



공개특허 10-2019-0116526



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0116526
(43) 공개일자 2019년10월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/27 (2019.01) *A61K 38/24* (2019.01)
C07K 14/505 (2006.01) *C07K 14/59* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/27 (2013.01)
A61K 38/24 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7028467(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2012년08월02일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2014-7005420
원출원일자(국제) 2012년08월02일
심사청구일자 2017년07월27일
- (85) 번역문제출일자 2019년09월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/IL2012/050288
- (87) 국제공개번호 WO 2013/018098
국제공개일자 2013년02월07일
- (30) 우선권주장
13/195,931 2011년08월02일 미국(US)

- (71) 출원인
옵코 바이오로직스 리미티드
이스라엘 8211804 이스라엘 키르야트 가트 애쉬레
간 스트리트 16
- (72) 발명자
페어스 푸어드
이스라엘 25155 아워피시 빌리지 피.오. 박스 423
피마 우디 이얼
이스라엘 84833 베에르-셰바 알렉 스트리트 30
- (74) 대리인
유미특허법인

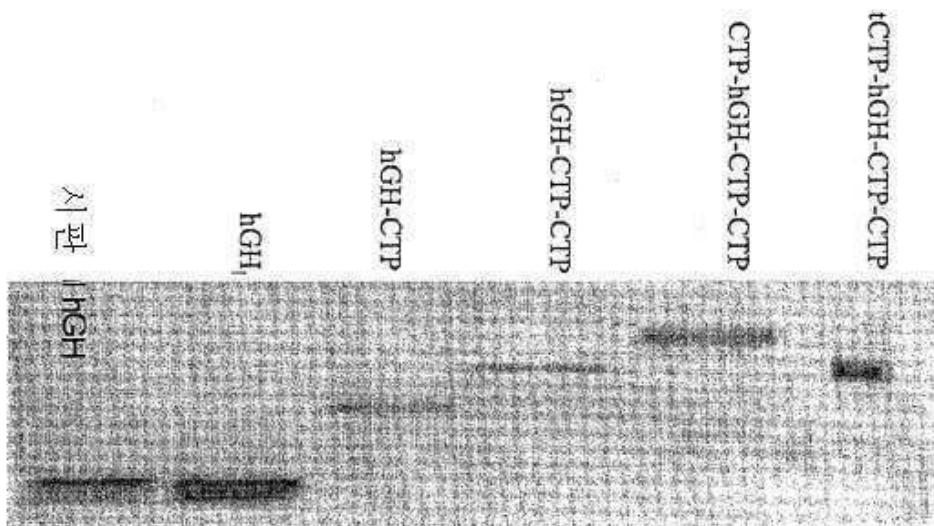
전체 청구항 수 : 총 58 항

(54) 발명의 명칭 장기 작용성 성장 호르몬 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명에서는, 체중 감소 또는 체지방 감소를 유도하는 방법, 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-1)의 수준을 높이는 방법, 및 인간 개체에서 성장 호르몬의 투여 빈도를 낮추는 방법에 있어서의, 용모막성 고나도트로핀의 카르복시-말단 웨타이드 (CTP) 하나와 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개가 아미노 말단과 카르복시 말단에 각각 부착된 성장 호르몬을 포함하는, 성장 호르몬 단백질 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 용도가 개시된다. 또한, 성장 호르몬 및 본 발명의 성장 호르몬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학 조성물, 및 이를 이용하는 방법이 개시된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 3/04 (2018.01)

C07K 14/505 (2013.01)

C07K 14/59 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 개체에서 체중 감소 또는 체지방 감소를 유도하는 방법으로서,

성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를, 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며,

이로써, 상기 개체에서 체중 증가 또는 체지방 감소가 유도되는 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 적어도 하나의 CTP의 서열이 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 신호 펩타이드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 신호 펩타이드의 서열이 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 적어도 하나의 CTP가 당화된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 적어도 하나의 CTP가 절단형 (truncated)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 적어도 하나의 CTP가 링커를 통해 상기 성장 호르몬에 부착된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 링커가 펩타이드 결합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 주 당 1회 또는 2주 당 1회로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 0.05-7.2 mg의 투여량 (dose)으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 4 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 1.2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 상기 개체에게 피하로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

인간 개체에서 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-1)의 수준을 높이는 방법으로서,

성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리웨타이드를, 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며,

이로써 상기 개체에서 IGF-1의 수준이 증가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 적어도 하나의 CTP의 서열이 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 폴리웨타이드가 신호 웨타이드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 신호 웨타이드의 서열이 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 주 당 1회 또는 2주 당 1회로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 0.05-7.2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제15항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 4 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제15항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 1.2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제15항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 상기 개체에게 피하로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

인간 개체에 대한 성장 호르몬의 투여 빈도를 낮추는 방법으로서,

성장 호르몬의 아미노 말단에 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드 (CTP) 하나와 성장 호르몬의 카르복시 말단에 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 부착하는 단계를 포함하며,

이로써, 성장 호르몬의 투여 빈도가 감소되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 적어도 하나의 CTP의 서열이 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, CTP의 상기 아미노 말단에 신호 서열을 부착하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 신호 펩타이드의 서열이 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제25항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 주 당 1회 또는 2주 당 1회로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제25항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 0.05-7.2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제25항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제25항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 4 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제25항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 1.2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제25항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 상기 개체에게 피하로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

인간 개체에서 성장 또는 체중 증가를 유도하는 방법으로서,

성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를, 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며,

상기 개체가 어린이 또는 청소년이며,

이로써 상기 개체에서 성장 또는 체중 증가가 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 적어도 하나의 CTP의 서열이 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 폴리펩타이드가 신호 펩타이드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 신호 웨타이드의 서열이 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제35항에 있어서, 상기 적어도 하나의 CTP가 당화된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제35항에 있어서, 적어도 하나의 CTP가 절단형 (truncated)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제35항에 있어서, 적어도 하나의 CTP가 링커를 통해 상기 성장 호르몬에 부착된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 링커가 웨타이드 결합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

제35항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 주 당 1회 또는 2주 당 1회로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

제35항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 0.05~7.2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제35항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제35항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 4 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제35항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 1.2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

제35항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 상기 개체에게 피하로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 49

개체에서 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-1)의 수준을 치료학적인 정상 범위로 유지하는 방법으로서,

성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리웨타이드를, 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며,

이로써, 상기 개체에서 IGF-1이 치료학적인 정상 범위로 유지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 적어도 하나의 CTP의 서열이 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

제49항에 있어서, 상기 폴리웨타이드가 신호 웨타이드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 신호 웹타이드의 서열이 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

제49항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 주 당 1회 또는 2주 당 1회로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제49항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 0.05-7.2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제49항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

제49항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 4 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

제49항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 1회 투여 당 약 1.2 mg의 투여량으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

제49항에 있어서, 상기 성장 호르몬이 상기 개체에게 피하로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

관련 출원에 대한 교차-참조

[0002]

본 출원은 2011년 8월 2일자로 출원된 미국 출원번호 제 13/195,931호에 대해 우선권을 주장하며, 미국 출원번호 제 13/195,931호는 2009년 7월 24일자 미국 출원번호 12/509,188호에 대한 일부 계속 출원이며, 미국 출원번호 12/509,188호는 2009년 6월 2일자 미국 출원번호 12/476,916호의 일부 계속 출원이며, 미국 출원번호 12/476,916호는 2009년 3월 11일자 미국 출원번호 제 12/401,746호의 일부 계속 출원이며, 미국 출원번호 제 12/401,746호는 2007년 2월 1일자 미국 출원번호 제 11/700,911호의 일부 계속 출원이며, 미국 출원번호 제 11/700,911호는 2006년 2월 3일자 미국 가출원번호 제 60/764,761호를 우선권하는 출원이다. 이를 출원들은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003]

본 명세서에서는, 체중 감소 또는 체지방 감소를 유도하는 방법, 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-1)의 수준을 높이는 방법, 및 인간 개체에서 성장 호르몬의 투여 빈도를 낮추는 방법에 있어서의, 융모막성 고나도트로핀의 카르복시-말단 웹타이드 (CTP) 하나와 융모막성 고나도트로핀 CTP 2개가 아미노 말단과 카르복시 말단에 각각 부착된 성장 호르몬을 포함하는, 성장 호르몬 단백질 및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 용도가 개시된다. 또한, 성장 호르몬 및 본 발명의 성장 호르몬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 약학 조성물, 및 이를 이용하는 방법이 개시된다.

배경 기술

[0004]

폴리웹타이드는 혈액, 간 또는 신장에서 변성되거나 또는 효소적으로 분해되기 쉽다. 즉, 폴리웹타이드는 전형적으로 수 시간의 짧은 순환성 반감기를 가진다. 웹타이드 약물은, 이의 낮은 안정성으로 인해, 통상적으로 활성 웹타이드의 유효한 혈장 농도를 유지하기 위해서는 지속적인 빈도로 전달된다. 아울러, 웹타이드 약물들은 통상적으로 주입(infusion)에 의해 투여되기 때문에, 잦은 웹타이드 약물의 주입은 개체에게 상당한 불편함을 준다. 따라서, 치료 폴리웹타이드의 높은 약리학적 효능을 유지하면서도 반감기를 연장시킬 수 있는 기법들이 요구되고 있다. 또한, 이러한 바람직한 웹타이드는 혈청 안정성 강화, 고 활성 및 개체에 주입시 바람직하지

못한 면역 반응의 낮은 유발 가능성 등의 요건을 충족시켜야 한다.

[0005] 짧은 혈청 반감기와 같은 비우호적인 약동학적 특성은 다수의 유망한 후보 약물들을 약학적으로 개발하는데 방해가 될 수 있다. 혈청 반감기는 분자의 실험적인 특징이므로, 각각의 새로운 잠재적인 약물에 대해 실험을 통해 평가하여야 한다. 예컨대, 저분자량의 폴리펩타이드 약물의 경우, 신장 여과와 같은 생리적인 소거 기전이, 필요한 투약 요법의 비용 또는 빈도로 인해, 약물을 치료학적 수준으로 유지하기 어렵게 만들 수 있다. 반대로, 약물 또는 이의 대사산물이 독성 부작용을 가진 경우, 긴 혈청 반감기도 부적절하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를, 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 개체에서 체중 감소 또는 체지방 감소가 유도되는, 인간 개체에서 체중 감소 또는 체지방 감소를 유도하는 방법을 제공한다.

[0007] 다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를, 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 개체에서 IGF-1 수준이 증가되는, 인간 개체에서 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-1) 수준을 높이는 방법을 제공한다.

[0008] 일 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 개체에서 정상적인 치료학적 범위로 IGF-1이 유지되는, 개체에서 정상 치료학적 범위로 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-1)를 유지하는 방법을 제공한다.

[0009] 다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬의 아미노 말단에 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프타이드 (CTP) 하나와 성장 호르몬의 카르복시 말단에 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 부착하는 단계를 포함하며, 이로써 성장 호르몬의 투여 빈도가 감소되는, 인간 개체에서 성장 호르몬의 투여 빈도를 낮추는 방법을 제공한다.

[0010] 일 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨프타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 개체에서 성장 또는 체중 증가가 유도되는, 상기 개체가 어린이 또는 청소년인, 인간 개체에서 성장 또는 체중 증가를 유도하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 hGH (서열번호 5), hGH-CTP (서열번호 9), hGH-CTP-CTP (서열번호 10), CTP-hGH-CTP-CTP (서열번호 11) 및 tCTP-hGH-CTP-CTP (서열번호 12)의 분자량 & 실체를 예시한 웨스턴 블로팅이다. PAGE SDS 겔을 블로팅하고, 항-hGH 단일클론 항체로 염색하였다. 사진은, 시판되는 야생형 hGH와 마찬가지로, CTP-변형된 hGH 변이체들이 항-hGH 항체에 의해 인지됨을 보여준다.

도 2는 본 발명의 GH-CTP 폴리펩타이드 (여러가지 MOD)를 투여한 후 뇌하수체 적출된 랫이 체중 증가됨을 예시한 막대 그래프이다.

도 3은 (1) CTP-hGH-CTP-CTP pCI-dhfr 플라스미드 지도와 (2) CTP-hGH-CTP-CTP의 단백질 구조식이다.

도 4는 랫에 CTP-hGH-CTP-CTP 또는 GH를 1회 i.v. 또는 s.c. 투여한 후, CTP-hGH-CTP-CTP 또는 GH의 혈장내 평균 농도 (pg/ml)를 나타낸 그래프이다 (n=3-6/투여/경로).

도 5는 뇌하수체 적출된 랫에 CTP-hGH-CTP-CTP (0.4, 0.8 및 4 mg/Kg)를 1회 s.c. 투여한 후, 평균 체중 증가를 매일 GH 주사 (0.1 mg/Kg/Day)와 비교하여 나타낸 그래프이다 (n=10 / 투여).

도 6은 CTP-hGH-CTP-CTP를 1회 주사한 이후의 곡선 하 면적이 랫에서의 체중 증가와 관련있음을 보여주는 그래프이다.

도 7은 뇌하수체 적출된 랫에 CTP-hGH-CTP-CTP (0.4, 0.8 및 4 mg/Kg)를 4일 간격으로 s.c. 투여한 후 체중 증가를 매일 GH 주사 (0.1 mg/Kg/Day)와 비교하여 나타낸 그래프이다 (n=10 / 투여).

도 8은 CTP-hGH-CTP-CTP와 시판 hGH를 SC 주사한 후 뇌하수체 적출된 랫에서의 hGH 혈청 농도를 나타낸 그래프이다. PK/PD 프로파일을 구하기 위해, CTP-hGH-CTP-CTP를 0.6 또는 1.8 mg/Kg로, 바이오토로핀을 0.35 또는 1.05 mg/Kg로 뇌하수체 적출된 랫에 1회 피하 투여하였다. 주사 후 혈청 hGH를 특수 ELISA 키트를 이용하여 측정하였다.

도 9는 CTP-hGH-CTP-CTP 및 시판 hGH를 SC 주사한 후 뇌하수체 적출된 랫에서의 IGF-1 혈청 농도를 나타낸 그래프이다. PK/PD 프로파일을 구하기 위해, CTP-hGH-CTP-CTP를 0.6 또는 1.8 mg/Kg로, 바이오토로핀을 0.35 또는 1.05 mg/Kg로 뇌하수체 적출된 랫에 1회 피하 투여하였다. 주사 후 혈청 IGF-1를 특수 ELISA 키트 (Roche Diagnostics)를 이용하여 측정하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012]

일 구현예에서, 본 발명은 장기 작용성 성장 호르몬 및 이의 제조 및 이용 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 장기 작용성 성장 호르몬은 카르복시 말단 웨타이드 (CTP, 또한 CTP 유닛으로도 지칭됨)를 포함한다. 다른 구현예에서, 장기 작용성 폴리웨타이드는 인간 융모막성 고나도트로핀 (hCG)의 카르복시 말단 웨타이드 (CTP)를 포함한다. 다른 구현예에서, CTP는 대상 성장 호르몬 또는 폴리웨타이드를 분해로부터 보호하는 보호제로서 작용한다. 다른 구현예에서, CTP는 대상 성장 호르몬 또는 폴리웨타이드의 C_{max} 를 증가시킨다. 다른 구현예에서, CTP는 대상 성장 호르몬 또는 폴리웨타이드의 T_{max} 를 증가시킨다. 다른 구현예에서, CTP는 대상 성장 호르몬 또는 폴리웨타이드의 효능을 강화한다.

[0013]

다른 구현예들에서, 아미노 말단에 부착된 1개의 CTP와 카르복시 말단에 탠덤으로 부착된 2개의 CTP 웨타이드를 포함하는, 본 발명의 대상인 조작된 성장 호르몬 또는 폴리웨타이드는, 생물 활성 측면에서, 대상의 CTP로 비-변형된 성장 호르몬 또는 폴리웨타이드와 적어도 등가이다. 다른 구현예들에서, 아미노 말단에 부착된 1개의 CTP와 카르복시 말단에 탠덤으로 부착된 2개의 CTP 웨타이드를 포함하는 본 발명의 대상인 조작된 성장 호르몬 또는 폴리웨타이드는, 약동학 및 약력학 등의 약리학적 특성 측면에서, 대상의 CTP로 비-변형된 성장 호르몬 또는 폴리웨타이드와 적어도 등가이다.

[0014]

다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나 이상의 CTP 웨타이드 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 2 이상의 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드를 포함하는 폴리웨타이드를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 1개의 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드와 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 2 이상의 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드를 포함하는 폴리웨타이드를 제공한다.

[0015]

다른 구현예에서, 용어 "CTP 웨타이드," "카르복시 말단 웨타이드" 및 "CTP 서열"은 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 다른 구현예에서, 카르복시 말단 웨타이드는 전장 CTP이다. 다른 구현예에서, 카르복시 말단 웨타이드는 절단형 (truncated) CTP이다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0016]

다른 구현예에서, "신호 서열" 및 "신호 웨타이드"는 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 다른 구현예에서, "서열"은 폴리뉴클레오티드에 대해 사용되는 경우 코딩부를 지칭할 수 있다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다.

[0017]

다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 1개의 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드, 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 2개의 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드로 구성된 폴리웨타이드를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 1개의 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드, 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 2개의 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드, 및 하나의 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드의 아미노 말단에 부착된 신호 웨타이드로 구성된 폴리웨타이드를 제공한다.

[0018]

다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP들을 포함하는 성장 호르몬은 CTP가 없는 동일한 성장 호르몬과 비교하여 강화된 생체내 생물학적 활성을 가진다. 다른 구현예에서, 아미노 말단에 부착된 하나 이상의 CTP와 카르복시 말단에 부착된 2 이상의 CTP를 포함하는 성장 호르몬은 CTP가 없는 동일한 성장 호르몬과 비교하여 강화된 생체내 생물학적 활성을 가진다. 다른 구현예에서, 아미노 말단에 부착된 1개의 CTP와 카르복시 말단에 부착된 2개

의 CTP를 포함하는 성장 호르몬은 CTP가 없는 동일한 성장 호르몬과 비교하여 강화된 생체내 생물학적 활성을 가진다.

[0019] 다른 구현예에서, 개체는 인간 개체이다. 다른 구현예에서, 개체는 애완 동물이다. 다른 구현예에서, 개체는 포유류이다. 다른 구현예에서, 개체는 농장 동물이다. 다른 구현예에서, 개체는 원숭이이다. 다른 구현예에서, 개체는 말이다. 다른 구현예에서, 개체는 소이다. 다른 구현예에서, 개체는 마우스이다. 다른 구현예에서, 개체는 뱃이다. 일 구현예에서, 개체는 남성이다. 다른 구현예에서, 개체는 여성이다.

[0020] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP-성장 호르몬-CTP-CTP의 배열 (configuration)은 웨타이드 결합을 통해 하나 이상의 CTP 단위가 연결된 성장 호르몬 또는 이의 활성 단편을 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP-성장 호르몬-CTP-CTP는 웨타이드 결합을 통해 추가적인 CTP 단위와 연결된, 하나 이상의 CTP 단위가 웨타이드 결합을 통해 연결된, 성장 호르몬 또는 이의 활성 단편을 포함한다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬 및/또는 이의 단편과 CTP 단위 및/또는 이들의 단편을 포함하는 본원에 기술된 폴리웨타이드는 웨타이드 결합을 통해 상호 연결된다. 다른 구현예에서, 하나의 핵산 분자는 성장 호르몬 및/또는 이의 단편, 및 CTP 단위 및/또는 이의 단편을 포함하는 본원에 기술된 폴리웨타이드를 코딩한다.

[0021] 다른 구현예에서, 카르복시-말단 웨타이드 (CTP)는 링커를 통해 성장 호르몬에 부착된다. 다른 구현예에서, 상기 CTP 서열을 성장 호르몬에 연결시키는 링커는 공유 결합이다. 다른 구현예에서, CTP 서열을 성장 호르몬에 연결시키는 링커는 웨타이드 결합이다. 다른 구현예에서, CTP를 성장 호르몬에 연결시키는 링커는 치환된 웨타이드 결합이다. 다른 구현예에서, 카르복시-말단 웨타이드 (CTP) 서열은 서열번호 1 및 서열번호 2에 기재된 서열들로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0022] 다른 구현예에서, 서열번호 1은 다음의 아미노산 (AA) 서열: DPRFQDSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILQ (서열번호 1)를 포함한다. 다른 구현예에서, 서열번호 2는 다음의 아미노산 (AA) 서열: SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (서열번호 2)를 포함한다.

[0023] 다른 구현예에서, 카르복시-말단 웨타이드 (CTP) 서열은 절단된 형태이다. 다른 구현예에서, 절단형 CTP는 다음의 아미노산 서열: SSSSKAPPPSLP (서열번호 4)를 포함한다.

[0024] 다른 구현예에서, 본 발명의 카르복시 말단 웨타이드 (CTP)는, 천연 인간 융모막성 고나도트로핀 웨타이드의 아미노산 112 - 145번 위치의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 인간 융모막성 고나도트로핀 웨타이드의 아미노산 118 - 145번 위치의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, CTP 서열은 또한 인간 융모막성 고나도트로핀 웨타이드의 112-118번 위치 중 임의의 위치에서 시작되며 145번 위치에서 종결된다. 일부 구현예들에서, CTP 서열은 28, 29, 30, 31, 32, 33 또는 34개의 아미노산 길이이고, 유전자은행에 기탁된 CTP 아미노산 서열의 112, 113, 114, 115, 116, 117 또는 118번의 위치에서 종결된다.

[0025] 다른 구현예에서, CTP 웨타이드는 원용에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함되는 미국 특허에 기술된 CTP 웨타이드이다. 다른 구현예에서, CTP 웨타이드는, 미국 특허 5,712,122호에 기술된 바와 같이, 천연 CTP와 1-5개의 보존적인 아미노산 치환 차이가 있는 융모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이며, 상기 미국 특허는 원용에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함된다. 다른 구현예에서, CTP 웨타이드는 천연 CTP와 1개의 보존적인 아미노산 치환 차이가 있는 융모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이다. 다른 구현예에서, CTP 웨타이드는 천연 CTP와 2개의 보존적인 아미노산 치환 차이가 있는 융모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이다. 다른 구현예에서, CTP 웨타이드는 천연 CTP와 3개의 보존적인 아미노산 치환 차이가 있는 융모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이다. 다른 구현예에서, CTP 웨타이드는 천연 CTP와 4개의 보존적인 아미노산 치환 차이가 있는 융모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이다. 다른 구현예에서, CTP 웨타이드는 천연 CTP와 5개의 보존적인 아미노산 치환 차이가 있는 융모막성 고나도트로핀 CTP의 변이체이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 웨타이드 아미노산 서열 또는 그것의 웨타이드와 70% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 웨타이드 아미노산 서열은 천연적인 CTP 아미노산 서열 또는 그것의 웨타이드와 80% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 웨타이드 아미노산 서열은 천연적인 CTP 아미노산 서열 또는 그것의 웨타이드와 90% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 웨타이드 아미노산 서열은 천연적인 CTP 아미노산 서열 또는 그것의 웨타이드와 95% 이상 상동하다.

[0026] 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 웨타이드의 DNA 서열은 천연적인 인간 CTP의 DNA 서열 또는 그것의 웨타이드와 70% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 웨타이드의 DNA 서열은 천연적인 인간 CTP의 DNA 서열 또는 그것의 웨타이드와 80% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 웨타이드의 DNA 서열은 천연적인

인간 CTP의 DNA 서열 또는 그것의 웨타이드와 90% 이상 상동하다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 웨타이드의 DNA 서열은 천연적인 인간 CTP의 DNA 서열 또는 그것의 웨타이드와 95% 이상 상동하다.

