

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 983 610**

(51) Int. Cl.:

A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)
C07K 14/59 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2012 E 18198355 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024 EP 3482765**

(54) Título: **Hormona del crecimiento de acción prolongada y métodos para producir la misma**

(30) Prioridad:

02.08.2011 US 201113195931

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2024

(73) Titular/es:

**OPKO BIOLOGICS LTD. (100.0%)
16 Ashlegan Street
Kiryat Gat, 8211804, IL**

(72) Inventor/es:

**FARES, FUAD y
FIMA, UDI EYAL**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 610 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Hormona del crecimiento de acción prolongada y métodos para producir la misma

Campo de la invención

5 Se describen el uso de una proteína de la hormona del crecimiento y los polinucleótidos que la codifican que comprenden un péptido carboxi-terminal amino-terminal (CTP) de gonadotropina coriónica y dos CTP de gonadotropina coriónica carboxi-terminal unidos a la hormona del crecimiento en métodos para inducir la pérdida de peso o la reducción de la grasa corporal, un método para aumentar los niveles de factor del crecimiento similar a insulina (IGF-1) y métodos para reducir la frecuencia de dosificación de una hormona del crecimiento en un sujeto humano. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden la hormona del crecimiento y polinucleótidos que codifican la hormona del crecimiento de la invención y métodos que utilizan los mismos.

10

Antecedentes de la invención

15 Los polipéptidos son susceptibles a la desnaturalización o la degradación enzimática en la sangre, el hígado o el riñón. Por consiguiente, los polipéptidos típicamente tienen semividas en la circulación cortas de varias horas. Debido a su baja estabilidad, los fármacos peptídicos se administran normalmente con una frecuencia sostenida para mantener una concentración en plasma eficaz del péptido activo. Además, ya que los fármacos peptídicos se administran habitualmente por infusión, la inyección frecuente de fármacos peptídicos provoca una incomodidad considerable a un sujeto. Por lo tanto, existe la necesidad de tecnologías que prolonguen las semividas de los polipéptidos terapéuticos manteniendo al mismo tiempo una alta eficacia farmacológica de los mismos. Dichos fármacos peptídicos deseados también deberían cumplir los requisitos de estabilidad en suero mejorada, alta actividad y una baja probabilidad de inducir una respuesta inmunitaria indeseada cuando se inyectan en un sujeto.

20

25 La farmacocinética desfavorable, tal como una semivida en suero corta, puede evitar el desarrollo farmacéutico de muchos candidatos farmacológicos de otro modo prometedores. La semivida en suero es una característica empírica de una molécula, y debe determinarse de forma experimental para cada nuevo fármaco potencial. Por ejemplo, con fármacos polipeptídicos de peso molecular inferior, los mecanismos de depuración fisiológicos, tal como la filtración renal, pueden hacer que el mantenimiento de niveles terapéuticos de un fármaco sea inviable debido al coste o la frecuencia del régimen de dosificación requerido. Por el contrario, una semivida en suero prolongada no es deseada cuando un fármaco o sus metabolitos tienen efectos secundarios tóxicos.

El documento US 2010/081614 describe un polipéptido CTP-hGH-CTP-CTP que corresponde a la SEQ ID NO: 11 de la presente solicitud y su uso médico en el tratamiento de la deficiencia de hGH.

30 Resumen de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido modificado con el péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica para su uso en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 es una transferencia de Western que ilustra el peso molecular e identidad de hGH (SEQ ID NO: 5), hGH-CTP (SEQ ID NO: 9), hGH-CTP-CTP (SEQ ID NO: 10), CTP-hGH-CTP-CTP (SEQ ID NO: 11) y tCTP-hGH-CTP-CTP (SEQ ID NO: 12). El gel de PAGE SDS se transfirió y se tiñó usando anticuerpos monocionales anti-hGH. La fotografía indica que como la hGH comercial y de tipo silvestre, las variantes de hGH modificadas con CTP se reconocen por anticuerpos anti-hGH.

40 La Figura 2 es un gráfico de barras que ilustra el aumento de peso de ratas hipofisectomizadas después de la administración de los polipéptidos de GH-CTP (los MOD diferentes) de la presente invención.

La Figura 3 incluye dos esquemas (1) un mapa del plásmido CTP-hGH-CTP-CTP pCI-dhfr y (2) la fórmula de una proteína estructural de CTP-hGH-CTP-CTP.

La Figura 4 son gráficos que muestran la concentración plasmática media de CTP-hGH-CTP-CTP o GH (pg/ml) después de una sola dosis i.v. o s.c. de CTP-hGH-CTP-CTP o GH en ratas (n = 3-6 por dosis/vía).

45 La Figura 5 son gráficos que muestran el aumento de peso gradual medio después de dosis s.c. individuales de CTP-hGH-CTP-CTP (0.4, 0.8 y 4 mg/kg) en ratas hipofisectomizadas en comparación con inyecciones de GH diarias (0.1 mg/kg/día) (n = 10 por dosis).

La Figura 6 es un gráfico que muestra el área bajo la curva después de una sola inyección de CTP-hGH-CTP-CTP que se correlaciona con el aumento de peso corporal en ratas.

50 La Figura 7 es un gráfico que muestra el aumento de peso gradual después de dosis s.c. de CTP-hGH-CTP-CTP (0.4, 0.8 y 4 mg/kg) con 4 días de diferencia en ratas hipofisectomizadas en comparación con inyecciones de GH diarias (0.1 mg/kg/día) (n = 10 por dosis).

La Figura 8 es un gráfico que muestra la concentración en suero de hGH en ratas hipofisectomizadas después de una inyección SC de CTP-hGH-CTP-CTP y hGH comercial. Se inyectaron por vía subcutánea una sola dosis de CTP-hGH-CTP-CTP, 0.6 o 1.8 mg/kg, y Biotropin, 0.35 o 1.05 mg/kg, ratas hipofisectomizadas para la determinación del perfil PK/PD. La inyección posterior de hGH en suero se midió utilizando kits ELISA específicos.

La Figura 9 es un gráfico que muestra los niveles en suero de IGF-1 en ratas hipofisectomizadas después de la inyección SC de CTP-hGH-CTP-CTP y hGH comercial. Se inyectaron por vía subcutánea una sola dosis de CTP-hGH-CTP-CTP, 0.6 o 1.8 mg/kg, y Biotropin, 0.35 o 1.05 mg/kg, ratas hipofisectomizadas para la determinación del perfil PK/PD. La inyección posterior de IGF-I en suero se midió utilizando kits ELISA específicos (Roche Diagnostics).

Descripción detallada de la invención

En una realización, la presente invención proporciona hormonas del crecimiento de acción prolongada y métodos para producir y utilizar las mismas. En otra realización, las hormonas del crecimiento de acción prolongada comprenden un péptido carboxi-terminal (CTP, también denominado unidad CTP). En otra realización, los polipéptidos de acción prolongada comprenden un péptido carboxi-terminal (CTP) de Gonadotropina Coriónica humana (hCG). En otra realización, CTP actúa como protector frente a la degradación de la hormona del crecimiento o los polipéptidos de interés. En otra realización, CTP prolonga la Cmax de las hormonas del crecimiento o los polipéptidos de interés. En otra realización, CTP prolonga el Tmax de las hormonas del crecimiento o los polipéptidos de interés. En otra realización, CTP prolonga las semividas en la circulación de las hormonas del crecimiento o los polipéptidos de interés. En algunas realizaciones, CTP aumenta la potencia de las hormonas del crecimiento o los polipéptidos de interés.

En otras realizaciones, las hormonas de crecimiento o polipéptidos modificados de interés de la invención, que comprenden un único CTP unido al extremo amino y dos péptidos de CTP unidos en tandem al extremo carboxi, son al menos equivalentes a las hormonas del crecimiento o polipéptidos no modificados por el CTP de interés, en términos de la actividad biológica. En otras realizaciones, las hormonas del crecimiento o polipéptidos modificados de interés de la invención, que comprenden un único CTP unido al extremo amino y dos péptidos de CTP unidos en tandem al extremo carboxi son al menos equivalentes a las hormonas de crecimiento o polipéptidos no modificados por CTP de interés en términos de medidas farmacológicas tales como la farmacocinética y la farmacodinámica.

En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento y al menos un péptido CTP unido a un extremo amino de la hormona del crecimiento y al menos dos péptidos carboxi-terminales de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de la hormona del crecimiento. En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende un péptido carboxi-terminal de gonadotropina coriónica unido a un extremo amino de una hormona del crecimiento y dos péptidos carboxi-terminales de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de la hormona del crecimiento.

En otra realización, los términos "péptido CTP", "péptido carboxi terminal" y "secuencia de CTP" se usan de forma intercambiable en esta memoria. En otra realización, el péptido carboxi terminal es un CTP de longitud completa. En otra realización, el péptido carboxi terminal es un CTP truncado. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, "secuencia señal" y "péptido señal" se usan de forma intercambiable en esta memoria. En otra realización, "secuencia" cuando se hace referencia a un polinucleótido puede referirse a una porción codificante. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, la invención proporciona un polipéptido modificado con CTP que consiste en una hormona del crecimiento, un solo péptido carboxi terminal de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de la hormona del crecimiento. En otra realización, la invención proporciona un polipéptido que consiste en una hormona del crecimiento, un solo péptido carboxi terminal de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de la hormona del crecimiento, dos péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de la hormona del crecimiento, y un péptido señal unido al extremo amino de un péptido carboxi terminal de gonadotropina coriónica.

En otra realización, una hormona del crecimiento que comprende CTPs como se describe en esta memoria tiene una mejor actividad biológica *in vivo* comparada con la misma hormona del crecimiento sin CTPs. En otra realización, una hormona del crecimiento que comprende al menos un CTP unido a su extremo amino y al menos dos CTP unidos a su extremo carboxi tiene una mejor actividad biológica *in vivo* comparada con la misma hormona del crecimiento sin CTPs. En otra realización, una hormona del crecimiento que comprende un CTP unido a su extremo amino y dos CTP unidos a su extremo carboxi tiene una actividad biológica *in vivo* mejorada en comparación con la misma hormona del crecimiento sin CTP.

En otra realización, un sujeto es un sujeto humano. En una realización, el sujeto es masculino. En otra realización, el sujeto es femenino.

En otra realización, la configuración de CTP-hormona del crecimiento-CTP-CTP como se describe en esta memoria

- comprende una hormona del crecimiento o un fragmento activo de la misma conectado mediante un enlace peptídico a al menos una unidad CTP. En otra realización, un CTP-hormona del crecimiento-CTP-CTP como se describe en esta memoria comprende una hormona del crecimiento o un fragmento activo de la misma conectado a través de un enlace peptídico al menos a una unidad CTP que está conectada a una unidad CTP adicional a través de un enlace peptídico. En otra realización, un polipéptido como se describe en esta memoria comprende una hormona del crecimiento, fragmentos de la misma y unidades CTP y/o fragmentos de las mismas están interconectados mediante un enlace peptídico. En otra realización, una molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido como se describe en esta memoria que comprende una hormona del crecimiento y/o fragmentos de la misma y unidades CTP y/o fragmentos de las mismas.
- 5 En otra realización, el péptido carboxi-terminal (CTP) está unido a la hormona del crecimiento a través de un enlazador. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP a la hormona del crecimiento es un enlace covalente. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP a la hormona del crecimiento es un enlace peptídico. En otra realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP a la hormona del crecimiento es un enlace peptídico sustituido. En otra realización, la secuencia de péptido carboxi-terminal (CTP) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- 10 En otra realización, la SEQ ID NO: 1 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (AA): DPRFQDSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILQ (SEQ ID NO: 1). En otra realización, la SEQ ID NO: 2 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (AA): SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 2).
- 15 En otra realización, la secuencia de péptido carboxi-terminal (CTP) está truncada. En otra realización, un CTP truncado comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: SSSSKAPPPSLP (SEQ ID NO: 4).
- 20 En otra realización, el péptido carboxi terminal (CTP) de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido 112 a la posición 145 de un péptido humano nativo de gonadotropina coriónica. En otra realización, la secuencia de CTP de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido 118 a la posición 145 de un péptido humano de gonadotropina coriónica. En otra realización, la secuencia de CTP también comienza desde cualquier posición entre las posiciones 112-118 y termina en la posición 145 del péptido humano de gonadotropina coriónica. En algunas realizaciones, el péptido de la secuencia de CTP es de 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 aminoácidos de longitud y comienza en la posición 112, 113, 114, 115, 116, 117 o 118 de la secuencia de aminoácidos de CTP depositada en el banco de genes.
- 25 En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 1-5 sustituciones de aminoácidos conservadoras como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5712122. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 1 sustitución de aminoácidos conservadora. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 2 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 3 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 4 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 5 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del péptido CTP de la presente invención es al menos 70 % homóloga a la secuencia de aminoácidos del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del péptido CTP de la presente invención es al menos 80 % homóloga a la secuencia de aminoácidos del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del péptido CTP de la presente invención es al menos 90 % homóloga a la secuencia de aminoácidos del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del péptido CTP de la presente invención es al menos 95 % homóloga a la secuencia de aminoácidos del CTP nativo o un péptido de la misma.
- 30 En otra realización, el CTP truncado comprende los primeros 11 aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 8 aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 13 aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 6 aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En una realización, el CTP truncado comprende los primeros 5 aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
- 35 En una realización, al menos una de las secuencias de aminoácidos de CTP de gonadotropina coriónica está glucosilada. En otra realización, ambas secuencias de aminoácidos de CTP de gonadotropina coriónica están
- 45
- 50
- 55

glucosiladas. En otra realización, 2 de las secuencias de aminoácidos de CTP de gonadotropina coriónica están glucosiladas. En otra realización, 2 o más de las secuencias de aminoácidos de CTP de gonadotropina coriónica están glucosiladas. En otra realización, cada una de las secuencias de aminoácidos de CTP de gonadotropina coriónica están glucosiladas. En una realización, la secuencia de CTP de la presente invención comprende al menos un sitio de glucosilación. En una realización, la secuencia de CTP de la presente invención comprende 2 sitios de glucosilación. En una realización, la secuencia de CTP de la presente invención comprende 3 sitios de glucosilación. En una realización, la secuencia de CTP de la presente invención comprende 4 sitios de glucosilación.

En otra realización, al menos una secuencia del péptido carboxi-terminal (CTP) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. En otra realización, al menos un péptido carboxi-terminal (CTP) está truncado.

En una realización, los términos "extremos", "terminal", "extremo terminal" y "extremo" cuando se hace referencia a un extremo carboxi o amino de una proteína o péptido o fragmento de los mismos proporcionados en la presente memoria, se usan de manera intercambiable en esta memoria. En otra realización, los términos "C-terminal", "carboxi terminal" o "carboxilo terminal" se usan de manera intercambiable en la presente memoria. En otra realización, los términos "N-terminal" y "amino terminal" se usan de manera intercambiable en esta memoria. Cada posibilidad representa una realización distinta de la presente invención.

En otra realización, una secuencia de CTP tanto en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento como en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento proporciona una mejor protección frente a la degradación de la hormona del crecimiento. En otra realización, al menos una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos unidades de CTP en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento proporciona una protección mejorada frente a la depuración. En otra realización, al menos una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos unidades de CTP en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento proporciona un tiempo de depuración prolongado. En otra realización, al menos una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos unidades de CTP en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento mejora la Crmáx de una hormona del crecimiento. En otra realización, al menos una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos unidades de CTP en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento mejora el Tmáx de una hormona del crecimiento. En otra realización, al menos una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos unidades de CTP en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento mejoró la T1/2 (semivida) de la hormona del crecimiento.

En otra realización, secuencias de CTP tanto en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento como en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento extienden la semivida de la hormona del crecimiento modificada. En otra realización, al menos una sola secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y al menos dos secuencias de CTP en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento proporcionan una semivida extendida a la hormona del crecimiento modificada. En otra realización, una sola secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos secuencias de CTP en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento proporcionan una semivida extendida a la hormona del crecimiento adjunta. En otra realización, una sola secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos secuencias de CTP en tandem en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento proporcionan una semivida extendida a la hormona del crecimiento modificada.

En otra realización, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de un polipéptido, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en tandem a la secuencia de CTP en el extremo carboxi proporcionan una protección mejorada contra la degradación a una hormona del crecimiento. En algunas realizaciones, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en tandem a la secuencia de CTP en el extremo carboxi extienden la semivida de la hormona del crecimiento. En algunas realizaciones, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en tandem a la secuencia de CTP en el extremo carboxi mejoran la actividad biológica de la hormona del crecimiento.

En otra realización, la hormona del crecimiento comprende además un péptido señal. En algunas realizaciones, las secuencias señal incluyen, pero no se limitan a, la secuencia señal endógena. En algunas realizaciones, las secuencias señal incluyen, pero no se limitan a, la secuencia señal endógena de cualquier hormona del crecimiento u hormonas del crecimiento conocidas. En otra realización, los polipéptidos y métodos de la presente invención proporcionan una hormona del crecimiento que tiene adicionalmente un péptido señal que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA (SEQ ID NO: 3).

