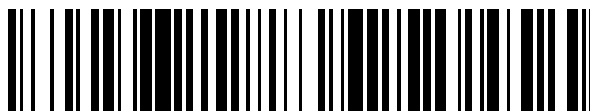


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 734**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/27 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2012** **PCT/IL2012/050288**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013** **WO13018098**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2012** **E 12819794 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018** **EP 2739298**

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

30 Prioridad:

02.08.2011 US 201113195931

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

01.04.2019

73 Titular/es:

OPKO BIOLOGICS LTD. (100.0%)

**16 Ashlegan Street
Kiryat Gat, 8211804, IL**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones:

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

ES 2 706 734 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso médico de una proteína de la hormona del crecimiento que comprende un péptido carboxi-terminal amino-terminal (CTP) de gonadotropina coriónica y dos CTP de gonadotropina coriónica carboxi-terminal unidos a la misma.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los polipéptidos son susceptibles a la desnaturalización o la degradación enzimática en la sangre, el hígado o el riñón. Por consiguiente, los polipéptidos típicamente tienen semividas en la circulación cortas de varias horas.

- 15 Debido a su baja estabilidad, los fármacos peptídicos se administran normalmente en una frecuencia sostenida para mantener una concentración en plasma eficaz del péptido activo. Además, ya que los fármacos peptídicos se administran habitualmente por infusión, la inyección frecuente de fármacos peptídicos provoca una incomodidad considerable a un sujeto. Por lo tanto, existe la necesidad de tecnologías que prolonguen las semividas de los polipéptidos terapéuticos manteniendo al mismo tiempo una alta eficacia farmacológica de los mismos. Dichos
- 20 fármacos peptídicos deseados también deberían cumplir los requisitos de estabilidad en suero mejorada, alta actividad y una baja probabilidad de inducir una respuesta inmunitaria indeseada cuando se inyectan en un sujeto.

La farmacocinética desfavorable, tal como una semivida en suero corta, puede evitar el desarrollo farmacéutico de muchos candidatos farmacológicos de otro modo prometedores. La semivida en suero es una característica empírica de una molécula, y debe determinarse de forma experimental por cada nuevo fármaco potencial. Por ejemplo, con

25 fármacos polipeptídicos de peso molecular inferior, los mecanismos de depuración fisiológicos, tal como la filtración renal, pueden hacer que el mantenimiento de niveles terapéuticos de un fármaco sea inviable debido al coste o la frecuencia del régimen de dosificación requerido. Por el contrario, una semivida en suero prolongada no es deseada cuando un fármaco o sus metabolitos tienen efectos secundarios tóxicos.

30

El documento US 2010/0081614 divulga un polipéptido y polinucleótidos que codifican el mismo que comprenden un péptido carboxi-terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido a un extremo amino de una hormona del crecimiento y dos péptidos carboxi-terminales (CTP) de gonadotropina coriónica unidos a un extremo carboxi de una hormona del crecimiento. También se divulgan composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido y los

35 polinucleótidos, y los métodos para usar las mismas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un polipéptido modificado con el péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica que comprende una hormona del crecimiento para su uso en un método para tratar la deficiencia de hormona del crecimiento en un sujeto adulto humano medida manteniendo los niveles del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) dentro de un intervalo terapéutico normal, en el que el polipéptido modificado con CTP comprende un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de la hormona del crecimiento, y opcionalmente un

45 péptido señal unido al extremo amino del CTP amino terminal, en donde el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido modificado con CTP que comprende una dosis de 1-5 mg/semana administrada una vez a la semana.

En una forma de realización, al menos un CTP está glucosilado.

50

En una forma de realización, al menos un CTP está unido a la hormona del crecimiento a través de un enlazador. En una forma de realización, el enlazador es un enlace peptídico.

En una forma de realización, al menos un CTP tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

55

En una forma de realización, la hormona del crecimiento es la hormona del crecimiento humana. En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento tiene al menos un 80% de homología con la SEQ ID NO: 5.

En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos del péptido señal comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3.

En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido modificado con CTP comprende la secuencia de aminoácidos 27-301 de SEQ ID NO: 11. En otra forma de realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido modificado con CTP comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 11. En una forma de realización, el polipéptido modificado con CTP está codificado por la SEQ ID NO: 16.

En las formas de realización de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido modificado con CTP comprende una dosis semanal de 1,2 mg, 1,8 mg, 2 mg o 4 mg.

En una forma de realización, el sujeto adulto humano es un hombre.

En una forma de realización, la hormona del crecimiento modificada con CTP se administra por vía subcutánea al sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

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

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

La Figura 5 son gráficos que muestran el aumento de peso gradual medio después de dosis s.c. individuales de CTP-hGH-CTP-CTP (0,4, 0,8 y 4 mg/kg) en ratas hipofisectomizadas en comparación con inyecciones de GH diarias (0,1 mg/kg/día) (n = 10 por dosis).

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

La Figura 7 es un gráfico que muestra el aumento de peso gradual después de dosis s.c. de CTP-hGH-CTP-CTP (0,4, 0,8 y 4 mg/kg) con 4 días de diferencia en ratas hipofisectomizadas en comparación con inyecciones de GH diarias (0,1 mg/kg/día) (n = 10 por dosis).

La Figura 8 es un gráfico que muestra la concentración en suero de hGH en ratas hipofisectomizadas después de una inyección SC de CTP-hGH-CTP-CTP y hGH comercial. Se inyectaron por vía subcutánea una sola dosis de CTP-hGH-CTP-CTP, 0,6 o 1,8 mg/kg, y Biotropin, 0,35 o 1,05 mg/kg, ratas hipofisectomizadas para la determinación del perfil PK/PD. La inyección posterior de hGH en suero se midió utilizando kits ELISA específicos.

