1	Milli-Q Water	-	
2	Serva IEF 마커 pH 3-10	N/A	
3	MOD-4023 기준 표준 (SR-929KU2)	10	
4	Xcellerex/Scigen MOD-4023 4-09-X003B-S1	10	
5	Xcellerex/Scigen MOD-4023 4-09-X003B-S2	10	
6	Xcellerex MOD-4023 EN648-01-10-014 A	10	
7	Xcellerex MOD-4023 EN648-01-10-019 A	10	
8	Xcellerex/Scigen MOD-4023 4-11-X003A-S1	10	
9	Rentschler Biotechnology MOD-4023 155C011001	10	
10	Serva IEF 마커 pH 3-10	N/A	



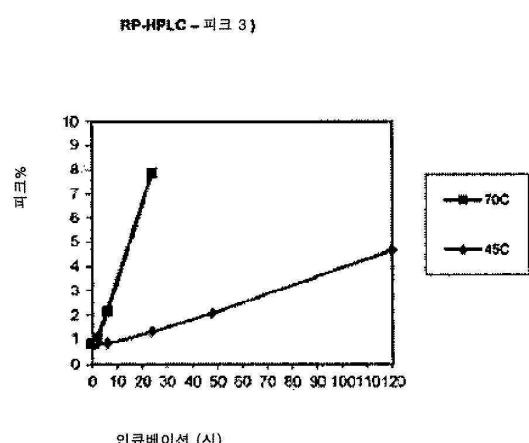
도면35b

문 호	SR-Nr. / SP-Nr. / Analysen-Nr. / Sample ID	샘플 명칭	[μg/ lane]	콜로이드성 블루-염색									
				120605_mLI_PRA40C-016									
1	-	블랭크	-										
2	SR-206P10	Serva IEF 미커 pH 3-10	NA										
3	SR-929SI1	MOD-4023 기준 표준	10										
4	SR-929KU2	MOD-4023 기준 표준	10										
5	SP1061/1 / 20041013	PRA_SP1061/1_5°C, t= 3 개월	10										
6	SP1061/1 / 20041017	PRA_SP1061/1_25°C60% RH t= 3 개월	10										
7	SP1062 / 1201865	PRA_MOD4023 (40 mg/mL) 호환성 연구 Xcellerex batch, Ch.: 648-01-11-003A, 25°C±2°C, t= 3 개월	10										
8	-	-	블랭크	-									
9	SR-206P10	Serva IEF 미커 pH 3-10	NA										
10	-	-	블랭크	-									

## 도면36a

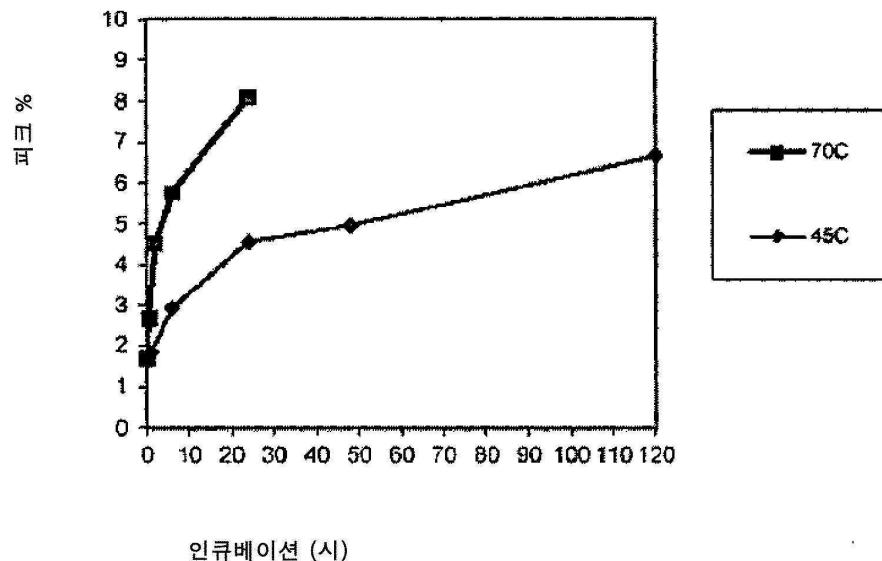


## 도면36b



## 도면36c

RP-HPLC - 피크 5)