[0027] 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4의 앞에서 11개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4의 앞에서 8개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4의 앞에서부터 13개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4의 앞에서부터 6개의 아미노산을 포함한다. 일 구현예에서, 절단형 CTP는 서열번호 4의 앞에서부터 5개의 아미노산을 포함한다.

[0028] 일 구현예에서, 하나 이상의 융모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열은 당화된다. 다른 구현예에서, 융모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열 양쪽이 당화된다. 다른 구현예에서, 2개의 융모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열이 당화된다. 다른 구현예에서, 2 이상의 융모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열이 당화된다. 다른 구현예에서, 융모막성 고나도트로핀 CTP 아미노산 서열들 모두 당화된다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 하나 이상의 당화 부위를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 2개의 당화 부위를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 3개의 당화 부위를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP 서열은 4개의 당화 부위를 포함한다.

[0029] 다른 구현예에서, 하나 이상의 카르복시-말단 웨타이드 (CTP) 서열은 서열번호 1 및 서열번호 2에 기술된 서열들로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 카르복시-말단 웨타이드 (CTP)는 절단된 형태이다.

[0030] 일 구현예에서, 용어 "말단 (termini, terminal, terminal end 및 terminus)"은, 본원에 제공된 단백질 또는 웨타이드 또는 이들의 단편의 카르복시 또는 아미노 끝부분을 언급하는 경우, 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 다른 구현예에서, 용어 "C-말단", "카르복시 말단" 또는 "카르복실 말단"은 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 다른 구현예에서, 용어 "N-말단" 및 "아미노 말단"은 본원에서 상호 호환적으로 사용된다. 각 가능성은 본 발명의 개별 구현예를 나타낸다

[0031] 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단과 카르복시 말단 양쪽의 CTP 서열들은 성장 호르몬이 분해되지 않도록 강화된 보호를 제공한다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에 위치한 하나 이상의 CTP 서열과 성장호르몬의 카르복시 말단내 2개의 CTP 단위들은 소거에 대해 강화된 보호를 제공한다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에 위치한 하나 이상의 CTP 서열과 성장 호르몬의 카르복시 말단의 2개의 CTP 단위들은 소거 시간 연장 (prolonged clearance time)을 제공한다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에 위치한 하나 이상의 CTP 서열과 성장 호르몬의 카르복시 말단의 2개의 CTP 단위들은 성장 호르몬의 C_{max} 를 증가시킨다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에 위치한 하나 이상의 CTP 서열과 성장 호르몬의 카르복시 말단의 2개의 CTP 단위들은 성장 호르몬의 T_{max} 를 증가시킨다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에 위치한 하나 이상의 CTP 서열과 성장 호르몬의 카르복시 말단의 2개의 CTP 단위들은 성장 호르몬의 $T_{1/2}$ (반감기)를 연장시킨다.

[0032] 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단과 카르복시 말단 양쪽에 위치한 CTP 서열들은 변형된 성장 호르몬의 반감기를 연장시킨다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에 위치한 하나 이상의 CTP 서열과 성장 호르몬의 카르복시 말단에 위치한 2 이상의 CTP 서열들은 변형된 성장 호르몬에게 반감기 연장을 제공한다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에 위치한 하나의 CTP 서열과 성장 호르몬의 카르복시 말단에 위치한 2개의 CTP 서열들은 부착된 성장 호르몬에 반감기 연장을 제공한다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에 위치한 하나의 CTP 서열과 성장 호르몬의 카르복시 말단에 텐덤으로 위치한 2개의 CTP 서열들은 변형된 성장 호르몬에 반감기 연장을 제공한다.

[0033] 다른 구현예에서, 폴리웨타이드 아미노 말단에 위치한 CTP 서열, 성장 호르몬의 카르복시 말단에 위치한 CTP 서열, 및 카르복시 말단에 위치한 CTP 서열에 텐덤으로 부착된 하나 이상의 부가적인 CTP 서열은 성장 호르몬 분해에 대해 강화된 보호를 제공한다. 일부 구현예들에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에 위치한 CTP 서열, 성장 호르몬의 카르복시 말단에 위치한 CTP 서열, 및 카르복시 말단에 위치한 CTP 서열에 텐덤으로 부착된 하나 이상의 부가적인 CTP 서열은 성장 호르몬의 반감기를 연장시킨다. 일부 구현예들에서, 성장 호르몬의 아미노 말단에 위치한 CTP 서열, 성장 호르몬의 카르복시 말단에 위치한 CTP 서열, 및 카르복시 말단에 위치한 CTP 서열에 텐덤으로 부착된 하나 이상의 부가적인 CTP 서열은 성장 호르몬의 생물학적 활성을 강화한다.

[0034] 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 신호 웨타이드를 추가로 포함한다. 일부 구현예들에서, 신호 서열은, 비제한적인 예로, 내인성 신호 서열을 포함한다. 일부 구현예들에서, 신호 서열은, 비제한적인 예로, 임의의 공지된 성장 호르몬 또는 성장 호르몬들의 내인성 신호 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리웨타이드

및 방법은 다음과 같은 아미노산 서열을 포함하는 신호 펩타이드를 부가적으로 가진 성장 호르몬을 제공한다: MATGSRSTLLLAFGLLCLPWLQEGRSA (서열번호 3).

[0035] 다른 구현예에서, 본 발명의 접합된 성장 호르몬은 비-변형된 성장 호르몬과 동일한 방식으로 사용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 접합된 성장 호르몬은 순환성 반감기 증가, 혈장 체류 시간 연장, 소거 감소, 및 증가된 생체내 임상 활성을 가진다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 성장 호르몬의 특성 개선으로 인해, 이들 접합체들은 비-변형된 성장 호르몬 보다 적은 빈도로 투여된다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 성장 호르몬은 주 당 1회 - 2주 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 성장 호르몬은 2주 당 1회 - 3주 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 접합된 성장 호르몬은 1일 1회 - 주 당 3회로 투여된다. 다른 구현예에서, 투여 빈도 감소로 환자의 순응성이 개선될 것이며, 치료 성과 개선과 환자의 삶의 질 개선으로 이어질 것이다. 다른 구현예에서, 폴리(에틸렌 글리콜)이 연결된 기존의 성장 호르몬 접합체와 비교하여, 본 발명의 접합체의 분자량 및 링커 구조를 가진 성장 호르몬 CTP 접합체가, 개선된 효능, 개선된 안정성, 증가된 AUC 수준, 증가된 순환 반감기를 가지는 것으로 확인된다. 다른 구현예에서, 폴리(에틸렌 글리콜)이 연결된 기존의 성장 호르몬 접합체와 비교하여, 본 발명의 접합체의 분자량 및 링커 구조를 가진 성장 호르몬이, 개선된 효능, 개선된 안정성, 증가된 AUC 수준, 증가된 순환 반감기를 가지는 것으로 확인된다. 다른 구현예에서, 접합된 성장 호르몬의 치료학적 유효량은 생체내 측정가능한 생물학적 활성에 필요한 접합체의 양이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 교시에 따라 이용되는 성장 호르몬은 증가된 효능을 나타낸다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 아미노 말단과 카르복시 말단 양쪽에 CTP 서열의 부착으로, 생체내 활성이 연장된다.

[0036] 다른 구현예에서, 접합된 성장 호르몬의 치료학적 유효량은 치료 중인 실제 병태 유형, 치료 중인 환자의 상태 뿐만 아니라 조성물의 기타 성분과 같은 인자에 따라 결정된다. 다른 구현예에서, 접합된 성장 호르몬의 치료학적 유효량은 주 당 1회로 투여되는 0.01 내지 10 µg /체중 kg이다. 다른 구현예에서, 접합된 성장 호르몬의 치료학적 유효량은 주 당 1회로 투여되는 0.1 내지 1 µg /체중 kg이다. 다른 구현예에서, 접합된 성장 호르몬을 포함하는 약학 조성물은 인간 환자에게 다양한 수단에 의해 투여하는데 유효한 효과 강도로 제형화된다.

[0037] 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 성장 호르몬이다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 인간 성장 호르몬이다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 뉴클레오티드 서열 및/또는 아미노산 서열은 유전자은행 데이터베이스에서 이용가능하다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 상동체이다. 다른 구현예에서, 상동체는 또한 결손, 삽입 또는 아미노산 치환 등의 치환 변이체 및 이의 생물 활성 폴리펩타이드 단편을 지칭한다.

[0038] 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 엑손 2, 3, 4 또는 이들의 임의 조합이 생략된 hGH 변이체이다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 신호 펩타이드를 포함한다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬은 신호 절단 부위를 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 재조합 GH를 포함한다.

[0039] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 성장 호르몬은 성장 호르몬 (GH) 유사 사이토카인 슈퍼페밀리에 속한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 성장 호르몬은 인간 성장 호르몬 (hGH)이다. 다른 구현예에서, 인간 성장 호르몬은 다음의 아미노산 서열을 포함한다 (유전자은행 등재 번호 P01241): MATGSRSTLLLAFGLLCLPWLQEGRSAFPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAQDFDTYQEFEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNEELL RISLLLIQSWEPEVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLR IVQCRSVEGSCGF (서열번호 5). 다른 구현예에서, 인간 성장 호르몬은 다음의 아미노산 서열을 포함한다: MFPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAQDFDTYQEFEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNEELLRISSLLIQSWEPEVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (서열번호 6). 다른 구현예에서, 인간 성장 호르몬은 다음의 아미노산 서열을 포함한다: MFPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLA (서열번호 7). 다른 구현예에서, hGH는 다음의 아미노산 서열을 포함한다: MATGSRSTLLLAFGLLCLPWLQEGRSAFPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAQDFDTYQEFEAYIPKVQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNEELL RISLLLIQSWEPEVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLR IVQCRSVEGSCGF (서열번호 8). 다른 구현예에서, hGH는 hGH의 65번 글루타민이 발린으로 치환된 치환 변이체이다.

[0040] 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 등재 번호 AAA72260으로 수탁된 유전자은행 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 등재 번호 AAK69708로 수탁된 유전자은행 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 등재 번호 CAA01435로 수탁된 유전자은행 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 등재 번호 CAA01329로 수탁된 유전자은행 아미노산 서열

을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 등재 번호 CAA00380으로 수탁된 유전자은행 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 등재 번호 AAA72555로 수탁된 유전자은행 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 등재 번호 NP_000506.2로 수탁된 유전자은행 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 등재 번호 NP_072053.1로 수탁된 유전자은행 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 등재 번호 NP_072054.1로 수탁된 유전자은행 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 등재 번호 NP_072055.1로 수탁된 유전자은행 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 등재 번호 NP_072056.1로 수탁된 유전자은행 아미노산 서열을 포함한다.

[0041] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 성장 호르몬을 코딩하는 핵산 분자는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 성장 호르몬 아미노산 서열을 코딩한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 성장 호르몬을 코딩하는 핵산 분자는 hGH를 코딩한다. 다른 구현예에서, 등재 번호 NM_000515.3로 유전자은행에 수탁된 핵산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 등재 번호 NM_022559.2로 유전자은행에 수탁된 핵산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 등재 번호 NM_022560.2로 유전자은행에 수탁된 핵산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 등재 번호 NM_022561.2로 유전자은행에 수탁된 핵산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 등재 번호 NM_022562.2로 유전자은행에 수탁된 핵산 서열을 포함한다.

[0042] 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬을 포함하는 폴리펩타이드는 성장 호르몬과 이의 카르복시 말단에 부착된 CTP 하나 (hGH-CTP)를 포함하며, 다음과 같은 아미노산 서열을 가진다:
MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGLAFPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLIIQSWEVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLREGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (서열번호 9).

[0043] 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬을 포함하는 폴리펩타이드는 성장 호르몬과 이의 카르복시 말단에 텐덤으로 부착된 2개의 CTP (hGH-CTP-CTP)를 포함하며, 다음과 같은 서열을 가진다:
MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGLAFPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLIIQSWEVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLREGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (서열번호 10).

[0044] 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬을 포함하는 폴리펩타이드는 성장 호르몬과 이의 카르복시 말단에 텐덤으로 부착된 2개의 CTP와 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 CTP (CTP-hGH-CTP-CTP)를 포함하며, 다음과 같은 서열을 가진다:
MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGLASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLIIQSWEVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLREGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (서열번호 11).

[0045] 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬을 포함하는 폴리펩타이드는, 성장 호르몬과 이의 카르복시 말단에 텐덤으로 부착된 CTP 2개 중 하나가 절단형인 2개의 CTP와 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 하나의 부가적인 CTP (tCTP-hGH-CTP-CTP)를 포함하며, 다음과 같은 서열을 가진다:
MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGLASSSSKAPPPSLPFPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLIIQSWEVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLREGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (서열번호 12).

[0046] 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬을 포함하는 폴리펩타이드는 성장 호르몬과 이의 카르복시 말단에 부착된 1개의 CTP와 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 1개의 CTP (CTP-hGH-CTP)를 포함하며, 다음과 같은 서열을 가진다:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGLASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLIIQSWEVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLREGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (서열번호 13).

[0047] 다른 구현예에서, 성장 호르몬과 하나의 CTP를 포함하는 폴리펩타이드는 다음의 아미노산 서열을 포함한다:
MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGLASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLIIQSWEVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLREGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (서열번호 14).

- [0048] 다른 구현예에서, CTP-hGH-CTP를 가진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자는 다음과 같은 핵산 서열을 포함한다:
tctagaggacatggcacccggcagcaggaccgcgtgtggcctcgccgtgtgcctgcacggggcagcgcgcagctttcttaa
ggctccaccccatctgcccagccccagcagactgcggggcccgacacacccattcgcccaaccatccccctgaggcgttgcga
caacgcacgtgaggcgtcaggcgtgcaccagctggccttgacacctaccaggagtgcgaggaaggctacatcccaaggaggaga
gcagaaccccccagacccctgtgttcagcagagcatccccaccccaaggcaacagaggaggacccaggcagaagagcaac
ctggagctgtgaggcgttccagacccatggccggctggaggacggcagccaggaccgcagatcttaaggcagacccctcc
cctgtgtgtatccagagctggctggagccgtgcagttctgagaagcgtgtcgccacacgcctgggtacggcgcaggcaca
gcgtgaggcgttccagacccatggccggctggaggacggcagccaggaccgcagatcttaaggcagacccctcc
caccacagccacaacgcacgcacgcgtgcgaagaactacggcgtgtactgttcagaaaggacatggacaagggtggag
acccctccctgaggcgttcccaaggcagccctccctgaggcgttcccaaggcagggcgttccctggccctccgacacacc
aatcctgcctcagtgtgaaggctggatgcggccgc (서열번호 15).
- [0049] 다른 구현예에서, CTP-hGH-CTP-CTP를 가진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자는 다음과 같은 핵산 서열을 포함한다:
tctagaggacatggcacccggcagcaggaccgcgtgtggcctcgccgtgtgcctgcacggggcagcgcgcagctttcttaa
ggctccaccccatctgcccagccccagcagactgcggggcccgacacacccattcgcccaaccatccccctgaggcgttgcga
caacgcacgtgaggcgtcaggcgtgcaccagctggccttgacacctaccaggagtgcgaggaaggctacatcccaaggaggaga
gcagaaccccccagacccctgtgttcagcagagcatccccaccccaaggcaacagaggaggacccaggcagaagagcaac
ctggagctgtgaggcgttccagacccatggccggctggaggacggcagccaggaccgcagatcttaaggcagacccctac
caccacagccacaacgcacgcacgcgtgcgaagaactacggcgtgtactgttcagaaaggacatggacaagggtggag
acccctccctgaggcgttcccaaggcagccctccctgaggcgttcccaaggcagggcgttccctggccctccgacacacc
aatcctgccacagagcagctcttaaggccctccatccctgaggcgttccctggccctctgacacccctatccctgcctc
aaggctggatgcggccgc (서열번호 16).
- [0050] 다른 구현예에서, CTP-hGH-CTP-CTP를 가진 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 분자는 다음과 같은 핵산 서열을 포함한다:
tctagaggacatggcacccggcagcaggaccgcgtgtggcctcgccgtgtgcctgcacggggcagcgcgcagctttcttaa
ggctccaccccatccctggccgttccctgaggcgttccctgaggcgttccctgaggcgttccctgaggcgttccctgagg
cgttccctgaggcgttccctgaggcgttccctgaggcgttccctgaggcgttccctgaggcgttccctgaggcgttcc
caccaggagttcaggaaggctacatccccaggaggcagaagtcacgcgttccctgaggcgttccctgaggcgttccct
cagcaacaggaggaggacccaggcagaagcaacctggagctgtgaggatccctgtgtccctgaggcgttccctgagg
cgttccctgaggcgttccctgaggcgttccctgaggcgttccctgaggcgttccctgaggcgttccctgaggcgttcc
ggacggcagccaggaccggccagatcttaaggcagacccatccctggccgttccctgaggcgttccctgaggcgttcc
gtactgttcagaaaggacatggacaagggtggagaccccttctgaggatcgtgcagttcagaaaggcgttccctgagg
ccctcccccggccatccctcccaaggcaggcgttccctggccctccgacacaccaatccctggccgttccctgagg
atcccccctccggcgttccctggcccttgcacacccctatccctgcctcagtgtgaaggctggatgcggccgc (서열번호 17).
- [0051] 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 성장 호르몬의 공지 서열과 상동적이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은 본원에 기술된 성장 호르몬 서열과 상동적이다. 일부 구현예들에서, 본 발명에 따른 상동체는 또한 결손, 삽입 또는 아미노산 치환 등의 치료 변이체 및 이의 생물학적 활성 폴리펩타이드 단편을 포함한다. 일 구현예에서, 치환 변이체는 hGH의 65번 위치의 글루타민이 발린으로 치환된 것이다 [Gellerfors et al., J Pharm Biomed Anal 1989, 7:173-83].
- [0052] 일 구현예에서, "인간 성장 호르몬" (hGH)은 hGH 활성 (즉, 성장 자극)을 나타내는 유전자은행 등재 번호 P01241에 기재된 것과 같은 폴리펩타이드를 지칭한다.
- [0053] 일 구현예에서, "인간 성장 호르몬" (hGH)은 hGH 활성 (즉, 성장 자극)을 나타내는 유전자은행 등재 번호 P01241에 기재된 것과 같은 폴리펩타이드를 지칭한다. 일 구현예에서, 본 발명의 hGH는 또한 상동체를 지칭한다. 일 구현예에서, 본 발명의 hGH 아미노산 서열은 국립 생물공학정보 (NCBI)의 BlastP 소프트웨어를 디폴트 파라미터로 이용하여 결정하였을 때, 유전자은행 등재번호 P01241에 기술된 hGH 서열과 상동성이 50% 이상이다. 일 구현예에서, 본 발명의 hGH 아미노산 서열은 국립 생물공학정보 (NCBI)의 BlastP 소프트웨어를 디폴트 파라미터로 이용하여 결정하였을 때, 유전자은행 등재번호 P01241에 기술된 hGH 서열과 상동성이 60% 이상이다. 일 구현예에서, 본 발명의 hGH 아미노산 서열은 국립 생물공학정보 (NCBI)의 BlastP 소프트웨어를 디폴트 파라미터로 이용하여 결정하였을 때, 유전자은행 등재번호 P01241에 기술된 hGH 서열과 상동성이 70% 이상이다. 일 구

현예에서, 본 발명의 hGH 아미노산 서열은 국립 생물공학정보 (NCBI)의 BlastP 소프트웨어를 디폴트 파라미터로 이용하여 결정하였을 때, 유전자은행 등재번호 P01241에 기술된 hGH 서열과 상동성이 80% 이상이다. 일 구현예에서, 본 발명의 hGH 아미노산 서열은 국립 생물공학정보 (NCBI)의 BlastP 소프트웨어를 디폴트 파라미터로 이용하여 결정하였을 때, 유전자은행 등재번호 P01241에 기술된 hGH 서열과 상동성이 90% 이상이다. 일 구현예에서, 본 발명의 hGH 아미노산 서열은 국립 생물공학정보 (NCBI)의 BlastP 소프트웨어를 디폴트 파라미터로 이용하여 결정하였을 때, 유전자은행 등재번호 P01241에 기술된 hGH 서열과 상동성이 95% 이상이다.

- [0054] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 지방세포에 결합하여, 트리글리세라이드를 분해하고 이의 흡수력을 억제하여 순환성 지질이 축적되게 자극한다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 (실시예 부분에 나타낸 바와 같이) 인슐린 유사 성장 인자-I (IGF-1)에 의해 주로 매개되는 간접적인 효과를 발휘한다.
- [0055] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 간 및 기타 조직들이 IGF-1을 방출하도록 자극함으로써 신체 성장을 자극한다. 다른 구현예에서, IGF-1은 연골세포의 증식을 자극하여, 골 성장을 일으킨다. 다른 구현예에서, IGF-1은 골격근 세포의 증식을 자극하여, 근육 발달을 일으킨다.
- [0056] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 단백질, 지질 및 탄수화물 대사작용에 대해 대사 효과를 유도한다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 직접 효과를 가진다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 IGH-1의 유도를 통해 간접 효과를 가진다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 리더 펩타이드를 더 포함한다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 CTP 절단형 구조체를 포함한다.
- [0057] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 조직에서 단백질의 동화 작용을 자극한다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 아미노산 흡수, 단백질 합성 증가 및 단백질 산화 감소를 자극한다.
- [0058] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 지방 대사작용을 자극한다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 트리글리세라이드 분해 및 지방세포에서의 산화를 자극함으로써 지방의 이용을 자극한다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 체지방을 낮춘다.
- [0059] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 탄수화물의 대사작용을 자극한다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 혈당을 정상 범위로 유지시킨다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 항-인슐린 활성을 포함한다. 다른 구현예에서 CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 말초 조직의 글루코스 흡수를 자극하고 간에서의 글루코스 합성을 강화하는 인슐린의 능력을 억제한다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 인슐린 분비를 자극하여 고인슐린혈증을 유도한다.
- [0060] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 개체에서 성장 호르몬의 제한된 생산 또는 비-생산을 보완하는데 사용된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 성장 호르몬-방출 호르몬 (GHRH)의 제한된 생산 또는 비-생산을 보완한다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 소마토스타틴의 증가된 활성을 보완한다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 그렐린의 제한된 생산 또는 비-생산을 보완한다.
- [0061] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 시상하부, 뇌하수체 또는 타겟 세포에서 병변과 관련된 질환을 치료하는데 사용된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 호르몬에 대한 타겟 세포의 반응 감소와 관련된 질환을 치료하는데 사용된다.
- [0062] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 심각한 성장 지연을 나타내는 어린이를 치료하는데 사용된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 병리학적인 저신장을 보이는 어린이를 치료하는데 사용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 운동 수행을 강화하는데 사용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 노화 증상을 치료하는데 사용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 미용적인 노화 징후들을 치료하는데 사용된다.
- [0063] 다른 구현예에서, GH 결핍성 어린이를 GH로 치료하면 성장이 강화되지만, GH 결핍성 성인의 경우에는, GH로 치료하면 실질 체중이 증가하고 체지방은 감소 또는 저하된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH 형태로 치료하면 어린이와 성인에서 이러한 효과가 강화된다. 다른 구현예에서, GH 결핍성 어린이를 CTP 변형된 hGH로 치료하면

시판되는 비-변형된 GH를 동일 용량으로 매일 복용한 GH 결핍성 어린이와 비교하여, 성장 강화가 이루어진다. 다른 구현예에서, 어린이를 CTP 변형된 hGH로 치료하면 시판되는 비-변형된 GH를 동일 용량으로 매일 복용한 어린이에 비해 성장 강화가 이루어진다. 다른 구현예에서, GH 결핍성 성인을 CTP 변형된 hGH로 치료하면 시판되는 비-변형된 GH를 동일 용량으로 매일 복용한 GH 결핍성 성인과 비교하여 실질체중 증가 및 체지방 감소가 이루어진다. 다른 구현예에서, 성인을 CTP 변형된 hGH로 치료하면 시판되는 비-변형된 GH를 동일 용량으로 매일 복용한 성인과 비교하여 실질체중 증가 및 체지방 감소가 이루어진다.