La Figura 9 es un gráfico que muestra los niveles en suero de IGF-1 en ratas hipofisectomizadas después de la inyección SC de CTP-hGH-CTP-CTP y hGH comercial. Se inyectaron por vía subcutánea una sola dosis de CTP-hGH-CTP-CTP, 0,6 o 1,8 mg/kg, y Biotropin, 0,35 o 1,05 mg/kg, ratas hipofisectomizadas para la determinación del perfil PK/PD. La inyección posterior de IGF-I en suero se midió utilizando kits ELISA específicos (Roche Diagnostics).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un polipéptido modificado con el péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica que comprende una hormona del crecimiento para su uso en un método para tratar la deficiencia de hormona del crecimiento en un sujeto adulto humano medida manteniendo los niveles del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) dentro de un intervalo terapéutico normal, en el que el polipéptido modificado con CTP comprende un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de la hormona del crecimiento, y opcionalmente un péptido señal unido al extremo amino del CTP amino terminal, en donde el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido modificado con CTP que comprende una dosis de 1-5 mg/semana administrada una vez a la semana.

Como se describe en el presente documento, el péptido carboxi terminal (CTP, también denominado unidad CTP) de la gonadotropina coriónica humana (hCG) actúa como un protector contra la degradación de la hormona del crecimiento, extiende la $C_{\text{máx}}$ de la hormona del crecimiento, extiende el $T_{\text{máx}}$ de la hormona del crecimiento, 5 extiende la semivida en la circulación de la hormona del crecimiento o mejora la potencia de la hormona del crecimiento.

En otras formas de realización, las hormonas de crecimiento modificadas para su uso en la invención, que comprenden un único CTP unido al extremo amino y dos péptidos de CTP unidos en tándem al extremo carboxi, son 10 al menos equivalentes a las hormonas del crecimiento no modificadas por el CTP en términos de la actividad biológica. En otras formas de realización, las hormonas del crecimiento modificadas que comprenden un único CTP unido al extremo amino y dos péptidos de CTP unidos en tándem al extremo carboxi son al menos equivalentes a las hormonas de crecimiento no modificadas por CTP en términos de medidas farmacológicas tales como la farmacocinética y la farmacodinámica.

15 En otra forma de realización, los términos "péptido CTP", "péptido carboxi terminal" y "secuencia de CTP" se usan de forma intercambiable en el presente documento. En otra forma de realización, el péptido carboxi terminal es un CTP de longitud completa. En otra forma de realización, el péptido carboxi terminal es un CTP truncado.

20 En otra forma de realización, "secuencia señal" y "péptido señal" se usan de forma intercambiable en el presente documento. En otra forma de realización, "secuencia" cuando se hace referencia a un polinucleótido puede referirse a una porción codificante.

En otra forma de realización, el polipéptido modificado con CTP para su uso en la invención consiste en una 25 hormona del crecimiento, un solo péptido carboxi terminal de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de la hormona del crecimiento. En otra forma de realización, el polipéptido modificado con CTP para su uso en la invención consiste en una hormona del crecimiento, un solo péptido carboxi terminal de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de la hormona del crecimiento, dos péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica 30 unidos al extremo carboxi de la hormona del crecimiento, y un péptido señal unido al extremo amino de un péptido carboxi terminal de gonadotropina coriónica.

En otra forma de realización, una hormona del crecimiento que comprende un CTP unido a su extremo amino y dos 35 CTP unidos a su extremo carboxi tiene una actividad biológica *in vivo* mejorada en comparación con la misma hormona del crecimiento sin CTP.

En esta invención, el sujeto es un sujeto humano adulto. En una forma de realización, el sujeto es un hombre. En otra forma de realización, el sujeto es una mujer.

40 En otra forma de realización, un CTP- hormona del crecimiento -CTP-CTP como se describe en el presente documento comprende una hormona del crecimiento o un fragmento activo de la misma conectada a través de un enlace peptídico al menos a una unidad CTP que está conectada a una unidad CTP adicional a través de un enlace peptídico. En otra forma de realización, una molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido como se describe en el presente documento que comprende una hormona del crecimiento y/o fragmentos de la misma y unidades CTP 45 y/o fragmentos de las mismas.

En otra forma de realización, el péptido carboxi-terminal (CTP) está unido a la hormona del crecimiento a través de un enlazador. En otra forma de realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP a la hormona del crecimiento es un enlace covalente. En otra forma de realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP a la 50 hormona del crecimiento es un enlace peptídico. En otra forma de realización, el enlazador que conecta la secuencia de CTP a la hormona del crecimiento es un enlace peptídico sustituido. En otra forma de realización, la secuencia de péptido carboxi-terminal (CTP) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 1, y SEQ ID NO: 2.

55 La SEQ ID NO: 1 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (AA): DPRFQDSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILQ (SEQ ID NO: 1). SEQ ID NO: 2 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (AA): SSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILQ (SEQ ID NO: 2).

En otra forma de realización, la secuencia de péptido carboxi-terminal (CTP) está truncada. En otra forma de

realización, un CTP truncado comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: SSSSKAPPPSLP (SEQ ID NO: 4).

En otra forma de realización, el péptido carboxi terminal (CTP) comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido 112 a la posición 145 de un péptido humano nativo de gonadotropina coriónica. En otra forma de realización, la secuencia de CTP comprende la secuencia de aminoácidos del aminoácido 118 a la posición 145 de un péptido humano de gonadotropina coriónica. En otra forma de realización, la secuencia de CTP también comienza desde cualquier posición entre las posiciones 112-118 y termina en la posición 145 del péptido humano de gonadotropina coriónica. En algunas formas de realización, el péptido de la secuencia de CTP es de 28, 29, 30, 31, 32, 33 o 34 aminoácidos de longitud y comienza en la posición 112, 113, 114, 115, 116, 117 o 118 la secuencia de aminoácidos de CTP depositada en el banco de genes.

En otra forma de realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 1-5 sustituciones de aminoácidos conservadoras como se describe en la Pat. de Estados Unidos N.º 5.712.122. En otra forma de realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 1 sustitución de aminoácidos conservadora. En otra forma de realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 2 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra forma de realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 3 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra forma de realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 4 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra forma de realización, el péptido CTP es una variante de CTP de gonadotropina coriónica que difiere del CTP nativo en 5 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra forma de realización, la secuencia de aminoácidos del péptido CTP es al menos un 70% homóloga a la secuencia de aminoácidos del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra forma de realización, la secuencia de aminoácidos del péptido CTP es al menos un 80% homóloga a la secuencia de aminoácidos del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra forma de realización, la secuencia de aminoácidos del péptido CTP es al menos un 90% homóloga a la secuencia de aminoácidos del CTP nativo o un péptido de la misma. En otra forma de realización, la secuencia de aminoácidos del péptido CTP es al menos un 95% homóloga a la secuencia de aminoácidos del CTP nativo o un péptido de la misma.