En otra realización, las hormonas del crecimiento conjugadas de esta invención se usan de la misma manera que las hormonas del crecimiento sin modificar. En otra realización, las hormonas del crecimiento conjugadas de esta invención tienen una semivida en la circulación y un tiempo de residencia en plasma aumentados, una depuración reducida, y una actividad clínica *in vivo* aumentada. En otra realización, debido a las propiedades mejoradas de las

hormonas del crecimiento conjugadas como se describe en esta memoria, estos conjugados se administran con menos frecuencia que las hormonas del crecimiento no modificadas. En otra realización, las hormonas del crecimiento conjugadas como se describen en esta memoria, se administran desde una vez a la semana hasta una vez cada dos semanas. En otra realización, las hormonas del crecimiento conjugadas como se describen en esta memoria, se

5 administran desde una vez cada dos semanas hasta una vez cada tres semanas. En otra realización, las hormonas del crecimiento conjugadas como se describen en esta memoria, se administran desde una vez al día hasta tres veces a la semana. En otra realización, la frecuencia reducida de la administración dará como resultado un mejor cumplimiento del paciente que conducirá a mejores resultados del tratamiento, así como una mejor calidad de vida del paciente. En otra realización, en comparación con los conjugados convencionales de hormonas de crecimiento ligadas 10 a polí(etilenglicol), se ha encontrado que los conjugados CTP de la hormona del crecimiento que tienen el peso molecular y la estructura del enlazador de los conjugados de esta invención, tienen una potencia mejorada, una estabilidad mejorada, niveles elevados de AUC y mayor semivida en la circulación. En otra realización, en comparación con los conjugados convencionales de hormonas del crecimiento ligadas a polí(etilenglicol), se ha encontrado que las 15 hormonas del crecimiento que tienen el peso molecular y la estructura del enlazador de los conjugados de esta invención, tienen una potencia mejorada, una estabilidad mejorada, niveles elevados de AUC y mayor semivida en la circulación. En otra realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una hormona del crecimiento conjugada es 15 la cantidad de conjugado necesaria para la actividad biológica esperada medible *in vivo*. En otra realización, una hormona del crecimiento utilizada de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención presenta una potencia aumentada. En otra realización, la unión de la secuencia de CTP tanto al extremo amino como carboxi de una hormona 20 del crecimiento da como resultado una actividad *in vivo* prolongada.

En otra realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una hormona del crecimiento conjugada se determina según factores como el tipo exacto de afección que se está tratando, la condición del paciente que está siendo tratado, así como los demás ingredientes de la composición. En otra realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una 25 hormona del crecimiento conjugada es 0.01 a 10 µg por kg de peso corporal administrada una vez a la semana. En otra realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una hormona del crecimiento conjugada es 0.1 a 1 µg por kg de peso corporal administrada una vez a la semana. En otra realización, una composición farmacéutica que comprende una hormona del crecimiento conjugada se formula con una resistencia eficaz para la administración por diversos medios a un paciente humano.

30 En otra realización, la hormona del crecimiento es cualquier hormona del crecimiento conocida por un experto en la técnica. En otra realización, la hormona del crecimiento es una hormona del crecimiento humana. En otra realización, la secuencia de nucleótidos y/o la secuencia de aminoácidos de una hormona del crecimiento está disponible en una base de datos del banco de genes. En otra realización, la hormona del crecimiento es un homólogo. En otra realización, un homólogo también se refiere a una variante de delección, inserción o sustitución, que incluye una sustitución aminoacídica, y fragmentos de polipéptidos biológicamente activos de los mismos.

35 En otra realización, la hormona del crecimiento es una variante de los exones faltantes en la hGH 2, 3, 4, o cualquier combinación de ellos. En otra realización, la hormona del crecimiento comprende un péptido señal. En otra realización, la hormona del crecimiento comprende un sitio de escisión de señal. En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP de la presente invención comprenden GH recombinante.

40 En otra realización, una hormona del crecimiento como se describe en esta memoria, es un miembro de la superfamilia de las citocinas de tipo hormona del crecimiento (GH). En otra realización, una hormona del crecimiento como se describe en esta memoria es la hormona del crecimiento humana (hGH). En otra realización, una hormona del crecimiento humana comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (Genbank n.º de Acceso P01241):

45 MATGSRSTLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLA
KEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNNLELLRISL
GASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGS
FRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 5)

En otra realización, una hormona del crecimiento humana comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLA
KEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNNLELLRISL
EDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDM
F (SEQ ID NO: 6).

En otra realización, una hormona del crecimiento humana comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: MFPTIPLSRLFDNAMI, RAHRLHQLA (SEQ ID NO: 7). En otra realización, una hGH comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

55 MATGSRSTLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLA
KVQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNNLELLRISL
YGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGS
CFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 8).

En otra realización, una hGH es una variante de sustitución en la que la glutamina en la posición 65 de la hGH está

sustituida por una valina.

En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º AAA72260. En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º AAK69708. En otra

5 realización, una hormona del crecimiento de la invención comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º CAA01435. En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º CAA01329. En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º CAA00380. En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º AAA72555. En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NP_000506.2. En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NP_072053.1. En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NP_072054.1. En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NP_072055.1. En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NP_072056.1.

10 En otra realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento como se describe en esta memoria codifica cualquier secuencia de aminoácidos de una hormona del crecimiento conocida por un experto en la técnica. En otra realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento como se describe en esta memoria codifica una hGH. En otra realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NM_000515.3.

15 En otra realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NM_022559.2. En otra realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NM_022560.2. En otra realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NM_022561.2. En otra realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NM_022562.2.

20 En otra realización, un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento de la invención y un CTP unido a un extremo carboxi de una hormona del crecimiento (hGH-CTP) y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MATGSRTSLLAFLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEAYIP
KEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLLELRISLLLQSWLEPVQFLRSVFANSLVY
GASDSNVYDILKDLLEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYC
FRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 9).

25 En otra realización, un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento de la invención comprende dos CTP en tandem unidos a un extremo carboxi de una hormona del crecimiento (hGH-CTP-CTP) y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MATGSRTSLLAFLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEAYIP
KEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLLELRISLLLQSWLEPVQFLRSVFANSLVY
GASDSNVYDILKDLLEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYC
FRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPS
PSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 10).

30 En otra realización, un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento de la invención comprende dos CTP unidos en tandem a un extremo carboxi de una hormona del crecimiento y un CTP unido a un extremo amino de una hormona del crecimiento (CTP-hGH-CTP-CTP) tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MATGSRSTLLLAFGLLCLPWLQEGLSASSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRLFDN
AMLRAHRLHQLAFLDTYQEFEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLLELL
RISLLLIQSWEPVQFLRSVFAVSLVYGAASDSNVYDLLKDLEEGIQLMGRLEDGSPTRGQIFK
QTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSKAPPPSLP
SPSRLPGPSDTPILPQSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 11).

En otra realización, un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento de la invención comprende dos CTP en tandem unidos a un extremo carboxi de una hormona del crecimiento, en el que un CTP de los CTP está truncado, y un CTP adicional unido a un extremo amino de una hormona del crecimiento (tCTP-hGH-CTP-CTP) y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MATGSRSTSLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFTYQEFEAEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNELLRISLTLIQSWLEPVQFRLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 12).

En otra realización, un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento de la invención comprende un CTP unido a un extremo carboxi de una hormona del crecimiento y un CTP unido a un extremo amino de una hormona del crecimiento (CTP-hGH-CTP) y tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MATGSRSTSLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRLFDN
AMLRAHRLHQLAFTYQEFEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLLEL
RISLLIQSWEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFK
QTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSKAPPPSLP
SPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 13).

En otra realización, un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento y un CTP comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MATGSRSTSLLAPGLLCLPWLQEGRASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRLFDN
AMLRAHRLHQLAFDTYQEFEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLLELL
RISLLIQSWSLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDILKDLLEGIQTLMGRLEDGSVRTGQIFK
QTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCIRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO:
14).

En otra realización, una molécula polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene CTP-hGH-CTP comprende la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

En otra realización, una molécula polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene CTP-hGH-CTP-CTP

comprende la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

En otra realización, una molécula polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene CTP-hGH-CTP-CTP comprende la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención es homologa a una secuencia conocida de una hormona del crecimiento. En otra realización, una hormona del crecimiento de la invención es homologa a una secuencia de hormona del crecimiento como se divulga en esta memoria. En algunas realizaciones, la homología de acuerdo con la presente invención también incluye delecciones, inserciones o variantes de sustitución, incluyendo una sustitución de aminoácidos, de las mismas y fragmentos polipeptídicos biológicamente activos de los mismos. En una realización, la variante de sustitución es una en la que la glutamina en la posición 65 de hGH está sustituida por una valina [Gellerfors et al., *J Pharm Biomed Anal* 1989, 7:173-83].

En una realización, la frase "hormona del crecimiento humana" (hGH) se refiere a un polipéptido, tal como se expone en el Genbank n.^o de Acceso P01241, que presenta actividad de hGH (es decir estimulación del crecimiento).

- 15 En una realización, la "hormona del crecimiento humana" (hGH) se refiere a un polipéptido, tal como se expone en el Genbank con n.º de Acceso P01241, que presenta actividad de hGH (es decir estimulación del crecimiento). En una realización, hGH de la presente invención también se refiere a los homólogos. En una realización, la secuencia de aminoácidos de hGH de la presente invención es al menos 50 % homóloga con una secuencia de hGH expuesta en el GenBank con acceso n.º P01241 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando los parámetros por defecto). En una realización, la secuencia de aminoácidos de hGH de la presente invención es al menos 60 % homóloga con una secuencia de hGH expuesta en el GenBank con acceso n.º P01241 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando los parámetros por defecto). En una realización, la secuencia de aminoácidos de hGH de la presente invención es al menos 70 % homóloga con una secuencia de hGH expuesta en el GenBank con acceso n.º P01241 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando los parámetros por defecto). En una realización, la secuencia de aminoácidos de hGH de la presente invención es al menos 80 % homóloga con una secuencia de hGH expuesta en el GenBank con acceso n.º P01241 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando los parámetros por defecto). En una realización, la secuencia de aminoácidos de hGH de la presente invención es al menos 90 % homóloga con una secuencia de hGH expuesta en el GenBank con acceso n.º P01241 como se determina usando el software BlastP del

National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando los parámetros por defecto). En una realización, la secuencia de aminoácidos de hGH de la presente invención es al menos 95 % homóloga con una secuencia de hGH expuesta en el GenBank con acceso n.º P01241 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando los parámetros por defecto).

- 5 En otra realización, los polipéptidos que comprenden la hGH modificada por los CTP se unen a los adipocitos y los estimulan para descomponer los triglicéridos y suprimen su capacidad para captar y acumular los lípidos en la circulación. En otra realización, los polipéptidos que comprenden la hGH modificada por los CTP ejercen efectos indirectos mediados principalmente por un factor de crecimiento insulínico de tipo I (IGF-I) (como se muestra en la sección de ejemplos).
- 10 En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan el crecimiento corporal estimulando el hígado y otros tejidos para secretar IGF-I. En otra realización, IGF-I estimula la proliferación de condrocitos, dando como resultado un crecimiento óseo. En otra realización, IGF-I estimula la proliferación de células del músculo esquelético, dando como resultado el crecimiento muscular.
- 15 En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP inducen un efecto metabólico sobre el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP tienen un efecto directo. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP tienen un efecto indirecto a través de la inducción de IGF-I. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP comprenden además un péptido líder. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP incluyen construcciones truncadas de CTP.
- 20 En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan el anabolismo proteico en un tejido. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan la captación de aminoácidos, aumentan la síntesis de proteínas y disminuyen la oxidación de las proteínas.
- 25 En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan el metabolismo de las grasas. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan la utilización de la grasa estimulando la degradación de los triglicéridos y la oxidación en los adipocitos. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por CTP reducen la grasa corporal.
- 30 En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan el metabolismo de los carbohidratos. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP mantienen la glucosa en sangre dentro de un intervalo normal. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP comprenden una actividad anti-insulina. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP suprimen la capacidad de la insulina para estimular la captación de glucosa en los tejidos periféricos y mejorar la síntesis de glucosa en el hígado. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan la secreción de insulina, dando lugar a hiperinsulinemia.
- 35 En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP se usan para compensar la producción limitada o nula de hormona del crecimiento en un sujeto. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP compensan la producción limitada o nula de hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH). En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP compensan el aumento de la actividad de la somatostatina. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP compensan la producción limitada o nula de grelina.
- 40 En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP se usan para tratar enfermedades asociadas con lesiones bien en el hipotálamo, la pituitaria o en células diana. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP se usan para tratar enfermedades asociadas con una respuesta reducida de las células diana a la hormona.
- 45 En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP se usan para tratar a niños con grave retraso del crecimiento. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP se usan para tratar a niños de estatura patológicamente baja. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP de la invención se usan para aumentar el rendimiento atlético. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP de la invención se usan para tratar los síntomas del envejecimiento. En otra realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP de la invención se usan para tratar síntomas cosméticos de la edad.
- 50 En otra realización, el tratamiento de los niños con deficiencia de GH con GH da como resultado un aumento del crecimiento, mientras que en los adultos con deficiencia de GH, el tratamiento con GH da como resultado un aumento de la masa corporal magra y una disminución o reducción de la grasa corporal. En otra realización, el tratamiento con formas modificadas por CTP de GH da como resultado una mejora de estos efectos en niños y adultos. En otra realización, el tratamiento con hGH modificada con CTP en niños con deficiencia de GH tiene como resultado un incremento del crecimiento en comparación con los niños con deficiencia de GH que reciben la misma dosis de GH comercial, no modificada, diaria. En otra realización, el tratamiento con hGH modificada con CTP en niños tiene como resultado un incremento del crecimiento en comparación con los niños que reciben la misma dosis de GH comercial,

no modificada, diaria.

En otra realización, los métodos de la presente invención proporcionan hGH que tiene adicionalmente al menos un péptido de aminoácidos de CTP en el extremo N y al menos un péptido de aminoácidos de CTP en el extremo C para el tratamiento de la deficiencia de hGH. En otra realización, los métodos de la presente invención proporcionan polipéptidos que comprenden hGH modificada con CTP para el tratamiento de la deficiencia de hGH.

En otra realización, los métodos de la presente invención proporcionan una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína GH como se describe en esta memoria. En otra realización, los métodos de la presente invención proporcionan una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que comprende hGH modificada con CTP para estimular el crecimiento muscular, aumentar la función cardíaca, estimular el crecimiento óseo, mantener la integridad muscular, equilibrar el metabolismo muscular, inducir la acumulación muscular, inducir la acumulación muscular *de-novo*, potenciar la carga ósea, tratar los síntomas asociados con la osteoporosis, tratar una enfermedad de emaciación, aumentar la lipólisis, mejorar el equilibrio de fluidos, tratar la osteoporosis, mejorar la función pulmonar, mejorar la inmunidad, regenerar un órgano vital, aumentar el sentido del bienestar, restaurar el sueño REM o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, se utiliza hormona del crecimiento humana (hGH) según las enseñanzas de la presente invención. En algunas realizaciones, la unión de la secuencia de CTP a los extremos tanto amino como carboxi de la proteína hGH da como resultado una potencia aumentada (Figura 2). En algunas realizaciones, la unión de la secuencia de CTP a los extremos tanto amino como carboxi de la proteína hGH da como resultado una actividad *in-vivo* prolongada.

En algunas realizaciones, "polipéptido" o "proteína" como se usa en esta memoria incluye polipéptidos nativos (ya sean productos de degradación, polipéptidos sintetizados sintéticamente o polipéptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, polipéptidos sintetizados sintéticamente), así como peptoides y semipeptoides que son análogos polipeptídicos, que tienen, en algunas realizaciones, modificaciones que hacen a los polipéptidos incluso más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar en las células.

En algunas realizaciones, las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificación del extremo N terminal, modificación del extremo C terminal, modificación de enlaces polipeptídicos, incluyendo, pero sin limitarse a, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones del esqueleto, y modificación de residuos. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar compuestos peptidomiméticos y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). Se proporcionan posteriormente en esta memoria detalles adicionales a este respecto.

En algunas realizaciones, se sustituyen los enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) dentro del polipéptido. En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces N-metilados (-N (CH₃) -CO-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de éster (-C (R) H-C-O-O-C (R) -N-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de cetometileno (-CO-CH₂-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces α-aza (-NH-N (R) -CO-), en los que R es cualquier enlace carba alquilo, por ejemplo, metilo, (-CH₂-NH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de hidroxietileno (-CH (OH) -CH₂-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de tioamida (-CS-NH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por dobles enlaces olefínicos (-CH=CH-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de retro amida (-NH-CO-). En algunas realizaciones, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por derivados polipeptídicos (-N (R) -CH₂-CO-), en los que R es la cadena lateral "normal" presentada de forma natural en el átomo de carbono. En algunas realizaciones, estas modificaciones se producen en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena polipeptídica e incluso en varios (2-3 enlaces) al mismo tiempo.

En algunas realizaciones, los aminoácidos aromáticos naturales del polipéptido, tales como Trp, Tyr y Phe, están sustituidos por ácido no natural sintético tal como Fenilglicina, TIC, naftilanina (Nol), derivados metilados anulares de Phe, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros no aminoacídicos (por ejemplo, ácido graso, carbohidratos complejos, etc.).

En una realización, se entiende que "aminoácido" incluye los 20 aminoácidos de origen natural; incluyendo estos aminoácidos con frecuencia modificados postraduccionalmente *in vivo*, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosforeonina; e incluyendo otros aminoácidos poco habituales, pero sin limitarse a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. En una realización, "aminoácido" incluye tanto D-aminoácido como L-aminoácido.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención se utilizan en productos terapéuticos que requieren que los polipéptidos estén en forma soluble. En algunas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención incluyen uno o más aminoácidos polares no naturales o naturales, incluyendo, pero sin limitación, serina y treonina, que son capaces de aumentar la solubilidad del polipéptido debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.