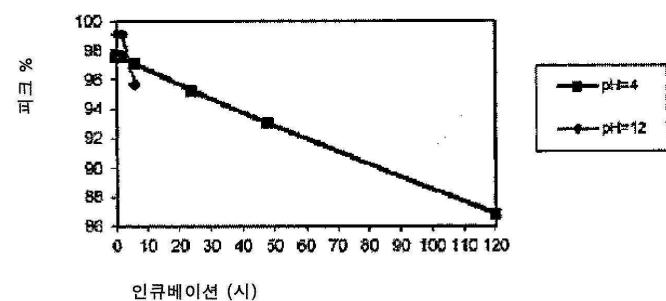
인큐베이션 (시)

## 도면36d

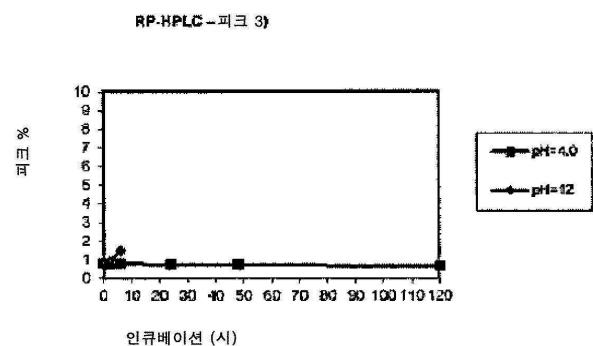
저장 온도	인큐베이션 온도에서 시간	매인 피크%	21-22분에 피크	25-26분에 피크
45°C	0	97.50	0.81	1.69
	1	97.40	0.77	1.83
	6	96.24	0.63	2.93
	24	94.15	1.30	4.55
	48	92.99	2.06	4.96
	120	88.68	4.65	6.67
70°C	0	97.50	0.81	1.69
	0.5	96.48	0.85	2.67
	2	94.46	1.02	4.52
	6	92.12	2.12	5.77
	24	81.29	7.87	8.09