En una forma de realización, el CTP truncado comprende los primeros 11 aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En una forma de realización, el CTP truncado comprende los primeros 8 aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

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

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

En una forma de realización, los términos "extremos", "terminal", "extremo terminal" y "extremo" cuando se hace referencia a un extremo carboxi o amino de una proteína o péptido o fragmento de los mismos proporcionados en el presente documento, se usan de manera intercambiable en el presente documento. En otra forma de realización, los términos "C-terminal", "carboxi terminal" o "carboxilo terminal" se usan de manera intercambiable en el presente documento. En otra forma de realización, los términos "N-terminal" y "amino terminal" se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Como se divulga en el presente documento, al menos una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos unidades de CTP en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento proporciona una protección mejorada frente a la depuración. En otra forma de realización, al menos una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos unidades de CTP en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento proporciona un tiempo de depuración prolongado. En otra forma de realización, al menos una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos

unidades de CTP en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento mejora la $C_{\text{máx}}$ de una hormona del crecimiento. En otra forma de realización, al menos una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos unidades de CTP en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento mejora el $T_{\text{máx}}$ de una hormona del crecimiento. En otra forma de realización, al menos una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos unidades de CTP en el extremo carboxi terminal de una hormona del crecimiento mejoró la $T_{1/2}$ (semivida) de la hormona del crecimiento.

Como se divulga en el presente documento, al menos una sola secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y al menos dos secuencias de CTP en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento proporcionan una semivida extendida a la hormona del crecimiento modificada. En otra forma de realización, una sola secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos secuencias de CTP en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento proporcionan una semivida extendida a la hormona del crecimiento adjunta. En otra forma de realización, una sola secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento y dos secuencias de CTP en tándem en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento proporcionan una semivida extendida a la hormona del crecimiento modificada.

Como se divulga en el presente documento, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de un polipéptido, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en tándem a la secuencia de CTP en el extremo carboxi proporcionan una protección mejorada contra la degradación a una hormona del crecimiento. En algunas formas de realización, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en tándem a la secuencia de CTP en el extremo carboxi extienden la semivida de la hormona del crecimiento. En algunas formas de realización, una secuencia de CTP en el extremo amino terminal de una hormona del crecimiento, una secuencia de CTP en el extremo carboxi terminal de la hormona del crecimiento, y al menos una secuencia de CTP adicional unida en tándem a la secuencia de CTP en el extremo carboxi mejoran la actividad biológica de la hormona del crecimiento.

En otra forma de realización, la hormona del crecimiento comprende además un péptido señal. En algunas formas de realización, las secuencias señal incluyen, pero sin limitación, la secuencia señal endógena. En algunas formas de realización, las secuencias señal incluyen, pero sin limitación, la secuencia señal endógena de cualquier hormona del crecimiento u hormonas del crecimiento conocidas. En otra forma de realización, los polipéptidos para su uso en la presente invención incluyen una hormona del crecimiento que tiene adicionalmente un péptido señal que comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSA (SEQ ID NO: 3).

Como se divulga en el presente documento, las hormonas del crecimiento conjugadas con CTP tienen una semivida en la circulación y un tiempo de residencia en plasma aumentados, una depuración reducida, y una actividad clínica *in vivo* aumentada. En otra forma de realización, debido a las propiedades mejoradas de las hormonas del crecimiento conjugadas como se describe en el presente documento, estos conjugados se administran con menos frecuencia que las hormonas del crecimiento no modificadas. En otra forma de realización, las hormonas del crecimiento conjugadas como se describen en el presente documento, se administran una vez a la semana. Como se divulga en el presente documento, la frecuencia reducida de la administración dará como resultado un mejor cumplimiento del paciente que conducirá a mejores resultados del tratamiento, así como una mejor calidad de vida del paciente. Como se divulga en el presente documento, en comparación con los conjugados convencionales de hormonas de crecimiento ligadas a poli(etilenglicol), se ha encontrado que los conjugados CTP de la hormona del crecimiento que tienen el peso molecular y la estructura del enlazador que se divulgan en el presente documento tienen una potencia mejorada, una estabilidad mejorada, niveles elevados de AUC y una mejora semivida en la circulación. Como se divulga en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de una hormona del crecimiento conjugada es la cantidad de conjugado necesaria para la actividad biológica esperada medible *in vivo*. En otra forma de realización, una hormona del crecimiento modificada con CTP utilizada de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención presenta una potencia aumentada. En otra forma de realización, como se divulga en el presente documento, la unión de la secuencia de CTP tanto al extremo amino como carboxi de una hormona del crecimiento da como resultado una actividad *in vivo* prolongada.

En otra forma de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de una hormona del crecimiento conjugada se determina de acuerdo con factores como el tipo exacto de afección que se está tratando, la condición del paciente que está siendo tratado, así como los demás ingredientes en la composición. En otra forma de realización, una composición farmacéutica que comprende una hormona del crecimiento conjugada se formula con una resistencia eficaz para la administración por diversos medios a un paciente humano.