[0064] 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 암컷 개체에서 모유 생산을 증진시키기 위해 사용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP/젖소-GH 접합체는 젖소에서 모유 생산을 증진시키기 위해 사용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP/동물-GH 구조체는 혼합 농업 기법에 사용된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP/농장 동물-GH 구조체는 비제한적인 예로 돼지 등의 농장 동물의 성장을 강화하는데 사용된다.

[0065] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은, 근육 성장의 자극, 심장 기능 증가, 뼈 성장 자극, 근육 온전성 (muscle integrity) 유지, 근육 대사작용의 균형 형성, 근육 형성 유도, 새로운 근육 형성(muscle buildup) 유도, 골 하중 강화, 골다공증과 관련된 증상의 치료, 소모성 질환의 치료, 지질분해 증가, 체액 밸런스의 개선, 골다공증 치료, 폐 기능 향상, 면역성 개선, 생명 유지 장기의 재증식, 행복감 증대, REM 수면 회복 또는 이들의 임의 조합을 위한, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법을 근육 성장의 자극, 심장 기능 증가, 뼈 성장 자극, 근육 온전성 유지, 근육 대사작용의 균형 형성, 근육 형성 유도, 새로운 근육 형성 유도, 골 하중 강화, 골다공증과 관련된 증상의 치료, 소모성 질환의 치료, 지질분해 증가, 체액 밸런스의 개선, 골다공증 치료, 폐 기능 향상, 면역성 개선, 생명 유지 장기의 재증식, 행복감 증대, REM 수면 회복 또는 이들의 임의 조합을 위한 CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0066] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은, 소모성 질환, AIDS, 악액질 또는 hGH 결핍증을 치료하기 위해, N-말단에 하나 이상의 CTP 아미노산 펩타이드와 C-말단에 하나 이상의 CTP 아미노산 펩타이드를 부가적으로 가진, hGH를 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 소모성 질환, AIDS, 악액질 또는 hGH 결핍증을 치료하기 위해, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0067] 일부 구현예들에서, 본 발명의 인간 성장 호르몬 폴리펩타이드는, 성장 결함 장애, AIDS 소모증, 노화, HIV 감염 개체의 면역 기능 손상, 이화대사 질병, 수술 회복, 울혈성 심근병증, 간 이식, 간 절제술 후 간 재생, 만성 신부전, 신성 골이영양증 (renal osteodystrophy), 골다공증, 연골무형성증 (achondroplasia)/연골저형성증 (hypochondroplasia), 골격 이형성증, 만성 염증 또는 영양 장애, 예컨대 크론 질환, 단장 증후군 (short bowel syndrome), 소아 만성 관절염, 낭포성 섬유증, 남성 불임증, X 염색체 연관 저인산혈증성 구루병 (X-linked hypophosphatemic rickets), 다운 증후군, 이분 척추증 (Spina bifida), 누난 증후군 (Noonan syndrome), 비만, 근력 손상 (impaired muscle strength) 및 섬유근통 등의, 성장 및 체중 관련한 병태를 앓고 있는 개체를 치료하는데 사용할 수 있다.

[0068] 다른 구현예에서, 본 발명의 인간 성장 호르몬 폴리펩타이드는 다발성 경화증을 앓고 있는 개체를 치료하는데 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 인간 성장 호르몬 폴리펩타이드는 비만 개체의 체중 감소를 강화하는데 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 인간 성장 호르몬 폴리펩타이드는 비만 개체에서 체지방을 감소시키는데 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 인간 성장 호르몬 폴리펩타이드는 개체에서 실질체중을 높이는데 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 인간 성장 호르몬 폴리펩타이드는 심부전, 궤양성 대장염 및 화상을 앓고 있는 개체를 치료하는데 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 인간 성장 호르몬 폴리펩타이드는 근육량을 측정하는데 사용될 수 있다.

[0069] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 본원에 기술된 GH 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은, 근육 성장의 자극, 심장 기능 증가, 뼈 성장 자극, 근육 온전성 유지, 근육 대사작용의 균형 형성, 근육 형성 유도, 새로운 근육 형성 유도, 골 하중 강화, 골다공증과 관련된 증상의 치료, 소모성 질환의 치료, 지질분해 증가, 체액 밸런스의 개선, 골다공증 치료, 폐 기능 향상, 면역성 개선, 생명 유지 장기의 재증식, 행복감 증대, REM 수면 회복 또는 이들의 임의 조합을 위해, CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다.

[0070] 일부 구현예들에서, 인간 성장 호르몬 (hGH)은 본 발명의 교시에 따라 이용된다. 일부 구현예들에서, hGH 단백질의 아미노 말단과 카르복시 말단 양쪽에 CTP 서열을 부착하면 효능이 증가된다 (도 2). 일부 구현예들에서, hGH 단백질의 아미노 말단과 카르복시 말단 양쪽에 CTP 서열을 부착하면 생체내 활성이 연장된다.

- [0071] 일부 구현예들에서, "폴리펩타이드" 또는 "단백질"은, 본원에서, 천연 펩타이드 (분해 산물, 합성에 의해 합성한 단백질 또는 재조합 단백질) 및 펩타이드 모방체 (전형적으로, 합성에 의해 합성한 단백질), 뿐만 아니라, 단백질 유사체이며, 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드가 체내에서 보다 안정적이거나 세포로 더 잘 침투할 수 있게 하는 변형을 가진, 펩토이드 및 세미펩토이드를 포함한다.
- [0072] 일부 구현예들에서, 변형은, 비제한적인 예로서, N 말단 변형, C 말단 변형, 폴리펩타이드 결합 변형, 비제한적인 예로, $\text{CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-S=O}$, O=C-NH , $\text{CH}_2\text{-O}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, S=C-NH , CH=CH 또는 CF=CH , 벡본 변형, 및 잔기 변형을 포함한다. 펩타이드모방성 화합물의 제조 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992)에 명시되어 있으며, 이 문헌은 본원에 충분히 기술된 것과 같이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 이러한 측면들에 대한 보다 상세한 내용들은 아래에 제공된다.
- [0073] 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드에서 폴리펩타이드 결합 ($-\text{CO-NH-}$)이 치환된다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드 결합이 N-메틸화된 결합 ($-\text{N}(\text{CH}_3)\text{-CO-}$)으로 치환된다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드 결합이 에스테르 결합 ($-\text{C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$)으로 치환된다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드 결합이 케토메틸렌 결합 ($-\text{CO-CH}_2-$)으로 치환된다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드 결합이 R이 임의의 알킬, 예컨대, 메틸인 α -아자 결합 ($-\text{NH-N(R)-CO-}$), 카르바 결합 ($-\text{CH}_2\text{-NH-}$)으로 치환된다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드 결합이 하이드록시에틸렌 결합 ($-\text{CH(OH)-CH}_2-$)으로 치환된다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드 결합이 티오아미드 결합 ($-\text{CS-NH-}$)으로 치환된다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드 결합이 올레핀 이중 결합 ($-\text{CH=CH-}$)으로 치환된다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드 결합이 레트로 아미드 결합 ($-\text{NH-CO-}$)으로 치환된다. 일부 구현예들에서, 폴리펩타이드 결합이 R이 탄소 원자 상에 천연적으로 제시되는 "정상" 측쇄인 폴리펩타이드 유도체 ($-\text{N(R)-CH}_2\text{-CO-}$)로 치환된다. 일부 구현예들에서, 이들 변형들은 폴리펩타이드 체인을 따라 임의 결합부에서, 심지어 동시에 여러 곳 (2-3개의 결합)에서 이루어진다.
- [0074] 일부 구현예들에서, Trp, Tyr 및 Phe 등의 폴리펩타이드의 천연 방향족 아미노산은 폐닐글리신, TIC, 나프ти렐 아닌 (No1), Phe의 고리-메틸화된 유도체, Phe의 할로겐화된 유도체 또는 o-메틸-Tyr 등의 합성한 비-천연 산으로 치환된다. 일부 구현예들에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 하나 이상의 변형된 아미노산 또는 하나 이상의 비-아미노산 단량체들 (예, 지방산, 캠플렉스 탄수화물 등)을 포함한다.
- [0075] 일 구현예에서, "아미노산" 또는 "아미노산들"은 20개의 천연 아미노산; 예를 들어, 하이드록시프롤린, 포스포세린 및 포스포트레오닌 등의 생체내에서 번역 후 수정된 아미노산; 및 비제한적인 예로서, 2-아미노아디프산, 하이드록시라이신, 이소데스모신, 노르발린, 노르루신 및 오르니틴 등의 기타 특이 아미노산을 포함하는 것으로 이해된다. 일 구현예에서, "아미노산"은 D-아미노산 및 L-아미노산 둘다를 포함한다.
- [0076] 일부 구현예들에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 폴리펩타이드가 가용성 형태이어야 하는 치료제로 이용된다. 일부 구현예들에서, 본 발명의 폴리펩타이드는, 비제한적인 예로서, 하이드록시-함유 측쇄로 인해 폴리펩타이드의 용해성을 높일 수 있는, 세린 및 트레오닌 등의, 비-천연 또는 천연 극성 아미노산을 하나 이상 포함한다.
- [0077] 일부 구현예들에서, 당해 기술 분야의 당업자라면 환화가 CTP 특징으로 변형된 hGH를 심각하게 방해하지 않는 경우, 성장 호르몬의 사이클 형태들도 사용할 수 있다는 것을 알 것이지만, 본 발명의 CTP로 변형된 hGH를 포함하는 폴리펩타이드는 선형 형태로 이용된다.
- [0078] 일부 구현예들에서, 본 발명의 CTP로 변형된 hGH는 표준 고상 기법을 이용함으로써와 같이 생화학적으로 합성된다. 일부 구현예들에서, 이러한 생화학적 방법들로는 전용 고상 합성, 부분 고상 합성, 단편 축합 또는 고전적인 용액 합성을 포함한다. 일부 구현예들에서, 이들 방법은, 성장 호르몬이 상대적으로 짧거나 (약 5-15kDa) 및/또는 재조합 기법으로 제조할 수 없을 (즉, 핵산 서열에 의해 코딩되지 않는) 경우에, 사용되며, 따라서 다른 화학적 방법이 이용된다.
- [0079] 일부 구현예들에서, CTP에 의해 변형된 hGH의 고상 합성 공정은 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있으며, John Morrow Stewart and Janis Dillaha Young, Solid Phase Protein Syntheses (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984)에 추가로 기술되어 있다. 일부 구현예들에서, 합성 폴리펩타이드는 분취용 고성능 액체 크로마토그래피로 정제되며 [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.], 이의 조성은 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 방법들로 아미노산 서열 분석을 통해

검증할 수 있다.

[0080] 일부 구현예들에서, 재조합 단백질 기법이 본 발명의 CTP로 변형된 hGH를 제조하는데 사용된다. 일부 구현예들에서, 재조합 단백질 기법이 상대적으로 긴 (예, 아미노산 19-25개 보다 긴) 폴리펩타이드를 제조하는데 이용된다. 일부 구현예들에서, 재조합 단백질 기법들이 본 발명의 CTP로 변형된 hGH를 다량 제조하는데 사용된다. 일부 구현예들에서, 재조합 기법은 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 및 Brogli et al., (1984) Science 224:838-843, Gurley et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565 and Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463에 기술되어 있다.

[0081] 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 hGH는 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 이용하여 합성된다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 hGH를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, cis-조절 서열 (예, 프로모터 서열)의 전사 통제를 포함하는 발현 벡터로 삽입된다. 다른 구현예에서, cis-조절 서열은 본 발명의 성장 호르몬의 구성적인 발현을 지시하는데 적합한 것이다. 다른 구현예에서, cis-조절 서열은 본 발명의 CTP로 변형된 hGH의 조직 특이적인 발현을 지시하는데 적합한 것이다. 다른 구현예에서, cis-조절 서열은 본 발명의 CTP로 변형된 hGH의 유도성 발현을 지시하는데 적합한 것이다.

[0082] 다른 구현예에서, 본 발명에 사용하기 적합한 조직-특이적인 프로모터는 특정 세포 집단에서 기능하는 서열을 포함하며, 예컨대, 비제한적인 예로서, 간 특이적인 일부민 등의 프로모터 [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], 림프계 특이 프로모터 [Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]; 특히 T 세포 수용체 [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] 및 면역글로불린 [Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740]의 프로모터, 뉴로필라멘트 프로모터 [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477] 등의 뉴론-특이적인 프로모터, 체장-특이적인 프로모터 [Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] 또는 유청 프로모터 (미국 특허 4,873,316 및 유럽 출원 공개 번호 264,166) 등의 유선-특이적인 프로모터가 있다. 본 발명에 사용하기 적합한 유도성 프로모터는 예컨대 테트라사이클린-유도성 프로모터 (Srour, M.A., et al., 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405)를 포함한다.

[0083] 일 구현예에서, "폴리뉴클레오티드 분자"라는 표현은 RNA 서열, 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열 (cDNA), 게놈 폴리뉴클레오티드 서열 및/또는 컴포지트 폴리뉴클레오티드 서열 (예, 전술한 것의 조합)의 형태로 분리 및 제공되는, 단일 가닥 또는 이중 가닥의 핵산 서열을 지칭한다.

[0084] 일 구현예에서, "상보적인 폴리뉴클레오티드 서열"은 역전사효소 또는 임의의 다른 RNA 의존적인 DNA 중합효소를 이용하여 메신저 RNA의 역전사로부터 만들어지는 서열을 지칭한다. 일 구현예에서, 이 서열은 DNA 중합효소를 이용하여 이후에 생체내 또는 시험관내에서 증폭시킬 수 있다.

[0085] 일 구현예에서, "게놈 폴리뉴클레오티드 서열"은 염색체로부터 유래된 (분리된) 서열을 지칭하며, 염색체의 연속된 영역을 나타낸다.

[0086] 일 구현예에서, "컴포지트 폴리뉴클레오티드 서열"은 적어도 부분적으로 상보적이며 적어도 부분적으로 게놈인 서열을 지칭한다. 일 구현예에서, 컴포지트 서열은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 코딩하는데 필수적인 일부 엑손 서열 뿐만 아니라 그 사이에 있는 일부 인트론 서열을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 인트론 서열은 다른 유전자의 것을 비롯하여 임의의 소스의 것일 수 있으며, 전형적으로 보존된 스플라이싱 신호 서열을 포함할 것이다. 일 구현예에서, 인트론 서열은 cis로 작용하는 발현 조절 인자를 포함한다.

[0087] 다른 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 실시예 1에 기술된 PCR 기법 또는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 다른 방법 또는 공정을 이용하여 제조된다. 일부 구현예들에서, 상기 공정은 2개의 다른 DNA 서열들을 연결하는 단계를 포함한다 (예, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

[0088] 일 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현 벡터 (즉, 핵산 구조체)에 삽입하여, 재조합 폴리펩타이드를 발현시킬 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 이 벡터를 원핵 생물에서의 복제 및 병합 (integration)에 적합할 수 있도록 해주는 부가적인 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 이 벡터를 진핵 생물에서의 복제 및 병합에 적합할 수 있도록 해주는 부가적인 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는 이 벡터를 원핵 생물과 진핵 생물 둘다에서 복제 및 병합에 적합하게 하는 서틀 벡터를 포함한다. 다른 구현예에서, 클론닝 벡터는 전사 및 번역 개시 서열 (예, 프로모터, 인핸서) 및 전사 및

번역 종결인자 (예, 폴리아데닐화 신호)를 포함한다.

- [0089] 일 구현예에서, 다양한 원핵 생물 또는 진핵 생물 세포는 본 발명의 CTP로 변형된 hGH를 발현시키기 위한 숙주-발현 시스템으로서 사용될 수 있다. 일부 구현예들에서, 이러한 것으로는, 비제한적인 예로서, 미생물, 예컨대, 폴리펩타이드 코딩 서열을 포함하는, 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아; 폴리펩타이드 코딩 서열을 포함하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 폴리펩타이드 코딩 서열을 포함하는, 재조합 바이러스 발현 벡터(예, 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 토바코 모자이크 바이러스, TMV) 또는 Ti 플라스미드 등의 재조합 플라스미드 발현 벡터로 형질전환된 식물 세포 시스템을 포함한다.
- [0090] 다른 구현예에서, 본 발명의 성장 인자를 발현시키기 위해 비-박테리아성 발현 시스템 (예, CHO 세포 등의 포유류 발현 시스템)이 사용된다. 일 구현예에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포유류 세포에서 발현시키기 위해 사용되는 발현 벡터는, CMV 프로모터와 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 pCI-DHFR 벡터이다. pCI-dhfr 벡터의 구축은 실시예 1에서 일 실시예로 기술된다.
- [0091] 다른 구현예에서, 본 발명의 박테리아 시스템에서, 발현되는 폴리펩타이드에 대해 의도된 용도에 따라 다수의 발현 벡터들을 유리하게 선택될 수 있다. 일 구현예에서, 다량의 폴리펩타이드가 바람직하다. 일 구현예에서, 아마, 발현되는 산물을 박테리아의 원형질막 공간 (periplasm)으로 또는 단백질 산물이 쉽게 정제되는 배양 배지로 향하게 하는, 소수성 신호 서열과의 융합체로서, 단백질 산물을 높은 수준으로 발현되게 하는 벡터가 바람직할 것이다. 일 구현예에서, 특정 융합 단백질은 폴리펩타이드의 회수를 돋기 위해 특이적인 절단 부위를 구비하도록 조작된다. 일 구현예에서, 이러한 조작으로 개조가능한 벡터로는, *E. coli* 발현 벡터의 pET 시리즈가 있으나, 이로 한정되지 않는다 [Studier et al., Methods in Enzymol. 185:60-89 (1990)].
- [0092] 일 구현예에서, 효모 발현 시스템이 사용된다. 일 구현예에서, 구성적인 프로모터 또는 유도성 프로모터를 포함하는 다수의 벡터들이 미국 특허 출원 제 5,932,447호에 기술된 바와 같이 효모에 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 효모 염색체로의 외래 DNA 서열의 병합을 촉진시키는 벡터가 사용된다.
- [0093] 일 구현예에서, 본 발명의 발현 벡터는, 예컨대, 내부 리보좀 도입부 (IRES)와 같은 단일 mRNA 및 프로모터-카메라 폴리펩타이드의 계놈 병합을 위한 서열로부터 수종의 단백질 번역을 허용하는, 추가적인 폴리뉴클레오티드 서열들을 더 포함할 수 있다.
- [0094] 일부 구현예들에서, 포유류 발현 벡터로는, 인비트로겐 사로부터 입수가능한, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41 및 pNMT81, 프로메가 사로부터 입수가능한 pCI, 스트라테진 사로부터 입수가능한, pMbac, pPbac, pBKR-RSV 및 pBKR-CMV, 클론텍사로부터 입수가능한 pTRES, 및 이들의 유도체가 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0095] 다른 구현예에서, 본 발명에서는 레트로바이러스와 같이, 진핵 생물 바이러스 유래의 조절 인자를 포함하는 발현 벡터가 사용된다. SV40 벡터로는 pSVT7 및 pMT2가 있다. 일부 구현예들에서, 소 파필로마 바이러스 유래 벡터로는 pBV-1MTHA가 있으며, 엡스타인 바 바이러스 유래의 바이러스로는 pHEBO 및 p205가 있다. 다른 예시적인 벡터로는, pMSG, pAV009/A⁺, pMT010/A⁺, pMAMneo-5, 베쿨로바이러스 pDSVE, 및 SV-40 초기 프로모터, SV-40 후기 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 뮤라인 유방암 바이러스 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 폴리헤드린 프로모터 또는 진핵 생물 세포에서의 발현에 유효한 것으로 입증된 그외 프로모터의 지시 하에, 단백질의 발현을 허용하는, 임의의 다른 벡터를 포함한다.
- [0096] 다른 구현예에서, 재조합 바이러스 벡터는 측면 감염(lateral infection) 및 타겟팅 특이성과 같은 이점을 제공하기 때문에, 본 발명의 CTP로 변형된 GH를 생체내 발현시키는데 사용가능하다. 일 구현예에서, 측면 감염은 예컨대 레트로바이러스의 생활 주기에 내재되어 있으며, 감염된 단일 세포가 출아되어 이웃한 세포를 감염하는 자손 비리온을 만들어내는 프로세스이다. 다른 구현예에서, 그 결과 거대 면적이 급속도로 감염되며, 대부분은 처음에 오리지널 바이러스 입자로 감염되지 않았다. 일 구현예에서, 옆으로 전파할 수 없는 바이러스 벡터가 제조된다. 다른 구현예에서, 이러한 특징은, 원하는 목적이 국한된 수의 타겟 세포에만 특정된 유전자를 도입하고자 하다면, 유용할 수 있다.
- [0097] 다른 구현예에서, 다양한 방법을 이용하여, 본 발명의 발현 벡터를 세포내로 도입할 수 있다. 이러한 방법들은 일반적으로 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in 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) 및 Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]에 기술되어 있으며, 예컨대, 안정적인 또는 일시적인 형질감염, 리포렉션, 전기천공 및 재조합 바이러스 벡터로의 감염을 포함한다. 또한, 파지티브-네거티브 선별 방법에 대해 미국 특허 5,464,764 및 5,487,992를 참조한다.

[0098] 다른 구현예에서, 바이러스 감염을 통한 핵산의 도입은, 바이러스의 감염 특성으로 인해 보다 높은 형질감염 효율을 달성할 수 있기 때문에, 리포렉션 및 전기천공 등의 다른 방법들에 비해 몇가지 이점을 제공해준다.

[0099] 일 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 GH가, 또한 전술한 임의의 적합한 투여 방식 (즉, 생체내 유전자 요법)을 채택하여 개체에게 투여되는 핵산 구조체로부터 발현될 수 있음을 자명할 것이다. 일 구현예에서, 핵산 구조체를, 적절한 유전자 전달 비히클/방법 (형질감염, 형질전이, 상동성 재조합 등)과 필요에 따라서는 발현 시스템을 통해 적절한 세포로 도입한 후, 변형된 세포를 배양을 통해 증폭시키고 개체에게로 다시 회귀시킨다 (즉, 생체외 유전자 요법).

[0100] 일 구현예에서, 성장 호르몬을 이용한 생체내 유전자 요법은 동물 모델들에서 수행된 바 있다.