En algunas realizaciones, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP de la presente invención se

utilizan en forma lineal, aunque un experto en la técnica apreciará que en los casos en los que la ciclación no interfiera gravemente con la hGH modificada por los CTP característicos, también se pueden utilizar formas cíclicas de las hormonas del crecimiento.

- 5 En algunas realizaciones, la hGH modificada por CTP de la presente invención se sintetizan de forma bioquímica tal como usando técnicas de fase sólida convencionales. En algunas realizaciones, estos métodos bioquímicos incluyen síntesis de fase sólida exclusiva, síntesis de fase sólida parcial, condensación de fragmentos, o síntesis de solución clásica. En algunas realizaciones, estos métodos se usan cuando las hormonas del crecimiento son relativamente cortas (aproximadamente 5-15 kDa) y/o cuando no pueden producirse por técnicas recombinantes (es decir, no están codificadas por una secuencia de ácidos nucleicos) y, por lo tanto, implica una química diferente.
- 10 En algunas realizaciones, se conocen bien en la técnica procedimientos de síntesis de hGH de fase sólida modificadas por CTP y se describen por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, *Solid Phase Polypeptide Syntheses* (2a Ed., Pierce Chemical Company, 1984). En algunas realizaciones, los polipéptidos sintéticos se purifican por chromatografía líquida preparativa de alto rendimiento [Creighton T. (1983) *Proteins, structures and molecular principles*. WH Freeman y Co. N.Y.] y cuya composición puede confirmarse a través de secuenciación de aminoácidos por métodos conocidos por los expertos en la técnica.
- 15 En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para generar la hGH modificada por CTP de la presente invención. En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de polipéptidos relativamente largos (por ejemplo, mayores de 18-25 aminoácidos). En algunas realizaciones, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de grandes cantidades de la hGH modificada por CTP de la presente invención. En algunas realizaciones, se describen técnicas recombinantes por Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 y Brogli et al., (1984) *Science* 224: 838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 y Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, págs. 421-463.
- 20 En otra realización, hGH modificadas por CTP de la presente invención se sintetizan usando un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. En otra realización, el polinucleótido que codifica la hGH modificada por CTP de la presente invención está ligado a un vector de expresión, que comprende un control de la transcripción de una secuencia reguladora en cis (por ejemplo, una secuencia promotora). En otra realización, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión constitutiva de las hormonas del crecimiento de la presente invención. En otra realización, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión específica de tejido de la hGH modificada por CTP de la presente invención. En otra realización, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión inducible de la hGH modificada por CTP de la presente invención.
- 25 En otra realización, los promotores específicos de tejido adecuados para el uso de la presente invención incluyen secuencias que son funcionales en poblaciones celulares específicas, los ejemplos incluyen, pero sin limitación, promotores tales como albúmina, que es específica del hígado [Pinkert et al., (1987) *Genes Dev.* 1: 268-277], promotores específicos linfoides [Calame et al., (1988) *Adv. Immunol.* 43: 235-275]; en particular promotores de los receptores de linfocitos T [Winoto et al., (1989) *EMBO J.* 8: 729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) *Cell* 33:729-740], promotores específicos de neuronas tales como el promotor de neurofilamentos [Byrne et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477], promotores específicos del páncreas [Edlunch et al. (1985) *Science* 230:912-916] o promotores específicos de las glándulas mamarias tales como el promotor de suero de la leche (patente de Estados Unidos n.º 4873316 y la publicación de solicitud europea n.º 264166). Los promotores inducibles adecuados para el uso de la presente invención incluyen, por ejemplo, el promotor inducible por tetraciclina (Srour, M.A., et al., 2003. *Thromb. Haemost.* 90: 398-405).
- 30 En una realización, la frase "un polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico mono o bicatenaria que puede aislarse y proporcionarse en forma de una secuencia de ARN, una secuencia polinucleotídica complementaria (ADNc), una secuencia polinucleotídica genómica y/o una secuencia polinucleotídica compuesta (por ejemplo, una combinación de las anteriores).
- 35 En una realización, "secuencia polinucleotídica complementaria" se refiere a una secuencia, que es resultado de la transcripción inversa de ARN mensajero usando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. En una realización, la secuencia puede amplificarse posteriormente *in vivo* o *in vitro* usando una ADN polimerasa.
- 40 En una realización, "secuencia polinucleotídica genómica" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y, por lo tanto, representa una porción contigua de un cromosoma.
- 45 En una realización, "secuencia polinucleotídica compuesta" se refiere a una secuencia que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. En una realización, una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exónicas requeridas para codificar el polipéptido de la presente invención, así como algunas secuencias intrónicas interpuestas entre las mismas. En una realización, las secuencias intrónicas puede ser de cualquier fuente, incluyendo de otros genes, y típicamente incluirán secuencias señal de corte y empalme

conservadas. En una realización, las secuencias intrónicas incluyen elementos reguladores de expresión de acción en cis.

En otra realización, los polinucleótidos de la presente invención se preparan usando técnicas de PCR como se describe en el Ejemplo 1, o cualquier otro método o procedimiento conocido por un experto en la técnica. En algunas 5 realizaciones, el procedimiento implica la ligación de dos secuencias de ADN diferentes (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

En una realización, los polinucleótidos de la presente invención se insertan en vectores de expresión (es decir, una construcción de ácidos nucleicos) para permitir la expresión del polipéptido recombinante. En una realización, el vector 10 de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales que hacen a este vector adecuado para la replicación y la integración en procariotas. En una realización, el vector de expresión de la presente invención incluye secuencias adicionales que hacen a este vector adecuado para la replicación y la integración en eucariotas. En una realización, el vector de expresión de la presente invención incluye un vector lanzadera que hace a este vector adecuado para la replicación y la integración tanto en procariotas como en eucariotas. En otra realización, los vectores 15 de clonación comprenden secuencias de inicio de la transcripción y traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).

En una realización, pueden usarse una diversidad de células procariotas y eucariotas como sistemas de expresión en huésped para expresar la hGH modificada por CTP de la presente invención. En algunas realizaciones, estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vector de expresión de ADN cosmídico que contiene la secuencia codificante polipeptídica; levadura 20 transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante polipeptídica; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante, tal como plásmido Ti, que contienen la secuencia codificante polipeptídica.

En otra realización, se usan sistemas de expresión no bacterianos (por ejemplo, sistemas de expresión de mamífero, 25 tal como células CHO) para expresar las hormonas del crecimiento de la presente invención. En una realización, el vector de expresión usado para expresar polinucleótidos de la presente invención en células de mamífero es el vector pCI-DHFR que comprende un promotor de CMV y un gen de resistencia a neomicina. Se describe la construcción del vector pCI-dhfr, según una realización, en el Ejemplo 1.

En otra realización, en sistemas bacterianos de la presente invención, pueden seleccionarse ventajosamente varios 30 vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el polipéptido expresado. En una realización, se desean grandes cantidades de polipéptido. En una realización, se desean vectores que dirigen la expresión de altos niveles del producto proteico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrófoba, que dirige el producto expresado al periplasma de la bacteria o el medio de cultivo en el que el producto proteico se purifica fácilmente. En una realización, ciertas proteínas de fusión se modifican por ingeniería genética con un sitio de escisión específico 35 para ayudar en la recuperación del polipéptido. En una realización, los vectores adaptables a dicha manipulación incluyen, pero sin limitación, la serie pET de vectores de expresión de *E. coli* [Studier et al., *Methods in Enzymol.* 185: 60-89 (1990)].

En una realización, se usan sistemas de expresión de levaduras. En una realización, se pueden usar varios vectores 40 que contienen promotores constitutivos o inducibles en levadura como se divulga en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º: 5932447. En otra realización, se usan vectores que promueven la integración de secuencias de ADN ajeno en el cromosoma de levadura.

En una realización, el vector de expresión de la presente invención puede incluir además secuencias polinucleotídicas adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas de un único ARNm tal como un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) y secuencias para la integración genómica del polipéptido químérico del promotor.

En otra realización, los vectores de expresión de mamíferos incluyen, pero sin limitación, pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), 45 pGL3, pZeoSV2 (+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que están disponibles en Invitrogen, pCI que está disponible en Promega, pMbac, pPbac, pBKR-RSV y pBK-CMV que están disponibles en Stratagene, pTRES que está disponible en Clontech, y sus derivados.

En otra realización, la presente invención usa vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus 50 eucariotas tales como retrovirus. Los vectores de SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En algunas realizaciones, los vectores derivados de virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus de Epstein Barr incluyen pHEBO y p2O5. Otros vectores ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A+, pMTO10/A+, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV-40, promotor tardío de SV-40, promotor de metalotioneína, promotor del virus de tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, u otros promotores que se ha mostrado que son 55 eficaces para la expresión en células eucariotas.

En otra realización, los vectores virales recombinantes son útiles para la expresión *in vivo* de la GH modificada por CTP de la presente invención ya que ofrecen ventajas tales como infección lateral y especificidad de direccionamiento.

- En una realización, la infección lateral es inherente en el ciclo de vida de, por ejemplo, retrovirus y es el proceso por el que una única célula infectada produce muchos viriones descendientes que emergen e infectan células vecinas. En otra realización, el resultado es que se infecta rápidamente un área grande, la mayor parte de la cual no se había infectado inicialmente por las partículas víricas originales. En una realización, se producen vectores víricos que son incapaces de propagarse lateralmente. En otra realización, esta característica puede ser útil si el fin deseado es introducir un gen específico solamente en un número localizado de células diana.
- En otra realización, pueden usarse diversos métodos para introducir el vector de expresión de la presente invención en las células. Dichos métodos se describen en general en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección, lipofección, electroporación e infección estable o transitoria con vectores virales recombinantes. Además, véanse, las patentes de Estados Unidos n.^{os} 5464764 y 5487992 para métodos de selección positiva-negativa.
- En otra realización, la introducción de ácido nucleico por infección vírica ofrece varias ventajas sobre otros métodos tales como lipofección y electroporación, ya que puede obtenerse mayor eficacia de transfección debido a la naturaleza infecciosa de los virus.
- En una realización, se apreciará que la GH modificada con CTP de la presente invención también puede expresarse a partir de un constructo de ácido nucleico administrado al individuo empleando cualquier modo de administración adecuado, descrito anteriormente en esta memoria (es decir, terapia génica *in vivo*). En una realización, la construcción de ácido nucleico se introduce en una célula adecuada mediante un vehículo/método de suministro génico apropiado (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión según sea necesario y después las células modificadas se expanden en cultivo y se devuelven al individuo (es decir, terapia génica *ex vivo*).
- En una realización, la terapia génica *in vivo* que usa una hormona del crecimiento se ha realizado en modelos animales.
- En una realización, se usan vectores de expresión vegetales. En una realización, la expresión de una secuencia codificante del polipéptido se conduce por varios promotores. En algunas realizaciones, se usan promotores víricos tales como los promotores de ARN 35S y ARN 19S de CaMV [Brisson et al., *Nature* 310: 511-514 (1984)], o el promotor de proteína de cubierta para TMV [Takamatsu et al., *EMBO J.* 6: 307-311 (1987)]. En otra realización, se usan promotores vegetales tales como, por ejemplo, la subunidad pequeña de RUBISCO [Coruzzi et al., *EMBO J.* 3: 1671-1680 (1984); y Brogli et al., *Science* 224: 838-843 (1984)] o promotores de choque térmico, por ejemplo, hsp17.5-E o hsp17.3-B de soja [Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* 6: 559-565 (1986)]. En una realización, se introducen construcciones en células vegetales usando plásmido Ti, plásmido Ri, vectores víricos de plantas, transformación de ADN directa, microinyección, electroporación y otras técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, págs. 421-463 (1988)]. La presente invención también puede usar otros sistemas de expresión tales como sistemas celulares huésped de insectos y mamíferos, que se conocen bien en la técnica.
- Se apreciará que además de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica el polipéptido), la construcción de expresión de la presente invención también puede incluir secuencias modificadas por ingeniería genética para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad del polipéptido expresado.
- Pueden usarse diversos métodos, en algunas realizaciones, para introducir el vector de expresión de la presente invención en el sistema celular huésped. En algunas realizaciones, dichos métodos se describen generalmente en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección, lipofección, electroporación e infección estable o transitoria con vectores virales recombinantes. Además, véanse, las patentes de Estados Unidos n.^{os} 5464764 y 5487992 para métodos de selección positiva-negativa.
- En una realización, se cultivan células transformadas en condiciones eficaces, que permiten la expresión de altas cantidades de polipéptido recombinante. En otra realización, las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero sin limitación, un medio eficaz, biorreactor, temperatura, pH y condiciones de oxígeno que permiten la producción de proteínas. En una realización, un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante de la presente invención. En otra realización, un medio incluye típicamente una disolución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, y sales, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas, apropiados. En otra realización, las células de la presente invención pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y

placas de Petri. En otra realización, el cultivo se realiza a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. En otra realización, las condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto en la técnica.

- 5 En otra realización, dependiendo del vector y el sistema huésped usado para la producción, las hormonas del crecimiento de la presente invención resultantes permanecen dentro de la célula recombinante, se secretan al medio de fermentación, se secretan a un espacio entre dos membranas celulares, tales como el espacio periplásmico en *E. coli*; o se conservan en la superficie externa de una membrana celular o viral.
- En una realización, después de un tiempo predeterminado en cultivo, se realiza una recuperación del polipéptido recombinante.
- 10 En una realización, la frase "recuperar el polipéptido recombinante" usada en esta memoria se refiere a recoger el medio de fermentación completo que contiene polipéptido y no es necesario que implique etapas adicionales de separación o purificación.
- 15 En una realización, las hormonas del crecimiento de la presente invención se purifican usando una diversidad de técnicas de purificación de proteínas convencionales, tales como, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de concanavalina A, cromatoenfoque y solubilización diferencial.
- 20 En una realización, para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada puede modificarse por ingeniería genética para codificar el polipéptido de la presente invención y un resto escindible fusionado. En una realización, puede diseñarse una proteína de fusión de modo que el polipéptido pueda aislarse fácilmente por cromatografía de afinidad; por ejemplo, por inmovilización en una columna específica para el resto escindible. En una realización, se diseña un sitio de escisión entre el polipéptido y el resto escindible y el polipéptido puede liberarse de la columna cromatográfica por tratamiento con una enzima o agente apropiado que escinde específicamente la proteína de fusión en este sitio [por ejemplo, véase Booth et al., *Immunol. Lett.* 19: 65-70 (1988); y Gardella et al., *J. Biol. Chem.* 265: 25 15854-15859 (1990)].
- 25 En una realización, el polipéptido de la presente invención se recupera en forma "sustancialmente pura".
- En una realización, la frase "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones descritas en esta memoria.
- 30 En una realización, el polipéptido de la presente invención también puede sintetizarse usando sistemas de expresión *in vitro*. En una realización, se conocen bien en la técnica métodos de síntesis *in vitro* y están disponibles en el mercado los componentes del sistema.
- 35 En una realización, se realiza la producción de GH modificada por CTP usando tecnología de ADN recombinante.
- En otra realización, los polipéptidos recombinantes se sintetizan y se purifican; su eficacia terapéutica puede ensayarse *in vivo* o *in vitro*. En una realización, las actividades de unión de la GH recombinante modificada por CTP de la presente invención se puede determinar mediante varios ensayos.
- 40 En una realización, la presente invención comprende los polipéptidos CTP-hGH-CTP-CTP. En una realización, se usan métodos de tecnología de ADN recombinante para la producción de polipéptidos CTP-hGH-CTP-CTP como se ilustra en el Ejemplo 1. En una realización, la eficacia terapéutica de los polipéptidos CTP-hGH-CTP-CTP de la presente invención se ensaya *in vivo*. En una realización, la eficacia terapéutica de los polipéptidos CTP-hGH-CTP-CTP de la presente invención se ensaya *in vitro*. En una realización, las actividades de unión de los polipéptidos de hGH recombinantes de la presente invención se miden usando Nb2 (una línea celular del linfoma de rata dependiente de prolactina (Banco de Células ECACC)) o una línea celular murina FCD-P1, transfectada previamente con un receptor de la hormona del crecimiento humana. En una realización, la unión de hGH con estos receptores induce la proliferación celular que En una realización se mide por los niveles de tinción celular de MTT en función de la actividad de hGH. En una realización, la actividad *in vivo* se deduce midiendo el aumento de peso a lo largo del tiempo en animales deficientes en hormona del crecimiento tratados.
- 45 En una realización, la presente invención proporciona un método para inducir el crecimiento o el aumento de peso en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido a un extremo amino de dicha hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos a un extremo carboxi de la hormona del crecimiento, induciendo de este modo el crecimiento o aumento de peso en un sujeto.
- 50 En otra realización, la presente invención proporciona un método para inducir el crecimiento en un sujeto humano, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de dicha hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de dicha hormona
- 55

del crecimiento, induciendo de este modo el crecimiento en dicho sujeto. El sujeto humano es un niño con deficiencia de GH.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para inducir el aumento de peso en un sujeto humano, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de dicha hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de dicha hormona del crecimiento, induciendo de este modo el aumento de peso en dicho sujeto. El sujeto humano es un niño con deficiencia de GH.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para inducir el crecimiento en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una hormona del crecimiento modificada por CTP como se describe en esta memoria. En una realización, la hormona del crecimiento modificada por CTP se administra directamente al sujeto, mientras que en otra realización, se administra al sujeto un polinucleótido que codifica dicha hormona del crecimiento modificada por CTP. En otra realización, se proporciona en esta memoria un método para inducir el crecimiento en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una composición que consiste en excipientes conocidos, vehículos conocidos, y un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido a un extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica unidos a un extremo carboxi de la hormona del crecimiento. En otra realización, se proporciona en esta memoria un método para inducir el crecimiento en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una composición que consiste en excipientes conocidos, vehículos conocidos, y un polipéptido que consiste en una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido a un extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica unidos a un extremo carboxi de la hormona del crecimiento.