- En otra forma de realización, la hormona del crecimiento es cualquier hormona del crecimiento conocida por un experto en la técnica. En otra forma de realización, la hormona del crecimiento es una hormona del crecimiento humana. En otra forma de realización, la secuencia de nucleótidos y/o la secuencia de aminoácidos de una hormona del crecimiento está disponible en una base de datos del banco de genes. En otra forma de realización, la hormona del crecimiento es un homólogo. En otra forma de realización, un homólogo también se refiere a una variante de delección, inserción o sustitución, que incluye una sustitución aminoacídica, y fragmentos de polipéptidos biológicamente activos de los mismos.
- 10 En otra forma de realización, la hormona del crecimiento es una variante de los exones faltantes en la hGH 2, 3, 4, o cualquier combinación de los mismos. En otra forma de realización, la hormona del crecimiento comprende un péptido señal. En otra forma de realización, la hormona del crecimiento comprende un sitio de escisión de señal. En otra forma de realización, los polipéptidos que comprenden GH modificada por CTP comprenden GH recombinante.
- 15 En otra forma de realización, una hormona del crecimiento como se describe en el presente documento, es un miembro de la superfamilia de las citocinas de tipo hormona del crecimiento (GH). En otra forma de realización, una hormona del crecimiento como se describe en el presente documento es la hormona del crecimiento humana (hGH). En otra forma de realización, una hormona del crecimiento humana comprende la siguiente secuencia de aminoácidos (Genbank N.º de Acceso P01241):
- 20 MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEA
YIPKEQKYSFLQNPQTSCLFSESIPSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF ANSL
VYGASDSNVYDILLKDLLEGIQTLGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDAL
LKNYGLLYCFRKDMKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 5). En otra forma de realización, una hormona del crecimiento humana comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
- 25 MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSCLFSESIPSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDILLKDLLEGIQ
TLGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALKNYGLLYCFRKDMKVETFLRIVQ CRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 6). En otra forma de realización, una hormona del crecimiento humana comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLA (SEQ ID NO: 7). En otra forma de realización, una hGH
- 30 comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEA
YIPKVQKYSFLQNPQTSCLFSESIPSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF
ANSLVYGASDSNVYDILLKDLLEGIQTLGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDAL
LKNYGLLYCFRKDMKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 8). En otra forma de realización, una hGH es una
- 35 variante de sustitución en la que la glutamina en la posición 65 de la hGH está sustituida por una valina.

- En otra forma de realización, una hormona del crecimiento comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º AAA72260, acceso n.º AAK69708, acceso n.º CAA01435, acceso n.º CAA01329, acceso n.º CAA00380, acceso n.º AAA72555, acceso n.º NP_000506.2, acceso n.º NP_072053.1, acceso n.º NP_072054.1, acceso n.º NP_072055.1, o con el acceso n.º NP_072056.1.
- 40

- En otra forma de realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento como se describe en el presente documento codifica cualquier secuencia de aminoácidos de una hormona del crecimiento conocida por un experto en la técnica. En otra forma de realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento como se describe en el presente documento codifica una hGH. En otra forma de realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NM_000515.3. En otra forma de realización, la molécula de ácido nucleico que codifica una hormona del crecimiento comprende la secuencia depositada de aminoácidos del banco de genes con el acceso n.º NM_022559.2, acceso n.º NM_022560.2, acceso n.º NM_022561.2, o con el acceso n.º NM_022562.2.
- 50

Como se divulga en el presente documento, un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento y un CTP unido al extremo carboxi de la hormona del crecimiento (hGH-CTP) puede tener la siguiente secuencia de aminoácidos:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEA
YIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF
ANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDAL
LKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILP
Q (SEQ ID NO: 9).

Como se divulga en el presente documento, un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento y dos CTP en tándem unidos al extremo carboxi de la hormona del crecimiento (hGH-CTP-CTP) puede tener la siguiente
5 secuencia de aminoácidos:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEA
YIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF
ANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDAL
LKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILP
QSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 10).

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

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRL
FDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTSPNREETQQK
SNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLED
GSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSC
GFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID
NO: 11).

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

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPFPPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQL
AFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSW
LEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKF
DTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPS
RLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 12).

Como se divulga en el presente documento, un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento y un CTP unido al extremo carboxi de la hormona del crecimiento y un CTP unido al extremo amino de la hormona del
20 crecimiento (CTP-hGH-CTP) puede tener la siguiente secuencia de aminoácidos:

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRL
FDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTSPNREETQQK
SNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLED
GSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSC
GFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 13).

Como se divulga en el presente documento, un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento y un CTP puede comprender la siguiente secuencia de aminoácidos:

MATGSR TSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRL
FDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSEIPTSPNREETQQK
SNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLD
GSPRTGQIFKQTYSKFDTN SHND DALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSC

5 GF (SEQ ID NO: 14).

Como se divulga en el presente documento, una molécula polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene CTP-hGH-CTP puede comprender la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccatggctgcaggagggcagcgcca
gctcttcttctaaggctccaccccatctctgcccagccccagcagactgccgggccccagcgacacacccattctgccccagttccccacc
atccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggtcacaggctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgaggaag
cctacatccccaaggagcagaagtacagcttctgcagaacccccagacctccctgtgcttcagcgagagcatccccacccccagcaaca
gagaggagaccagcagaaggaacactggagctgctgaggatctccctgctgctgatccagagctggctggagcccgtgcagttcctga
gaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgacagcaacgtgtacgacctgctgaaggacctggaggaggcatccagacc
ctgatgggcccggctggaggacggcagccccaggaccggccagatctcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagccacaacg
acgacgccctgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaaggacatggacaaggtggagaccttctgaggatcgtgcagtga
gaagcgtggaggggcagctgcggcttcagctccagcagaaggccccctccccgagcctgccctcccccaagcaggctgcctgggccctcc
gacacaccaatcctgcctcagtgatgaaggtctggatcgggccgc (SEQ ID NO: 15).

10

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

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccatggctgcaggagggcagcgcca
gctcttcttctaaggctccaccccatctctgcccagccccagcagactgccgggccccagcgacacacccattctgccccagttccccacc
atccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggtcacaggctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgaggaag
cctacatccccaaggagcagaagtacagcttctgcagaacccccagacctccctgtgcttcagcgagagcatccccacccccagcaaca
gagaggagaccagcagaaggaacactggagctgctgaggatctccctgctgctgatccagagctggctggagcccgtgcagttcctga
gaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgacagcaacgtgtacgacctgctgaaggacctggaggaggcatccagacc
ctgatgggcccggctggaggacggcagccccaggaccggccagatctcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagccacaacg
acgacgccctgctgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaaggacatggacaaggtggagaccttctgaggatcgtgcagtga
gaagcgtggaggggcagctgcggcttcagctccagcagaaggccccctccccgagcctgccctcccccaagcaggctgcctgggccctcc
gacacaccaatcctgcacagagcagctcctctaaggccccctcctccatccctgccatccccctccggctgcctggcccccttgacacccc
tactctgcctcagtgatgaaggtctggatcgggccgc (SEQ ID NO: 16).