[0101] 일 구현예에서, 식물 발현 벡터를 이용한다. 일 구현예에서, 폴리펩타이드 코딩 서열의 발현은 다수의 프로모터에 의해 구동된다. 일부 구현예들에서, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터들 [Brinson et al., Nature 310:511-514 (1984)], 또는 TMV의 막 단백질 프로모터 [Takamatsu et al., EMBO J. 6:307-311 (1987)] 등의 바이러스 프로모터가 사용된다. 다른 구현예에서, 예컨대, RUBISCO의 소형 서브유닛 [Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1680 (1984); 및 Brogli et al., Science 224:838-843 (1984)] 또는 열 충격 프로모터, 예컨대 soybean hsp17.5-E 또는 hsp17.3-B [Gurley et al., Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986)]와 같은 식물 프로모터들이 사용된다. 일 구현예에서, 구조체는 Ti 플라스미드, Ri 플라스미드, 식물 바이러스 벡터, DNA의 직접 형질전환, 미세주입, 전기천공 및 그외 당업자에게 잘 공지된 기법을 이용하여 식물 세포로 도입된다. 예로, Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 (1988)]를 참조한다. 곤충 및 포유류 숙주 세포 시스템과 같이 당해 기술 분야에 잘 공지된 다른 발현 시스템들도 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0102] 삽입된 코딩 서열 (폴리펩타이드 코딩 서열)의 전사 및 번역에 필수적인 요소를 포함하는 것 이외에도, 본 발명의 발현 구조체는 또한 발현된 폴리펩타이드의 안정성, 생산, 정제, 수율 또는 활성을 최적화하도록 조작된 서열을 포함할 수 있음을 자명할 것이다.

[0103] 일부 구현예들에서, 숙주 세포 시스템에 본 발명의 발현 벡터를 도입하기 위해 다양한 방법들이 사용될 수 있다. 일부 구현예들에서, 이러한 방법들은 일반적으로 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), in 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) 및 Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986]에 기술되어 있으며, 예컨대 안정적인 또는 일시적인 형질감염, 리포렉션, 전기천공 및 재조합 바이러스 벡터에 의한 감염을 포함한다. 또한, 파지티브-네거티브 선별 방법에 대해 미국 특허 5,464,764 및 5,487,992를 참조한다.

[0104] 일 구현예에서, 형질전환된 세포는, 재조합 폴리펩타이드를 다량 발현시킬 수 있는, 유효 조건 하에 배양된다. 다른 구현예에서, 유효 배양 조건은, 비제한적인 예로서, 단백질 생산을 혀용하는 유효 배지, 생물반응기, 온도, pH 및 산소 조건을 포함한다. 일 구현예에서, 유효 배지는 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 생산하기 위해 세포를 배양하는, 모든 배지를 지칭한다. 다른 구현예에서, 배지는 전형적으로 동화가능한 탄소원, 질소원 및 인원, 및 적절한 염, 미네랄, 금속 및 비타민 등의 그외 영양분을 포함하는 수계 용액이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 세포는 기존의 발효 생물반응기, 교반 플라스크, 시험관, 마이크로타이터 디쉬 및 페트리 플레이트에서 배양할 수 있다. 다른 구현예에서, 배양은 재조합 세포에게 적합한 온도, pH 및 산소 함유율 조건에서 수행된다. 다른 구현예에서, 배양 조건은 당해 기술 분야의 당업자의 지식내에 포함된다.

[0105] 다른 구현예에서, 생산에 사용되는 벡터 및 숙주 시스템에 따라, 본 발명의 제조되는 성장 인자는 재조합 세포 안에 체류하거나, 발효 배지로 분비되거나, *E. coli*와 같이 페리플라스믹 공간 등의 2개의 세포막 사이 공간으로 분비되거나, 또는 세포나 바이러스의 막의 외부 표면 상에 유지된다.

- [0106] 일 구현예에서, 소정의 시간동안 배양한 후, 재조합 폴리펩타이드를 회수한다.
- [0107] 일 구현예에서, "재조합 폴리펩타이드의 회수"라는 표현은 본원에서 폴리펩타이드를 함유한 전체 발현 배지를 수집하는 것을 지칭하며, 추가적인 분리 또는 정제 단계를 내포하지 않을 수 있다.
- [0108] 일 구현예에서, 본 발명의 성장 호르몬은, 비제한적인 예로서, 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 여과, 전기영동, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 겔 여과 크로마노그래피, 역상 크로마토그래피, 콘카나 발린 A 크로마토그래피, 크로마토포커싱 및 차별적인 가용화 등의 다양한 단백질 정제 표준 기법을 이용하여 정제된다.
- [0109] 일 구현예에서, 용이한 회수를 위해, 발현된 코딩 서열은 본 발명의 폴리펩타이드 및 융합된 절단성 모이어티를 코딩하도록 조작될 수 있다. 일 구현예에서, 융합 단백질은, 폴리펩타이드가 친화성 크로마토그래피, 예컨대 절단가능한 모이어티에 대해 특이적인 컬럼 상에서의 고정화에 의해 쉽게 분리될 수 있도록, 설계될 수 있다. 일 구현예에서, 절단 부위는 폴리펩타이드와 절단가능한 모이어티 사이에 위치되게 조작되며, 폴리펩타이드는 그 부위에서 융합 단백질을 특이적으로 절단시키는 적정 효소나 제제 처리에 의해 크로마토그래피 컬럼으로부터 분리시킬 수 있다 [예, Booth *et al.*, Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); 및 Gardella *et al.*, J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].
- [0110] 일 구현예에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 "실질적으로 순수한" 형태로 회수된다.
- [0111] 일 구현예에서, "실질적으로 순수한"이라는 표현은 본원에 기술된 용도로 단백질을 효과적으로 사용할 수 있는 순도를 지칭한다.
- [0112] 일 구현예에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 또한 시험관내 발현 시스템을 이용하여 합성할 수 있다. 일 구현예에서, 시험관내 합성 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 시스템의 구성들은 상업적으로 입수가능하다.
- [0113] 일 구현예에서, CTP 변형된 GH 생산은 재조합 DNA 기법을 이용하여 수행된다.
- [0114] 다른 구현예에서, 재조합 폴리펩타이드를 합성 및 정제하고, 이의 치료학적 효능을 생체내 또는 시험관내에서 분석할 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 재조합 GH의 결합 활성은 다양한 분석을 이용하여 확인할 수 있다.
- [0115] 일 구현예에서, 본 발명은 CTP-hGH-CTP-CTP 폴리펩타이드를 포함한다. 일 구현예에서, 재조합 DNA 기법들은 실시예 1에 예시된 바와 같이 CTP-hGH-CTP-CTP 폴리펩타이드들을 제조하는데 사용된다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP-hGH-CTP-CTP 폴리펩타이드의 치료학적 효과는 생체내에서 평가된다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP-hGH-CTP-CTP 폴리펩타이드의 치료학적 효과는 시험관내에서 평가된다. 일 구현예에서, 본 발명의 재조합 hGH 폴리펩타이드의 결합 활성은, 사전에 인간 성장 호르몬 수용체로 형질감염시킨, Nb2 (프로락틴-의존형 랫 텁프 종 세포주 (ECACC 세포은행)) 또는 FCD-P1 뮤라인 세포주를 이용하여 측정된다. 일 구현예에서, 이를 수용체로의 hGH의 결합은, 일 구현예에서, hGH 활성의 함수로서 MTT 세포 염색 수준에 의해 측정되는, 세포 증식을 유도한다. 일 구현예에서, 생체내 활성은 치료받은 성장 호르몬 결핍 동물에서 경시적으로 체중 증가를 측정함으로써 추정된다.
- [0116] 일 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀의 카르복시 말단 웨타이드 (CTP) 하나, 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 개체에서 성장 또는 체중 증가가 유도되는, 개체에서 성장 또는 체중 증가를 유도하는 방법을 제공한다.
- [0117] 다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 개체에서 성장이 유도되는, 인간 개체의 성장을 유도하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 상기 인간 개체는 청소년이다. 다른 구현예에서, 상기 인간 개체는 어린이이다. 다른 구현예에서, 상기 인간 개체는 GH-결핍성 어린이다.
- [0118] 다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 융모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 개체에서 체중 증가가 유도되는, 인간 개체에서 체중 증가를 유도하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 상기 인간 개체는 청소년이다. 다른 구현예에서, 상기 인간 개체는 어린이이다. 다른 구현예에서, 상기 인간 개체는 GH-결핍성

어린이다.

[0119] 다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 개체에서 체중 감소 또는 체지방 감소가 유도되는, 인간 개체에서 체중 감소 또는 체지방 감소를 유도하는 방법을 제공한다. 일 구현 예에서, 상기 개체는 비만이다. 다른 구현예에서, 상기 개체는 과체중이다. 다른 구현예에서, 상기 개체는 성인이다. 다른 구현예에서, 상기 인간 개체는 GH-결핍성 성인이다.

[0120] 다른 구현예에서, 본 발명은, 개체의 지방 축적을 낮추는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 개체에서 균량을 높이는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 개체에서 균육 성장을 촉진하는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 상기 개체는 성인이다. 다른 구현예에서, 상기 인간 개체는 GH-결핍성 성인이다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 균육/지방 비율을 높이는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 체질량 지수 (BMI) 또는 케틀레 지수 (Quetelet index)를 낮추는 방법을 제공한다.

[0121] 다른 구현예에서, 본 발명은 본원에 기술된 CTP로 변형된 성장 호르몬을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 개체에서 성장을 유도하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, CTP-변형된 성장 호르몬은 개체에 직접 투여되며, 다른 구현예로, 상기 CTP-변형된 성장 호르몬을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 공지 부형제, 공지 비허를 및 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드 (CTP) 하나와 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드 2개를 포함하는 폴리펩타이드로 구성된 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 개체에서 성장을 유도하는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명은, 공지 부형제, 공지 비허를 및 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드 (CTP) 하나와 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 웨타이드 2개로 구성된 폴리펩타이드로 구성된 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 개체에서 성장을 유도하는 방법을 제공한다.

[0122] 다른 구현예에서, 성장은 체중 증가로 측정된다. 다른 구현예에서, 성장은 키 증가로 측정된다. 다른 구현예에서, 성장은 체중 증가로 측정된다. 다른 구현예에서, 성장은 균량 증가로 측정된다. 다른 구현예에서, 성장은 체중 증가로 측정된다. 다른 구현예에서, 성장은 골량 증가로 측정된다. 다른 구현예에서, 성장은 체중 증가로 측정된다. 다른 구현예에서, 성장은 지방 증가로 측정된다. 다른 구현예에서, 성장은 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 방법으로 측정된다. 다른 구현예에서, 성장을 측정하는 개체는 어린이이다. 다른 구현예에서, 성장을 측정하는 개체는 GH-결핍성 어린이이다.

[0123] 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 0.1-5 ml 용액 중의 1-90 μg 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 0.1-5 ml 용액 중의 1-50 μg 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 0.1-5 ml 용액 중의 1-25 μg 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 0.1-5 ml 용액 중의 50-90 μg 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 0.1-5 ml 용액 중의 10-50 μg 용량으로 투여된다.

[0124] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 0.1-5 ml 용액 중의 1-90 μg 용량으로 근육내 (IM) 주입, 피하 (SC) 주입, 또는 정맥내 (IV) 주입으로 주당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 0.1-5 ml 용액 중의 1-90 μg 용량으로 근육내 (IM) 주입, 피하 (SC) 주입, 또는 정맥내 (IV) 주입으로 주당 2회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 0.1-5 ml 용액 중의 1-90 μg 용량으로 근육내 (IM) 주입, 피하 (SC) 주입, 또는 정맥내 (IV) 주입으로 주당 3회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 0.1-5 ml 용액 중의 1-90 μg 용량으로 근육내 (IM) 주입, 피하 (SC) 주입, 또는 정맥내 (IV) 주입으로 2주 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 0.1-5 ml 용액 중의 1-90 μg 용량으로 근육내 (IM) 주입, 피하 (SC) 주입, 또는 정맥내 (IV) 주입으로 17일 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 0.1-5 ml 용액 중의 1-90 μg 용량으로 근육내 (IM) 주입, 피하 (SC) 주입, 또는 정맥내 (IV) 주입으로 19일 당 1회로 투여된다.

[0125] 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 GH와 같이 분자량이 50,000 달톤 보다 낮은 단백질 약물은 일반적으로 생체내에서 수명이 짧은 종이며, 수시간의 짧은 순환성 반감기를 가진다. 다른 구현예에서, 일반적으로 피하 투여 경로는 순환계로의 좀더 느린 방출을 제공한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 변형된 폴리펩타이드

는 GH와 같이 분자량이 50,000 달톤 보다 낮은 단백질 약물의 반감기를 연장시킨다. 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP 변형된 폴리펩타이드는 보다 장기간 동안 GH가 유익한 효과를 발휘하게 할 수 있다.

[0126] 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH를 포함하는 CTP 변형된 폴리펩타이드의 면역원성은 분리된 GH와 동일하다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH를 포함하는 CTP 변형된 폴리펩타이드의 면역원성은 분리된 GH와 비슷하다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같이 CTP 펩타이드를 이용한 GH 변형은 GH의 면역원성을 낮춘다. 다른 구현예에서, GH를 포함하는 CTP 변형된 폴리펩타이드는 분리된 GH 단백질과 같이 활성을 나타낸다. 다른 구현예에서, GH를 포함하는 CTP 변형된 폴리펩타이드는 분리된 GH 보다 활성이 높다. 다른 구현예에서, GH를 포함하는 CTP 변형된 폴리펩타이드는 생활성의 저하는 최소화되고 성장 호르몬의 보호력은 최대화된다.

[0127] 다른 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 GH는 그대로 개체에게 제공된다. 일 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 GH는 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합되는 약학 조성물의 일부로서 개체에게 제공될 수 있다.

[0128] 다른 구현예에서, "약학 조성물"은 생리학적으로 적합한 담체 및 부형제 등의 다른 화학 성분과 본원에 기술된 활성 성분 하나 이상으로 구성된 조제물을 지칭한다. 약학 조성물의 목적은 유기체에 화합물의 투여를 쉽게 하기 위한 것이다.

[0129] 다른 구현예에서, "활성 성분"은 생물학적 효과를 담당하는 대상 폴리펩타이드 서열을 지칭한다.

[0130] 일 구현예에서, 본 발명은 조합된 조제물 (combined preparation)을 제공한다. 일 구현예에서, "조합된 조제물"은, 전술한 조합 파트너를 독립적으로 투여하거나, 또는 상당량의 조합 파트너와의 여러가지 고정된 조합물들을 예를 들어, 동시에, 공동으로, 개별적으로 또는 순차적으로 사용함으로써 투여하는 의미에서, 특히 "부품 키트(kit of parts)"로 규정된다. 다른 구현예에서, 이후, 부품 키트의 구성 요소들을, 예컨대 동시에, 또는 연대적 시차적으로 (chronologically staggered), 즉, 여러가지 시간대에, 부품 키트를 구성하는 임의 구성 요소에 대해 동일한 또는 상이한 시간 간격으로 투여할 수 있다. 조합 파트너들의 총량 비율을 조합된 조제물로 투여할 수 있다. 조합된 조제물은, 예컨대, 당해 기술 분야의 당업자에게 자명할 수 있는 바와 같이, 치료할 환자 서브개체군의 요구, 또는 특정 질환, 질환의 중증도, 연령, 성별 또는 체중에 따라 차이가 필요한 단일 환자의 요구를 처리하기 위해, 다변화될 수 있다.

[0131] 다른 구현예에서, "생리적으로 허용가능한 담체" 및 "약제학적으로 허용가능한 담체"라는 표현은 상호 호환적으로 유기체에 유의한 자극을 야기하지 않으며, 투여된 화합물의 생물 활성 및 특성을 방해하지 않는 담체 또는 희석제를 지칭한다. 보강제도 이러한 표현에 포함된다. 일 구현예에서, 약제학적으로 허용가능한 담체에 포함되는 성분들 중 한 가지는, 예컨대 유기 매질과 수성 매질 둘다에 광범위한 용해성을 가진 생체친화적인 폴리머인 폴리에틸렌 글리콜(PEG)일 수 있다 (Mutter et al. (1979)).

[0132] 다른 구현예에서, "부형제"는 활성 성분의 투여를 더욱 쉽게 할 수 있도록 하기 위해 약학 조성물에 첨가되는 비활성 물질을 지칭한다. 일 구현예에서, 부형제는 칼슘 카보네이트, 칼슘 포스페이트, 다양한 당류 및 전분 타입들, 셀룰로스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.

[0133] 약물의 제형화 및 투여 기법들은 "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition에서 찾아볼 수 있으며, 이 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0134] 다른 구현예에서, 적정 투여 경로는, 예컨대, 경구, 직장, 경점막, 경비, 장 또는 비경구 전달, 예컨대 근육내, 피하 및 골수강내(intramedullary) 주입 뿐만 아니라 척수강내(intrathecal), 직접 뇌실내(intraventricular), 정맥내, 복막내, 코내 또는 안내 주입을 포함한다.

[0135] 다른 구현예에서, 조제물은 전신 방식 보다는 국소로, 예컨대 환자 신체의 특정 부위에 직접 조제물을 주입함으로써 국소로 투여된다.

[0136] 본 발명은 다양한 용량 범위의 구현예들을 포함한다. 본 발명의 CTP로 변형된 GH의 투여량은, 일 구현예에서, 0.005-100 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.005-5 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.01-50 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.1-20 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.1-10 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.01-5 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.001-0.01 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.001-0.1 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.1-5 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.5-50 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.2-15 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.8-65 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-50 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 5-10 mg/day의 범위

이다. 다른 구현예에서, 투여량은 8-15 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-20 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 20-40 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 60-120 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 12-40 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 40-60 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 50-100 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-60 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 15-25 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 5-10 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 55-65 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-5 mg/day의 범위이다.

[0137] 본 발명의 CTP로 변형된 GH의 투여량은, 일 구현예에서, 0.005-100 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.005-5 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.01-50 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.05-7.2 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.05-7.2 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.05-7.2 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.1-20 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.1-10 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.01-5 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.001-0.01 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.001-0.1 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.1-5 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.5-50 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.2-15mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.26-10.7mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.8-65 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-50 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 5-10 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 8-15 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-20 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 20-40 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 60-120 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 12-40 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 40-60 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 50-100mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-60 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 15-25 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 5-10 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 55-65 mg/week의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-5 mg/week의 범위이다.

[0138] 다른 구현예에서, 개체에 세 제공되는 GH 투여량은 동일 개체 집단 (예, 어린이, 노인층, 남성, 여성, GH 결핍, 특정 민족 등)의 기준 개체에게 제공되는 표준 투여량의 50%이다. 다른 구현예에서, 투여량은 특정 개체 집단의 개체에게 제공되는 투여량의 30%이다. 다른 구현예에서, 투여량은 특정 개체 집단의 개체에게 제공되는 투여량의 45%이다. 다른 구현예에서, 투여량은 특정 개체 집단의 개체에게 제공되는 투여량의 100%이다.

[0139] 다른 구현예에서, 투여량은 1-5 mg/week이다. 다른 구현예에서, 투여량은 2 mg/week이다. 다른 구현예에서, 투여량은 4 mg/week이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1.2 mg/week이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1.8 mg/week이다. 다른 구현예에서, 투여량은 대략 본원에 기술된 투여량이다.

[0140] 다른 구현예에서, 투여량은 1-5 mg/투여이다. 다른 구현예에서, 투여량은 2 mg/투여이다. 다른 구현예에서, 투여량은 4 mg/투여이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1.2 mg/투여이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1.8 mg/투여이다. 일 구현예에서, 조성물은 주 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, 조성물은 2주 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, 조성물은 매달 투여된다. 다른 구현예에서, 조성물은 매일 투여된다.

[0141] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH는 코내 투약 형태 (dosage form)로 제형화된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH는 주사용 투약 형태로 제형화된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH는 0.0001 mg - 0.6 mg 범위의 용량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH는 개체에게 0.001 mg - 0.005 mg 범위의 용량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH는 개체에게 0.005 mg - 0.01 mg 범위의 용량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH는 개체에게 0.01 mg - 0.3 mg 범위의 용량으로 개체에게 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 0.2 mg - 0.6 mg 범위의 용량으로 개체에게 투여된다.

[0142] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH는 개체에게 1-100 μ g 범위의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 10-80 μ g 범위의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 20-60 μ g 범위의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 10-50 μ g 범위의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 40-80 μ g 범위의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 10-30 μ g 범위의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 30-60 μ g 범위의 용량으로 투여된다.

[0143] 다른 구현예에서, CTP로 변형된 GH는 개체에게 0.2 mg - 2 mg 범위의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서,

CTP 변형된 GH는 개체에게 2 mg - 6 mg 범위의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 4 mg - 10 mg 범위의 용량으로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 5 mg - 15 mg 범위의 용량으로 투여된다.

[0144] 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 근육으로 주입된다 (근육내 주입). 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 피부 아래에 주입된다 (피하 주입). 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 근육으로 주입된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 피부 아래에 주입된다.

[0145] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은, CTP 변형된 GH를 필요로 하는 개체에게 제공하는 단계를 포함하며, 이로써, 성장 호르몬 요법 사용에 대한 순응성을 높이는, GH 요법의 사용 순응성을 높이는 방법을 포함한다.

[0146] 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 GH 요법이 필요한 만성 질환을 앓고 있는 환자의 순응성 증가를 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 전술한 바와 같이 CTP로 GH를 변형함으로써 투여 빈도를 낮출 수 있다. 다른 구현예에서, 용어 순응성은 충실성을 포함한다. 다른 구현예에서, 본 발명의 방법은 GH의 투여 빈도를 줄임으로써 GH 요법을 필요로 하는 환자의 순응성을 높이는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, GH의 투여 빈도 감소는 CTP 변형된 GH를 보다 안정적이게 만드는 CTP 변형을 통해 달성된다. 다른 구현예에서, GH의 투여 빈도 감소는 성장 호르몬의 T1/2 증가의 결과로서 달성된다. 다른 구현예에서, GH의 투여 빈도 감소는 GH의 소거 시간 증가의 결과로서 달성된다. 다른 구현예에서, 성장 호르몬의 투여 빈도 감소는 성장 호르몬의 AUC 측정치 증가의 결과로서 달성된다.

[0147] 따라서, 다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬의 아미노 말단에 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드 하나와, 성장 호르몬의 카르복시 말단에 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드 2개를 부착하는 단계를 포함하며, 이로써 성장 호르몬의 곡선 하 면적 (AUC)을 개선시키는, 성장 호르몬의 곡선 하 면적 (AUC)을 개선시키는 방법을 추가로 제공한다.

[0148] 이에, 다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬의 아미노 말단에 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드 하나와, 성장 호르몬의 카르복시 말단에 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드 2개를 부착하는 단계를 포함하며, 이로써 성장 호르몬의 투여 빈도를 낮추는, 성장 호르몬의 투여 빈도를 낮추는 방법을 추가로 제공한다.

[0149] 즉, 다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 개체에게 제공하는 단계를 포함하며, 이로써 성장 호르몬 요법의 사용 순응도를 높이는, 성장 호르몬의 사용 순응도를 높이는 방법을 제공한다.

[0150] 다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 상기 개체에서 IGF-1 수준을 높이는, 인간 개체에서 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-1) 수준을 높이는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, IGF-1 수준을 높이는 방법은 아래 실시예 6에 제공된다.

[0151] 다른 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 IGF-1 수준을 개체에서 바람직한 치료학적 범위로 증가시키는, 인간 개체에서 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-1) 수준을 바람직한 치료학적 범위로 높이는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 상기 개체는 성인이다. 다른 구현예에서, 상기 인간 개체는 GH-결핍성 성인이다. 다른 구현예에서, 인간 개체는 정상 성인이다. 다른 구현예에서, IGF-1 수준을 바람직한 치료학적 수준으로 높이는 방법은 아래 실시예 9에 제공된다.

[0152] 일 구현예에서, 본 발명은, 성장 호르몬, 성장 호르몬의 아미노 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 카르복시 말단 펩타이드 (CTP) 하나 및 성장 호르몬의 카르복시 말단에 부착된 용모막성 고나도트로핀 CTP 2개를 포함하는 폴리펩타이드를 치료학적 유효량으로 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 이로써 개체에서 IGF-1 수준을 정상 치료학적 범위로 유지하는, 인슐린 유사 성장 인자 (IGF-1) 수준을 정상 치료학적 범위로 개체에서 유지하는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, IGF-1 수준을 정상 치료학적 범위로 유지하는 방법은 아래 실시예 9에 제공된다.