En otra realización, el crecimiento se mide por el aumento de peso. En otra realización, el crecimiento se mide por el aumento de altura. En otra realización, el crecimiento se mide por el aumento de peso. En otra realización, el crecimiento se mide por el aumento de masa muscular. En otra realización, el crecimiento se mide por el aumento de peso. En otra realización, el crecimiento se mide por el aumento de masa ósea. En otra realización, el crecimiento se mide por el aumento de grasa. En otra realización, el crecimiento se mide por cualquier medida conocida que se conozca por un experto en la técnica. El sujeto en el que se mide el crecimiento es un niño con deficiencia de GH.

En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP de la presente invención se administran en una dosis de 1-90 microgramos en 0.1-5 ml de disolución. En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP se administran en una dosis de 1-50 microgramos en 0.1-5 ml de disolución. En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP se administran en una dosis de 1-25 microgramos en 0.1-5 ml de disolución. En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP se administran en una dosis de 50-90 microgramos en 0.1-5 ml de disolución. En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP se administran en una dosis de 10-50 microgramos en 0.1-5 ml de disolución.

En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP se administran en una dosis de 1-90 microgramos en 0.1-5 ml de disolución mediante inyección intramuscular (IM), inyección subcutánea (SC) o inyección intravenosa (IV) una vez a la semana. En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP se administran en una dosis de 1-90 microgramos en 0.1-5 ml de disolución mediante inyección intramuscular (IM), inyección subcutánea (SC) o inyección intravenosa (IV) dos veces a la semana. En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP se administran en una dosis de 1-90 microgramos en 0.1-5 ml de disolución mediante inyección intramuscular (IM), inyección subcutánea (SC) o inyección intravenosa (IV) tres veces a la semana. En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP se administran en una dosis de 1-90 microgramos en 0.1-5 ml de disolución mediante inyección intramuscular (IM), inyección subcutánea (SC) o inyección intravenosa (IV) una vez cada dos semanas. En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP se administran en una dosis de 1-90 microgramos en 0.1-5 ml de disolución mediante inyección intramuscular (IM), inyección subcutánea (SC) o inyección intravenosa (IV) una vez cada 17 días. En otra realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP se administran en una dosis de 1-90 microgramos en 0.1-5 ml de disolución mediante inyección intramuscular (IM), inyección subcutánea (SC) o inyección intravenosa (IV) una vez cada 19 días.

En otra realización, los fármacos proteicos de peso molecular inferior a 50 000 Daltons, tal como la GH modificada por CTP de la presente invención, son en general especies de vida corta *in vivo*, que tienen una semivida corta en la circulación de varias horas. En otra realización, la vía de administración subcutánea en general proporciona una liberación más lenta en la circulación. En otra realización, el polipéptido modificado con CTP de la invención prolonga la semivida de los fármacos proteicos de peso molecular inferior a 50 000 Daltons, tal como la GH. En otra realización, el polipéptido modificado con CTP de la invención permite que la GH ejerza sus efectos beneficiosos durante un periodo de tiempo más prolongado.

En otra realización, la inmunogenicidad de un polipéptido modificado con CTP que comprende una GH modificada por

- 5 CTP es igual a una GH aislada. En otra realización, la inmunogenicidad de un polipéptido modificado con CTP que comprende una GH modificada por CTP es comparable a una GH aislada. En otra realización, la modificación de una GH como se describe en esta memoria con péptidos CTP reduce la inmunogenicidad de la GH. En otra realización, el polipéptido modificado por CTP que comprende una GH es tan activo como una proteína GH aislada. En otra realización, el polipéptido modificado por CTP que comprende una GH es más activa que una GH aislada. En otra realización, el polipéptido modificado por CTP que comprende una GH maximiza la capacidad protectora de la hormona del crecimiento contra la degradación mientras que minimiza las reducciones en la bioactividad.
- 10 En otra realización, la GH modificada por CTP de la presente invención se proporciona al individuo *per se*. En una realización, la GH modificada por CTP de la presente invención se proporciona al individuo como parte de una composición farmacéutica donde se mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 En otra realización, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en esta memoria con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.
- 20 En otra realización, "principio activo" se refiere a la secuencia polipeptídica de interés, que causa el efecto biológico.
- 25 15 En una realización, la presente invención proporciona preparaciones combinadas. En una realización, "una preparación combinada" define especialmente un "kit de partes" en el sentido de que los compañeros de combinación como se han definido anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de los compañeros de combinación es decir, simultáneamente, conjuntamente, por separado o secuencialmente. En otra realización, las partes del kit de partes pueden después, por ejemplo, administrarse de forma simultánea o escalonarse cronológicamente, es decir, en diferentes puntos temporales y con intervalos temporales iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. La relación de las cantidades totales de los compañeros de combinación puede administrarse en la preparación combinada. La preparación combinada puede variarse, por ejemplo, para afrontar las necesidades de una subpoblación de pacientes para tratar o las necesidades del paciente individual cuyas necesidades diferentes pueden deberse a una enfermedad particular, gravedad de una enfermedad, edad, sexo o peso corporal como puede realizarse fácilmente por un experto en la técnica.
- 30 20 En otra realización, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse de forma intercambiable se refieren a un vehículo o un diluyente que no provoca irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Se incluye un adyuvante en estas frases. En una realización, uno de los ingredientes incluidos en el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidad en medios tanto acuosos como orgánicos (Mutter et al. (1979)).
- 35 25 En otra realización, "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. En una realización, los excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.
- 40 30 Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.
- 45 35 En otra realización, las vías adecuadas de administración, por ejemplo, incluyen administración oral, rectal, transmucosa, transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.
- 50 40 En otra realización, la preparación o medicamento se administra de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.
- 55 45 La dosificación está en un intervalo de 1-60 mg/semana.
- 55 50 En otra realización, la dosificación es de 1-5 mg/administración. En otra realización, la dosificación es de 2 mg/administración. En otra realización, la dosificación es de 4 mg/administración. En otra realización, la dosificación es de 1.2 mg/administración. En otra realización, la dosificación es de 1.8 mg/administración. En una realización, la composición se administra una vez a la semana. En otra realización, la composición se administra una vez cada dos semanas. En otra realización, la composición se administra mensualmente. En otra realización, la composición se administra diariamente.
- 55 55 En otra realización, la GH modificada por CTP se formula en una forma de dosificación intranasal. En otra realización, la GH modificada por CTP se formula en una forma de dosificación inyectable. En otra realización, la GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0.0001 mg a 0.6 mg. En otra realización, la GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0.001 mg a 0.005 mg. En otra realización, la GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0.005 mg a 0.01 mg. En otra

realización, la GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0.01 mg a 0.3 mg. En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0.2 mg a 0.6 mg.

5 En otra realización, la GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis que varía de 1-100 microgramos.
 10 En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 10-80 microgramos. En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 20-60 microgramos. En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 10-50 microgramos. En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 40-80 microgramos. En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 10-30 microgramos. En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 30-60 microgramos.

15 En otra realización, la GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 0.2 mg a 2 mg. En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 2 mg a 6 mg. En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 4 mg a 10 mg. En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto en una dosis en el intervalo de 5 mg a 15 mg.

20 En otra realización, se inyecta una GH modificada por CTP en el músculo (inyección intramuscular). En otra realización, se inyecta una GH modificada por CTP por debajo de la piel (inyección subcutánea). En otra realización, se inyecta una GH modificada por CTP en el músculo. En otra realización, se inyecta una GH modificada por CTP por debajo de la piel.

25 En otra realización, los métodos de la invención tienen como resultado el aumento del cumplimiento de los pacientes afectados por enfermedades crónicas que necesitan una terapia con GH. En otra realización, los métodos de la invención permiten la reducción en la frecuencia de dosificación de una GH modificando la GH con CTP como se describe anteriormente en esta memoria. En otra realización, el término cumplimiento comprende adherencia. En otra realización, los métodos de la invención incluyen el aumento del cumplimiento de los pacientes que necesitan una terapia con GH al reducir la frecuencia de administración de la GH. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración de la GH se consigue debido a las modificaciones de CTP que hacen que la GH modificada por CTP sea más estable. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración de la GH se consigue como resultado del aumento de la T_{1/2} de la hormona del crecimiento. En otra realización, la reducción de la frecuencia de administración de la GH se consigue como resultado del aumento del tiempo de depuración de la GH. En otra realización, la reducción en la frecuencia de administración de la hormona del crecimiento se consigue como resultado del aumento de la medida del AUC de la hormona del crecimiento.

30 En una realización, la presente invención proporciona un método para mantener los niveles del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) dentro de un intervalo terapéutico normal en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de la hormona del crecimiento, manteniendo de este modo los niveles de IGF-1 dentro de un intervalo terapéutico normal en el sujeto. En otra realización, los métodos para mantener los niveles de IGF-1 dentro de un nivel terapéutico normal se proporcionan en el Ejemplo 9, a continuación.

35 40 En otra realización, se administra una GH modificada por CTP a un sujeto una vez al día. En otra realización, un polipéptido que comprende una GH modificada por CTP se administra a un sujeto una vez cada dos días. En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto una vez cada tres días. En otra realización, se administra una GH modificada por CTP a un sujeto una vez cada cuatro días. En otra realización, se administra una GH modificada por CTP a un sujeto una vez cada cinco días. En otra realización, se administra una GH modificada por CTP a un sujeto una vez cada seis días. En otra realización, una GH modificada por CTP se administra a un sujeto una vez a la semana. En otra realización, se administra una GH modificada por CTP a un sujeto una vez cada 7-14 días. En otra realización, se administra una GH modificada por CTP a un sujeto una vez cada 10-20 días. En otra realización, se administra una GH modificada por CTP a un sujeto una vez cada 5-15 días. En otra realización, se administra una GH modificada por CTP a un sujeto una vez cada 15-30 días.

45 50 En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 50-500 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 50-150 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 100-200 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 150-250 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 200-300 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 250-400 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 300-500 mg/día. En otra realización, la dosificación está en un intervalo de 350-500 mg/día.

55 En una realización, la dosificación es de 20 mg/día. En una realización, la dosificación es de 30 mg/día. En una realización, la dosificación es de 40 mg/día. En una realización, la dosificación es de 50 mg/día. En una realización, la dosificación es de 0.01 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 0.1 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 1 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 0.530 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 0.05

mg/día. En otra realización, la dosificación es de 50 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 10 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 20-70 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 5 mg/día.

En otra realización, la dosificación es de 1-90 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 1-90 mg/2 días. En otra realización, la dosificación es de 1-90 mg/3 días. En otra realización, la dosificación es de 1-90 mg/4 días. En otra

5 realización, la dosificación es de 1-90 mg/5 días. En otra realización, la dosificación es de 1-90 mg/6 días. En otra realización, la dosificación es de 1-90 mg/semana. En otra realización, la dosificación es de 1-90 mg/9 días. En otra realización, la dosificación es de 1-90 mg/11 días. En otra realización, la dosificación es de 1-90 mg/14 días.

En otra realización, la dosificación de hormona del crecimiento es de 10-50 mg/día. En otra realización, la dosificación es de 10-50 mg/2 días. En otra realización, la dosificación es de 10-50 mg/3 días. En otra realización, la dosificación

10 es de 10-50 mg/4 días. En otra realización, la dosificación es de 10-50 microgramos mg/5 días. En otra realización, la dosificación es de 10-50 mg/6 días. En otra realización, la dosificación es de 10-50 mg/semana. En otra realización, la dosificación es de 10-50 mg/9 días. En otra realización, la dosificación es de 10-50 mg/11 días. En otra realización, la dosificación es de 10-50 mg/14 días.

15 La administración oral, en una realización, comprende una forma de dosificación unitaria que comprende comprimidos, cápsulas, grageas, comprimidos masticables, suspensiones, emulsiones y similares. Dichas formas de dosificación unitaria comprenden una cantidad segura y eficaz de la hormona de crecimiento de la invención deseada, cada una de cuales es, en una realización desde aproximadamente 0.7 o 3.5 mg hasta aproximadamente 280 mg/70 kg, o en otra realización, aproximadamente 0.5 o 10 mg hasta aproximadamente 210 mg/70 kg. Los vehículos

20 farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de formas de dosificación unitarias para administración peroral se conocen bien en la técnica. En algunas realizaciones, los comprimidos típicamente comprenden adyuvantes convencionales farmacéuticamente compatibles como diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, manitol, lactosa y celulosa; aglutinantes tales como almidón, gelatina y sacarosa; disgregantes tales como almidón, ácido algínico y croscarmelosa; lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. En

25 una realización, pueden usarse emolientes tales como dióxido de silicio para mejorar las características de flujo de la mezcla de polvos. En una realización, pueden añadirse agentes colorantes, tales como colorantes FD&C, para determinar el aspecto. Los edulcorantes y agentes saporíferos, tales como aspartamo, sacarina, mentol, menta y sabores de frutas, son adyuvantes útiles para comprimidos masticables. Las cápsulas típicamente comprenden uno o más diluyentes sólidos desvelados anteriormente. En algunas realizaciones, la selección de componentes vehículo depende de consideraciones secundarias como el sabor, el coste y la estabilidad en almacenamiento, que no son críticas para los fines de la presente invención, y puede realizarse fácilmente por un experto en la técnica.

30 En una realización, la forma de dosificación oral comprende un perfil de liberación predefinido. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos masticables de liberación prolongada. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención

35 comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos masticables de liberación lenta. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos masticables de liberación inmediata. En una realización, la forma de dosificación oral se formula de acuerdo con el

perfil de liberación deseado del principio activo farmacéutico como se conoce por los expertos en la técnica.

35 La forma de dosificación oral comprende un perfil de liberación predefinido. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos masticables de liberación prolongada. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos masticables de liberación lenta. En una realización, la forma de dosificación oral de la presente invención comprende comprimidos, cápsulas, grageas o comprimidos masticables de liberación inmediata. En una realización, la forma de dosificación oral se formula de acuerdo con el perfil de liberación deseado del principio activo farmacéutico como se conoce por los expertos en la técnica.

40 Las composiciones perorales, en algunas realizaciones, comprenden disoluciones, emulsiones, suspensiones líquidas, y similares. En algunas realizaciones, se conocen bien en la técnica vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de dichas composiciones. En algunas realizaciones, las composiciones orales líquidas comprenden desde aproximadamente 0.001 % hasta aproximadamente 0.933 % del compuesto o los compuestos

deseados, o en otra realización, desde aproximadamente 0.01 % hasta aproximadamente 10 %.

45 En algunas realizaciones, las composiciones para su uso en los métodos de esta invención comprenden disoluciones o emulsiones, que en algunas realizaciones son disoluciones o emulsiones acuosas que comprenden una cantidad

segura y eficaz de los compuestos de la presente invención y opcionalmente otros compuestos, diseñadas para administración intranasal tópica. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden desde aproximadamente 0.001 % hasta aproximadamente 10.0 % p/v de una GH modificada por CTP, más preferiblemente desde aproximadamente 0.01 % hasta aproximadamente 2.0 %, que se usa para administración sistémica de los compuestos por la vía intranasal.

50 En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por inyección intravenosa, intraarterial o intramuscular de una preparación líquida. En algunas realizaciones, las formulaciones líquidas incluyen disoluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites, y similares. En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa, y por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa.

55 En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intraarterial, y por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para administración intraarterial. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular y por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para administración intramuscular.

Además, en otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía tópica a superficies corporales, y por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, pomadas, cremas, lociones, gotas y similares. Para administración tópica, los compuestos de la

presente invención se combinan con un agente o agentes terapéuticos apropiados adicionales, preparados y aplicados como disoluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un vehículo farmacéutico.

- 5 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se fabrican por procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, forma de realización de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.
- 10 En una realización, las composiciones farmacéuticas para el uso según la presente invención se formulan de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que pueden usarse de forma farmacéutica.
- 10 En una realización, la formulación depende de la vía de administración seleccionada.
- 15 En una realización, se formulan inyectables de la invención en disoluciones acuosas. En una realización, se formulan inyectables de la invención en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón salino fisiológico. En algunas realizaciones, para administración transmucosa, se usan penetrantes apropiados para la barrera para permear en la formulación. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica.
- 20 En una realización, las preparaciones descritas en esta memoria se formulan para administración parenteral, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. En algunas realizaciones, se presentan formulaciones para inyección en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. En algunas realizaciones, las composiciones son suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículo oleosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o de dispersión.
- 25 Las composiciones también comprenden, en algunas realizaciones, conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal, y similares; agentes quelantes, tales como edetato sódico y otros; tampones tales como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad tales como cloruro sódico, cloruro potásico, glicerina, manitol y otros; antioxidantes tales como ácido ascórbico, acetilcistina, metabisulfato sódico y otros; agentes aromáticos; agentes de ajuste de viscosidad, tales como polímeros, incluyendo celulosa y derivados de la misma; y alcohol polivinílico y ácido y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según sea necesario. Las composiciones también comprenden, en algunas realizaciones, anestesia local u otros activos. Las composiciones pueden usarse como pulverizaciones, nebulizaciones, gotas y similares.
- 30 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, se preparan suspensiones de los principios activos, en algunas realizaciones, como suspensiones de inyección a base de agua u oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados, incluyen, en algunas realizaciones, aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa contienen, en algunas realizaciones, sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. En otra realización, la suspensión también contiene estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.
- 35 En otra realización, el compuesto activo puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véanse Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibíd., págs. 317-327; véase en general ibíd.).
- 40 En otra realización, la composición farmacéutica suministrada en un sistema de liberación controlada se formula para infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración.
- 45 En una realización, se usa una bomba (véanse Langer, anteriormente; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos. En otra realización más, puede situarse un sistema de liberación controlada en proximidad a la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).
- 50 En algunas realizaciones, el principio activo está en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, disolución a base de agua sin pirógenos, estéril, antes de su uso. Las composiciones se formulan, en algunas realizaciones, para administración por atomización e inhalación. En otra realización, las composiciones están contenidas en un recipiente con medios de atomización unidos.
- 55 En una realización, la preparación de la presente invención se formula en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de suppositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. En otra realización, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principios activos eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se trate.