15

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

tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccatggctgcaggagggcagcgcca
gctcttcttctaaggctccacccccgagcctgcccttccccaccatccccctgagcaggctgttcgacaacgccatgctgagggctcacagg
ctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgaggaagcctacatccccaaggagcagaagtacagcttctgcagaacccccag
acctcctgtgcttcagcgagagcatccccacccccagcaacagagaggagaccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatctc
cctgctgctgatccagagctggctggagcccgctgcagttcctgagaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgacagcaa
cgtgtacgacctgctgaaggacctggaggaggcatccagaccctgatgggcccggctggaggacggcagccccaggaccggccagat
cttcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagccacaacgacgacgcctgtgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaag
gacatggacaaggtggagaccttctgaggatcgtgcagtgacagaagcgtggaggcgagctgcggcttcagctccagcagcaaggcccc
tccccgagcctgccctcccccaagcaggctgcctgggccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctcctctaagggccctcctcca
tccctgccatccccctcccggtgcctggccccttgacacccctatcctgcctcagtgatgaaggtctggatgcggccgc (SEQ ID
NO: 17).

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

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

15 En una forma de realización, la "hormona del crecimiento humana" (hGH) se refiere a un polipéptido, tal como se
expone en el Genbank N.º de Acceso P01241, que presenta actividad de hGH (es decir estimulación del
crecimiento). En una forma de realización, hGH también se refiere a los homólogos. En una forma de realización, la
secuencia de aminoácidos de hGH para su uso en la presente invención es al menos un 80% homóloga con una
20 secuencia de hGH expuesta en el GenBank Acceso N.º P01241 como se determina usando el software BlastP del
National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando los parámetros por defecto). En una forma de
realización, la secuencia de aminoácidos de hGH es al menos un 90% homóloga con una secuencia de hGH
expuesta en el GenBank Acceso N.º P01241 como se determina usando el software BlastP del National Center of
Biotechnology Information (NCBI) usando los parámetros por defecto). En una forma de realización, la secuencia de
25 aminoácidos de hGH es al menos un 95% homóloga con una secuencia de hGH expuesta en el GenBank Acceso
N.º P01241 como se determina usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI)
usando los parámetros por defecto).

Como se divulga en el presente documento, los polipéptidos que comprenden la hGH modificada por los CTP se
30 unen a los adipocitos y los estimulan para descomponer los triglicéridos y suprimen su capacidad para captar y
acumular los lípidos en la circulación. Como se divulga en el presente documento, los polipéptidos que comprenden
la hGH modificada por los CTP ejercen efectos indirectos mediados principalmente por un factor de crecimiento
insulínico de tipo I (IGF-I) (como se muestra en la sección de ejemplos).

35 Como se divulga en el presente documento, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP
estimulan el crecimiento corporal estimulando el hígado y otros tejidos para secretar IGF-I. En otra forma de
realización, IGF-I estimula la proliferación de condrocitos, dando como resultado un crecimiento óseo. En otra forma
de realización, IGF-I estimula la proliferación de células del músculo esquelético, dando como resultado el
crecimiento muscular.

40 Como se divulga en el presente documento, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP inducen
un efecto metabólico sobre el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos. En otra forma de realización, los
polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP tienen un efecto directo. En otra forma de realización, los

polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP tienen un efecto indirecto a través de la inducción de IGF-I. En otra forma de realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP comprenden además un péptido líder. En otra forma de realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP incluyen construcciones truncadas de CTP.

5 Como se divulga en el presente documento, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan el anabolismo proteico en un tejido. En otra forma de realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan la captación de aminoácidos, aumentan la síntesis de proteínas y disminuyen la oxidación de las proteínas.

10 Como se divulga en el presente documento, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan el metabolismo de las grasas. En otra forma de realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan la utilización de la grasa estimulando la degradación de los triglicéridos y la oxidación en los adipocitos. En otra forma de realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por CTP
15 reducen la grasa corporal.

Como se divulga en el presente documento, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan el metabolismo de los carbohidratos. En otra forma de realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP mantienen la glucosa en sangre dentro de un intervalo normal. En otra forma de realización,
20 los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP comprenden una actividad anti-insulina. En otra forma de realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP suprimen la capacidad de la insulina para estimular la captación de glucosa en los tejidos periféricos y mejorar la síntesis de glucosa en el hígado. En otra forma de realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP estimulan la secreción de insulina, dando lugar a hiperinsulinemia.

25 Como se divulga en el presente documento, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP pueden usarse para compensar la producción limitada o nula de hormona del crecimiento en un sujeto. En otra forma de realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP compensan la producción limitada o nula de hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH). En otra forma de realización, los polipéptidos que
30 comprenden hGH modificada por los CTP compensan el aumento de la actividad de la somatostatina. En otra forma de realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP compensan la producción limitada o nula de grelina.

Como se divulga en el presente documento, el tratamiento de los niños con deficiencia de GH con GH da como
35 resultado un aumento del crecimiento, mientras que en los adultos con deficiencia de GH, el tratamiento con GH da como resultado un aumento de la masa corporal magra y una disminución o reducción de la grasa corporal. En otra forma de realización, el tratamiento con formas modificadas por CTP de GH da como resultado una mejora de estos efectos en niños y adultos. En otra forma de realización, el tratamiento con hGH modificada con CTP en adultos con deficiencia de GH produce un aumento de la masa corporal magra y una reducción de la grasa corporal en
40 comparación con los adultos con deficiencia de GH que reciben la misma dosis de GH comercial, no modificada, diaria. En otra forma de realización, el tratamiento con hGH modificada con CTP en adultos produce un aumento de la masa corporal magra y una reducción de la grasa corporal en comparación con los adultos que reciben la misma dosis de GH comercial, no modificada, diaria.

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

En algunas formas de realización, las modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificación del extremo N terminal, modificación del extremo C terminal, modificación de enlaces polipeptídicos, incluyendo, pero sin limitación, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones del esqueleto,
55 y modificación de residuos. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar compuestos peptidomiméticos y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). Se proporcionan posteriormente en el presente documento detalles adicionales a este respecto.