[0153] 일 구현예에서, 인간 개체에서의 IGF-1의 수준 증가는, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 근위축성 측색경화증

(amyotrophic lateral sclerosis) (ALS aka "Lou Gehrig's Disease"), 중증 화상 및 근긴장성 이영양증 (MMD)을 치료, 예방 또는 억제하는데 효과적일 수 있다. 다른 구현예에서, 인간 개체에서 IGF-1 수준의 정상 치료학적 범위로의 증가는, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 근위축성 측색경화증 (ALS aka "Lou Gehrig's Disease"), 중증 화상 및 근긴장성 이영양증 (MMD)을 치료, 예방 또는 억제하는데 효과적일 수 있다.

[0154] 일 구현예에서, 바람직한 치료학적 범위는, 아래에 추가로 제시된 바와 같이 (실시예 9 참조), 연령 그룹 및 성별로 계층화된, 정상 집단에서 예상되는 평균 IGF-1 수준으로부터 +/- 2 표준편차 내지 -2 표준편차로서 정의된다. 아울러, 실험에서는, 정상 범위에 속하는 환자들의 차이를 관찰하기 위한 목적으로, 표준편차 +/-1.5의 좁은 범위내에서 IGF-1 수준을 측정한다.

[0155] 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 1일 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH를 포함하는 폴리펩타이드는 개체에게 2일 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 3일 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 4일 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 5일 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 6일 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 주당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 7-14일 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 10-20일 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 5-15일 당 1회로 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 개체에게 15-30일 당 1회로 투여된다.

[0156] 다른 구현예에서, 투여량은 50-500 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 50-150 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 100-200 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 150-250 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 200-300 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 250-400 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 300-500 mg/day의 범위이다. 다른 구현예에서, 투여량은 350-500 mg/day의 범위이다.

[0157] 일 구현예에서, 투여량은 20 mg/day이다. 일 구현예에서, 투여량은 30 mg/day이다. 일 구현예에서, 투여량은 40 mg/day이다. 일 구현예에서, 투여량은 50 mg/day이다. 일 구현예에서, 투여량은 0.01 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.1 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.530 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 0.05 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 50 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 20-70 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 5 mg/day이다.

[0158] 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/2 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/3 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/4 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/5 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/6 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/week이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/9 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/11 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 1-90 mg/14 day이다.

[0159] 다른 구현예에서, 성장 호르몬 투여량은 10-50 mg/day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/2 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/3 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/4 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/5 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/6 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/week이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/9 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/11 day이다. 다른 구현예에서, 투여량은 10-50 mg/14 days이다.

[0160] 경구 투여는, 일 구현예에서, 정제, 캡슐제, 로젠제 (lozenges), 씹어먹는 정제, 혼탁제, 에멀젼제 등을 포함하는 단위 투약 형태를 포함한다. 이러한 단위 투약 형태는 본 발명의 바람직한 성장 호르몬을 안전하고 유효한 양으로 포함하며, 이를 각각이 일 구현예에서, 약 0.7 또는 3.5 mg - 약 280 mg/70 kg이고, 또는 다른 구현예에서, 약 0.5 또는 10 mg - 약 210 mg/70 kg이다. 경구 투여를 위한 단위 투약 형태를 제조하는데 적합한 약제학적으로 허용가능한 담체는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 일부 구현예들에서, 정제는 통상적으로 칼슘 카보네이트, 소듐 카보네이트, 만니톨, 락토스 및 셀룰로스 등의 비활성 희석제; 전분, 젤라틴 및 슈크로스 등의 결합제; 전분, 알긴산 및 크로스카멜로스 등의 봉해제; 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 및 탈크 등의 윤활제와 같이 통상적인 약제학적으로 허용가능한 보강제를 포함한다. 일 구현예에서, 분말-혼합물의 유동 특징을 개선시키기 위해 실리콘 다이옥사이드 등의 유동성 개선제(glidant)가 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 착색제, 예컨대 FD&C 염료를 외양을 위해 첨가할 수 있다. 아스파르탐, 사카린, 멘톨, 페퍼민트 및 과일향과 같은 감미제 및 향제를 씹어먹는 정제에 사용가능한 보강제이다. 캡슐제는 전형적으로 전술한 하나 이상의 고

형 희석제를 포함한다. 일부 구현예들에서, 담체 성분의 선택은, 본 발명의 목적에 있어 중요한 것은 아니지만, 맛, 비용 및 저장 안정성과 같은 부차적인 고려 사항에 따라 결정되며, 당해 기술 분야의 당업자라면 용이하게 실시할 수 있다.

[0161] 일 구현예에서, 경구 투약 형태는 소정의 방출 프로파일을 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 경구 투약 형태는 지속 방출 정제(extended release tablet), 캡슐제, 로젠제 또는 씹어 먹는 정제를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 경구 투약 형태는 서방형 정제, 캡슐제, 로젠제 또는 씹어 먹는 정제를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 경구 투약 형태는 즉시 방출 정제, 캡슐제, 로젠제 또는 씹어 먹는 정제를 포함한다. 일 구현예에서, 경구 투약 형태는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지된 바와 같이 약학 활성 성분의 원하는 방출 프로파일에 따라 제형화된다.

[0162] 경구 조성물 (Peroral composition)은, 일부 구현예들에서, 액체 용액, 에멀젼제, 혼탁제 등을 포함한다. 일부 구현예들에서, 이러한 조성물을 제조하는데 적합한 약제학적으로 허용가능한 담체들은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 일부 구현예들에서, 액체 경구 조성물은 바람직한 화합물 또는 화합물들을 약 0.001% 내지 약 0.933%, 또는 다른 구현예에서, 약 0.01% 내지 약 10 %로 포함한다.

[0163] 일부 구현예들에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물은 용액 또는 에멀젼제이며, 일부 구현예들에서는 본 발명의 화합물의 안전한 유효량과, 선택적으로 국소 코내 투여용으로 의도된 그외 화합물을 포함하는, 수계 용액 또는 에멀젼제를 포함한다. 일부 구현예들에서, 조성물은 CTP 변형된 GH Hong 약 0.001% 내지 약 10.0% w/v로, 더 바람직하게는, 약 00.1% 내지 약 2.0로 포함하며, 이는 코내 경로로 화합물을 전신 전달하기 위해 사용된다.

[0164] 다른 구현예에서, 약학 조성물은 액체 조제물의 정맥내, 동맥내 또는 근육내 주입에 의해 투여된다. 일부 구현예들에서, 액체 제형은 용액제, 혼탁제, 분산제, 에멀젼제, 오일제 등을 포함한다. 일 구현예에서, 약학 조성물은 정맥내로 투여되며, 따라서 이는 정맥내 투여에 적합한 형태로 제형화된다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 동맥내로 투여되며, 따라서 이는 동맥내 투여에 적합한 형태로 제형화된다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 근육내로 투여되며, 따라서 이는 근육내 투여에 적합한 형태로 제형화된다.

[0165] 추가적으로, 다른 구현예에서, 약학 조성물은 신체 표면에 국소 투여되며, 따라서 이는 국소 투여에 적합한 형태로 제형화된다. 적합한 국소 제형으로는 젤제, 연고제, 크림제, 로션제, 점액제 등이 있다. 국소 투여를 위해, 본 발명의 화합물은, 약제학적 담체가 첨가 또는 무첨가된, 생리적으로 허용가능한 희석제 중의 용액제, 혼탁제 또는 에멀젼제로서 제조 및 적용되는, 추가적인 적정 치료학적 제제 또는 제제들과 조합된다.

[0166] 일 구현예에서, 본 발명의 약학 조성물은 당해 기술 분야에 공지된 프로세스들, 예컨대 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정-제조, 레비게이션 (levigating), 에멀젼화, 캡슐화, 포집화 (entrapping) 또는 동결건조 프로세스의 수단에 의해 제조된다.

[0167] 일 구현예에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학 조성물은, 약제학적으로 사용될 수 있는 조제물로 활성 성분들을 가공하는 과정을 돋는, 부형제 및 보조제를 포함하는, 하나 이상의 생리학적으로 허용가능한 담체를 이용하여, 통상적인 방식으로 제형화된다. 일 구현예에서, 제형은 선택한 투여 경로에 따라 결정된다.

[0168] 일 구현예에서, 본 발명의 주사제 (injectable)는 수용액으로 제형화된다. 일 구현예에서, 본 발명의 주사제는 행크 용액, 링거 용액 또는 생리 염 완충액 등의 생리적으로 친화적인 완충액 중에서 제형화된다. 일부 구현예들에서, 경점막 투여를 위해, 침투할 장벽에 적합한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당해 기술 분야에 공지되어 있다.

[0169] 일 구현예에서, 본원에 기술된 조제물은 비경구 투여용으로, 예컨대 볼루스 주입 또는 연속 주입에 의한 투여용으로 제형화된다. 일부 구현예들에서, 주입용 제형은, 단위 투약 형태, 예컨대 앰플, 또는 다용량 (multidose) 용기내로, 선택적으로 첨가된 보존제와 함께, 제공된다. 일부 구현예들에서, 조성물은 오일성 또는 수계 비히클 중의 혼탁액, 용액 또는 에멀젼제이며, 혼탁화제, 안정화제 및/또는 분산화제와 같은 제형성 제제 (formulatory agent)가 포함된다.

[0170] 또한, 조성물은, 일부 구현예들에서, 벤즈알코늄 클로라이드 및 티메로살 등과 같은 보존제; 에데테이트 소듐 등의 키클레이트제; 포스페이트, 시트레이트 및 아세테이트 등의 완충액; 소듐 클로라이드, 포타슘 클로라이드, 글리세린, 만니톨 등의 긴장성 제제 (tonicity agent); 아스코르브산, 아세틸시스틴, 소듐 메타바이설포에이트 등의 항산화제; 방향성 제제; 셀룰로스 및 이의 유도체 등의 폴리머와 같은 점성 조정제; 및 폴리비닐 알코올 및 필요에 따라 이를 수계 조성물의 pH를 조절하기 위한 산과 염기를 포함한다. 또한, 조성물은, 일부 구현예

들에서, 국소 마취제 또는 그외 활성제를 포함한다. 조성물은 스프레이제, 미스트제, 점액제 등으로 사용될 수 있다.

[0171] 일부 구현예들에서, 비경구 투여용 약학 조성물은 수용성 형태의 활성 수계 용액 조제물을 포함한다. 추가적으로, 활성 성분의 혼탁제는, 일부 구현예들에서, 적절한 오일 또는 수(water) 기반의 주입 혼탁제로서 제조된다. 적합한 친지성 용매 또는 비히클로서, 일부 구현예들에서, 세사미 오일과 같은 지방 오일, 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포좀 등의 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 수성 주입 혼탁제는, 일부 구현예들에서, 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란 등의, 혼탁물의 점성을 증가시키는 물질을 포함한다. 다른 구현예에서, 혼탁제는 또한 고도로 농축된 용액을 제조할 수 있도록 활성 성분들의 용해성을 증가시키는 적정 안정화제 또는 제제들을 포함한다.

[0172] 다른 구현예에서, 활성 화합물은 비히클, 특히 리포좀 안에 포함된 형태로 전달될 수 있다 (Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez- Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; 일반적으로 상기 문헌들을 참조함).

[0173] 다른 구현예에서, 조절된 방출 시스템 (controlled release system) 형태로 전달되는 약학 조성물은, 정맥내 주입, 이식가능한 삼투 펌프, 경피 패치, 리포좀 또는 그외 투여 방식으로 제형화된다. 일 구현예에서, 펌프가 사용된다 (Langer, *supra*; 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) 참조). 다른 구현예에서, 폴리머 물질이 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 조절된 방출 시스템은 치료 타겟, 즉 뇌 근처에 위치시킬 수 있으며, 그에 따라 전신 투여량의 일부만 필요할 수 있다 (예, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 참조). 다른 조절된 방출 시스템에 대해서는 Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)의 리뷰에 기술되어 있다.

[0174] 일부 구현예들에서, 활성 성분은 사용 전에 적정 비히클, 예컨대, 멸균된, 발열원-제거된 수계 용액을 이용하여 만들기 위한 분말 형태이다. 조성물은, 일부 구현예들에서, 미립자화 및 흡입 투여용으로 제형화된다. 다른 구현예에서, 조성물은 미립자화 수단이 장착된 용기에 함유된다.

[0175] 일 구현예에서, 본 발명의 조제물은, 예컨대, 코코아 버터 또는 그외 글리세라이드와 같은 통상적인 좌제 베이스를 이용하여, 좌제나 정체 관장제 (retention enemas) 등의 직장 조성물로 제형화된다.

[0176] 일부 구현예들에서, 본 발명의 측면에 사용하기 적합한 약학 조성물은, 활성 성분들이 의도한 목적을 달성하는데 유효한 양으로 포함된 조성물을 포함한다. 다른 구현예에서, 치료학적 유효량은 치료 중인 개체의 질환 증상을 예방, 경감 또는 개선시키거나 또는 생존을 연장시키는데 유효한 활성 성분의 양을 의미한다.

[0177] 일 구현예에서, 치료학적 유효량은 당해 기술 분야의 당업자의 능력내에서 충분히 결정된다.

[0178] 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 이의 구성 성분으로서 제공할 수 있는 물질의 일부 예는, 락토스, 글루코스 및 슈크로스 등의 당류; 옥수수 전분 및 감자 전분 등의 전분류; 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 메틸 셀룰로스 등의 셀룰로스 및 이의 유도체; 트라가칸트 분말; 말트; 젤라틴; 탈크; 스테아르산 및 마그네슘 스테아레이트 등의 고형 윤활제; 칼슘 설페이트; 땅콩 오일, 면실유, 세사미 오일, 올리브유, 옥수수유 및 테오브로마 오일 등의 식물성 오일; 프로필렌 글리콜, 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜 등의 폴리올; 알긴산; Tween™ 상표의 유화제 등의 유화제; 소듐 라우릴 설페이트 등의 습윤제 (wetting agent); 착색제; 풍미제; 타정제 (tableting agent), 안정화제; 항산화제; 보존제; 발열원-결핍된 물; 등장성 식염수; 및 포스페이트 완충 용액이다. 화합물과 함께 사용되는 약제학적으로 허용가능한 담체의 선택은, 기본적으로, 화합물의 투여 방식에 따라 결정된다. 만일 대상 화합물을 주입하고자 한다면, 일 구현예에서, 약제학적으로 허용가능한 담체는, 혈액-친화적인 혼탁화제가 첨가된 멸균된, 생리 식염수이며, 이의 pH는 약 7.4로 조정된 것이다.

[0179] 아울러, 조성물은, 추가적으로, 결합제 (예, 아카시아, 옥수수 전분, 젤라틴, 카보머, 에틸 셀룰로스, 구아르검, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로스, 포비돈), 봉해제 (예, 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산, 실리콘 다이옥사이드, 크로스카르멜로스 소듐, 크로스포비돈, 구아르 검, 소듐 전분 글리콜레이트), pH와 이온 세기가 다양한 완충액 (예, 트리스-HCl, 아세테이트, 포스페이트), 표면 흡수를 방지하기 위한 알부민 또는 젤라틴 등의 첨가제, 디터전트 (예, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, 담즙산염), 프로테아제 저해제, 계면활성제 (예, 소듐 라우릴 설페이트), 침투 강화제 (permeation enhancer), 가용화제 (예, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜), 항산화제 (예, 아스코르브산, 소듐 메타바이설파이트, 부틸화된 하이드록시아닌

졸), 안정화제 (예, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스), 점성 증가제 (예, 카보머, 콜로이드형의 실리콘 다이옥사이드, 에틸 셀룰로스, 구아르 검), 감미제 (예, 아스파르탐, 시트르산), 보존제 (예, 티메로살, 벤질 알코올, 파라벤), 윤활제 (예, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트), 유동-보조제 (flow-aid)(예, 콜로이드형 실리콘 다이옥사이드), 가소화제 (예, 디에틸 프탈레이트, 트리에틸 시트레이트), 유화제 (예, 카보머, 하이드록시프로필 셀룰로스, 소듐 라우릴 설페이트), 폴리머 코팅제 (예, 폴록사며 또는 폴록사민), 코팅 및 막 형성제 (예, 에틸 셀룰로스, 아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트) 및/또는 보강제를 포함한다.

- [0180] 시럽제, 엘리서제, 에멀젼제 및 혼탁제에 대한 전형적인 담체 성분으로는 에탄올, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 액체 슈크로스, 소르비톨 및 물을 포함한다. 혼탁제의 경우, 전형적인 혼탁화제로서 메틸 셀룰로스, 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 셀룰로스 (예, Avicel™, RC-591), 트라가칸트 및 소듐 알기레이트를 포함하며; 전형적인 습윤제로서 레시틴 및 폴리에틸렌 옥사이드 소르비탄 (예, 폴리소르베이트 80)을 포함한다. 전형적인 보존제로는 메틸 파라벤 및 소듐 벤조에이트를 포함한다. 다른 구현예에서, 경구 액체 조성물은 또한 전술한 감미제, 풍미제 및 착색제 등의 하나 이상의 성분들을 포함한다.
- [0181] 조성물은, 또한, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 하이드로겔 등의 폴리머 화합물의 미립자 조제물 안으로 또는 상으로, 또는 리포좀, 마이크로에멀젼, 마이셀, 유니라멜라 또는 멀티라멜라 비히클, 에리트로사이트 고스트 또는 스페로플라스트 상으로의, 활성 물질의 합체를 포함한다. 이러한 조성물은 물리적 상태, 용해성, 안정성, 생체 내 방출 속도 및 생체내 소거 속도에 영향을 미칠 것이다.
- [0182] 또한, 본 발명은, 폴리머(예, 폴록사며 또는 폴록사민)로 코팅된 미립자 조성물 및 조직-특이적인 수용체, 리간드 또는 항원에 대한 항체와 커플링되거나 조직-특이적인 수용체의 리간드와 커플링된 화합물을 포함한다.
- [0183] 다른 구현예에서, 화합물은, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜-폴리프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시 메틸 셀룰로스, 엑스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐파롤리돈 또는 폴리프롤린 등의 수용성 폴리머의 공유 결합에 의해 변형된다. 다른 구현예에서, 변형된 화합물은 대응되는 비변형된 화합물에 비해 정맥내 주입 후 실질적으로 연장된 혈중 반감기를 나타낸다. 일 구현예에서, 변형은 또한 화합물의 수용액 용해성을 증가시키고, 응집을 해소시키고, 화합물의 물리적 안정성과 화학적 안정성을 강화시키고, 화합물의 면역원성과 반응성을 크게 감소시킨다. 다른 구현예에서, 바람직한 생체내 생물 활성은, 이러한 폴리머-화합물 앱더트(abduct)를 비변형된 화합물 보다 낮은 빈도로 또는 낮은 투여량으로 투여함으로써, 달성된다.
- [0184] 다른 구현예에서, 유효량 또는 투여량의 조제는 시험관내 분석으로 먼저 추정할 수 있다. 일 구현예에서, 투여량은 동물 모델에서 공식화될 수 있으며, 이러한 정보를 사용하여 인간에서 유용한 투여량을 보다 정확하게 결정할 수 있다.
- [0185] 일 구현예에서, 본원에 기술된 활성 성분들의 독성 및 치료학적 효능은 시험관내, 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준적인 약학 공정에 의해 측정할 수 있다. 일 구현예에서, 이러한 시험관내 및 세포 배양 분석 및 동물 실험으로부터 수득한 데이터는 인간에게 사용하기 위한 투여량 범위를 공식화하는데 이용할 수 있다. 일 구현예에서, 투여량은 채택되는 투약 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 달라진다. 일 구현예에서, 실제 제형, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태에 비추어 개개 의사가 선택할 수 있다 [예, Fingl, et al., (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1].
- [0186] 일 구현예에서, 치료할 증상의 중증도 및 반응성에 따라, 투약은 1회 투여 또는 다회 투여일 수 있으며, 치료 기간은 수일 내지 수개월이거나, 또는 치유가 구현되거나 질환 상태의 경감이 달성될 때까지이다.
- [0187] 일 구현예에서, 투여할 조성물의 양 역시 치료 중인 개체, 고통의 중증도, 투여 방식, 처방의의 판단 등에 따라 결정될 것이다.
- [0188] 일 구현예에서, 혼용가능한 약학 담체 중에 제형화된 본 발명의 조제물을 비롯한 조성물은, 또한, 제조하여, 적정 용기에 넣고, 치료 증상이 표시된 라벨이 첨부된다.
- [0189] 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 전신 투여를 통해 투여된다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 성장 호르몬은 정맥내, 근육내 또는 피하 주입에 의해 투여된다. 다른 구현예에서, CTP 변형된 GH는 비이온성 계면 활성 제제 (즉, 계면활성제), 다양한 당류, 유기 폴리올 및/또는 인간 혈청 알부민과 같은 캠플렉스 유기 부형제 및 안정화제와 조합하여 동결건조된 (즉, 냉동-건조된) 조제물이다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 주사용 멸균 수내에 기술된 동결건조된 CTP 변형된 GH를 포함한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 주사용 멸균 PBS 중에 기술된 동결건조된 성장 호르몬을 포함한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 주사용 멸균 0.9% NaCl 중에 기

술된 동결건조된 성장 호르몬을 포함한다.