- 5 En una realización, la determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Algunos ejemplos de sustancias que pueden actuar como vehículos farmacéuticamente aceptables o componentes de los mismos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa y metil celulosa; 10 tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; lubricantes sólidos, tales como ácido esteárico y estearato de magnesio; sulfato cálcico; aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de theobroma; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido algínico; emulsionantes tales como los emulsionantes de la marca Tween®; agentes humectantes, tales como lauril sulfato sódico; agentes colorantes; agentes saporíferos; agentes de formación de 15 comprimidos, estabilizadores; antioxidantes; conservantes; agua sin pirógenos; disolución salina isotónica; y disoluciones de tampón fosfato. La elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar junto con el compuesto se determina básicamente por el modo en que va a administrarse el compuesto. Si el compuesto objeto se va a inyectar, en una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es disolución salina fisiológica estéril, con un agente de suspensión compatible con la sangre, cuyo pH se ha ajustado a aproximadamente 7.4.

- 20 Además, las composiciones comprenden adicionalmente aglutinantes (por ejemplo, goma arábiga, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etil celulosa, goma guar, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, povidona), agentes disgregantes (por ejemplo almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crosppovidona, goma guar, glicolato de almidón sódico), tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de diversos pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción en superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar), inhibidores de proteasa, tensioactivos (por ejemplo lauril sulfato sódico), potenciadores de la permeación, agentes de solubilización (por ejemplo, glicerol, polietilen glicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico, hidroxianisol butilado), estabilizadores (por ejemplo hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetyl celulosa), agentes que aumentan la viscosidad (por ejemplo carbómero, dióxido de silicio coloidal, etil celulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, aspartamo, ácido cítrico), 25 conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol benzílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, lauril sulfato sódico), coadyuvantes de fluidificación (por ejemplo dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo carbómero, hidroxipropil celulosa, lauril sulfato sódico), revestimientos poliméricos (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), 30 agentes formadores de revestimientos y películas (por ejemplo, etil celulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

Los componentes típicos de vehículos para jarabes, elixires, emulsiones y suspensiones incluyen etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, sacarosa líquida, sorbitol y agua. Para una suspensión, los agentes de suspensión típicos incluyen metil celulosa, carboximetil celulosa sódica, celulosa (por ejemplo, Avicel®, RC-591), tragacanto y alginato sódico; los agentes humectantes típicos incluyen lecitina y polioxietilen sorbitán (por ejemplo, polisorbato 80).

- 40 Los conservantes típicos incluyen metil parabeno y benzoato sódico. En otra realización, las composiciones líquidas perorales también contienen uno o más componentes tales como edulcorantes, agentes saporíferos y colorantes desvelados anteriormente.

Las composiciones también incluyen la incorporación del material activo en o sobre preparaciones de partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o en liposomas, 45 microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasma de eritrocitos, o esferoplastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo*.

- 50 También se comprenden por la invención composiciones en forma de partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado con anticuerpos dirigido contra receptores específicos de tejido, ligandos o antígenos o acoplado con ligandos de receptores específicos de tejido.

En otra realización, los compuestos modificados por la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona o poliprolina. En otra realización, los compuestos modificados presentan semivididas sustancialmente más largas en sangre, después de la inyección intravenosa, que los compuestos no modificados correspondientes. En 55 una realización, las modificaciones también aumentan la solubilidad del compuesto en disolución acuosa, eliminan la agregación, potencian la estabilidad física y química del compuesto y reducen en gran medida la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. En otra realización, la deseada actividad biológica *in vivo* se logra mediante la administración de tales aductos de polímero-compuesto menos frecuentemente o en dosis menores que con el compuesto no modificado.

En otra realización, puede estimarse la preparación de la cantidad o dosis eficaz inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. En una realización, una dosis puede formularse en modelos animales y dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa dosis útiles en seres humanos.

5 En una realización, pueden determinarse la toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en esta memoria por procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. En una realización, los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en el ser humano. En una realización, las dosificaciones varían dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. En una realización, la formulación, vía de administración y dosificación exactas pueden seleccionarse por el médico individual en vista de la afección del paciente. [Véase, por ejemplo, Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 pág. 1].

En una realización, dependiendo de la gravedad y sensibilidad de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una única o una pluralidad de administraciones, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se logra la cura o se consigue una disminución de la patología.

15 En una realización, la cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se trata, la gravedad de la afección, la manera de administración, el criterio del médico que la prescribe, etc.

En una realización, también se preparan composiciones que incluyen la preparación de la presente invención formulada en un vehículo farmacéutico compatible, se ponen en un recipiente apropiado, y se etiquetan para el tratamiento de una afección indicada.

20 En otra realización, una GH modificada por CTP se administra mediante administración sistémica. En otra realización, una hormona del crecimiento como se describe en esta memoria se administra por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. En otra realización, una GH modificada por CTP es una preparación liofilizada (es decir, secada por congelación) en combinación con excipientes orgánicos complejos y estabilizantes tales como agentes tensioactivos no iónicos (es decir, tensioactivos), diversos azúcares, polioles orgánicos y/o albúmina sérica humana.

25 En otra realización, una composición farmacéutica comprende una GH liofilizada modificada por CTP como se describe en agua estéril para inyección. En otra realización, una composición farmacéutica comprende una hormona de crecimiento liofilizada como se describe en PBS estéril para inyección. En otra realización, una composición farmacéutica comprende una hormona de crecimiento liofilizada como se describe en NaCl al 0.9 % estéril para inyección.

30 En otra realización, la composición farmacéutica comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria y portadores complejos tales como albúmina sérica humana, polioles, azúcares y agentes estabilizantes tensioactivos aniónicos. Véase, por ejemplo, el documento WO 89/10756 (Hara et al.- que contiene poliol y p-hidroxibenzoato). En otra realización, la composición farmacéutica comprende una hormona del crecimiento como se describe en esta memoria y ácido lactobiónico y un tampón de acetato/glicina. En otra realización, la composición

35 farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria y los aminoácidos, tales como arginina o glutamato, que aumentan la solubilidad de las composiciones de interferón en agua. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una GH liofilizada modificada por CTP como se describe en esta memoria, y glicina o albúmina sérica humana (HSA), un tampón (por ejemplo, acetato) y un agente isotónico (por ejemplo, NaCl). En otra realización, la composición farmacéutica comprende una GH liofilizada modificada por CTP como se describe en esta memoria y tampón fosfato, glicina y HSA.

40 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria se estabiliza cuando se pone en disoluciones tamponadas que tienen un pH entre aproximadamente 4 y 7.2. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria se estabiliza con un aminoácido como agente estabilizante y en algunos casos una sal (si el aminoácido no contiene una cadena lateral cargada).

45 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria es una composición líquida que comprende un agente estabilizante entre aproximadamente 0.3 % y 5 % en peso, que es un aminoácido.

50 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria proporciona precisión de dosificación y seguridad del producto. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria proporciona una formulación líquida estable y biológicamente activa para su uso en aplicaciones inyectables. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una GH no liofilizada modificada por CTP como se describe en esta memoria.

55 En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria proporciona una formulación líquida que permite el almacenamiento durante un largo periodo de tiempo en estado líquido que facilita el almacenamiento y el envío antes de la administración.

En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en

- esta memoria comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra realización, la composición farmacéutica inyectable que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra realización, la producción de micropartículas lipídicas mediante congelación por pulverización fue descrita por Speiser (Speiser et al., *Pharm. Res.* 8 (1991) 47-54) seguido de nanográmulos de lípidos para administración oral (Speiser, documento EP 0167825 (1990)). En otra realización, los lípidos, que se usan, son bien tolerados por el cuerpo (por ejemplo, glicéridos compuestos de ácidos grasos que están presentes en las emulsiones para nutrición parenteral).
- En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria está en forma de liposomas (J. E. Diederichs et al., *Pharm. Ind.* 56 (1994) 267-275).
- 5 10 15 20 25 30 35 40
- En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria comprende micropartículas poliméricas. En otra realización, la composición farmacéutica inyectable que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria comprende micropartículas poliméricas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria comprende nanopartículas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria comprende liposomas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria comprende una emulsión lipídica. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria comprende microesferas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria comprende nanopartículas lipídicas. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria comprende nanopartículas lipídicas que comprenden lípidos anfifílicos. En otra realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en esta memoria comprende nanopartículas lipídicas que comprenden un fármaco, una matriz lipídica y un tensioactivo. En otra realización, la matriz lipídica tiene un contenido de monoglicéridos que es de al menos 50 % p/p.
- En una realización, las composiciones de la presente invención se presentan en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. En una realización, el envase, por ejemplo, comprende papel metálico o plástico, tal como un envase de blíster. En una realización, el envase o dispositivo dosificador se acompaña de instrucciones para la administración. En una realización, el envase o dosificador se acompaña de un aviso asociado con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, siendo dicho aviso reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o administración humana o veterinaria. Dicho aviso, En una realización, es una etiqueta aprobada por la U. S. Food and Drug Administration para fármacos de prescripción o de un prospecto de producto aprobado.
- En una realización, se apreciará que la GH modificada por CTP de la presente invención pueden proporcionarse al individuo con agentes activos adicionales para conseguir un efecto terapéutico mejorado en comparación con el tratamiento con cada agente por sí solo. En otra realización, se toman medidas (por ejemplo, dosificación y selección del agente complementario) para efectos secundarios adversos que se asocian con terapias de combinación.
- Resultarán evidentes para un experto habitual en la técnica objetos, ventajas y características nuevas adicionales de la presente invención tras el examen de los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han indicado anteriormente en esta memoria y como se reivindican en la sección de reivindicaciones posteriormente encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.
- Ejemplos**
- En general, la nomenclatura usada en esta memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías como se exponen en las patentes de Estados Unidos n.^{os} 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 y 5272057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8a Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); se describen extensamente inmunoensayos disponibles en la patente y la bibliografía científica, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.^{os} 3791932; 3839153; 3850752; 3850578; 3853987; 3867517; 3879262; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; 4098876; 4879219; 5011771 y 5281521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y 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) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan a lo largo de este documento otras referencias generales.

5

Ejemplo 1**Generación de construcciones de hgh****MATERIALES Y MÉTODOS**

Se sintetizaron cuatro clones de hGH (variantes de proteína de 20 kD). Se ligaron fragmentos Xba I -Not I que contenían secuencias de hGH de las cuatro variantes en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr previamente digerido con XbaI -NotI. Se preparó ADN de los 4 clones (401-0, 1, 2, 3 y 4). También se sintetizó otro clon de hGH parcial (1-242 pb) de la proteína de 22 kD (0606114). Se pidieron cebadores de Sigma-Genosys. Las secuencias de cebador usadas para generar los polipéptidos de hGH modificada por CTP de la presente invención, se resumen en la Tabla 1, a continuación.

10

Tabla 1

Número de cebador	SEQ ID NO	secuencia	Sitio de restricción (subrayado en la secuencia)
25	18	5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'	XbaI
32 ^R	19	5' ACAGGGAGGTCTGGGGTTCTGCA 3'	
33	20	5' TGCAGAACCCCCCAGACCTCCCTGTGC 3'	
4 ^R	21	5' CCAAACATCATCAATGTATCTTA 3'	
25	22	5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'	XbaI
35 ^R	23	5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3'	
34	24	5' GCCTTGACACCTACCAGGAGTTCG 3'	
37 ^R	25	5' ACCGGGCCGGCATCCAGACCTTCATCACTGAGGC 3'	NotI
39 ^R	26	5' GCGGCCGCGGACTCATCAGAACGCCGAGCTGCC 3'	

Construcción de 402-0-p69-1 (hGH) SEQ ID NO: 5: hGH es la hormona del crecimiento humana recombinante de tipo silvestre (sin CTP) que se preparó para su uso como control en los experimentos descritos a continuación.

20

Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 25 y el cebador 32^R y ADN plasmídico de 0606114 (clon parcial de hGH 1-242 pb) como plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 245 pb.

La segunda reacción se realizó con el cebador 33 y el cebador 4^R y ADN plasmídico de 401-0-p57-2 como plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 542 pb.

25

La última reacción se realizó con los cebadores 25 y 4^R y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 705 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). El fragmento XbaI - NotI que contenía la secuencia de hGH-0 se ligó en el vector de expresión eucariota pCI-dhfr. El vector se transfirió en células CHO DG-44. Las células se cultivaron en medio sin proteínas.

30

Construcción de 402-1-p83-5 (hGH-CTP) - SEQ ID NO: 9 y 402-2-p72-3 (hGH-CTPx2) - SEQ ID NO: 10: hGH-CTP es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 1 copia del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). El casete de CTP de hGH-CTP se unió al extremo C (un casete). hGH-CTP-CTP es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 2 copias del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). Los dos cassetes de CTP de hGH-CTP-CTP se unieron con el extremo C (dos cassetes).

35

La construcción de hGH-CTP y hGH-CTP-CTP se realizó de la misma manera que la construcción de hGH-0. Se usaron pCI-dhfr-401-1-p20-1 (hGH*-ctp) y pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH*-ctp x2) como plantillas en la segunda reacción por PCR.

hGH-CTP y hGH-CTP-CTP se expresaron en células DG-44 CHO. Las células se cultivaron en medio sin proteínas. El peso molecular de hGH-CTP es ~30.5 kD ya que la hGH tiene un PM de 22 kD mientras que cada "casete de CTP" contribuye con 8.5 kD con respecto al peso molecular total (véase la Figura 1). El peso molecular de hGH-CTP-CTP es ~39 kD (véase la Figura 1).

40

Construcción de 402-3-p81-4 (CTP-hGH-CTP-CTP) - SEQ ID NO: 11 y 402-4-p82-9 (CTP*hGH-CTP-CTP) - SEQ ID NO: 12: CTP-hGH-CTP-CTP es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 3 copias

5 del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). Los tres casetes de CTP de CTP-hGH-CTP-CTP se unieron tanto al extremo N (un casete) como al extremo C (dos casetes). tCTP-hGH-CTP-CTP es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusiona con 1 copia truncada y 2 copias completas del péptido C-terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). El casete de CTP truncado de tCTP-hGH-CTP-CTP se unió con el extremo N y dos casetes de CTP se unieron con el extremo C (dos casetes).

10 Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 25 y el cebador 35^R y ADN plasmídico de p401-3-p12-5 o 401-4-p22-1 como plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 265 o 220 pb. La segunda reacción se realizó con el cebador 34 y el cebador 37^R y ADN plasmídico de TA-hGH-2-q65-1 como plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 695 pb. La 15 última reacción se realizó con los cebadores 25 y 37^R y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 938 o 891 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se ligó un fragmento Xba I -Not I que contenía una secuencia hGH en este vector de expresión eucariota pCI-dhfr.

15 CTP-hGH-CTP-CTP y tCTP-hGH-CTP-CTP se expresaron en células DG-44 CHO. Las células se cultivaron en medio sin proteínas. El peso molecular de CTP-hGH-CTP-CTP es ~47.5 kD (véase la Figura 1) y el peso molecular de tCTP-hGH-CTP-CTP es ~43.25 kD (véase la Figura 1).

20 **Construcción de 402-6-p95a-8 (CTP-hGH-CTP) - SEQ ID NO: 13:** Se realizó la construcción de hGH-6 de la misma manera que la construcción de hGH-3. Se usó pCI-dhfr-402-1-p83-5 (hGH-ctp) como plantilla en la segunda reacción de PCR.

25 **Construcción de 402-5-p96-4 (CTP-hGH) - SEQ ID NO: 14:** La reacción por PCR se realizó usando el cebador 25 y el cebador 39^R y el plásmido de ADN de pCI-dhfr- ctp-EPO-ctp (402-6-p95a-8) como plantilla; como resultado de una amplificación por pCr, se formó un producto de 763 pb y se ligó con el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se ligó un fragmento Xba I -Not I que contenía una secuencia de ctp-hGH en este vector de expresión eucariota pCI-dhfr para producir el clon 402-5-p96-4.

25 **Ejemplo 2**

Ensayos de bioactividad in vivo de polipéptidos hGH-CTP de la presente invención

El siguiente experimento se realizó para ensayar la actividad biológica de acción prolongada potencial de polipéptidos hGH-CTP en comparación con GH humana recombinante comercial y hGH.

Materiales y métodos

30 Ratas hipofisectomizadas hembras (60-100 g) recibieron una inyección S.C. semanal de 21.7 µg de polipéptidos de hGH-CTP o una inyección S.C. de 5 µg al día una vez de rhGH comercial de control.