## 도면37a

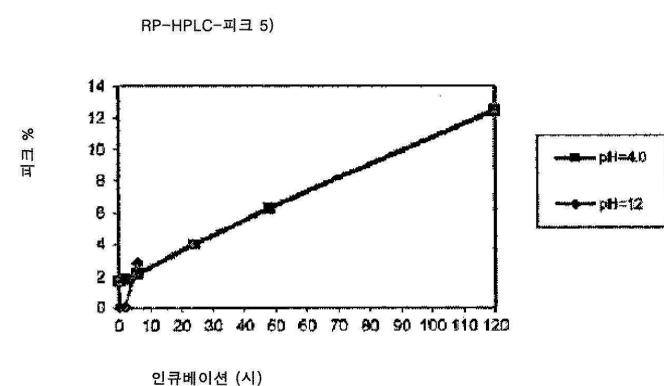
RP-HPLC- 매인피크



## 도면37b



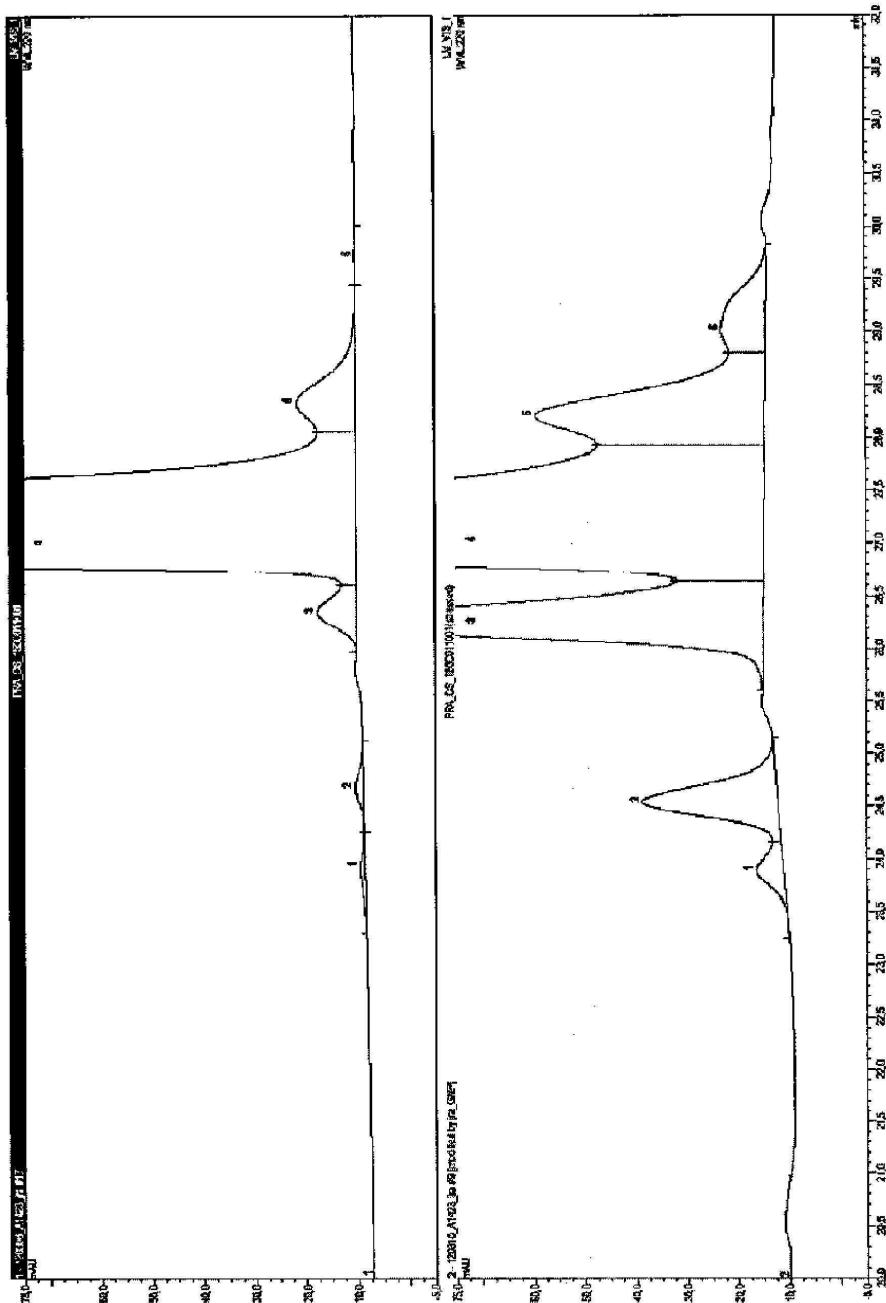
## 도면37c



## 도면37d

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

도면38



## 도면39

메인 피크 %		인큐베이션 시간 (분)			
		RB 40 mg/ml pH=5.9	RB 10 mg/ml pH=6.2	XCLX 40 mg/ml	pH=6.2
0	97.3		97.3		98.9
0.5	92.9		95.5		94.5
1	91				93.5
3	86.4				89.8

피크 3 %

피크 3 %		인큐베이션 시간 (분)			
		RB 40 mg/ml pH=5.9	RB 10 mg/ml pH=6.2	XCLX 40 mg/ml	pH=6.2
0	0.72		0.7		1.1
0.5	1.1		1.2		1.4
1	1.6				2
3	4.3				4.5

피크 5 %

피크 5 %		인큐베이션 시간 (분)			
		RB 40 mg/ml pH=5.9	RB 10 mg/ml pH=6.2	XCLX 40 mg/ml	pH=6.2
0	1.72		1.7		1.7
0.5	4.9		2.8		3.7
1	5.8				4
3	6.9				4.6

피크 7 %

피크 7 %		인큐베이션 시간 (분)			
		RB 40 mg/ml pH=5.9	RB 10 mg/ml pH=6.2	XCLX 40 mg/ml	pH=6.2
0	0		0		0
0.5	0.6		0.1		0
1m	1				0
3m	1.3				0

## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; OPKO BIOLOGICS LTD.

FARES, Fuad

FIMA, Udi Eyal

<120> LONG-ACTING POLYPEPTIDES AND METHODS OF PRODUCING AND  
ADMINISTERING SAME

&lt;130&gt; P-9520-PC6

<150> 14/059,134  
 <151> 2013-10-21  
 <150> 14/309,496  
 <151> 2014-06-19  
 <160> 50  
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 221

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165	170	175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp		
180	185	190
Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser		
195	200	205
Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln		
210	215	220
<210> 2		
<211> 249		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 2		
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu		
1	5	10
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu		
20	25	30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu		
35	40	45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu		
50	55	60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg		
65	70	75
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu		
85	90	95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser		
100	105	110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly		
115	120	125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu		
130	135	140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile		
145	150	155
160		