- [0190] 다른 구현예에서, 약학 조성물은, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH와, 인간 혈청 알부민, 폴리올, 당류 및 음이온 성 계면 활성 안정화제 등의 콤플렉스 담체를 포함한다. 예를 들어, WO 89/10756 (Hara et al.- 폴리머 및 p-하이드록시벤조에이트 함유)을 참조한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 본원에 기술된 성장 호르몬, 락토바이온산 (lactobionic acid) 및 아세테이트/글리신 완충액을 포함한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 본원에 기술된 CTP 변형된 GH와 인터페론 조성물의 수 용해성을 높이는 아미노산, 예컨대 아르기닌 또는 글루타메이트를 포함한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은, 본원에 기술된 동결건조된 CTP 변형된 GH와, 글리신 또는 인간 혈청 알부민 (HSA), 완충액 (예, 아세테이트) 및 등장성 제제 (예, NaCl)를 포함한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 본원에 기술된 동결건조된 CTP 변형된 GH와 포스페이트 완충액, 글리신 및 HSA를 포함한다.
- [0191] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 pH 약 4 - 7.2의 완충화된 용액 중에 두었을 때 안정적이다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 안정화제로서 아미노산, 일부 경우에 염 (아미노산에 하전된 측쇄가 없는 경우)을 이용하여 안정화시킨다.
- [0192] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 아미노산인 안정화제를 약 0.3% 내지 5 중량%로 포함하는 액체 조성물이다.
- [0193] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 투약 정확성 및 산물 안전성을 제공한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 주입 용도로 사용하기 위한 생물학적인 활성형이며, 안정적인 액체 조성물을 제공한다. 다른 구현예에서, 약학 조성물은 본원에 기술된 비-동결건조된 CTP 변형된 GH를 포함한다.
- [0194] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 투여하기 전까지 저장 및 수송하기 용이한 액체 상태로 장기간 동안 저장할 수 있는 액체 제형을 제공한다.
- [0195] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 매트릭스 물질로서 고상 지질을 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 주입용 약학 조성물은 매트릭스 물질로서 고상 지질을 포함한다. 다른 구현예에서, 분무 응결 (spray congealing)에 의한 액체 미세입자의 제조는 Speiser (Speiser and al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54)에 기술되어 있으며, 경구 투여용 액체 나노펠렛이 개시되어 있다 (Speiser EP 0167825 (1990)). 다른 구현예에서, 사용되는 지질은 신체에 잘 허용된다 (예, 비경구 영양 공급을 위해 에멀젼에 존재하는 지방산으로 구성된 글리세라이드).
- [0196] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 리포좀 형태이다 (J. E. Diederichs and al., Pharm./nd. 56 (1994) 267- 275).
- [0197] 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 폴리머 미세입자를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 주입용 약학 조성물은 폴리머 미세입자를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 나노입자를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 리포좀을 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 마이크로스피어를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 지질 나노입자를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 양쪽성 지질 (amphiphilic lipid)을 포함하는 지질 나노입자를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 CTP 변형된 GH를 포함하는 약학 조성물은 약물, 지질 매트릭스 및 계면활성제를 포함하는 지질 나노입자를 포함한다. 다른 구현예에서, 지질 매트릭스는 모노글리세라이드를 적어도 50% w/w로 포함한다.
- [0198] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 팩 또는 분배 장치, 예컨대 FDA 승인 키트로 제공되며, 여기에는 활성 성분을 포함하는 하나 이상의 단위 투약 형태가 포함된다. 일 구현예에서, 팩은, 예컨대, 블리스터 팩 등의 금속 또는 플라스틱 호일을 포함한다. 일 구현예에서, 팩 또는 분배 장치는 투여 설명서를 수반한다. 일 구현예에서, 팩 또는 분배기는 약제의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관으로부터 규정된 형태로 용기에 조합된 고지를 수반하며, 고지는 조성물의 형태 또는 인간이나 수의학적 투여 기관으로부터의 인가를 표시한다. 이러한 고지는, 일 구현예에서, 처방약에 대한 미국 식의약청에 의해 승인받은 표시이거나 또는 승인된 제품 인씨트 (product insert)이다.
- [0199] 일 구현예에서, 본 발명의 CTP로 변형된 GH는 각 제제 자체를 이용한 치료와 비교하여 개선된 치료학적 효과를 달성하기 위해, 추가적인 활성 제제와 함께 개체에게 제공될 수 있다. 다른 구현예에서, 병용 요법

(combination therapy)과 관련있는 부작용에 대해 조치 (예, 보완제의 투약 및 선택)가 취해진다.

[0200] 본 발명의 추가적인 목적, 이점 및 새로운 특징들은 한정되는 것으로 의도되지 않은 아래 실시예들을 수행함으로써 당해 기술 분야의 당업자들에게 명확해질 것이다. 부가적으로, 상기에서 논의되고 하기 청구항에서 청구된 본 발명의 다양한 각각의 구현예들과 측면들은 후술되는 실시예들로부터 실험적으로 뒷받침된다.

실시예

[0202] 일반적으로, 본원에 사용되는 명칭과 본원에서 이용되는 실험 공정들은 분자, 생화학, 미생물 및 재조합 DNA 기법들을 포함한다. 이러한 기법들은 문헌들에 잘 기술되어 있다. 예를 들어, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허들 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 및 5,272,057에 기술된 방법들; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980)을 참조하며, 이용 가능한 면역분석법들은 특히 및 과학 문헌, 예컨대, 미국 특허 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 및 5,281,521에 광범위하게 기술되어 있으며; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996)을 참조하며, 이를 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 그외 일반적인 참조문헌들도 이러한 문서 전반에 제시되어 있다.

실시예 1

hGH 구조체의 구축

재료 및 방법

[0206] 4개의 hGH 클론들 (20kD의 단백질 변이체들)을 합성하였다. 4개의 클론들에서, hGH 서열을 함유한 XbaI - Not I 단편들을 진핵생물 발현 벡터이며 사전에 XbaI - Not I으로 절단한 pCI-dhfr에 연결하였다. 4가지 클론들 (401-0, 1, 2, 3 및 4)로부터 DNA를 수득하였다. 또한, 22kD 단백질로부터 다른 일부 hGH 클론 (1-242 bp)을 합성하였다 (0606114). 프라이머들은 Sigma-Genosys 사에서 주문하였다. 본 발명의 CTP 변형된 hGH 폴리펩타이드를 제조하는 사용된 프라이머 서열들은 아래 표 1에 요약 개시한다.

표 1

프라이머 번호	서열 번호	서열	제한효소 부위 (밀줄 서열)
25	18	5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'	XbaI
32 ^R	19	5' ACAGGGAGGTCTGGGGTCTGCA 3'	
33	20	5' TGCAGAACCCCCAGACCTCCCTGTGC 3'	
4 ^R	21	5' CCAAACTCATCAATGTATCTTA 3'	
25	22	5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'	XbaI
35 ^R	23	5' CGAACTCCTGGTAGGTGTCAAAGGC 3'	

34	24	5' GCCTTGACACCTACCAGGAGTCG 3'	
37 ^R	25	5' ACGCGGCCGCATCCAGACCTCATCACTGAGGC 3'	Not I
39 ^R	26	5' CGGGCCGCGGACTCATCAGAAGCCGAGCTGCC 3'	

[0208] **402-0-p69-1 (hGH) (서열번호 5)의 구축:** hGH는 아래 기술된 실험들에서 대조군으로 사용하기 위해 준비한 야생형의 재조합 인간 성장 호르몬이다 (CTP 없음). 3번의 PCR 반응을 수행하였다. 1차 반응은 주형으로서 0606114 (hGH의 일부 클론 1-242 bp) 플라스미드 DNA를 대상으로 프라이머 25 및 프라이머 32^R을 이용하여 수행하였으며, PCR 증폭 결과로 245 bp 산물이 형성되었다.

[0209] 2차 반응은 주형으로서 401-0-p57-2 플라스미드 DNA를 대상으로 프라이머 33 및 프라이머 4^R을 이용하여 수행하였으며, PCR 증폭 결과로 542 bp 산물이 형성되었다.

[0210] 마지막 반응은 주형으로서 앞의 2가지 반응을 통해 수득한 산물들의 혼합물에 대해 프라이머 25 및 4^R을 이용하여 수행하였고, PCR 증폭 결과로 705 bp 산물이 만들어졌으며, 이를 TA 클로닝 벡터 (Invitrogen, catalog K2000-01)에 삽입하였다. hGH-0 서열을 포함하는 XbaI- NotI 단편을 전핵 생물 발현 벡터 pCI-dhfr에 삽입하였다. 이 벡터를 DG-44 CHO 세포에 형질감염시켰다. 세포는 단백질 무첨가 배지에서 배양하였다.

[0211] **402-1-p83-5 (hGH-CTP) - 서열번호 9 및 402-2-p72-3(hGH-CTPx2) - 서열번호 10 구축:** hGH-CTP는 인간 용모막성 고나도트로핀 (CTP)의 베타 체인의 C-말단 웨타이드 1 카페가 융합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. hGH-CTP의 CTP 카세트는 C-말단 (카세트 1개)에 결합되어 있다. hGH-CTP-CTP는 인간 용모막성 고나도트로핀 (CTP)의 베타 체인의 C-말단 웨타이드 2 카페가 융합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. hGH-CTP-CTP의 2개의 CTP 카세트들은 C-말단에 결합되어 있다 (카세트 2개).

[0212] hGH-CTP와 hGH-CTP-CTP의 구축은 hGH-0의 구축과 동일한 방식으로 수행하였다. pCI-dhfr-401-1-p20-1 (hGH*-ctp) 및 pCI-dhfr-401-2-p21-2 (hGH*-ctp x2)를 2차 PCR 반응의 주형으로 사용하였다.

[0213] hGH-CTP 및 hGH-CTP-CTP는 DG-44 CHO 세포에서 발현시켰다. 세포는 단백질 무첨가 배지에서 배양하였다. hGH-CTP의 분자량은 GH의 MW이 22 kD이고 "CTP 카세트" 각각이 8.5 kD이기 때문에 전체 분자량은 ~30.5 kD이다 (도 1). hGH-CTP-CTP의 분자량은 ~39 kD이다 (도 1).

[0214] **402-3-p81-4 (CTP-hGH-CTP-CTP) - 서열번호 11 및 402-4-p82-9(CTP*hGH-CTP-CTP) - 서열번호 12의 구축:** CTP-hGH-CTP-CTP는 인간 용모막성 고나도트로핀 (CTP)의 베타 체인의 C-말단 웨타이드 3 카페가 융합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. CTP-hGH-CTP-CTP의 3개의 CTP 카세트들은 N-말단 (카세트 1개)과 C-말단 (카세트 2개) 양쪽에 결합되어 있다. tCTP-hGH-CTP-CTP는 인간 용모막성 고나도트로핀 (CTP)의 베타 체인의 C-말단 웨타이드의 절단형 1 카페와 완전형 2 카페가 융합된 재조합 인간 성장 호르몬이다. tCTP-hGH-CTP-CTP의 절단형 CTP 카세트는 N-말단에 결합되고, CTP 카세트 2개는 C-말단 (카세트 2개)에 결합되어 있다.

[0215] 3번의 PCR 반응을 수행하였다. 1차 반응은 프라이머 25 및 프라이머 35^R을 사용하여 p401-3-p12-5 또는 401-4-p22-1as의 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 수행하였으며, PCR 증폭 결과로, 265 또는 220 bp 산물이 제조되었다. 2차 반응은 프라이머 34 및 프라이머 37^R을 사용하여 TA-hGH-2-q65-1의 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 수행하였으며, PCR 증폭 결과로, 695 bp 산물이 제조되었다. 마지막 반응은 프라이머 25 및 프라이머 37^R을 사용하여 앞의 2가지 반응의 산물의 혼합물을 주형으로 하여 수행하였으며, PCR 증폭 결과로, 938 또는 891 bp 산물이 제조되었으며, 이를 TA 클로닝 벡터 (Invitrogen, catalog K2000-01)에 연결하였다. hGH 서열이 포함된 XbaI - NotI 단편을 전핵 생물 발현 벡터 pCI-dhfr에 삽입하였다.

[0216] CTP-hGH-CTP-CTP 및 tCTP-hGH-CTP-CTP는 DG-44 CHO 세포에서 발현시켰다. 세포는 단백질 무첨가 배지에서 배양하였다. CTP-hGH-CTP-CTP의 분자량은 ~47.5 kD (도 1)이고, tCTP-hGH-CTP-CTP의 분자량은 ~43.25 kD이다 (도 1).

[0217] **402-6-p95a-8 (CTP-hGH-CTP) - 서열번호 13의 구축:** hGH-6 구축은 hGH-3을 구축하는 방법과 동일한 방식으로 수행하였다. 2차 PCR 반응에서 주형으로 pCI-dhfr-402-1-p83-5 (hGH-ctp)를 사용하였다.

[0218] **402-5-p96-4 (CTP-hGH) - 서열번호 14의 구축:** PCR 반응은 프라이머 25 및 프라이머 39^R을 사용하여 pCI-dhfr-

ctp-EPO-ctp (402-6-p95a-8)의 플라스미드 DNA를 주형으로 하여 수행하였으며, PCR 증폭 결과로, 763 bp 산물이 제조되었으며, 이를 TA 클로닝 벡터 (Invitrogen, catalog K2000-01)에 연결하였다. ctp-hGH 서열이 포함된 XbaI - NotI 단편을 진핵 생물 발현 벡터 pCI-dhfr에 삽입하여, 402-5-p96-4 클론을 제조하였다.

[0219]

실시예 2

[0220]

본 발명의 hGH-CTP 폴리펩타이드에 대한 생체내 생활성 검사

[0221]

아래 실험은 시판되는 재조합 인간 GH 및 hGH와 비교하여, hGH-CTP 폴리펩타이드의 장기 작용성 생물 활성 가능성을 검사하기 위해 수행하였다.

[0222]

재료 및 방법

[0223]

뇌하수체 적출된 암컷 랫 (60-100 g)에 21.7 μg 의 hGH-CTP 폴리펩타이드를 S.C.로 매주 주사하거나, 대조군 시판 rhGH 5 μg 을 S.C.로 매일 주사하였다.

[0224]

처리 전, 1차 주사한 지 24시간 후, 그리고 21일에, 실험을 종료할 때까지 2일마다, 동물 모두 체중을 측정하였다. 각 포인트는 그룹의 평균 체중 증가율을 나타낸다 ((체중 측정일 0 - 체중 측정 마지막일) / 체중 측정일 0). 평균 체중 증가를 시판 hGH의 매일 1회 주입에 대해 정규화하였다. 처리 스케줄을 표 2에 요약 개시한다.

표 2

번호	약물	N	경로	처리 스케줄	동물 투여량($\mu\text{g}/\text{랫}$)	누적 투여량($\mu\text{g}/\text{랫}$)	투여 부피(mL)
1	비히클	7	s.c.	1, 7 및 13일; 1/W	NA	NA	0.25
2	Mock	7	s.c.	1, 7 및 13일; 1/W	NA	NA	0.25
3	hGH 서열번호 5	7	s.c.	1, 7 및 13일; 1/W	21.7	65	0.25
4	hGH-CTP 서열번호 9	7	s.c.	1, 7 및 13일; 1/W	21.7	65	0.25
5	hGH-CTP-CTP 서열번호 10	7	s.c.	1, 7 및 13일; 1/W	21.7	65	0.25
6	CTP-hGH-CTP-CTP 서열번호 11	7	s.c.	1, 7 및 13일; 1/W	21.7	65	0.25
7	tCTP-hGH-CTP-CTP 서열번호 12	7	s.c.	1, 7 및 13일; 1/W	21.7	65	0.25
8	시판 hGH v.1	7	s.c.	1, 7 및 13일; 1/W	21.7	65	0.25
9	시판 hGH v.1	7	s.c.	1-3일; d/W	5	65	0.25

[0226]

결과들은 도 2에 요약 개시한다. 이를 결과는, CTP-hGH-CTP-CTP (서열번호 11) 및 tCTP-hGH-CTP-CTP (서열번호 12)가 100%로 체중 증가를 유도하는 시판 rhGH와 비교하여, 120% 이상의 체중 증가를 유도하였다.

[0227]

결론

[0228]

CTP-hGH-CTP-CTP (서열번호 11) 및 tCTP-hGH-CTP-CTP (서열번호 12) 21.7 μg 을 매주 3회 투여 (주사일: 1일, 7 일 및 13일)하였을 때, 13일간 투여량 5 μg 이 매일 1회 투여되는 동일한 누적 투여량으로 주사된 시판 rhGH와 비교하여, 뇌하수체 적출된 랫에서 30% 높은 체중 증가를 유도하였다.

[0229]

실시예 3

[0230]

CTP-변형된 GH의 약동학 연구

[0231]

단회-투여량 약동학 연구를 스프라그-다우리 랫에서 수행하였다. 모든 동물 실험은 동물 복지법, 실험 동물의 관리 및 사용에 대한 지침에 따라, 모디진 바이오테크놀로지 제너럴 Ltd의 동물 실험 윤리 위원회의 감독 및 승인 하에, 수행하였다. 랫은 12-h 명/암 사이클로 실온에서 개별 또는 케이지 당 2마리씩 수용시켰다. 물 (수돗물)과 비공인된 설치류 사료에는 자유롭게 접근하게 제공하였다.

[0232]

랫에서 CTP-hGH-CTP-CTP 및 GH의 약동학적 특성을 비교하기 위해, 4 그룹의 스프라그-다우리 랫 (270-290 g)으

로 그룹 당 수컷 랫 3-6마리를 사용하였다. 랫을 무작위로 4가지의 처리 그룹으로 할당하였다 (표 3). 랫에 GH (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. 또는 s.c.) 또는 CTP-hGH-CTP-CTP (108 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. 또는 s.c.)를 1회 s.c. 또는 i.v. 주사로 투여하였다. 이소플루란 마취 하에 수집한 투여 전 샘플을 제외하고는, 채혈을 마취하지 않은 동물에서 수행하였다. 혈액 샘플 (대략 0.25 ml)은, 표 3에 나타낸 시간대에 CTP-hGH-CTP-CTP의 혈장 농도를 ELISA로 분석하기 위해, EDTA-코팅된 검체용기 (microtainer)에 수집하였다. 각각의 샘플링 후, 혈액 체적을 동일 부피의 멸균 0.9% 식염수 (식염수)로 교체하였다. 샘플들은 원심분리 및 혈장 회수 전 최대 1시간 동안 얼음 위에 보관하였다. 혈장 샘플은 분석하기 전까지 약 -20°C에 보관하였다.

[0233]

표 3. 랫 약동학 실험에 대한 실험 설계**표 3**

[0234] 처리군	검사 항목	동물 수 /그룹/시간대	투여 경로	성별	투여 수준 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	주사 부피 (μl)	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)/총 부피 (ml)	시간대* (투여 후 경과 시간)
1	바이오토로핀	6#	SC	수컷	50	500	20/5	0 (투여 전) 0.5, 2, 4, 8, 24, 48
2	CTP-hGH-CTP-CTP	6#	SC	수컷	108	500	43.2/5	0.5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96
3	바이오토로핀	6#	IV	수컷	50	300	20/3	0, 0.12, 2, 4, 8, 24
4	CTP-hGH-CTP-CTP	6#	IV	수컷	108	300	43.2/3	0.12, 2, 4, 8, 24, 48, 72
혈액 샘플의 부피/시간대 - 500 μl								종말 혈액 샘플

[0235]

시간대 별 랫 3마리 인간 성장 호르몬을 검출하기 위한 특이적인 샌드위치 ELISA 시판 키트 (Roche Diagnostics)를 랫 혈장 샘플을 평가하는데 사용하였다. 이 키트는 항체 샌드위치 ELISA 포맷을 이용하여 혈장에서 인간 성장 호르몬을 검출한다. 이 키트는 랫 혈장에서 CTP-hGH-CTP-CTP 농도를 측정하기 위해 처음 사용하였다. 이들 혈장 샘플에 대해, CTP-hGH-CTP-CTP 표준 그래프 (1.2-00 ng/ml)를 사용하였으며, 랫 혈장내 CTP-hGH-CTP-CTP 농도를 상기 그래프로부터 구하였다.

[0236]

소거 (CL 또는 CL/F), 분배 체적 (Vd 또는 Vd/F), 반감기 ($t_{1/2}$), 시간에 따른 혈장 농도 곡선 하 면적 (AUC), 최대 혈장 관찰 농도 (C_{\max}) 및 최대 혈장 관찰 농도에 도달하는 시간 (T_{\max})을 비롯하여, 표준적인 약동학적 파라미터들을, 모델링 프로그램인 WinNonlin (Pharsight, version 3.1)을 이용한 비-구획 분석에 의해, 혈장 알부트로핀 (albutropin) 또는 GH 농도/시간 그래프로부터 구하였다. 이러한 분석을 위해 혈장내 CTP-hGH-CTP-CTP 또는 GH 농도 데이터를 일률적으로 가감하였다. AUC를 i.v. 데이터에 대한 로그-선형 사다리꼴 분석과 S.C. 데이터에 대한 선형-엽/로그-다운 사다리꼴 방법을 이용하여 계산하였다. 각 랫 (s.c. 알부트로핀 데이터 제외) 또는 원숭이에 대한 혈장내 농도 프로파일을 각각 분석하였으며, 약동학적 파라미터들에 대한 평균 (S.E.M.) 값들의 평균 ± 표준 오차를 표 4 및 도 4에 기록한다.

[0237]

CTP-hGH-CTP-CTP는 아미노산 275개와 O-연결된 탄수화물 최대 12개로 구성된 단쇄 단백질이다. 구조체는, 인간 용모막성 고나도트로핀 (hCG)의 베타 체인의 C-말단 웹타이드 (CTP) 3 카페가 부착된 변형된 인간 성장 호르몬 (소마트로핀(Somatropin))으로 구성되며; 1 카페는 N-말단에, 2 카페는 (앞뒤로) C 말단에 위치한다. 인간 성장 호르몬은 아미노산 191개로 구성된다. CTP는 아미노산 28개와 O-연결된 당쇄 4개로 구성된다.

[0238]

실시예 4**SD 랫에서 CTP-변형된 GH의 약동학적 특성**

[0239]

CTP-hGH-CTP-CTP의 약동학적 특성을 시판 hGH (바이오토로핀)와 비교하여 평가하였다.

[0240]

표 4. 스프라그-다우리 랫에서 CTP-hGH-CTP-CTP 및 GH (바이오토로핀)를 1회 i.v. 및 s.c. 투여한 후 약동학적 파라미터들의 평균

표 4

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

[0243] 데이터의 통계적 분석 각 샘플에 대해 구체적인 농도 수준을 측정하기 위해, 혈청 샘플에 대한 분석을 수행하였다. WinNonLin 비-구획 분석을 이용하여 농도 및 시간대 데이터를 가공하였다.

[0244] 결정한 파라미터는 AUC, MRT, t1/2, Cmax 및 Tmax를 포함한다. 도 4는 랫 ($n=3-6$ /투여/경로)에 CTP-hGH-CTP-CTP 또는 GH를 1회 i.v. 또는 s.c. 투여한 후 GH 농도 (pg/ml) 대비 우수한 약동학적 프로파일의 혈장내 CTP-hGH-CTP-CTP 농도를 나타낸다.

[0245] 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 1회 S.C. 주사한 후, SD 랫 혈액에서의 CTP-hGH-CTP-CTP 소거는 CTP-hGH-CTP 및 바이오토로핀 보다 현저하게 느리게 진행되었다. 대응되는 순환 반감기과 AUC는 다음과 같다:

[0246] 바이오토로핀 T1/2 1.7h, AUC 41 hr*ng/mL

[0247] CTP-hGH-CTP T1/2 8.5h, AUC 424 hr*ng/mL

[0248] CTP-hGH-CTP-CTP T1/2 9.0h, AUC 680 hr*ng/mL

[0249] 결론:

[0250] 6가지의 다른 변이체들 중에서 최종 후보로 CTP-hGH-CTP-CTP가 선정되었다. CTP-hGH-CTP-CTP는 생물 활성 및 약동학적 특성 측면에서 우수한 성능이 입증되었다.

실시예 5

CTP-변형된 GH의 1회 투여/반복 투여에 따른 체중 증가 (WGA)

[0253] 뇌하수체 적출된 (이간법 (interaural method)) 3-4주령의 수컷 랫을 CRL 레보레이토리즈에서 공급받았다. 모의-조작한 랫과 비슷한 체중 증가로 확인되는, 뇌하수체 적출이 불완전한 것으로 생각되는 동물들을 제외시키기 위해, 수술 후 3주간의 순화 기간 동안, 매주 2회 랫을 검사하고 체중을 측정하였다. 뇌하수체 적출이 불완전한 랫들은 본 실험에서 제외시켰다. 뇌하수체 적출 랫의 평균 체중은 실험 시 70-90 g이었다. 이는 hGH에 대한 USP 및 EP 생물분석의 기준이다. 뇌하수체 적출 랫 (뇌하수체가 제거된 랫)은 체중 증가 능력을 상실한다. hGH (및 CTP-hGH-CTP-CTP)를 이들 랫에 주사한 결과, 체중이 증가되었다. 지정된 기간 동안 주사한 hGH 양에 따른 측정되는 체중 증가를 기준으로, hGH (및 CTP-hGH-CTP-CTP)의 비활성을 구하였다. 랫에게 0.4, 0.8 및 4 mg/Kg을 1회 s.c.로, 또는 0.6 및 1.8 mg/Kg을 반복하여 s.c.로 3주간 4일 간격으로 투여하였다. 모든 동물은 각 체중을 1차 투여 전, 이후 2일 마다 또는 사망하는 경우 사망 시점에, 및 희생시키기 전에 무작위로 측정하였다.