35 Se midió el peso en todos los animales antes del tratamiento, 24 horas después de la primera inyección y después cada dos días hasta el final del estudio el día 21. Cada punto representa el porcentaje de aumento de peso medio del grupo ((Peso el día 0-peso el último día) / Peso el día 0). El aumento de peso medio se normalizó frente a inyección una vez al día de hGH comercial. El programa de tratamiento se resume en la Tabla 2.

Tabla 2

N.º	Fármaco	N	Ruta	Programa de tratamiento	Dosis equimolar (µg/rata)	Dosificación acumulada (µg/rata)	Vol. de dosis (ml)
1	Vehículo	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	NA	NA	0,25
2	Simulación	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	NA	NA	0,25
3	hGH SEQ ID NO: 5	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21,7	65	0,25
4	hGH-CTP SEQ ID NO: 9	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21,7	65	0,25
5	hGH-CTP-CTP SEQ ID NO: 10	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21,7	65	0,25
6	CTP-hGH-CTP-CTP SEQ ID NO: 11	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21,7	65	0,25
7	tCTP-hGH-CTP-CTP SEQ ID NO: 12	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21,7	65	0,25
8	hGH v.1 comercial	7	s.c.	días 1, 7 y 13; 1/S	21,7	65	0,25
9	hGH v.1 comercial	7	s.c.	días 1-13; d/S	5	65	0,25

Resultados

Los resultados se resumen en la Figura 2. Estos resultados muestran que CTP-hGH-CTP-CTP (SEQ ID NO: 11) y tCTP-hGH-CTP-CTP (SEQ ID NO: 12) indujeron un aumento de peso de más del 120 % en comparación con el rhGH comercial que indujo un aumento de peso del 100 %.

5 Conclusión

3 dosis semanales (Días de inyecciones: 1, 7 y 13) de 21.7 µg de CTP-hGH-CTP-CTP (SEQ ID NO: 11) y tCTP-hGH-CTP-CTP (SEQ ID NO: 12) indujeron un aumento de peso del 30 % mayor en ratas hipofisectomizadas en comparación con las ratas a las que se inyectó rhGH comercial a la misma dosis acumulada que se administró una vez al día a una dosis de 5 µg durante 13 días.

10 Ejemplo 3

Estudios farmacocinéticos de la GH modificada con CTP

Se realizaron estudios de farmacocinética de dosis única en ratas Sprague-Dawley. Toda la experimentación con animales se realizó de acuerdo con la Ley de Bienestar Animal, la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, y bajo la supervisión y aprobación de los Institutional Animal Care and Use Committees de Modigene, Biotechnology General Ltd. Las ratas se alojaron individualmente o dos por jaula en salas con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Se proporcionó *ad libitum* el acceso al agua (suministro municipal) y la comida para roedores no certificada.

Para comparar la farmacocinética de CTP-hGH-CTP-CTP y GH en las ratas, se hicieron cuatro grupos de ratas Sprague-Dawley (270-290 g), de tres a seis ratas macho por grupo. Las ratas se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos de tratamiento (véase la Tabla 3). A las ratas se les administró y una sola inyección s.c. o i.v. de GH (50 µg/kg i.v. o s.c.) o CTP-hGH-CTP-CTP (108 µg/kg i.v. o s.c.). Con la excepción de la muestra previa a la dosis, que se recogió bajo anestesia con isoflurano, la recogida de sangre se realizó en animales no anestesiados. Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 0.25 ml) en microrecipientes recubiertos con EDTA para los análisis ELISA de la concentración plasmática de CTP-hGH-CTP-CTP en los tiempos descritos en la Tabla 3. Después de cada muestreo, el volumen de sangre se reemplazó con un volumen igual de disolución salina al 0.9 % estéril. Las muestras se almacenaron en hielo durante hasta 1 h antes de la centrifugación y la recogida de plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a aproximadamente -20 °C antes del análisis.

Tabla 3. Diseño experimental de estudio farmacocinético en ratas

Trt. Grp.	Artículo de ensayo	N.º de animales/grupo/punto de tiempo	Vía de dosis	Género	Nivel de dosis (µg/kg)	Vol. inyectado (µl)	Concentración (µg/ml)/vol. total (ml)	Puntos de tiempo * (horas después de la dosis)
1	Biotropin	6#	sc	Hombre	50	500	20/5	0 (Pre-dosis) 0,5, 2, 4, 8, 24, 48
2	CTP-hGH-CTP-CTP	6#	sc	Hombre	108	500	43,2/5	0,5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
3	Biotropin	6#	IV	Hombre	50	300	20/3	0, 0,12, 2, 4, 8, 24
4	CTP-hGH-CTP-CTP	6#	IV	Hombre	108	300	43,2/3	0,12, 2, 4, 8, 24, 48,72
Volumen de muestra de sangre/punto de tiempo - 500 µl								Muestras de sangre terminales

3 ratas por punto de tiempo.

30

Se usó un kit ELISA tipo sándwich comercial específico para la detección de la hormona del crecimiento humana (Roche Diagnostics) para la evaluación de las muestras de plasma de rata. Este kit detecta la hormona del crecimiento humana en plasma mediante un formato ELISA de tipo sándwich de anticuerpos. Este kit se utilizó inicialmente para medir la concentración de CTP-hGH-CTP-CTP en plasma de rata. Para estas muestras de plasma, se utilizó una curva

estándar de CTP-hGH-CTP-CTP (1.2-100 ng/ml) y se interpolaron las concentraciones de CTP-hGH-CTP-CTP en plasma de rata a partir de esta curva.

Los parámetros farmacocinéticos estándar, incluyendo la depuración (CL o CL/F), el volumen de distribución (Vd o Vd/F), la semivida ($t_{1/2}$), el área bajo la curva de concentración de plasma en función del tiempo (AUC), la concentración plasmática máxima observada (Cmáx) y el tiempo hasta la concentración plasmática máxima observada (Tmáx) se obtuvieron de la albutropina plasmática o curvas de concentración de GH/tiempo mediante un análisis no compartimental utilizando el programa de modelado WinNonlin (Pharsight, versión 3.1). Los datos de concentración de CTP-hGH-CTP-CTP o GH en plasma se ponderaron uniformemente para este análisis. El AUC se calculó utilizando el análisis trapezoidal log-lineal para los datos i.v. y el método trapezoidal lineal ascendente/log descendente para los datos s.c. Los perfiles de concentración plasmática para cada rata (con la excepción de los datos de albutropina s.c.) o mono se analizaron individualmente, y la media ± error estándar de los valores medios (S.E.M.) para los parámetros farmacocinéticos se indican en la Tabla 4 y la Figura 4.

CTP-hGH-CTP-CTP es una proteína monocatenaria de 275 aminoácidos y hasta doce carbohidratos unidos a O. La estructura consiste en una hormona del crecimiento humana modificada (somatropina) unida a tres copias del péptido C-terminal (CTP) de la cadena beta de la gonadotropina coriónica humana (hCG); una copia en el extremo N y dos copias (en tandem) en el extremo C. La hormona de crecimiento humana está compuesta por 191 aminoácidos. El CTP está compuesto por 28 aminoácidos y cuatro cadenas de azúcares unidas a O.

Ejemplo 4

Farmacocinética de la GH modificada por CTP en ratas SD

La farmacocinética de CTP-hGH-CTP-CTP se evaluó y se comparó con la de la hGH comercial (Biotropin).

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos medios después de una administración de dosis única i.v. y s.c. de CTP-hGH-CTP-CTP GH y GH (Biotropin) en ratas Sprague-Dawley.

Estadísticas PK					
		SC		IV	
Parámetros	Unidades	Biotropin	CTP-hGH-CTP-CTP	Biotropin	CTP-hGH-CTP-CTP
Dosis	mg/kg h*ng/m	50	50	50	50
AUClast	L	41	680	162,7	1568,3
Cmáx	ng/ml	13	36,8	275,8	926
Tmáx	h	0,5	8	0	0
MRT	h	2,5	12,9	0,5	9,9
T1/2 alfa	h		1,58		0,74
T1/2 beta	h	1,73	9	0,5	6,9

Análisis estadístico de datos

El análisis de las muestras en suero se realizó con el fin de determinar los niveles de concentración específicos para cada muestra. La concentración y los datos de puntos temporales se procesaron usando análisis no compartimentalizado WinNonLin.

Los parámetros que se determinaron incluyen: AUC, MRT, t1/2, Cmáx, y Tmáx. La Figura 4 demuestra el perfil farmacocinético superior de la concentración plasmática de CTP-hGH-CTP-CTP en comparación con concentraciones de GH (pg/ml) después de una sola dosis i.v. o s.c. de CTP-hGH-CTP-CTP o GH en ratas ($n = 3-6$ por dosis/vía).

Después de una única inyección S.C. de 50 µg/kg, la depuración de CTP-hGH-CTP-CTP de la sangre de rata SD fue significativamente más lenta que la de CTP-hGH-CTP y de Biotropin. Los tiempos de semivida calculados correspondientes y las AUC fueron:

Biotropin	T1/2 1.7 h	AUC	41 h*ng/ml
CTP-hGH-CTP	T1/2 8.5h	AUC	424 h*ng/ml
CTP-hGH-CTP-CTP	T1/2 9.0h	AUC	680 h*ng/ml

35 Conclusión:

Se eligió CTP-hGH-CTP-CTP como el candidato final entre otras 6 variantes. CTP-hGH-CTP-CTP demostró un

rendimiento superior en términos de actividad biológica y farmacocinética.

Ejemplo 5

Ensayo de aumento de peso (WGA) para dosis única/dosis repetida de GH modificada por CTP

Se obtuvieron ratas macho hipofisectomizadas (método interaural), de 3-4 semanas de edad, de CRL Laboratories. Durante un periodo de aclimatación posquirúrgica de 3 semanas, se examinaron las ratas y se pesaron dos veces por semana para eliminar a los animales que se consideraba que tenían una hipofisectomía incompleta evidenciada por un aumento de peso similar al de las ratas operadas de forma simulada. Las ratas con hipofisectomización incompleta fueron eliminadas del estudio. El peso corporal promedio de las hipofisectomizadas fue de 70-90 gramos, en el momento del experimento. Este es el bioensayo estándar de USP y EP para hGH. Las ratas hipofisectomizadas (ratas de las que se extrajo la glándula pituitaria) pierden su capacidad para ganar peso. Las inyecciones de hGH (y de CTP-hGH-CTP-CTP) en estas ratas dan como resultado un aumento de peso. Basándose en el aumento de peso medido a lo largo de un periodo de tiempo definido y la cantidad de hGH inyectada, se determina la actividad específica de la hGH (y CTP-hGH-CTP-CTP). A las ratas se les administró una dosis única s.c. de 0.4, 0.8 y 4 mg/kg o dosis s.c. repetidas de 0.6 y 1.8 mg/kg con 4 días de diferencia durante 3 semanas. Los pesos corporales individuales de todos los animales se determinan al azar, antes de la primera dosificación, posteriormente cada dos días o en caso de fallecidos en el momento de la muerte, y antes del sacrificio.

Ensayo de aumento de peso de dosis única y dosis repetidas

Los resultados que comparan la respuesta de crecimiento de todo el cuerpo después de diferentes patrones de dosificación de CTP-hGH-CTP-CTP en ratas hipofisectomizadas se demuestran en la Figura 5. Los resultados demuestran que una única inyección de 0.4 y 0.8 mg/kg/día de dosis de hGH-CTP fue equivalente a 4 inyecciones diarias de 0.1 mg/kg/día de Biotropin. El pico del efecto hGH-CTP fue después de 2 días.

La Figura 6 demuestra además que el área bajo la curva después de la inyección única de CTP-hGH-CTP-CTP se correlaciona con el aumento de peso corporal en ratas. Por lo tanto, los datos colectivos demuestran que el aumento de peso corporal está estrechamente relacionado con el AUC acumulativa.

La construcción de hGH-CTP administrada con 4 días de diferencia promueve el mismo aumento de peso que las inyecciones diarias de Biotropin como se demuestra en la Figura 7. Se espera que la semivida de la hGH en seres humanos sea 5 veces mejor que en ratas, lo que indica un efecto máximo potencial en seres humanos después de 10 días para una sola inyección. Estos resultados apoyan la administración de la construcción de hGH-CTP, CTP-hGH-CTP-CTP, una vez por semana o quincenalmente en seres humanos.

Ejemplo 6

Estudios de farmacodinámica/farmacocinética de la GH modificada por CTP

Se obtuvieron ratas macho hipofisectomizadas (método interaural), de 3-4 semanas de edad, de CRL Laboratories. Durante un periodo de aclimatación posquirúrgica de 3 semanas, se examinaron las ratas y se pesaron dos veces por semana para eliminar a los animales que se consideraba que tenían una hipofisectomía incompleta evidenciada por un aumento de peso similar al de las ratas operadas de forma simulada. Las ratas con hipofisectomización incompleta fueron eliminadas del estudio. El peso corporal promedio de las ratas hipofisectomizadas y simuladas fue de 70 y 150 g, respectivamente, en el momento del experimento.

A las ratas se les administró una sola dosis s.c. con CTP-hGH-CTP-CTP, vehículo, hormona del crecimiento humana CTP-hGH-CTP-CTP o se administró s.c. hormona del crecimiento humana (20 µg/rata) en un volumen de inyección de 0.2 ml/rata. La dosis de GH fue de 0.35 y 1.05 µg/kg, una dosis de hormona del crecimiento que era equimolar con la cantidad de GH en una dosis correspondiente de 0.6 y 1.8 µg/kg de CTP-hGH-CTP-CTP. Los grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 4. Después de la inyección, se obtuvieron muestras de plasma para los análisis de IGF-1 en los tiempos descritos en la Tabla 5. Las muestras se analizaron para determinar la concentración de IGF-1 utilizando un ELISA comercial (R&D systems).

La administración semanal de hGH modificada con CTP tuvo éxito en mantener el IGF-I dentro del intervalo normal como la GH estándar y, además, también mantiene el peso corporal como la GH estándar.

Tabla 5. Programa de tratamiento para el estudio de ratas hipofisectomizadas

Trt. Grp.	Artículo de ensayo	N.º de animales/grupo/punto de tiempo	Vía de dosis	Dosis equim. (mg/rata)	Dosificación equim. (mg/kg)	Conc. de CTP-hGH-CTP-CTP mg/ml	Vol. de dosis (ml)	Puntos de tiempo * (horas después de la dosis)
M7	Biotropin	9	SC	0,032	0,35	0,16	0,2	0 (Pre-dosis) 0,5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
M8	Biotropin	9	SC	0,095	1,05	0,475	0,2	0 (Pre-dosis) 0,5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
M9	EN648-01-08-005	12	SC	0,032 (0,055)	0,35 (0,6)	0,275	0,2	1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
M10	EN648-01-08-005	12	SC	0,095 (0,165)	1,05 (1,8)	0,825	0,2	1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
Volumen de muestra de sangre/punto de tiempo - 500 µl								Muestras de sangre terminales

El análisis farmacocinético no compartimental se realizó en las curvas de concentración sérica media frente al tiempo para cada grupo. La Cmáx de CTP-hGH-CTP-CTP fue significativamente más alta que la Cmáx de Biotropin. La semivida terminal de CTP-hGH-CTP-CTP fue 6 veces más alta que la Biotropin.

5

Tabla 6: Estimaciones de parámetros farmacocinéticos de CTP-hGH-CTP-CTP y Biotropin después de una única inyección subcutánea en ratas hipofisectomizadas

Grupo	Dosis mg/kg	Género	Cmáx ng/ml	Tmáx h	AUC _{0-∞} ng·h/m	AUC _{0-t} ng·h/ml	CL/F ml/h/kg	T _{1/2} h
CTP-hGH-CTP-CTP	1,8	M	2.150	8	37.713	37.695	0,928	6,86
	0,6	M	681	8	11.505	11.489	3,042	6,8
	1,05	M	1.078	0,5	3.541	3.540	9,884	1
	0,35	M	439	0,5	1.279	1.279	27,36	1

El AUC_{0-t} y el AUC_{0-∞} fueron muy similares, lo que sugiere que la duración del muestreo fue adecuada para caracterizar los perfiles farmacocinéticos. El AUC de CTP-hGH-CTP-CTP fue 10 veces mayor que el de Biotropin. Además, la Cmáx fue generalmente proporcional a la dosis y para CTP-hGH-CTP-CTP y fue dos veces más alta que la Cmáx de Biotropin. Sin embargo, como se muestra en la Figura 8, la Tmáx de CTP-hGH-CTP-CTP fue de 8 h en comparación con las 0,5 h de Biotropin, y las semividas terminales no parecieron variar con el nivel de dosis. La T_{1/2} de CTP-hGH-CTP-CTP fue 6,8 veces más larga que la de Biotropin.

10

Los efectos indirectos de la GH están mediados principalmente por un factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), una hormona que se secreta del hígado y otros tejidos en respuesta a la hormona del crecimiento. La mayoría de los efectos que promueven el crecimiento de la hormona del crecimiento se debe en realidad a la actuación del IGF-I sobre sus células diana. Por consiguiente, se midió el efecto de la construcción CTP-hGH, CTP-hGH-CTP-CTP, sobre los niveles séricos de IGF-1 en ratas hipofisectomizadas. La Figura 9 presenta los resultados de los niveles séricos de IGF-1 en ratas hipofisectomizadas después de la inyección SC de CTP-hGH-CTP-CTP y hGH comercial.

15

Se inyectaron por vía subcutánea una sola dosis de CTP-hGH-CTP-CTP, 0,6 o 1,8 mg/kg, y Biotropin, 0,35 o 1,05 mg/kg, ratas hipofisectomizadas para la determinación del perfil PK/PD. La inyección posterior de IGF-I en suero se midió utilizando kits ELISA específicos (Roche Diagnostics).