En algunas formas de realización, se sustituyen los enlaces polipeptídicos (-CO-NH-) dentro del polipéptido. En

- algunas formas de realización, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces N-metilados (-N(CH₃)-CO-). En algunas formas de realización, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-). En algunas formas de realización, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de cetometileno (-CO-CH₂-). En algunas formas de realización, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces α -aza (-NH-N(R)-CO-), en los que R es cualquier enlace carba alquilo, por ejemplo, metilo, (-CH₂-NH-). En algunas formas de realización, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-). En algunas formas de realización, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de tioamida (-CS-NH-). En algunas formas de realización, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por dobles enlaces olefínicos (-CH=CH-). En algunas formas de realización, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por enlaces de retro amida (-NH-CO-). En algunas formas de realización, los enlaces polipeptídicos se sustituyen por derivados polipeptídicos (-N(R)-CH₂-CO-), en los que R es la cadena lateral "normal" presentada de forma natural en el átomo de carbono. En algunas formas de realización, estas modificaciones se producen en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena polipeptídica e incluso en varios (2-3 enlaces) al mismo tiempo.
- 15 En algunas formas de realización, los aminoácidos aromáticos naturales del polipéptido, tales como Trp, Tyr y Phe, están sustituidos por ácido no natural sintético tal como Fenilglicina, TIC, naftilalanina (Nol), derivados metilados anulares de Phe, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr. En algunas formas de realización, los polipéptidos incluyen uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros no aminoacídicos (pro ejemplo, ácido graso, carbohidratos, complejos, etc.).
- 20 En una forma de realización, se entiende que "aminoácido" incluye los 20 aminoácidos de origen natural; incluyendo estos aminoácidos con frecuencia modificados postraduccionalmente *in vivo*, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; e incluyendo otros aminoácidos poco habituales, pero sin limitación, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. En una forma de realización, "aminoácido" incluye tanto
- 25 D-aminoácido como L-aminoácido.
- En algunas formas de realización, los polipéptidos se utilizan en productos terapéuticos que requieren que los polipéptidos estén en forma soluble. En algunas formas de realización, los polipéptidos para su uso en la presente invención incluyen uno o más aminoácidos polares no naturales o naturales, incluyendo, pero sin limitación, serina y
- 30 treonina, que son capaces de aumentar la solubilidad del polipéptido debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.
- En algunas formas de realización, los polipéptidos que comprenden hGH modificada por los CTP se utilizan en forma lineal, aunque un experto en la técnica apreciará que en los casos en los que la ciclación no interfiera gravemente con la hGH modificada por los CTP característicos, también se pueden utilizar formas cíclicas de las hormonas del crecimiento.
- 35 En algunas formas de realización, la hGH modificada por CTP para su uso en la presente invención se sintetizan de forma bioquímica tal como usando técnicas de fase sólida convencionales. En algunas formas de realización, estos métodos bioquímicos incluyen síntesis de fase sólida exclusiva, síntesis de fase sólida parcial, condensación de fragmentos, o síntesis de solución clásica. En algunas formas de realización, estos métodos se usan cuando las hormonas del crecimiento son relativamente cortas (aproximadamente 5-15 kDa) y/o cuando no pueden producirse por técnicas recombinantes (es decir, no están codificadas por una secuencia de ácidos nucleicos) y, por lo tanto, implica una química diferente.
- 45 En algunas formas de realización, se conocen bien en la técnica procedimientos de síntesis de hGH de fase sólida modificadas por CTP y se describen por John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, Solid Phase Polypeptide Syntheses (2ª Ed., Pierce Chemical Company, 1984). En algunas formas de realización, los polipéptidos sintéticos se purifican por cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento [Creighton T. (1983) Proteins, structures and
- 50 molecular principles. WH Freeman y Co. N.Y.] y cuya composición puede confirmarse a través de secuenciación de aminoácidos por métodos conocidos por los expertos en la técnica.
- En algunas formas de realización, se usan técnicas de proteínas recombinantes para generar la hGH modificada por CTP para su uso en la presente invención. En algunas formas de realización, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de polipéptidos relativamente largos (por ejemplo, mayores de 18-25 aminoácidos). En algunas formas de realización, se usan técnicas de proteínas recombinantes para la generación de grandes cantidades de la hGH modificada por CTP. En algunas formas de realización, se describen técnicas recombinantes por Bitter et al., (1987) Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier et al. (1990) Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson et al. (1984) Nature 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) EMBO J. 6:307-311, Coruzzi et al.

(1984) EMBO J. 3: 1671-1680 y Brogli et al., (1984) Science 224: 838-843, Gurley et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565 y Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, págs. 421-463.

- 5 En otra forma de realización, hGH modificada por CTP para su uso en la presente invención se sintetizan usando un polinucleótido que codifica el polipéptido. En otra forma de realización, el polinucleótido que codifica la hGH modificada por CTP está ligado a un vector de expresión, que comprende un control de la transcripción de una secuencia reguladora en cis (por ejemplo, una secuencia promotora). En otra forma de realización, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión constitutiva de las hormonas del crecimiento. En otra forma
10 de realización, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión específica de tejido de la hGH modificada por CTP. En otra forma de realización, la secuencia reguladora en cis es adecuada para dirigir la expresión inducible de la hGH modificada por CTP.

- En otra forma de realización, los promotores específicos de tejido adecuados incluyen secuencias que son
15 funcionales en poblaciones celulares específicas, los ejemplos incluyen, pero sin limitación, promotores tales como albúmina, que es específica del hígado [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1: 268-277], promotores específicos linfoides [Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43: 235-275]; en particular promotores de los receptores de linfocitos T [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8: 729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji et al. (1983) Cell 33729-740], promotores
20 específicos de neuronas tales como el promotor de neurofilamentos [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477], promotores específicos del páncreas [Edlunch et al. (1985) Science 230:912-916] o promotores específicos de las glándulas mamarias tales como el promotor de suero de la leche (Pat. de Estados Unidos N.º 4.873.316 y la Publicación de Solicitud Europea N.º 264.166). Los promotores inducibles adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor inducible por tetraciclina (Srouf, M.A., et al., 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405).

- 25 En una forma de realización, la frase "un polinucleótido" se refiere a una secuencia de ácido nucleico mono o bicatenaria que puede aislarse y proporcionarse en forma de una secuencia de ARN, una secuencia polinucleotídica complementaria (ADNc), una secuencia polinucleotídica genómica y/o una secuencia polinucleotídica compuesta (por ejemplo, una combinación de las anteriores).

- 30 En una forma de realización, "secuencia polinucleotídica complementaria" se refiere a una secuencia, que es resultado de la transcripción inversa de ARN mensajero usando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. En una forma de realización, la secuencia puede amplificarse posteriormente *in vivo* o *in vitro* usando una ADN polimerasa.