1회 투여 및 반복 투여에 따른 체중 증가 분석

[0255] 뇌하수체 적출 랫에서 CTP-hGH-CTP-CTP를 여러가지 투여 패턴으로 투여한 후 전신 성장 반응을 비교한 결과들을 도 5에 나타낸다. 그 결과, hGH-CTP의 투여량 0.4 & 0.8 mg/Kg/day 1회 주사가 바이오토로핀 0.1 mg/Kg/day 매일 주사 4회와 등가인 것으로 나타났다. hGH-CTP 효과를 나타낸 피크는 2일 후에 나타났다.

[0256] 도 6은 CTP-hGH-CTP-CTP 1회 주사한 이후의 곡선하 면적이 랫에서 체중 증가와 상관성이 있다는 것을 추가로 보여준다. 즉, 수집된 데이터에 따르면, 체중 증가는 누적 AUC와 밀접한 관련성이 있다.

[0257] 4일 간격으로 투여한 hGH-CTP 구조체는 도 7에서 확인되는 바와 같이 바이오토로핀의 매일 주사와 동일한 체중 증가를 촉진하였다. 인간의 경우 hGH 반감기는 랫 보다 5배 높을 것으로 예상된다 - 이는 1회 주사하는 경우,

10일 후 인간에서 잠재적인 피크 효과가 있음을 의미함. 이러한 결과들은, hGH-CTP 구조체, CTP-hGH-CTP-CTP를 인간에게 매주 또는 2주 마다 투여할 수 있음을 뒷받침해준다.

[0258] 실시예 6

[0259] CTP-변형된 GH의 약동학적/약동학적 연구

[0260] 뇌하수체 적출된 (이간법) 3-4주령의 수컷 랫을 CRL 레보레이토리즈에서 공급받았다. 모의-조작한 랫과 비슷한 체중 증가로 확인되는, 뇌하수체 적출이 불완전한 것으로 생각되는 동물들을 제외시키기 위해, 수술 후 3주간의 순화 기간 동안, 매주 2회 랫을 검사하고 체중을 측정하였다. 뇌하수체 적출이 불완전한 랫들은 본 실험에서 제외시켰다. 뇌하수체 적출 랫과 모의 랫의 평균 체중은 실험 시 각각 70 및 150 g이었다.

[0261] 랫에게 CTP-hGH-CTP-CTP, 바이오틴, 인간 성장 호르몬 CTP-hGH-CTP-CTP 또는 인간 성장 호르몬 ($20 \mu\text{g}/\text{랫}$)을 1회 s.c.로, 주사 부피 0.2 ml/랫으로 투여하였다. GH 투여량은 0.35 및 $1.05 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 이고, 성장 호르몬의 투여량은 CTP-hGH-CTP-CTP 투여량 0.6 및 $1.8 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 에 해당되는 GH 양과 동물 농도이다. 처리군을 표 4에 요약 기술한다. 주사한 후, 표 5에 기재된 시간에 IGF-1을 분석하기 위한 혈장 샘플을 취하였다. 샘플은 시판 ELISA (R&D systems)를 이용하여 IGF-1 농도를 분석하였다.

[0262] CTP-변형된 hGH를 매주 투여한 결과, 표준 GH로서 정상 범위내로 IGF-1을 유지시키는데 성공하였으며, 아울러 체중도 표준 GH로 유지되었다.

[0263] 표 5. 뇌하수체 적출 랫 실험의 처리 스케줄

표 5

[0264]	처리군	검사 항목	동물 수/ 그룹/시간대	투여 경로	등가 용량 (mg/랫)	등가 투여량 (mg/Kg)	CTP-hGH- CTP-CTP 농도, mg/ml	투여 부피 (ml)	시간대* (투여 후 경과 시간)
M7	바이오틴	9	SC	0.032	0.35	0.16	0.2	0 (투여 전) 0.5, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96	
M8	바이오틴	9	SC	0.095	1.05	0.475	0.2	0 (투여 전) 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	
혈액 샘플 부피/시간대 - $500 \mu\text{l}$								총말 혈액 샘플	

[0265] 각 그룹에 대해 시간 대비 평균 혈청 농도에 대한 비-구획 약동학적 분석을 수행하였다. CTP-hGH-CTP-CTP의 Cmax가 바이오틴의 Cmax 보다 현저하게 높았다. CTP-hGH-CTP-CTP의 종말 반감기는 바이오틴의 6배였다. 표 6: 뇌하수체 적출된 랫에서 1회 투여 후 CTP-hGH-CTP-CTP 및 바이오틴의 약동학적 파라미터 평가

표 6

[0266]	그룹	투여량 mg/kg	성별	Cmax ng/mL	Tmax hr	AUC ₀₋₈ ng·hr/mL	AUC _{0-t} ng·hr/mL	CL/F mL/hr/kg	T _{1/2} hr
CTP-hGH-CTP-CTP	1.8	M	2,150	8	37,713	37,695	0.928	6.86	
hGH	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	

[0267] AUC_{0-t}와 AUC₀₋₈은 매우 유사하였으므로, 샘플링 기간이 약동학적 프로파일을 특정하는데 적합하였다. CTP-hGH-

CTP-CTP의 AUC는 바이오토로핀 보다 10배 높았다. 아울러, Cmax는 전체적으로 투여량에 비례하였으며, CTP-hGH-CTP-CTP의 경우, 바이오토로핀의 Cmax 보다 2배 높았다. 그러나, 도 8에 나타낸 바와 같이, CTP-hGH-CTP-CTP의 Tmax는 바이오토로핀의 0.5 시간과 비교하여, 8시간이었으며, 종말 반감기는 투여 수준에 따라 달라지는 것으로는 보이지 않았다. CTP-hGH-CTP-CTP의 T1/2는 바이오토로핀 보다 6.8배 길었다. GH의 간접 효과는 주로 인슐린 유사 성장 인자-I (IGF-1)에 의해 매개되는데, 이 호르몬은 간과 그외 조직들에서 성장 호르몬에 반응하여 분비된다. 성장 호르몬의 성장 촉진 작용 대부분은 실제 타겟 세포에 대한 IGF-1의 작용으로 인한 것이다. 이에 뇌하수체 적출된 랫에서 IGF-1 혈청 수준에 대한 CTP-hGH 구조체, CTP-hGH-CTP-CTP의 효과를 측정하였다. 도 9는 CTP-hGH-CTP-CTP 및 시판 hGH를 SC 주사한 후, 뇌하수체 적출된 랫에서의 IGF-1 혈청내 수준 결과를 도시한다.

[0268] PK/PD 프로파일을 구하기 위해, 뇌하수체 적출된 랫에 CTP-hGH-CTP-CTP를 0.6 또는 1.8 mg/Kg로, 바이오토로핀을 0.35 또는 1.05 mg/Kg로 1회 피하 주사하였다. 주사 후 혈청내 IGF-1를 특이적인 ELISA 키트 (Roche Diagnostics)를 이용하여 측정하였다.

[0269] CTP-hGH-CTP-CTP를 주사한 후 혈청 내 IGF-1 누적 수준은 바이오토로핀을 주사한 후 보다 현저하게 높았다. Cmax는 전반적으로 투여량에 비례하였으며, CTP-hGH-CTP-CTP의 경우 바이오토로핀의 Cmax의 3-4배였다. Tmax는 CTP-hGH-CTP-CTP가 36-48 시간으로, 바이오토로핀 20-24시간과 비교되었다. 결론적으로, 혈청내 높은 hGH 수준과 장기간의 존재는 IGF-1 수준을 현저하게 증가시킨다.

실시예 7

CTP-변형된 GH의 탄수화물 함량 및 시알산 함량

[0272] O-글리칸 분석에는 프로자임 키트 (Prozyme kit)를 이용한다. O-글리칸은 단백질로부터 화학적으로 효소적으로 절단시키고, 페이퍼 크로마토그래피를 이용하여 웨타이드들로부터 분리한다. O-글리칸 풀의 서열분석은 순차적인 효소적 절단 (엑소-글리코시다제)을 수행한 후 표준물질과 비교하여 HPLC 분석을 수행함으로써, 수행한다.

서열 분석을 이용한 글리코프로파일링

[0274] 글리코프로파일링 (Glycoprofiling)은 Ludger Ltd에서 수행하였다. 샘플 2종 (EN648 및 RS0708)을 3세트로 방출시켜 취한 후, 각 방출물을 3세트로 HPLC로 분석하였다. EN648 및 RS0708 샘플 300 µg 세트와, 시트레이트/소듐 클로라이드 완충액 100 µl 샘플 1개, + 양성 대조군 폐투인 (250µg) 및 음성 대조군 물 100 µl을, 분자량 컷 오프가 10,000Da인 막을 이용하여 원심분리에 의해 한외여과하여, 완충액을 물로 교체한 다음, 0-모드 조건 (60°C에서 6시간)에서 하이드라지노분해 (hydrazinolysis)를 통해 취하였다. 방출된 글리칸들을 다시 N-아세틸화하고, LudgerClean CEX 카트리지를 이용하여 클린 업하였다. 방출된 글리칸 분액을 2-아미노벤즈아미드 (2AB)로 표지하고, Ludger Clean S 카트리지로 클린 업한 다음 LudgerSep-N2 HILIC-HPLC로 분석하였다.

단당류 함량

[0276] 중성 단당류를 분석하기 위해서는 글리칸을 이를 구성하는 단당류 성분으로 가수분해시켜야 한다. 가수분해는 무손상 당단백질 샘플을 대상으로 Ludger Ltd에서 수행하였다. 구체적으로, 무손상 당단백질 50 µg을 산 가수분해하고, 2-AB (2-아미노벤즈아미드)로 표지한 후, 역상 HPLC 컬럼에서 분리하였다. 이 방법은 N 및 O 연결된 타입을 포함하여, 당단백질에 존재하는 모든 글리칸들을 가수분해시킨다.

시알산 프로파일링

[0278] 샘플 2종 (EN648 및 RS0708)과 대조군 완충액을 분석하였다. 시알산 분석에는 단당류의 약산 방출과 이후 DMB 형광발색단 표지 및 LudgerSep-R1 컬럼에서의 HPLC 분석이 요구된다. 무손상 당단백질 50 µg을 각 분석을 위해 산 가수분해하였다.

CTP-hGH-CTP-CTP의 글리코 분석

[0280] 표 7. 글리칸 분석. 피크들의 구조 할당 및 % 면적은 HPLC와 효소 어레이 분해를 기초로 한다.

표 7

피크 ID ^a	GU ^b	구조 ^c	명칭	총 글리칸에 대한 % ^e			
				Und ^d	NAN1	ABS	ABS BTG
1 ^f	0.92	◆—2AB +bgd	GalNAc	0.4	0.4	0.6	53.0
2 ^f	1.02	◇—2AB +bgd	galactose	1.9	9.7	23.8	26.5
*	1.72			4.3	4.6	2.3	
3	1.79	◆—2AB	Galβ1-3GalNAc	2.3	67.7	69.4	17.1 ^h
4 ^g	2.25	★◆—2AB	NeuNAcα2-3Gal	19.8	13.0 ^h		
*	2.57			1.5	1.9	1.1	1.1
5	2.90	★◆—2AB	NeuNAcα2-3Galβ1-3 GalNAc	70.6			
*	3.58			0.6	0.7	0.6	
6	3.22	★◆—2AB	Galβ1-3[NeuNAcα2-6] GalNAc	0.9	2.3		
7	4.42	★◆—2AB	NeuNAcα2-3Galβ1-3 [NeuNAcα2-6]GalNAc	1.8			

[0281]

[0282] 단당류 프로파일에 따르면, CTP-hGH-CTP-CTP 당단백질 샘플들은 주로 0-연결된 타입의 글리칸들을 포함하고 있었다. 대부분의 0-글리칸 피크는 시알화된 코어 1 (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc)이다. 대부분의 시알산은 Neu5Ac이고, 디-아세틸화된 시알산 N-아세틸-9-O-아세틸뉴라민산 (Neu5, 9Ac2) 3-4% 및 N-글리콜릴뉴라민산 1% 미만이 존재하는 것으로 보이는 몇몇 작은 피크들이 존재하였다. 또한, Neu5Ac α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc도 소량 존재하였다.

[0283]

설시예 8

레소스 원숭이에서 CTP-변형된 GH의 약동학/독성 동태학적 분석

[0285]

시간에 따른 혈청 농도 그래프를 각 동물에 대해 구축하였다. 비-구획 분석을 WinNonlin professional version 5.2.1 (Pharsight Corporation, Mt View CA.)를 이용하여 수행하였다. 약동학적 파라미터들의 추정치들을 아래 표 8에 나타낸다.

[0286]

표 8: 레소스 원숭이에게 1회 피하 주사한 후 비-구획 분석을 통한 CTP-hGH-CTP-CTP 약동학적 파라미터 추정치 (평균 ± SD)

표 8

파라미터	1.8 mg/kg	90 mg/kg
Cmax (μ g/mL)	2.073 ± 0.417	108.7 ± 46.0
Tmax (hr)	4 ± 0	11 ± 7
AUC _{0-t} (μ g·hr/mL)	38.7 ± 7.4	2,444 ± 394
AUC ₀₋₈ (μ g·hr/mL)	39.0 ± 7.3	2,472 ± 388
CL/F (mL/hr/kg)	47.5 ± 9.0	37.04 ± 4.78
T _{1/2} (hr)	10.00 ± 1.47	9.85 ± 1.07
Vz/F (mL/kg)	701 ± 236	529 ± 104

[0288]

AUC_{0-t}와 AUC₀₋₈은 매우 유사하였으므로, 샘플링 기간이 약동학적 프로파일을 특정하는데 적합하였다. Cmax는 투여량에 비례하였다. Tmax는 고용량에서 더 늦어졌다. Tmax는 저용량 군의 모든 동물들에서 4시간이었지만, 고

용량 군에서는 8 또는 24시간이었다. 종말 반감기는 2가지 투여 군들 간에 비슷하였다. AUC는 투여량에 대략적으로 비례하였지만, 저용량 군과 비교하여, 고용량 군이 비례하는 AUC가 약간 더 컸으며, CL/F 및 Vz/F가 약간 낮게 평가되었다. CL 및 Vz가 고용량 군에서 낮거나 또는 F가 저용량 군에서 낮다고 말할 순 없다. 이들 군들은 중첩되므로, CL/F 및 Vz/F에 유의한 차이가 있다고 하기는 어렵다.

[0289] 모델을 통해 평가한 약동학적 파라미터들은 비-구획 분석의 결과와 매우 비슷하였다. 흡수 반감기 및 소거 반감기를 아래 표 9에 나타낸다.

[0290] 표 9: 레소스 원숭이에서의 약동학적 모델링을 통해 도출한, 피하 주사한 후 CTP-hGH-CTP-CTP의 흡수 및 소거 반감기 추정치 (평균 ± SD)

표 9

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

[0291] 데이터는, 소거 속도가 그룹들 간에 거의 비슷하며, 저용량 군에서 T_{1/2 el}이 약간 더 길다는 것을 보여준다. 그러나, 흡수는 피하 90 mg/kg 투여하였을 때가 1.8 mg/kg으로 투여하였을 때 보다 5배 더 느렸다. 비-구획 분석 경우에서와 같이, 모델링에서는 고용량 군에서 보다 긴 Tmax가 확인되었다. GH 보충 공급은 어린이와 성인의 GH 결핍을 치료하는데 효과적이지만, 장기간에 걸친 매일 주사하는 문제점으로 인해 의사들은 특정 환자 집단에서의 이의 사용을 제한할 뿐만 아니라, 투약 실수 위험성 증가, 관리 제공자의 수적 증가, 치료 비용 및/또는 비-순응성 증가가 발생한다. 처방된 GH 투약 용법의 불응 등의 의미들을 이해하지 못할 수 있는, 저신장 어린이 등의 특정 집단의 경우, 특히, GH 요법에 따른 최상의 효과를 달성하기 위해서는 순응이 필연적으로 중요하다. 매일 GH 주사에 대한 보다 적절한 대안책과 그에 따른 순응성을 확보하고자 하는 사안은, GH 결핍 어린이가 지속적인 GH 치료가 필요한 성인으로 이행되기 때문에 더욱 중요하다. 매일 요법이 필요한 이유는 주로 재조합 GH이 혈장내 반감기가 짧기 때문이며, 그래서 서방형 GH의 개발로 이어지고 있다 (Reiter EO, Attire KM., Mashing TJ, Silverman BL, Kemp SF, Neolith RB, Ford KM, and 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), pp. 47004-4706.).

[0293] 상기에서 언급한 재조합 인간 성장 호르몬-CTP 융합 단백질, GH-CTP는 GH 보다 체류 기간이 더 긴 약동학적 프로파일을 팻에서 나타낸다. 이러한 독특한 약동학적 프로파일로 인해, GH-CTP를 간헐적으로 투여하면, 혈장내 IGF-1 수준 증가 및 성장 각각으로 확인되는 바와 같이, 성장-호르몬 결핍 팻에서 약력학적 효과가 달성된다.

[0294] GH-CTP는 팻에 s.c. 투여하였을 때 GH에 비해 우수한 약동학적 프로파일을 제공한다. 혈장내 GH-CTP의 소거에도 GH 대비 상당한 차이가 존재한다. 구체적으로, GH-CTP는 혈장에서 s.c.로 투여한 후 GH 보다 6배 더 느리게 소거된다. GH-CTP의 종말 반감기과 평균 체류 시간은 팻에 s.c. 투여한 후 GH 보다 약 6배 길다. 아울러, s.c. 투여 후 Cl/F는 GH-CTP가 GH 보다 10배 낮다.

[0295] 팻에서의 약동학적 이점이 약력학적 이점으로 이행되는지를 조사하기 위한 시도로, 매일 보다는 낮은 빈도로 용법을 수행하여, GH-CTP가 GH-결핍성 뇌하수체 적출 팻에서 성장을 자극할 수 있는지를, 등물의 CTP-hGH-CTP-CTP 및 GH 투여량 수준들에서 테스트하였다. GH-CTP 1회 SC 주사는 체중 증가를 촉진하였으며, 이는 GH를 4일 매일 누적 주사한 결과와 동일하였다. 또한, GH-CTP를 4일 마다 투여하는 스케줄에서 GH 대비 강화된 체중 증가가 확인되었다.

[0296] 약력학적으로, 뇌하수체 적출된 팻에서, GH 대비 GH-CTP의 상대적으로 긴 순환 시간으로 인해, s.c. 1회 주사한 후 혈장에서 측정되는 IGF-1 반응이 지속되었다. GH-CTP 1회 투여량을 피하 투여하면 뇌하수체 적출된 팻에서 용량-의존적인 방식으로 순환성 IGF-1 농도가 증가되었다. 일부트로핀 최고량에서, IGF-1 농도는 1회 투여한 후 75시간 만큼 긴 기간 동안 베이스라인 보다 높게 상승하였다. 즉, GH-CTP의 1회 투여시 순환 시간 증가는, GH 1회 투여에 비해 상당한 약력학적 향상을 초래하므로, GH-CTP가 표준적인 GH 처리 용법에 비해 적은 투여 빈도로도 유사한 성장 강화 및 체지방 감소를 제공할 수 있다는 것을 보여준다.

[0297] CTP-변형된 hGH의 1회 투여량, 즉 레소스의 경우 90 mg/kg, 팻의 경우 180 mg/kg은 양쪽 종들에서 충분히 허용되었다. 팻과 영장류 간의 상대생장 인수는 대략 X2이며, 이는 이들 동물에서 관여되는 단백질 소거를 토대로

한 것이다. 산업적으로 허용되는 외삽 모델에 따라, 치료학적 단백질의 반감기는 종 간에 증가한다 (FDA 지침). 영장류의 경우 90 mg/kg이, 랫에서의 CTP 변형된 hGH 180 mg/kg 보다 약간 우수한 PK 프로파일을 가진다. 즉, 인간에 대한 상대생장 외삽은 매주 또는 2주 당 1회 주사를 뒷받침해준다.

[0298] CTP-GH 구조체를 이용하는 본 발명의 컨셉은 시판 GH 재조합 제품에 비해 투여 빈도를 감소시킨다. 뉴트로핀 Depot[®]는 소아 집단에 대한 사용이 승인된 서방형 GH 제형이지만, 과거 대조군과의 비교를 통해, 1년 및 2년 성장율이 GH로 치료받은 어린이(1년 성장을 10.1 ± 2.8 cm/year) 보다, 뉴트로핀 Depot[®]를 복용한 어린이(1년 성장을 8.2 ± 1.8 cm/year)에서 유의하게 낮은 것으로 확인되었다 (Silverman BL. Blethen SL. Reiter EO. Attie KM. Neuwirth RB. and 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), pp. 715-722.). 피하 투여되는 뉴트로핀 Depot[®]의 국소 효과로 결절, 홍반, 주사 부위의 통증, 두통 및 구역질이 수반된다. 랫과 원숭이에 대한 전임상 독성 실험들에서, CTP-hGH-CTP-CTP를 s.c. 투여하면 비히클와 비교하여 국소 반응이 발생되지 않는 것으로 입증되었다. GH의 저 투여 빈도 형태가 필요한 의학적 필요성을 감안하면, 본 실험에서의, 랫에 대한 CTP-hGH-CTP-CTP의 약리학적 특성들은, 이 제품이 독성과 환자 순응성 측면에서도 우호적임을 시사해준다. 랫에서의 CTP-hGH-CTP-CTP의 지속적인 활성은, 현재 매일 투여로 달성되는 치료학적 효과를 구현하는데, 간헐적인 투여만으로도 충분한 제제로서의 이의 잠재적인 유용성을, 뒷받침해준다.

[0299]

실시예 9

[0300] 인간 성장 호르몬 (hGH-CTP)의 장기 작용성 CTP 변형된 버전은 성장 호르몬 결핍성 성인에서 매우 효과적임 - II상 임상 실험

[0301] 무작위, 개방-표지형(open-label)의 II상 임상 실험을 수행하여, 현재 정상 호르몬을 매일 주사받고 있는 환자에서, hGH-CTP의 매주 또는 매달 2회 주사시, 이의 안전성, 허용성, 약동학적 특성 및 약력학적 특성을 조사하였다. 실험은 6개국 여러 곳에서 수행되었다. 실험에서 3가지 메인 코호트에는, 성장 호르몬-결핍 성인 환자가 매일 주사 형태로 7일간 복용하는, 시판 hGH의 누적 투여량에 대해 30%, 45% 또는 100%에 해당되는 투여량으로 hGH-CTP를 매주 1회 투여되었다 (각각, "30%", "45%" 및 "100%" 코호트로 지칭됨). 데이터는 각 코호트 당 13명으로 환자 39명의 결과이다. 각 코호트에는 여성 2명이 포함된다.

[0302] 3가지 메인 코호트 외에도, 성장 호르몬 결핍 성인들을 4번째 실험 코호트에 등록시켰으며, 이는 정식 II상 실험의 번위로 수행하였다. 4번째 코호트 실험 환자에게는, 성장 호르몬-결핍 성인 환자가 매일 주사 형태로 2주간 복용하는, 시판 제품의 누적 투여량에 대해 50%에 해당되는 hGH-CTP를 2주 당 1회로 주사하였다.