20

Los niveles séricos acumulados de IGF-I después de la inyección de CTP-hGH-CTP-CTP fueron significativamente más altos que después de la inyección de Biotropin. La Cmáx fue generalmente proporcional a la dosis y para CTP-hGH-CTP-CTP fue 3-4 veces más alta que la Cmáx de Biotropin. El Tmáx de CTP-hGH-CTP-CTP fue de 36-48 horas en comparación con las 20-24 horas de Biotropin. En conclusión, los niveles más altos de hGH y una mayor presencia en el suero dan como resultado un aumento significativo en los niveles de IGF-1.

25

Ejemplo 7**Contenido de carbohidratos y contenido de ácido siálico de la GH modificada por CTP**

El análisis de O-glicanos se basa en un kit de Prozyme. Los O-glicanos se escinden química y enzimáticamente de la proteína y se separan de los péptidos mediante cromatografía en papel. La secuenciación del grupo O-glucano se realiza mediante digestiones enzimáticas secuenciales (exo-glucosidasas) seguidas de un análisis de HPLC en comparación con los estándares.

Glucoperfil con análisis de secuencia

El glucoperfil se realizó por Ludger Ltd. Se tomaron dos muestras (EN648 y RS0708) a través de liberaciones por triplicado y cada liberación también se analizó por HPLC por triplicado. Las muestras triplicadas de 300 µg de EN648 y RS0708 y una muestra única de 100 µl de tampón citrato/cloruro de sodio, más un control positivo de fetuina (250 µg) y un control negativo de 100 µl de agua, se ultrafiltraron mediante centrifugación utilizando una membrana de corte de peso molecular de 10 000 Da para reemplazar el tampón con agua, luego se tomaron a través de hidrazinolisis en condiciones de modo O (6 h a 60 °C). Los glicanos liberados se volvieron a W-acetilar y se limpian con cartuchos LudgerClean CEX. Una alícuota de los glicanos liberados se marcó entonces con 2-aminobenzamida (2AB), se limpió con cartuchos Ludger Clean S y se analizó mediante HILIC-HPLC LudgerSep-N2.

Contenido de monosacáridos

El análisis de monosacáridos neutros requiere la hidrólisis de glicanos a sus componentes constitutivos de monosacáridos. La hidrólisis se realizó por Ludger Ltd, en muestras de glucoproteínas intactas. Específicamente, se hidrolizaron con ácido 50 µg de glucoproteína intacta, se etiquetó con 2-AB (2-aminobenzamida) y se ejecutó en una columna de HPLC de fase inversa. Este método hidroliza todos los glicanos presentes en la glucoproteína, incluidos los tipos unidos por N y O.

Perfil de ácido siálico

Se analizaron dos muestras (EN648 y RS0708) y un control de tampón. El análisis de ácido siálico requiere una liberación de ácido suave de los monosacáridos, seguida del etiquetado con fluoróforo DMB y el análisis por HPLC en una columna LudgerSep-R1. Se hidrolizaron con ácido 50 µg de glucoproteína intacta para cada análisis.

Glucoanálisis de CTP-hGH-CTP-CTP

Tabla 7. Análisis de glicanos. Las asignaciones estructurales y las áreas porcentuales de los picos se basan en HPLC y en las digestiones de matriz de enzimas.

Pico ID ^a	GU ^b	Estructura ^c	nombre	Porcentaje de glicanos totales ^e			
				Und ^d	NAN1	ABS	ABS BTG
1 ^f	0,92		GalNAc	0,4	0,4	0,6	53,0
2 ^f	1,02		galactosa	1,9	9,7	23,8	26,5
*	1,72			4,3	4,6	2,3	

3	1,79		Galβ1-3GalNAc	2,3	67,7	69,4	17,1 ^h
4 ^g	2,25		NeuNAc2-3Gal	19,8	13,0 ^h		
*	2,57			1,5	1,9	1,1	1,1
5	2,90		NeuNAc2-3Galβ1-3 GalNAc	70,6			
*	3,58			0,6	0,7	0,6	
6	3,22		Galβ1-3[NeuNAc2-6] GalNAc	0,9	2,3		
7	4,42		NeuNAc2-3Galβ1-3 [NeuNAc2-6]GalNAc	1,8			

Los perfiles de monosacáridos indican que las muestras de glucoproteínas CTP-hGH-CTP-CTP contienen glicanos de tipo de enlace O predominantemente. El pico principal de O-glicano es el núcleo sialilado 1 (Neu5Aca2-3Galβ1-3GalNAc). El ácido siálico principal es Neu5Ac y hay algunos picos menores que sugieren la presencia del 3-4 % de

ácido siálico diacetilado ácido N-acetil-9-O-acetylneuramínico (Neu5, 9Ac2) y menos del 1 % de ácido N-glicolilneurámico. También hay pequeñas cantidades de Neu5Aca2-6 (Gal β 1-3) GalNAc.

EJEMPLO 8

Análisis farmacocinético/toxicocinético de la GH modificada por CTP en monos Rhesus

- 5 Se generaron curvas de concentración de suero frente al tiempo para cada animal. El análisis no compartimental se realizó con la versión profesional de WinNonlin 5.2.1 (Pharsight Corporation, Mt View CA.). Los parámetros farmacocinéticos estimados se muestran en la Tabla 8 a continuación:

Tabla 8: Estimaciones de los parámetros farmacocinéticos de CTP-hGH-CTP-CTP (Media ± DE) del análisis no compartimental después de una única inyección subcutánea en monos Rhesus

Parámetro	1,8 mg/kg	90 mg/kg
Cmáx (μg/ml)	2,073 ± 0,417	108,7 ± 46,0
Tmáx (h)	4 ± 0	11 ± 7
AUC _{0-t} (μg·h/ml)	38,7 ± 7,4	2.444 ± 394
AUC _{0-∞} (μg·h/ml)	39,0 ± 7,3	2.472 ± 388
CL/F (ml/h/kg)	47,5 ± 9,0	37,04 ± 4,78
T _{1/2} (h)	10,00 ± 1,47	9,85 ± 1,07
Vz/F (ml/kg)	701 ± 236	529 ± 104

10 El AUC_{0-t} y el AUC_{0-∞} fueron muy similares, lo que sugiere que la duración del muestreo fue adecuada para caracterizar los perfiles farmacocinéticos. La Cmáx fue proporcional a la dosis. Tmáx fue más tarde a la dosis más alta. Tmáx fue a las 4 horas para todos los animales en el grupo de dosis baja y fue a las 8 o 24 horas en el grupo de dosis alta. Las semividas terminales son similares para los dos grupos de dosis.

- 15 15 El AUC fue aproximadamente proporcional a la dosis con un AUC ligeramente mayor que el AUC proporcional a la dosis más alta, lo que produjo una estimación ligeramente inferior de CL/F y Vz/F en comparación con la dosis más baja. No es posible decir si CL y Vz son más bajos con la dosis más alta o si F es más bajo con la dosis más baja. Hubo superposición entre los grupos, por lo que es cuestionable que esto represente una diferencia significativa en CL/F y Vz/F.
- 20 20 Los parámetros farmacocinéticos estimados por el modelo fueron muy similares a los del análisis no compartimental. Las semividas de absorción y eliminación se muestran en la Tabla 9 a continuación:

Tabla 9: Estimaciones de las semividas de absorción y eliminación de CTP-hGH-CTP-CTP (media ± DE) después de la inyección subcutánea derivada del modelado farmacocinético en monos Rhesus

Dosis	T _{1/2 abs} (h)	T _{1/2 el} (h)
1.8 mg/kg	1.17 ± 0.40	10.41 ± 2.36
90 mg/kg	6.49 ± 1.87	7.26 ± 1.85

- 25 25 Los datos indican que las tasas de eliminación son bastante similares entre los grupos con una T_{1/2} ligeramente mayor en el grupo de dosis más baja. Sin embargo, la absorción es más de 5 veces más lenta después de la administración subcutánea de 90 mg/kg en comparación con la siguiente dosis de 1.8 mg/kg. Como en el caso del análisis no compartimental, el modelado indicó una Tmáx posterior a la dosis alta.
- 30 30 Aunque la suplementación con GH es eficaz en el tratamiento de la deficiencia de GH en niños y adultos, las desventajas de las inyecciones diarias durante períodos prolongados de tiempo limitan su uso por parte de los médicos en ciertas poblaciones de pacientes y aumentan el riesgo de error de dosificación, el número de los cuidadores, el coste del tratamiento y/o el incumplimiento. Especialmente importante en ciertas poblaciones, tal como niños de baja estatura que pueden no entender las implicaciones de no seguir el régimen de dosificación de GH prescrita, es la necesidad de cumplimiento para lograr el beneficio óptimo de la terapia con GH. El problema de encontrar una alternativa más adecuada a las inyecciones diarias de GH y el cumplimiento posterior cobra mayor importancia a medida que los niños con deficiencia de GH hacen la transición a adultos con una necesidad continua de tratamiento con GH. El requisito de la terapia diaria se debe en gran parte a la corta semivida en plasma de la GH recombinante y ha conducido al desarrollo de una forma de liberación sostenida de la GH (Reiter EO, Attire KM., Mashing TJ, Silverman BL, Kemp SF, Neolith RB, Ford KM. y Sanger P. A multimember study of the efficacy and safety of sustained release GH in the treatment of naive pediatric patients with GH deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001), págs.
- 35 40

4700-4706).

GH-CTP, una proteína de fusión recombinante de hormona del crecimiento humana-CTP, como se proporciona en esta memoria, tiene un perfil farmacocinético en la rata que tiene una duración más larga que la de la GH. Este perfil farmacocinético único permite la administración intermitente de GH-CTP para lograr efectos farmacodinámicos en ratas con deficiencia de hormona del crecimiento, como lo demuestra el crecimiento y las elevaciones en los niveles de IGF-1 en plasma, respectivamente.

GH-CTP ofrece un perfil farmacocinético superior en comparación con el de la GH cuando se administra s.c. en la rata. Existen diferencias sustanciales en la depuración plasmática de la GH-CTP en comparación con la GH. Específicamente, el plasma se depura de GH-CTP más de 6 veces más lentamente que la GH después de la dosificación s.c. La semivida terminal y el tiempo de residencia promedio de GH-CTP fueron aproximadamente seis veces más largos que los de GH en ratas después de una administración s.c. Además, Cl/F tras la dosificación s.c. es 10 veces menor para GH-CTP que para GH.

En un esfuerzo por examinar si las ventajas farmacocinéticas en la rata se tradujeron en un beneficio farmacodinámico, la posibilidad de que GH-CTP pudiera estimular el crecimiento en ratas hipofisectomizadas con deficiencia de GH con regímenes de dosificación menos frecuentes que diariamente, se ensayó a niveles de dosis equimolares de CIM-hGH-CTP-CTP y GH. Una sola inyección SC de GH-CTP promovió un aumento de peso gradual que fue igual a 4 inyecciones consecutivas diarias de GH. Además, el programa de administración cada cuatro días para GH-CTP muestra un aumento de peso corporal mejorado en comparación con GH.

Farmacodinámicamente, el largo tiempo de circulación de GH-CTP en relación con la GH en las ratas hipofisectomizadas dio como resultado una respuesta de IGF-1 prolongada medida en plasma sanguíneo después de una sola inyección s.c. La administración subcutánea de una dosis única de GH-CTP aumentó las concentraciones de IGF-1 en la circulación de una manera dependiente de la dosis en ratas hipofisectomizadas. Con la dosis más alta de albutropina, las concentraciones de IGF-1 se elevaron por encima del nivel inicial hasta 75 horas después de una administración única. Por lo tanto, el mayor tiempo de circulación de una dosis única de GH-CTP dio como resultado una mejora farmacodinámica sustancial con respecto a una dosis única de GH, lo que aumenta la posibilidad de que GH-CTP pueda ofrecer un aumento del crecimiento y una disminución de la grasa corporal similares con una frecuencia de dosificación reducida en comparación con regímenes de tratamiento estándar con GH.

Las dosis de hGH modificada con CTP individuales de 90 mg/kg en Rhesus y 180 mg/kg en ratas fueron bien toleradas en ambas especies. El factor alométrico entre ratas y primates es de aproximadamente X2, que se basa en la depuración anticipada de proteínas en estos animales. En línea con los modelos de extrapolación aceptados en la industria para el aumento de la semivida de las proteínas terapéuticas entre especies (Guía de la FDA). 90 mg/kg en primates tiene un perfil PK ligeramente mejor que 180 mg/kg de hGH modificada por CTP en ratas. Por lo tanto, la extrapolación alométrica para seres humanos admite inyecciones semanales o de una vez/2 s.

El presente concepto que utiliza una construcción CTP-GH, reduce la frecuencia de dosificación en comparación con el producto recombinante de GH comercial. Nutropin Depot® es una formulación de liberación sostenida de GH aprobada para su uso en poblaciones pediátricas; sin embargo, las comparaciones con los controles históricos han revelado que las tasas de crecimiento a 1 y 2 años son significativamente más bajas ($p < 0.001$) en los niños que recibieron Nutropin Depot® (tasa de crecimiento a 1 año de 8.2 ± 1.8 cm/año) que en los niños tratados con G^h (tasa de crecimiento anual de 10.1 ± 2.8 cm/año) (Silverman BL, Blethen SL, Reiter EO, Attie KM, Neuwirth RB, y Ford KM. A long-acting human growth hormone (Nutropin Depot®): efficacy and safety following two years of treatment in children with growth hormone deficiency. J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 15 (2002), págs. 715-722). Los efectos locales de Nutropin Depot® administrado por vía subcutánea incluyen nódulos, eritema, dolor en el sitio de inyección, cefalea y vómitos. Los estudios de toxicología preclínica tanto en ratas como en monos han demostrado que la administración s.c. de CTP-hGH-CTP-CTP no produce reacciones locales en comparación con el vehículo. Dada la necesidad médica de una forma administrada con menos frecuencia de GH, las propiedades farmacológicas de CTP-hGH-CTP-CTP en este estudio en ratas sugieren que este producto también es favorable en términos de toxicología y cumplimiento del paciente. La actividad sostenida de CTP-hGH-CTP-CTP en la rata apoya su utilidad potencial como agente que requiere solo una administración intermitente para lograr un beneficio terapéutico que se logra actualmente con la dosificación diaria.

50 Ejemplo 9 comparativo

La versión modificada con CTP de acción prolongada de la hormona del crecimiento humana (hGH-CTP) fue altamente eficaz en adultos con deficiencia de la hormona del crecimiento - Ensayo clínico de fase II

Se realizó un ensayo clínico de fase II al azar y abierto para evaluar la seguridad, la tolerabilidad, la farmacocinética y las propiedades farmacodinámicas de la hGH-CTP inyectada semanalmente o dos veces al mes en pacientes que actualmente reciben inyecciones diarias de hormona del crecimiento. El ensayo se realizó en varios sitios en seis países. Las tres cohortes principales en el ensayo recibieron una dosis semanal única de hGH-CTP, que contenía el 30 %, 45 % o el 100 % de la dosis comercial equivalente acumulativa de hGH que los pacientes adultos con deficiencia de hormona de crecimiento reciben en el transcurso de siete días en la forma de inyecciones diarias (denominadas

cohortes al "30 %", "45 %" y "100 %", respectivamente). Los datos reflejan los resultados de 39 pacientes, 13 en cada cohorte. Se incluyeron 2 mujeres en cada cohorte.

Además de las tres cohortes principales, los adultos con deficiencia de hormona del crecimiento se incluyeron en una cuarta cohorte experimental, que se realizó fuera del ensayo formal de fase II. Los pacientes de la cuarta cohorte experimental reciben una inyección única de hGH-CTP una vez cada dos semanas que contiene el 50 % de la dosis comercial acumulativa de la que reciben los pacientes adultos con deficiencia de hormona del crecimiento durante un periodo de dos semanas en forma de inyecciones diarias.

La eficacia de las tres cohortes principales que reciben una inyección semanal única de hGH-CTP se define midiendo los niveles diarios de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) dentro del intervalo terapéutico deseado durante un periodo de siete días (durante la última semana de tratamiento en el estudio). El intervalo terapéutico deseado se define como entre +2 desviaciones estándar a -2 desviaciones estándar de los niveles promedio de IGF-1 esperados en una población normal, estratificada por grupo de edad y género. Además, el ensayo midió los niveles de IGF-1 dentro de un intervalo más estrecho de +/- 1.5 desviaciones estándar con el fin de observar la varianza de los pacientes dentro del intervalo normal.

15 **Resultados:**

La Tabla 10 contiene el porcentaje promedio de días dentro del intervalo terapéutico normal (+/- 2 DE), el porcentaje promedio de días dentro de un intervalo terapéutico normal más estrecho (+/- 1.5 DE) y la Cmáx promedio (nivel de concentración más alto) de IGF-1 para los hombres, medido durante la última semana de tratamiento, expresado en desviaciones estándar de los niveles medios de IGF-1 de la población normal.

20 **Tabla 10:** Resultados del ensayo clínico de fase II en seres humanos.

Cohorte	% de días dentro del intervalo normal estrecho de IGF-1 (+/- 1.5 DE)	% de días dentro del intervalo normal de IGF-1 (+/- 2 DE)	Prom. Cmax de IGF-1 (preferida por debajo de +2 DE)
30 %	57 %	100 %	-0.9
45 %	100 %	100 %	0.1
100 %	86 %	100 %	0.4

Dos mg por semana de hGH-CTP, que contienen el 50 % de la dosis semanal acumulativa de hGH que se suele prescribir a un paciente adulto como la dosis de tratamiento inicial, tiene una alta probabilidad de ser definida como la dosis inicial para hombres y mujeres en la fase III en adultos.