- 35 En una forma de realización, "secuencia polinucleotídica genómica" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y, por lo tanto, representa una porción contigua de un cromosoma.

- En una forma de realización, "secuencia polinucleotídica compuesta" se refiere a una secuencia que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. En una forma de realización, una secuencia
40 compuesta puede incluir algunas secuencias exónicas requeridas para codificar el polipéptido, así como algunas secuencias intrónicas interpuestas entre las mismas. En una forma de realización, las secuencias intrónicas puede ser de cualquier fuente, incluyendo de otros genes, y típicamente incluirán secuencias señal de corte y empalme conservadas. En una forma de realización, las secuencias intrónicas incluyen elementos reguladores de expresión de acción en cis.

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

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

promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).

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

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

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

En una forma de realización, se usan sistemas de expresión de levaduras. En una forma de realización, se pueden usar varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles en levadura como se divulga en la Solicitud de Pat. de Estados Unidos N.º: 5.932.447. En otra forma de realización, se usan vectores que promueven la integración de secuencias de ADN ajeno en el cromosoma de levadura.

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

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

En otra forma de realización, se usan vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas tales como retrovirus. Los vectores de SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En algunas formas de realización, los vectores derivados de virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus de Epstein Barr incluyen pHEBO y p2O5. Otros vectores ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMT010/A⁺, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV-40, promotor tardío de SV-40, promotor de metalotioneína, promotor del virus de tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, u otros promotores que se ha mostrado que son eficaces para la expresión en células eucariotas.

En otra forma de realización, los vectores virales recombinantes son útiles para la expresión *in vivo* de la GH modificada por CTP ya que ofrecen ventajas tales como infección lateral y especificidad de direccionamiento. En una forma de realización, la infección lateral es inherente en el ciclo de vida de, por ejemplo, retrovirus y es el proceso por el que una única célula infectada produce muchos viriones descendientes que emergen e infectan células vecinas. En otra forma de realización, el resultado es que se infecta rápidamente un área grande, la mayor parte de la cual no se había infectado inicialmente por las partículas víricas originales. En una forma de realización, se producen vectores víricos que son incapaces de propagarse lateralmente. En otra forma de realización, esta

característica puede ser útil si el fin deseado es introducir un gen específico solamente en un número localizado de células diana.

En otra forma de realización, pueden usarse diversos métodos para introducir el vector de expresión en las células.

- 5 Dichos métodos se describen en general en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, 10 transfección, lipofección, electroporación e infección estable o transitoria con vectores virales recombinantes. Además, véanse, las Pat. de Estados Unidos N.º 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positiva-negativa.

- En otra forma de realización, la introducción de ácido nucleico por infección vírica ofrece varias ventajas sobre otros 15 métodos tales como lipofección y electroporación, ya que puede obtenerse mayor eficacia de transfección debido a la naturaleza infecciosa de los virus.

- En una forma de realización, se usan vectores de expresión vegetales. En una forma de realización, la expresión de una secuencia codificante del polipéptido se conduce por varios promotores. En algunas formas de realización, se 20 usan promotores víricos tales como los promotores de ARN 35S y ARN 19S de CaMV [Brisson et al., *Nature* 310: 511-514 (1984)], o el promotor de proteína de cubierta para TMV [Takamatsu et al., *EMBO J.* 6: 307-311 (1987)]. En otra forma de realización, se usan promotores vegetales tales como, por ejemplo, la subunidad pequeña de RUBISCO [Coruzzi et al., *EMBO J.* 3: 1671-1680 (1984); y Brogli et al., *Science* 224: 838-843 (1984)] o promotores de choque térmico, por ejemplo, hsp17.5-E o hsp17.3-B de soja [Gurley et al., *Mol. Cell. Biol.* 6: 559-565 (1986)]. En 25 una forma de realización, se introducen construcciones en células vegetales usando plásmido Ti, plásmido Ri, vectores víricos de plantas, transformación de ADN directa, microinyección, electroporación y otras técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Weissbach & Weissbach [*Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, págs. 421-463 (1988)]. También pueden usarse otros sistemas de expresión tales como sistemas celulares huésped de insectos y mamíferos, que se conocen bien en la técnica.

- 30 Se apreciará que además de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica el polipéptido), la construcción de expresión también puede incluir secuencias modificadas por ingeniería genética para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad del polipéptido expresado.

- 35 Pueden usarse diversos métodos, en algunas formas de realización, para introducir el vector de expresión en el sistema celular huésped. En algunas formas de realización, dichos métodos se describen generalmente en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang 40 et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] e incluyen, por ejemplo, transfección, lipofección, electroporación e infección estable o transitoria con vectores virales recombinantes. Además, véanse, las Pat. de Estados Unidos N.º 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positiva-negativa.

- 45 En una forma de realización, se cultivan células transformadas en condiciones eficaces, que permiten la expresión de altas cantidades de polipéptido recombinante. En otra forma de realización, las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero sin limitación, un medio eficaz, biorreactor, temperatura, pH y condiciones de oxígeno que permiten la producción de proteínas. En una forma de realización, un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se 50 cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante. En otra forma de realización, un medio incluye típicamente una solución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, y sales, minerales, metales y otros nutrientes, tales como vitaminas, apropiados. En otra forma de realización, las células pueden cultivarse en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de petri. En otra forma de realización, el cultivo se realiza a una temperatura, pH y contenido 55 de oxígeno apropiados para una célula recombinante. En otra forma de realización, las condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto en la técnica.

En otra forma de realización, dependiendo del vector y el sistema huésped usado para la producción, las hormonas del crecimiento modificadas por CTP resultantes permanecen dentro de la célula recombinante, se secretan al medio

de fermentación, se secretan a un espacio entre dos membranas celulares, tales como el espacio periplásmico en *E. coli*; o se conservan en la superficie externa de una membrana celular o viral.

En una forma de realización, después de un tiempo predeterminado en cultivo, se realiza una recuperación del polipéptido recombinante.

En una forma de realización, la frase "recuperar el polipéptido recombinante" usada en el presente documento se refiere a recoger el medio de fermentación completo que contiene polipéptido y no es necesario que implique etapas adicionales de separación o purificación.

En una forma de realización, las hormonas del crecimiento modificadas por CTP se purifican usando una diversidad de técnicas de purificación de proteínas convencionales, tales como, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de concanavalina A, cromatoenfoco y solubilización diferencial.