[0303] hGH-CTP를 매주 1회 주사한 3가지 메인 코호트의 경우, 효과는 바람직한 치료학적 범위내에서 (실험에서 마지막 치료 주 동안) 7일간 매일 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1) 수준을 측정함으로써, 확인하였다. 바람직한 치료학적 범위는, 연령 그룹 및 성별로 계층화된, 정상 집단에서 예상되는 평균 IGF-1 수준으로부터 $+2$ 표준편차 내지 -2 표준편차에 해당되는 범위로서 정의된다. 아울러, 본 실험에서는, 정상 범위에 속하는 환자들의 차이를 관찰하기 위한 목적으로, 표준편차 ± 1.5 의 좁은 범위내에서 IGF-1 수준을 측정하였다.

[0304] 결과:

[0305] 표 10은, 마지막 치료 주 동안 측정한, 수컷에서, IGF-1의, 정상 치료학적 범위 (± 2 SD)에 속하는 평균 일수 비율, 좁은 (± 1.5 SD) 정상 치료학적 범위에 속하는 평균 일수 비율, 및 평균 Cmax (최고 농도)를 나타낸 것으로, 이는 정상 집단의 평균 IGF-1 수준에 대한 표준 편차로 표시된다.

[0306] 표 10: 인간 II 상 임상 실험의 결과

표 10

코호트	IGF-1의 좁은 정상 범위에 속하는 일수 % (± 1.5 SD)	IGF-1의 정상 범위에 속하는 일수 % (± 2 SD)	IGF-1의 평균 Cmax (바람직한 ± 2 SD 미만)
30%	57%	100%	-0.9
45%	100%	100%	0.1
100%	86%	100%	0.4

[0308]

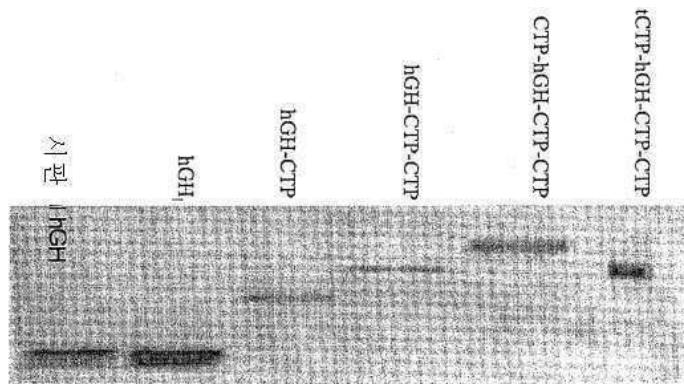
성인 환자가 첫 치료 투여량으로서 통상적으로 처방받게 되는 hGH 누적 매주 투여량의 50%에 해당되는 2 mg/week의 hGH-CTP는, 성인 III상 실험에서 남성과 여성들에서 개시 투여량으로서 정해질 가능성이 매우 높다. 안전성 및/또는 허용성 문제와 관련된 증거는 없으며, hGH-CTP가 고용량으로 사용시 환자에서 IGF-1을 과도한 수준으로, 또는 심지어 정상 범위 보다 높은 수준으로 유도한다는 징후도 없었다.

[0309]

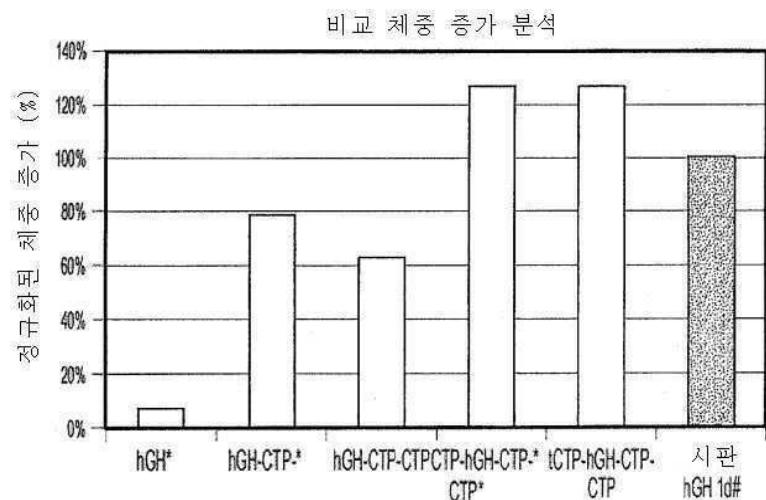
본 발명의 특정한 특징들이 본원에 예시 및 기술되어 있지만, 당해 기술 분야의 당업자라면 여러가지 변형, 치환, 변화 및 등가를 구현할 수 있을 것이다. 따라서, 첨부된 청구항은 본 발명의 실질적인 사상내에서 상기한 모든 변형들과 변화를 포함하는 것으로 이해된다.

도면

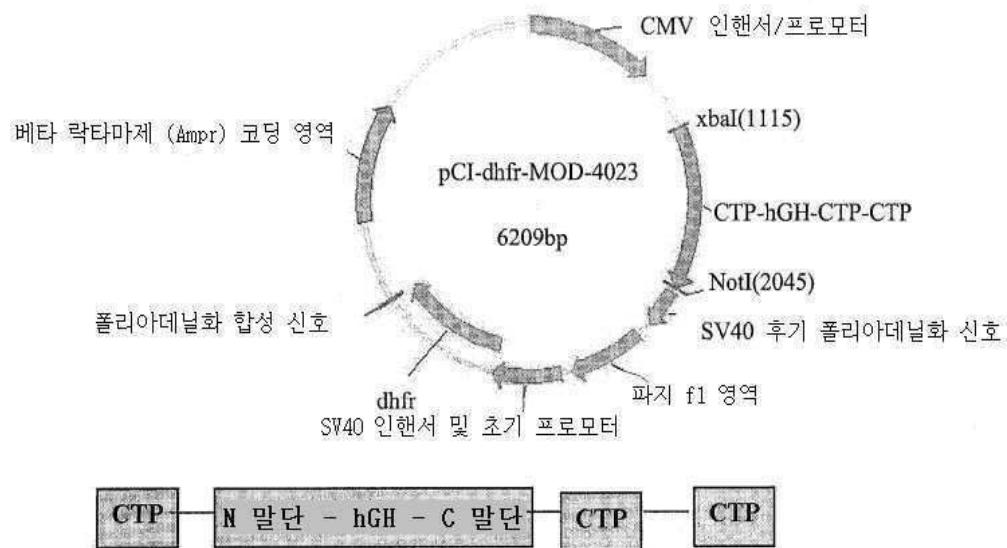
도면1



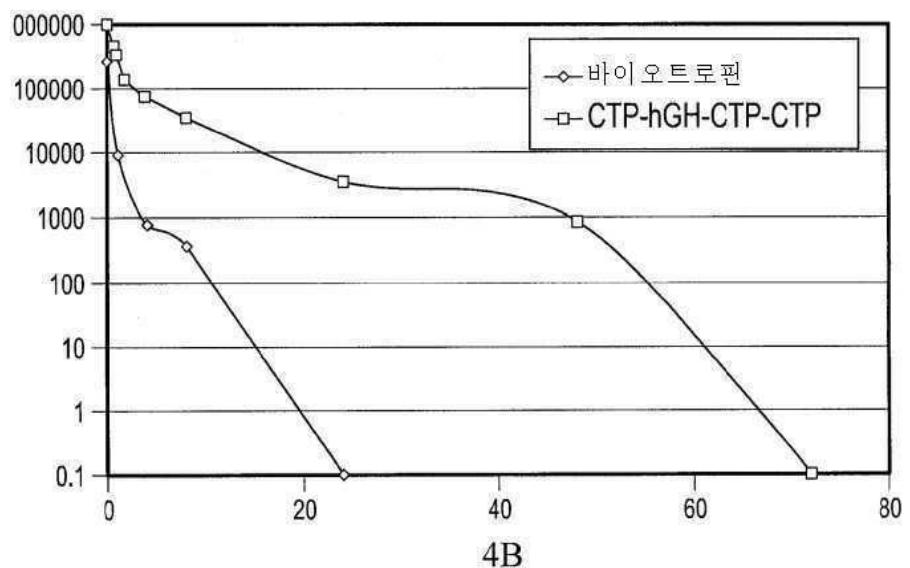
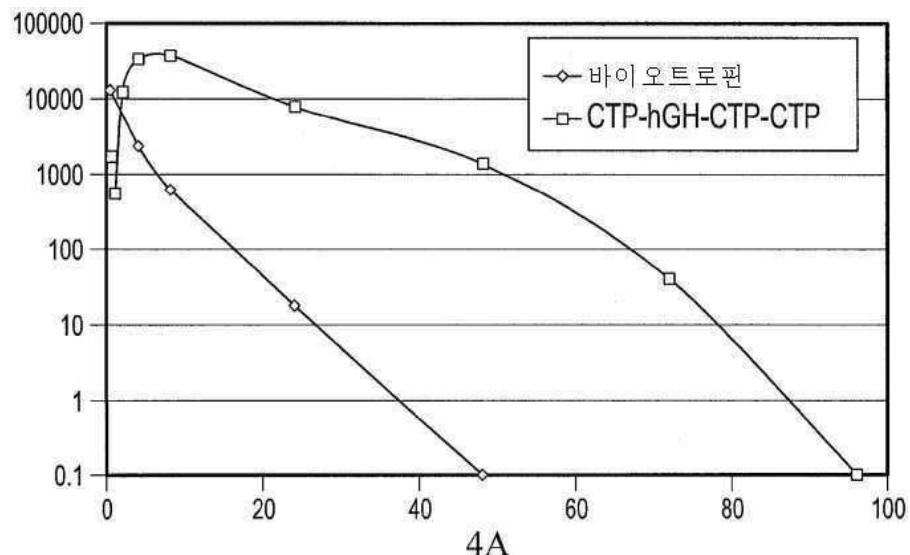
도면2



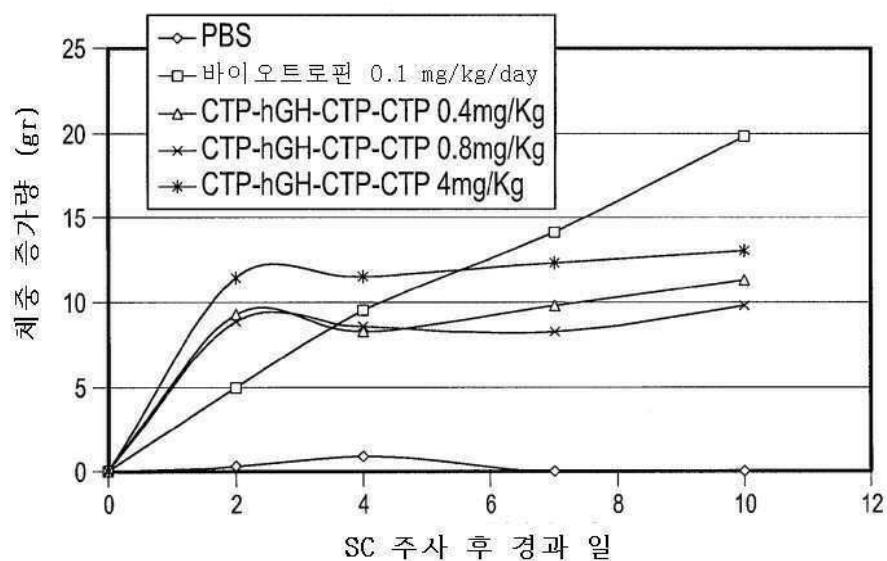
도면3



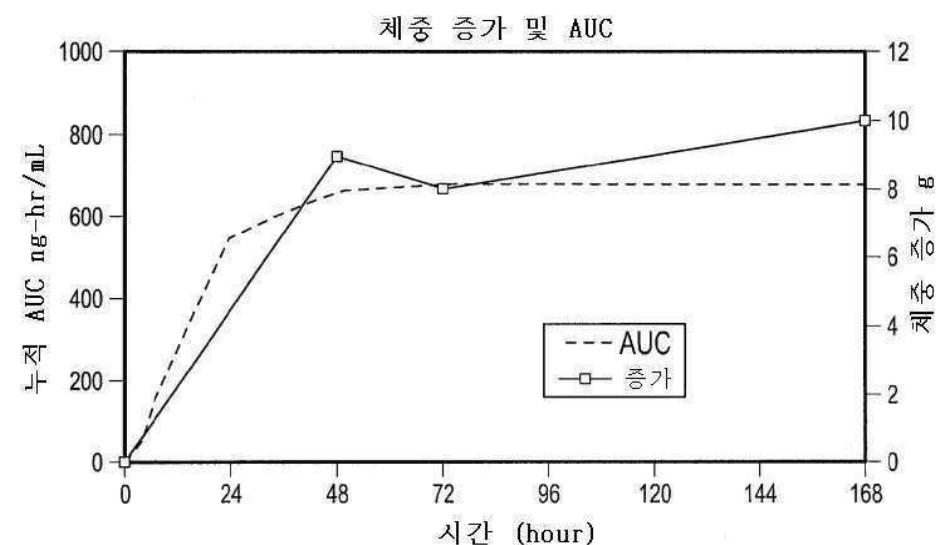
도면4



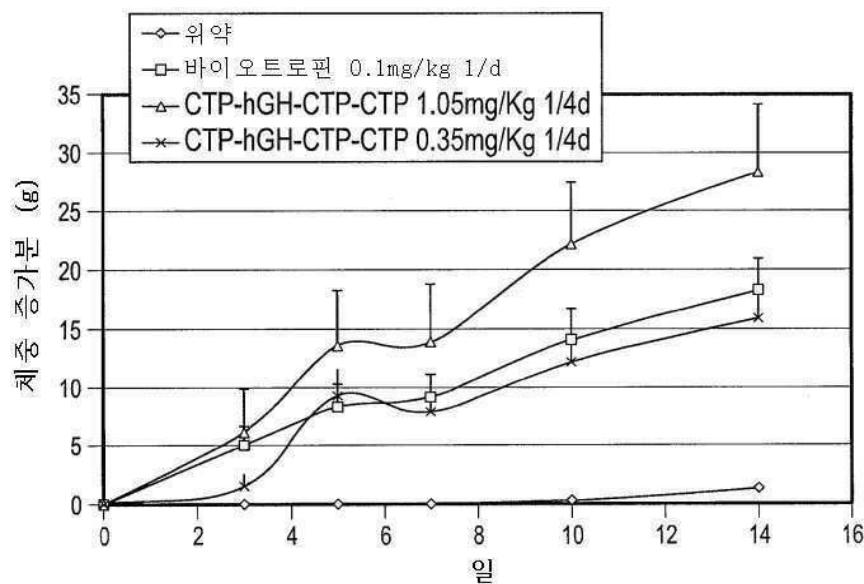
도면5



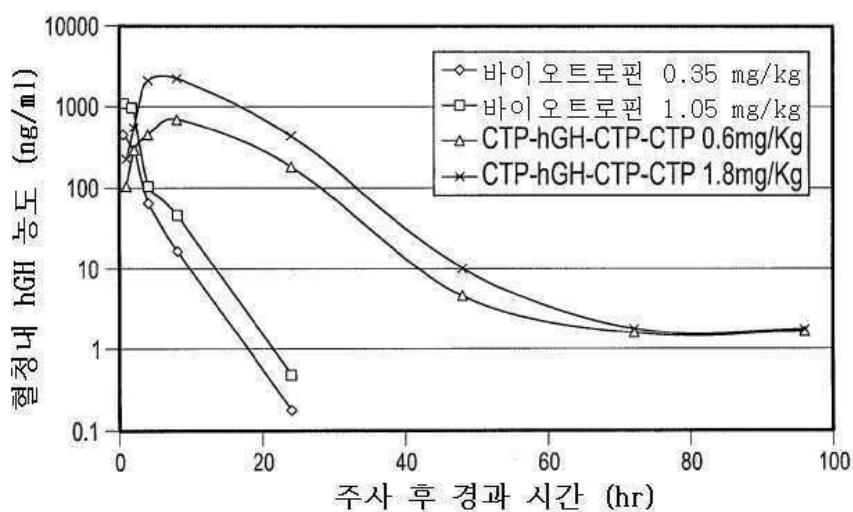
도면6



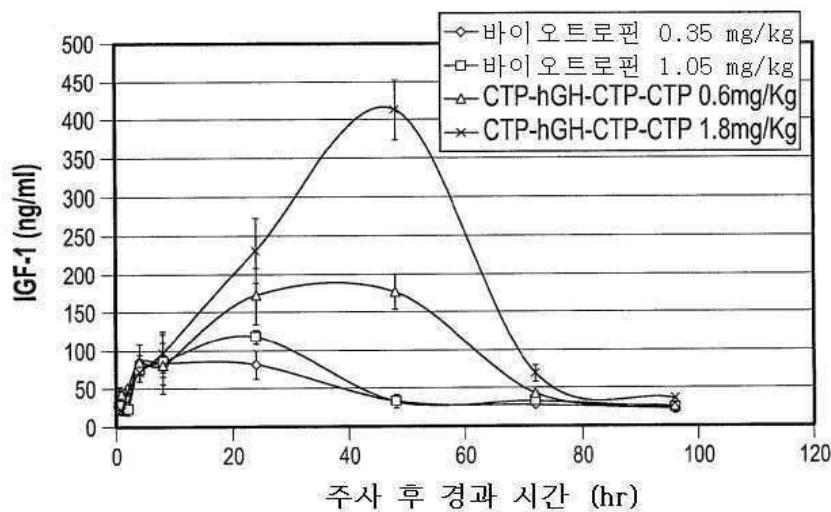
도면7



도면8



도면9



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Prolor Biotech Inc.

<120> LONG-ACTING GROWTH HORMONE AND METHODS OF PRODUCING SAME

<130> P-9520-PC4

<140> PCT/US12/999999

<141> 2012-08-01

<150> 12/476,916

<151> 2009-06-02

<150> 13/195,931

<151> 2011-08-02

<150> 12/509,188

<151> 2009-07-24

<150> 12/476,916

<151> 2009-06-02

<150> 12/401,746

<151> 2009-03-11

<150> 11/700,910

<151> 2007-02-01

<150> 60/764,761

<151> 2006-02-03

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

Gln

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

20	25
----	----

<210> 3

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala

20	25
----	----

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

1 5 10

<210> 5

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

210 215

<210> 6

<211> 192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu

1 5 10 15

Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe

20 25 30

Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr

100 105 110

Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg

115 120 125

Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr

130 135 140

Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe

180 185 190

<210> 7

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu

1 5 10 15

Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala

20 25

<210> 8

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

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

<210> 9

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

100	105	110
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val		
115	120	125
Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu		
130	135	140
Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg		
145	150	155
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser		
165	170	175
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe		
180	185	190
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys		
195	200	205
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro		
210	215	220
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr		
225	230	235
240		
Pro Ile Leu Pro Gln		
245		
<210>	10	
<211>	273	
<212>	PRT	
<213>	Homo sapiens	
<400>	10	
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu		
1	5	10
15		
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu		
20	25	30
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln		
35	40	45
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys		
50	55	60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln

<210> 11

<211> 301

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

<210> 12

<211> 285

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

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

Gln Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
 260 265 270
 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 275 280 285

<210> 13
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Lys Ala
 20 25 30

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
 35 40 45
 Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
 50 55 60
 Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

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

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

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

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

Gln

<210> 14

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Gly Ser Cys Gly Phe

245

<210> 15

<211> 853

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

tctagaggac atggccaccc gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60

cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct 120

gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac 180

catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gtcacaggc tgcaccagct 240

ggccttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag 300

cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcggag agcatcccc caaaaaagcaa 360

cagagaggag acccaggaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat 420

ccagagctgg ctggagcccg tgcagttcct gagaagcgtg ttgcacaaca gcctgggtgt 480

cgcgcccagc gacagcaacg tgtacgaccc gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac 540

cctgtatgggc cggctggagg acggcagecc caggaccggc cagatttca agcagaccta 600

cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacccctg ctgaagaact acgggctgct 660

gtactgtttc agaaaggaca tggacaaggt ggagacccctc ctgaggatcg tgcagtgcag 720

aagcgtggag ggcagctgctg gttcagctc cagcagcaag gcccctcccc cgagccgtcc 780

ctccccaagc aggctgcctg ggcctccga cacaccaatc ctgcctcagt gatgaagggtc 840

tggatgcggc cgc 853

<210> 16

<211> 937

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

tctagaggac atggccaccc gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60

cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct 120

gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac 180

catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gtcacaggc tgcaccagct 240

ggccttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag 300

cttcctgcag aaccccaaga cctccctgtg ctgcggcag agcatcccc ccccccagcaa	360
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat	420
ccagagctgg ctggagcccg tgcagttcct gagaagcgtg ttgcacaaca gcctgggtga	480
cgggcccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac	540
cctgatggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatctca agcagaccta	600
cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgcctg ctgaagaact acgggctgct	660
gtactgcttc agaaaggaca tggacaagggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag	720
aagcgtggag ggtagctgctgc gcttcagctc cagcagcaag gcccctcccc cgagccgtcc	780
ctcccaagc aggtgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgccacaga gcagctctc	840
taaggccct cctccatccc tgccatcccc ctcccggtg cctggccctt ctgacacccc	900
tatcctgcct cagtgtatgaa ggtctggatg cggccgc	937
<210> 17	
<211> 889	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 17	
tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttc gcctgctgtg	60
cctggccatgg ctgcaggagg gcagcgcagg ctcttcttct aaggctccac ccccgagcct	120
gcccttcccc accatcccc ttagcaggtt gttcgacaaac gccatgtga gggctcacag	180
gctgcaccag ctggccttg acacctacca ggagttcgag gaagcctaca tccccaaagga	240
gcagaagtac agtttcgtc agaacccca gaccccttg tgcttcagcg agagcatccc	300
caccccccagc aacagagagg agacccagca gaagagcaac ctggagctgc tgaggatctc	360
cctgttgtc atccagagct ggctggagcc cgtcagttc ctgagaagcg tggtcgccaa	420
cagcctggtg tacggcgcca gcgacagcaa cgtgtacgac ctgctgaagg acctggagga	480
gggcattccag accctgtatgg gcccgttggaa ggacggcagc cccaggaccg gccagatctt	540
caagcagacc tacagcaagt tcgacaccaa cagccacaac gacgacgccc tgctgaagaa	600
ctacggctg ctgtactgct tcagaaagga catggacaaag gtggagaccc tcctgaggat	660
cgtgcagtgc agaaggctgg agggcagctg cggcttcagc tccagcagca aggccctcc	720
cccgagcctg ccctccccaa gcaggctgcc ttggccctcc gacacaccaa tcctgccaca	780
gaggcagctcc tctaaggccc ctccatccatc cctgcacatcc ccctccggc tgcctggccc	840
ctctgacacc cctatcctgc ctcagtgatg aaggcttgaa tgccggccgc	889

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> XbaI Forward primer for HGH-CTP constructs
<400>
18
ctctagagga catggccac 19
<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer for HGH-CTP constructs
<400> 19
acagggaggt ctggggttc tgca 24
<210> 20
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer for HGH-CTP constructs
<400> 20
tgcagaaccc ccagacctcc ctgtgc 26
<210> 21
<211
> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer for HGH-CTP constructs
<400> 21
ccaaactcat caatgttatct ta 22
<210> 22
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> XbaI Forward primer for HGH-CTP constructs

<400> 22	
ctcttagagga catggccac	19
<210> 23	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer for HGH-CTP constructs	
<400> 23	
cgaactcctg gtaggtgtca aaggc	25
<210> 24	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer for HGH-CTP constructs	
<400> 24	
gccttgaca cctaccagga gttcg	25
<210> 25	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer for HGH-CTP constructs	
<400> 25	
acgcggccgc atccagacct tcatcactga ggc	33
<210> 26	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer for HGH-CTP constructs	
<400> 26	
gcggccgcgg actcatcaga agccgcagct gccc	34