25 No hubo evidencia de problemas de seguridad y/o tolerabilidad, y no hay indicios de que hGH-CTP, cuando se usa en dosis altas, indujera niveles excesivos de IGF-1 en los pacientes o incluso niveles por encima del intervalo normal.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido modificado con el péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica que comprende una hormona del crecimiento para su uso en un método para tratar una deficiencia de hormona del crecimiento en un sujeto niño humano medida manteniendo los niveles del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) dentro de un intervalo terapéutico normal, en el que el polipéptido modificado con CTP comprende un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos en tandem al extremo carboxi de la hormona del crecimiento, en donde el método comprende administrar al sujeto niño humano una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido modificado con CTP una vez a la semana de una dosis de 1 a 60 miligramos por semana (mg/semana).
- 10 2. El polipéptido modificado con CTP para su uso según la reivindicación 1, en el que al menos un CTP está glucosilado.
- 15 3. El polipéptido modificado con CTP para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos un CTP está unido a la hormona del crecimiento a través de un enlazador.
- 20 4. El polipéptido modificado con CTP para su uso según la reivindicación 3, en el que el enlazador es un enlace peptídico.
- 25 5. El polipéptido modificado con CTP para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la hormona del crecimiento es la hormona del crecimiento humana.
- 30 6. El polipéptido modificado con CTP para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos un CTP tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 35 7. El polipéptido modificado con CTP para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido comprende la secuencia de los aminoácidos 27 a 301 de SEQ ID NO: 11.
- 40 8. El polipéptido modificado con CTP para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz comprende una dosis una vez por semana de 5 a 10 mg/semana
- 45 9. El polipéptido modificado con CTP para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el sujeto niño humano es masculino.
- 50 10. El polipéptido modificado con CTP para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el polipéptido modificado con CTP se administra por vía subcutánea al sujeto niño humano.

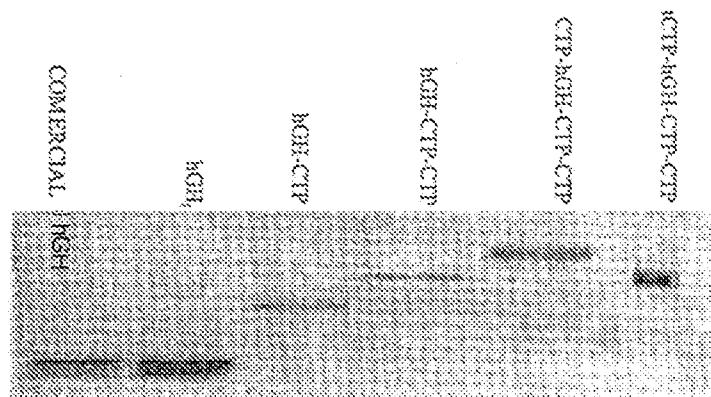


FIGURA 1 |

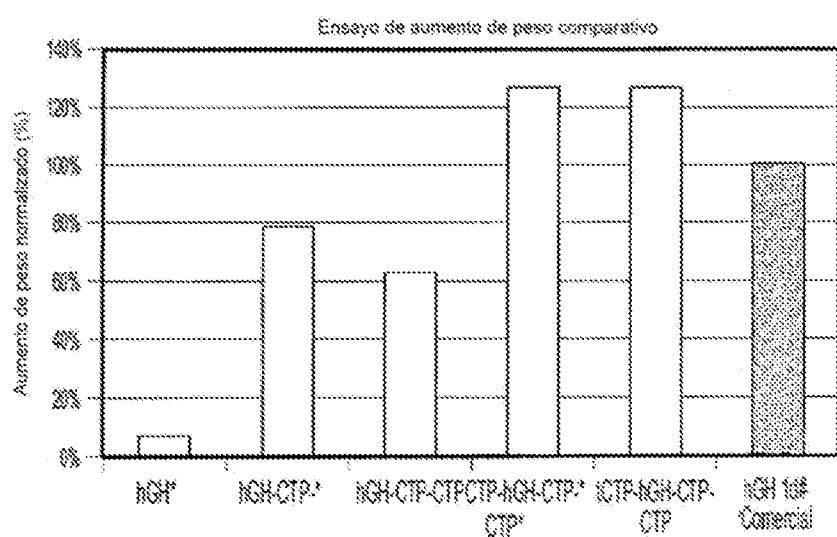


FIGURA 2

ES 2 983 610 T3

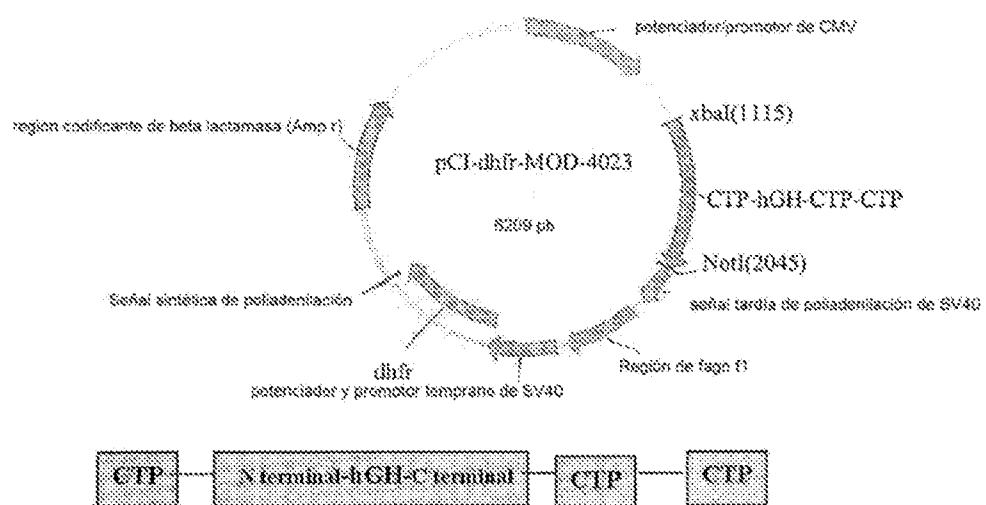


FIGURA 3

ES 2 983 610 T3

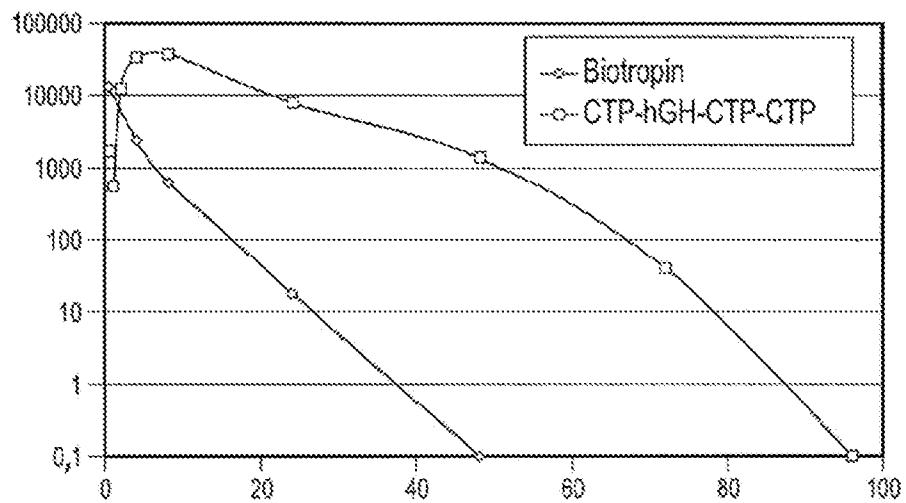


FIGURA 4A

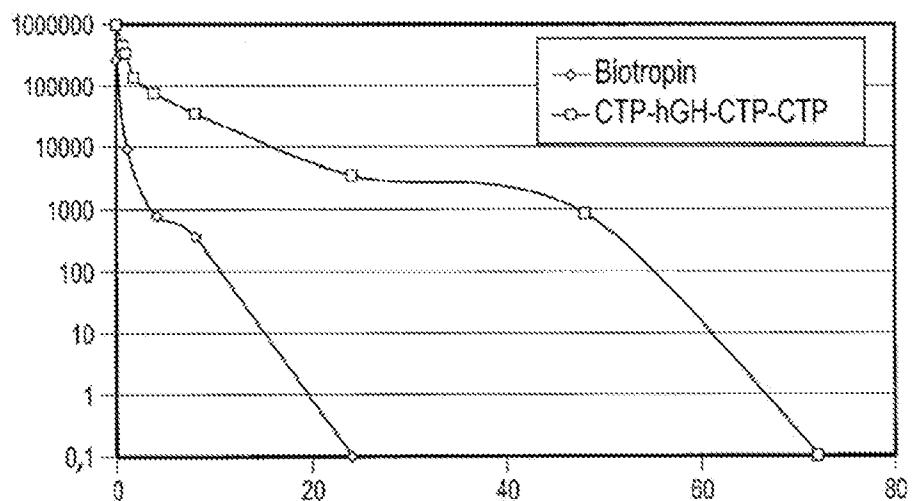


FIGURA 4B

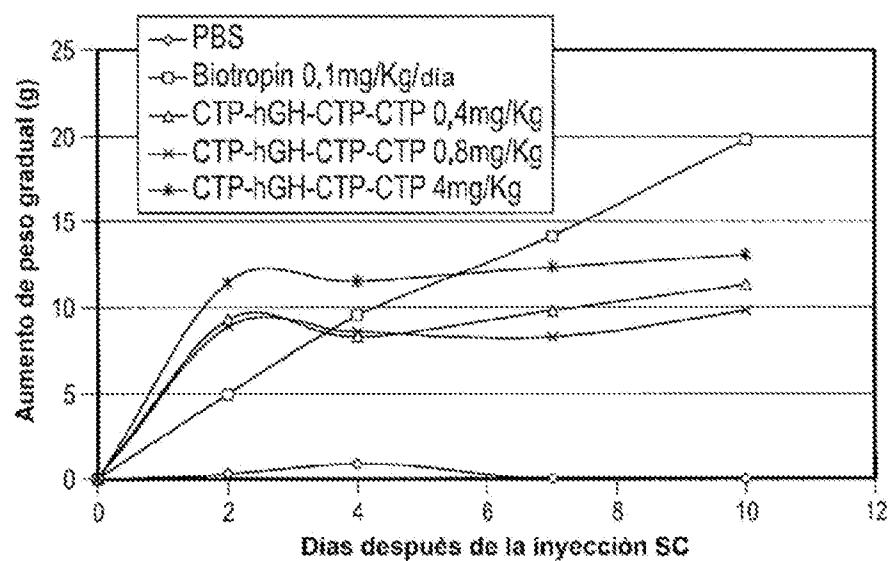


FIGURA 5

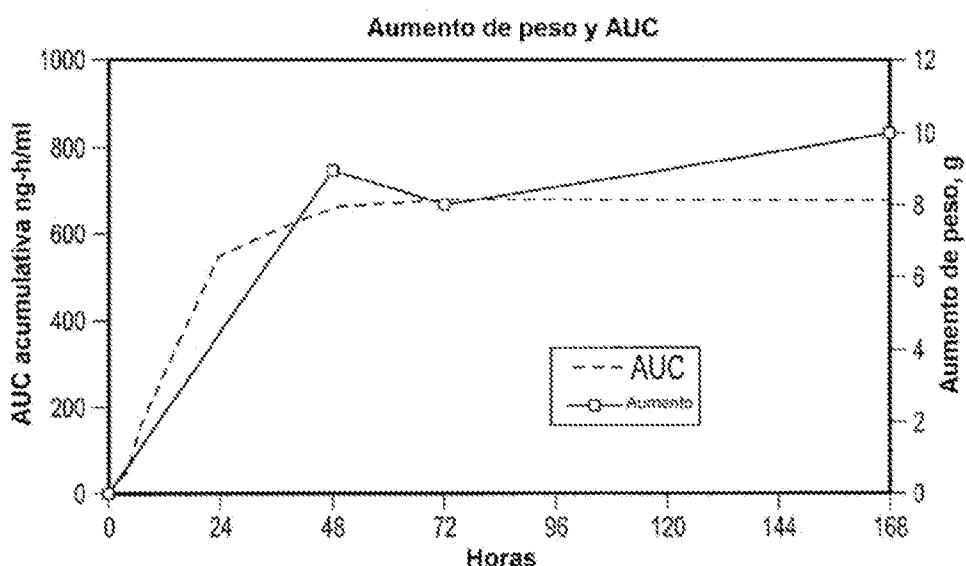
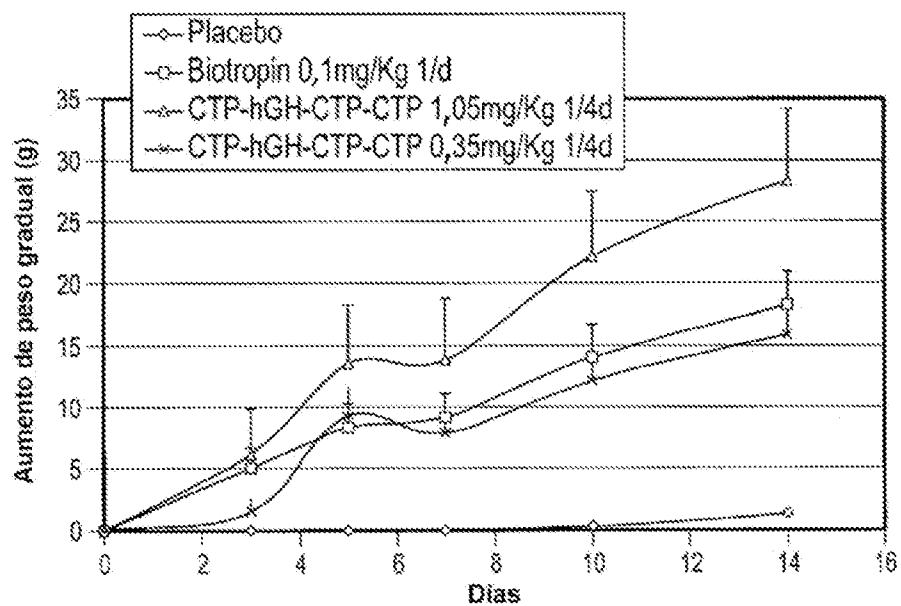


FIGURA 6



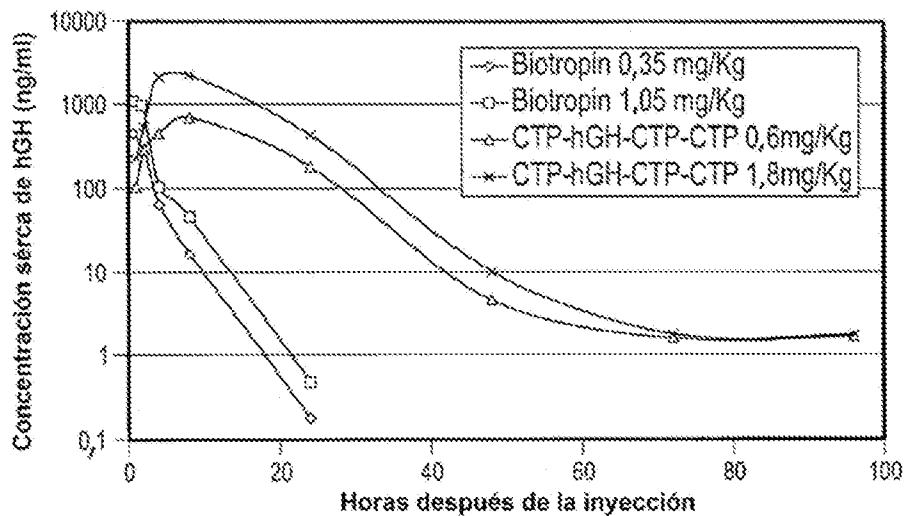


FIGURA 8

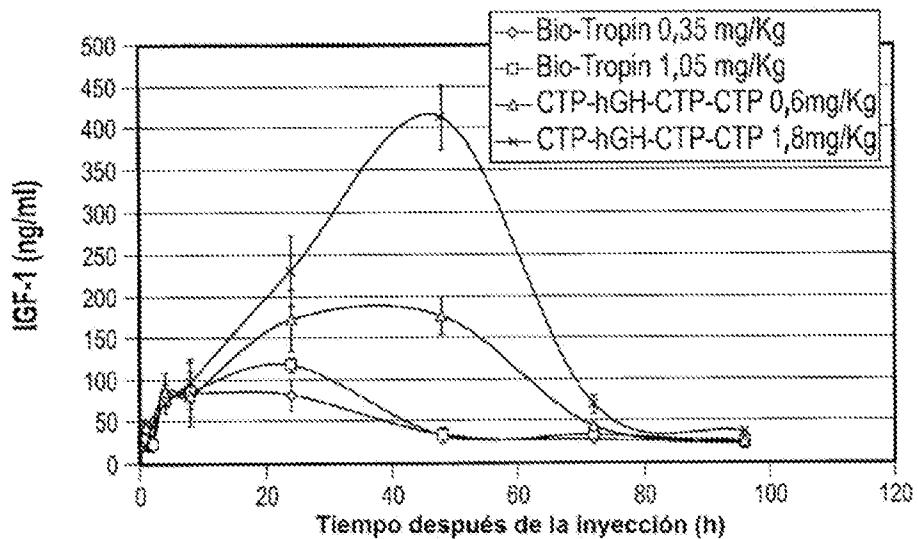


FIGURA 9