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

245

<210> 3

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro

245 250 255

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

260 265 270

Pro Ile Leu Pro Gln

275

<210> 4

<211> 387

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn  
 290 295 300  
 Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val  
 305 310 315 320  
 Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln  
 325 330 335  
  
 Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg  
 340 345 350  
 Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn  
 355 360 365  
 Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr  
 370 375 380  
 Gly Asp Arg  
 385  
 <210> 5  
 <211> 221  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5  
 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu  
  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Lys  
 20 25 30  
 Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser  
 35 40 45  
 Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser  
 50 55 60  
 Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile  
  
 65 70 75 80  
 Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val  
 85 90 95  
 Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly

100	105	110
Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala		
115	120	125
Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu		
130	135	140
Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu		
145	150	155
Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro		
165	170	175
Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr		
180	185	190
Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu		
195	200	205
Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg		
210	215	220
<210> 6		
<211> 249		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 6		
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu		
1	5	10
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys		
20	25	30
Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser		
35	40	45
Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser		
50	55	60
Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile		
65	70	75
Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val		
85	90	95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

245

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Forward primer for EPO-CTP constructs

<400> 7

aatctagagg tcatcatggg ggtgc 25

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Forward primer for EPO-CTP constructs

<400> 8	
attgcggccg cggatccaga agaccttat tg	32
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Reverse primer for EPO-CTP constructs	
<400> 9	
taaatattgg ggtgtccgag ggccc	25
<210> 10	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Forward primer for EPO-CTP constructs	
<400> 10	
ccaatattac cacaagcccc accacgcctc at	32
<210> 11	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Reverse primer for EPO-CTP constructs	
<400> 11	
tgcggccgat gatccttatac tgtccctgt cctgc	35
<210> 12	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Forward primer for EPO-CTP constructs	
<400> 12	
gccctgctgt cggaaagc	17
<210> 13	
<211> 32	
<212> DNA	

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Reverse primer for EPO-CTP constructs

&lt;400&gt; 13

attgcggccg cggatccaga agacctttat tg 32

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt;

&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Reverse primer for EPO-CTP constructs

&lt;400&gt; 14

cttgaggaa gaggagccca ggactgggag gc 32

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Forward primer for EPO-CTP constructs

&lt;400&gt; 15

cctgggctcc tttcctcaa agg 24

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 193

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

Arg

<210> 17

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CTP amino acid sequence

<400> 17

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20	25	30
----	----	----

Pro Gln

<210> 18

<211> 28

<212> PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; CTP amino acid sequence

&lt;400&gt; 18

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

1 5 10 15

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

20 25

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

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

1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly

20 25

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 786

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 20

tctagaggc atcatgggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtccct 60

tctgtcgctc cctctgggcc tcccagtcct gggctcctct tcctcaaagg cccctcccc 120

gagccttcca agtccatccc gactccggg gcccctggac accccaatat taccacaagc 180

cccacccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctttgg aggccaagga 240

ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga acactgcagc ttgaatgaga atatcactgt 300

cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcggtc agcaggccgt 360

agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggcctgtt 420

ggtaactct tcccagccgt gggagccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg 480

ccttcgcagc ctcaccactc tgcttcgggc tctggagcc cagaaggaag ccatctcccc 540

tccagatgct gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact 600

cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660

caggacaggg gacagatctt cttctcaaa ggccctccc ccgagccttc caagtccatc 720  
 ccgactcccg gggccctcg acaccccgat cctcccacaa taaaggtctt ctggatccgc 780  
 ggccgc 786  
 <210> 21  
 <211> 873  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 21  
 tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtccct 60  
 tctgtcgctc cctctggcc tcccagtcct gggctctct tcctcaaagg cccctcccc 120  
 gagccttcca agtccatccc gactcccgaa gcccctggac accccaatat taccacaagg 180  
 cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctttgg aggccaagga 240  
 ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga acactgcagc ttgaatgaga atatcactgt 300  
 cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt 360  
 aagaatctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt 420

ggtaactct tcctcaggcggt gggagccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg 480  
 ctttcgcagc ctcaaccactc tgcttcgggc tctggagcc cagaaggaag ccatactcccc 540  
 tccagatgctgc gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact 600  
 cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660  
 caggacaggg gacagatctt cttctcaaa ggccctccc ccgagccttc caagtccatc 720  
 ccgactcccg gggccctccg acacaccaat cctgcccacag agcagctct ctaaggcccc 780  
 tcctccatcc ctgcacatccc cctcccgct gcctggcccc tctgacacccc ctatcctgcc 840

tcagtgtatga aggtttctg gatccgcggc cgc 873  
 <210> 22  
 <211> 221  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

<210> 23

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

210 215

<210> 24

<211> 166

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln

1 5 10 15  
 Ser Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu  
 20 25 30  
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln

35 40 45  
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln  
 50 55 60  
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn  
 65 70 75 80  
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn  
 85 90 95  
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr

100 105 110  
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg  
 115 120 125  
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr  
 130 135 140  
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu  
 145 150 155 160  
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
 165

<210> 25  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25  
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30

<210> 26

<211> 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 26

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Cys Phe Ser

1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser

20

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; XbaI Forward primer for HGH-CTP constructs

&lt;400&gt; 27

ctctagagga catggccac 19

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Reverse primer for HGH-CTP constructs

&lt;400&gt; 28

acagggaggt ctggggttc tgca 24

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt;

Forward primer for HGH-CTP constructs

&lt;400&gt; 29

tgcagaaccc ccagacctcc ctgtgc 26

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Reverse primer for HGH-CTP constructs

<400> 30	
ccaaactcat caatgtatct ta	22
<210> 31	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> XbaI Forward primer for HGH-CTP constructs	
<400> 31	
ctctagagga catggccac	19
<210> 32	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Reverse primer for HGH-CTP constructs	
<400> 32	
cgaactcctg gtaggtgtca aaggc	25
<210> 33	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> Forward primer for HGH-CTP constructs	
<400> 33	
gccttgaca cctaccagga gttcg	25
<210> 34	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220><223> NotI Reverse primer for HGH-CTP constructs	
<400>	
> 34	
acgcggccgc atccagacct tcatcaactga ggc	33
<210> 35	
<211> 34	
<212> DNA	

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Reverse primer for HGH-CTP constructs

&lt;400&gt; 35

gcggccggc actcatcaga agccgcagct gccc 34

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 217

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 36

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180	185	190
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys		
195	200	205
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe		
210	215	

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 245

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 37

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu			
1	5	10	15
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu			
20	25	30	
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln			
35	40	45	
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys			

50	55	60	
Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe			
65	70	75	80
Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys			
85	90	95	
Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Ile Gln Ser Trp			
100	105	110	
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val			

115	120	125	
Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu			
130	135	140	
Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg			
145	150	155	160
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser			
165	170	175	

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

180 185 190

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

195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Lys Ala Pro

210 215 220

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

225 230 235 240

Pro Ile Leu Pro Gln

245

<210

> 38

<211> 273

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Lys Ala Pro

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Gln

<210> 39

<211> 301

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50	55	60
Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp		
65	70	75
Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr		
85	90	95
Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile		
100	105	110
Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu		
115	120	125
Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val		
130	135	140
Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser		
145	150	155
Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln		
165	170	175
Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile		
180	185	190
Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp		
195	200	205
Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met		
210	215	220
Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu		
225	230	235
Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu		
245	250	255
Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro		
260	265	270
Gln Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser		
275	280	285
Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln		
290	295	300

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 285

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220  
 Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu  
  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro  
 245 250 255  
 Gln Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser  
 260 265 270  
 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
 275 280 285  
 <210> 41  
 <211> 273  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 41  
 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu  
  
 1 5 10 15  
 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Lys Ala  
 20 25 30  
 Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp  
 35 40 45  
 Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe  
 50 55 60  
 Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp  
  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr  
 85 90 95  
 Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile  
 100 105 110  
 Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu  
 115 120 125  
 Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val

130	135	140	
Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser			
145	150	155	160
Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln			
165	170	175	
Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile			
180	185	190	
Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp			

195	200	205	
Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met			
210	215	220	
Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu			
225	230	235	240
Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu			
245	250	255	
Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro			

260	265	270	
Gln			

<210> 42			
<211> 245			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 42			
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu			
1	5	10	15
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Lys Ala			
20	25	30	
Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp			
35	40	45	

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Gly Ser Cys Gly Phe

245

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> CTP amino acid sequence

<400> 43

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

1 5 10

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 853

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 44

tctagaggac atggccaccc gca	gaggac cagcctgctg ctggcctcg	gcctgctgtg	60
cctgccc	atggccatgg ctgcaggagg	gcagcgccag ctcttcttct	120
cccccccccc	aggactgc cggggcc	ccccatctct	180

ccccctgt	aggaggctgt tcgacaacgc	catgtgagg gtcacaggc	tgaccagct	240
ggccttgac	acctaccagg agttcgagga	agcctacatc	ccaaaggagc	300
tttcgtcag	aacccccaga cctccctgtg	tttcagcgag	agcatcccc	360
cagagaggag	accaggcaga agagcaac	ggagctgctg	aggatctccc	420
ccagagctgg	ctggagcccg tgcagttct	gagaagcgtg	ttcgccaaca	480
cggcgcc	gacagcaacg tgtacgac	gctgaaggac	ctggaggagg	540
cctgtatggc	cggtggagg acggcagccc	caggaccggc	cagatctca	600

cagcaagt	tc gacaccaaca	gccacaacga	cgacgccc	ctgaagaact	acgggctgct	660
gtactgcttc	agaaggaca	tggacaagg	ggagac	ctgaggatcg	tgca	720
aagcgtggag	ggcagctg	gttcag	cagcagcaag	gccc	cccc	780
ctcccaagc	aggctgc	ggcc	cacaccaatc	ctgc	cctc	840
tggatgcggc	cgc					853

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 937

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 45

tctagaggac atggccaccc gca	gaggac cagcctgctg ctggcctcg	gcctgctgtg	60
---------------------------	-----------------------------	------------	----

cctgccc	atggccatgg ctgcaggagg	gcagcgccag ctcttcttct	aggactccac	ccccatctct	120
cccccccccc	aggactgc cggggcc	ccccatctct	atctgcccc	agttccccac	180
ccccctgt	aggaggctgt tcgacaacgc	catgtgagg gtcacaggc	tgaccagct		240
ggccttgac	acctaccagg agttcgagga	agcctacatc	ccaaaggagc	agaagtacag	300
tttcgtcag	aacccccaga cctccctgtg	tttcagcgag	agcatcccc	ccccagcaa	360
cagagaggag	accaggcaga agagcaac	ggagctgctg	aggatctccc	tgctgctgat	420

ccagagctgg ctggagcccg tgcagttct gagaagcgtg ttgcacaaca gcctgggtga	480
cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac	540
cctgatggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatctca agcagaccta	600
cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgcctg ctgaagaact acggcgtct	660
gtactgttc agaaaggaca tggacaagggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag	720
aagcgtggag ggcagctgct gcttcagtc cagcagcaag gcccctcccc cgagcctgcc	780
ctccccaaagc aggctgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgccacaga gcagctctc	840
taaggcccct cctccatccc tgccatcccc ctccggctg cctggccct ctgacacccc	900
tatcctgcct cagtgtatgaa ggtctggatg cggccgc	937
<210> 46	
<211> 889	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 46	
tctagaggac atggccaccc gcagcaggac cagcctgctg ctggccttc gcctgctgtg	60
cctgcccattgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccgagccct	120
gcccctcccc accatcccccc ttagcaggct gttcgacaac gccatgctga gggctcacag	180
gctgcaccag ctggccttgc acacctacca ggagttcgag gaagcctaca tccccaaagga	240
gcagaagtagc agttcctgc agaacccttca gaccccttgc tgctcagcg agagcatccc	300
caccccccagc aacagagagg agacccagca gaagagcaac ctggagctgc tgaggatctc	360
cctgctgctg atccagagct ggctggagcc cgtgcagttc ctgagaagcg tggtcgccaa	420
cagcctggtg tacggcgcca ggcacagcaa cgtgtacgac ctgctgaagg acctggagga	480
gggcattccag accctgatgg gccggctgga ggacggcagc cccaggaccg gccagatctt	540
caaggcagacc tacagcaagt tcgacaccaa cagccacaac gacgacgccc tgctgaagaa	600
ctacgggctg ctgtactgct tcagaaagga catggacaag gtggagacat tcctgaggat	660
cgtgcagtgc agaagcgtgg agggcagctg cggcttcagc tccagcagca aggcccctcc	720
cccgagcctg ccctccccaa gcaggctgcc tggccctcc gacacaccaa tcctgccaca	780
gaggcagctcc tctaaaggcccc ctcctccatc cctgccatcc ccctccggc tgcctggccc	840
ctctgacacc cctatcctgc ctcagtgtatg aaggcttgaa tgccggccgc	889
<210> 47	
<211> 217	

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

210 215

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 48

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Gln

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 49

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

1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala

20 25

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Reverse primer for EPO-CTP constructs

&lt;400&gt; 50

gcttccgaca gcagggc 17