En una forma de realización, para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada puede modificarse por ingeniería genética para codificar el polipéptido y un resto escindible fusionado. En una forma de realización, puede diseñarse una proteína de fusión de modo que el polipéptido pueda aislarse fácilmente por cromatografía de afinidad; por ejemplo, por inmovilización en una columna específica para el resto escindible. En una forma de realización, se diseña un sitio de escisión entre el polipéptido y el resto escindible y el polipéptido puede liberarse de la columna cromatográfica por tratamiento con una enzima o agente apropiado que escinde específicamente la proteína de fusión en este sitio [por ejemplo, véase Booth et al., *Immunol. Lett.* 19: 65-70 (1988); y Gardella et al., *J. Biol. Chem.* 265: 15854-15859 (1990)].

En una forma de realización, el polipéptido de la GH modificada por CTP se recupera en forma "sustancialmente pura".

En una forma de realización, la frase "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones descritas en el presente documento.

En una forma de realización, el polipéptido de la GH modificada por CTP también puede sintetizarse usando sistemas de expresión *in vitro*. En una forma de realización, se conocen bien en la técnica métodos de síntesis *in vitro* y están disponibles en el mercado los componentes del sistema.

En una forma de realización, se realiza la producción de GH modificada por CTP usando tecnología de ADN recombinante.

En otra forma de realización, los polipéptidos recombinantes se sintetizan y se purifican; su eficacia terapéutica puede ensayarse *in vivo* o *in vitro*. En una forma de realización, las actividades de unión de la GH recombinante modificada por CTP se puede determinar mediante varios ensayos.

La presente invención aprovecha los polipéptidos CTP-hGH-CTP-CTP. En una forma de realización, se usan métodos de tecnología de ADN recombinante para la producción de polipéptidos CTP-hGH-CTP-CTP como se ilustra en el Ejemplo 1. En una forma de realización, la eficacia terapéutica de los polipéptidos CTP-hGH-CTP-CTP se ensaya *in vivo*. En una forma de realización, la eficacia terapéutica de los polipéptidos CTP-hGH-CTP-CTP se ensaya *in vitro*. En una forma de realización, las actividades de unión de los polipéptidos de hGH recombinantes se miden usando Nb2 (una línea celular del linfoma de rata dependiente de prolactina (Banco de Células ECACC)) o una línea celular murina FCD-P1, transfectada previamente con un receptor de la hormona del crecimiento humana. En una forma de realización, la unión de hGH con estos receptores induce la proliferación celular que en una forma de realización se mide por los niveles de tinción celular de MTT en función de la actividad de hGH. En una forma de realización, la actividad *in vivo* se deduce midiendo el aumento de peso a lo largo del tiempo en animales deficientes en hormona del crecimiento tratados.

Se divulga en el presente documento un método para inducir el crecimiento o el aumento de peso en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido a un extremo amino de dicha hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos a un extremo carboxi de la hormona del crecimiento, induciendo de este modo el crecimiento o aumento de peso en un sujeto.

También se divulga en el presente documento un método para inducir el crecimiento en un sujeto humano, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de dicha hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de dicha hormona del crecimiento, induciendo de este modo el crecimiento en dicho sujeto.

También se divulga en el presente documento un método para inducir el aumento de peso en un sujeto humano, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de dicha hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de dicha hormona del crecimiento, induciendo de este modo el aumento de peso en dicho sujeto.

También se divulga en el presente documento un método para inducir la pérdida de peso o reducción de la grasa corporal en un sujeto humano, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de dicha hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de dicha hormona del crecimiento, induciendo de este modo la pérdida de peso o reducción de la grasa corporal en dicho sujeto. En una forma de realización, dicho sujeto es obeso. En otra forma de realización, el sujeto tiene sobrepeso. En otra forma de realización, el sujeto humano es un adulto. En otra forma de realización, el sujeto humano es un adulto con deficiencia de GH.

También se describe en el presente documento un método para disminuir los depósitos de grasa en un sujeto, un método para aumentar la masa muscular en un sujeto, y un método para promover el crecimiento muscular en un sujeto. En otra forma de realización, el sujeto humano es un adulto. En otra forma de realización, el sujeto humano es un adulto con deficiencia de GH. En el presente documento también se divulga un método para aumentar la relación músculo-grasa y un método para disminuir el índice de masa corporal (IMC) o el índice de Quetelet.

También se divulga en el presente documento un método para inducir el crecimiento en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una hormona del crecimiento modificada por CTP como se describe en el presente documento. En otra forma de realización, se proporciona en el presente documento un método para inducir el crecimiento en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una composición que consiste en excipientes conocidos, vehículos conocidos, y un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido a un extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica unidos a un extremo carboxi de la hormona del crecimiento. También se divulga en el presente documento un método para inducir el crecimiento en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una composición que consiste en excipientes conocidos, vehículos conocidos, y un polipéptido que consiste en una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido a un extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos péptidos carboxi terminales de gonadotropina coriónica unidos a un extremo carboxi de la hormona del crecimiento.

En otra forma de realización, el crecimiento se mide por el aumento de peso. En otra forma de realización, el crecimiento se mide por el aumento de altura. En otra forma de realización, el crecimiento se mide por el aumento de masa muscular. En otra forma de realización, el crecimiento se mide por el aumento de masa ósea. En otra forma de realización, el crecimiento se mide por el aumento de grasa. En otra forma de realización, el crecimiento se mide por cualquier medida conocida que se conozca por un experto en la técnica.

En otra forma de realización, los fármacos proteicos de peso molecular inferior a 50.000 Daltons, tal como la GH modificada por CTP, son en general especies de vida corta *in vivo*, que tienen una semivida corta en la circulación de varias horas. En otra forma de realización, la vía de administración subcutánea en general proporciona una liberación más lenta en la circulación. En otra forma de realización, el polipéptido modificado con CTP prolonga la semivida de los fármacos proteicos de peso molecular inferior a 50.000 Daltons, tal como la GH. En otra forma de realización, el polipéptido modificado con CTP permite que la GH ejerza sus efectos beneficiosos durante un periodo de tiempo más prolongado.

Como se divulga en el presente documento, la inmunogenicidad de un polipéptido modificado con CTP que comprende una GH modificada por CTP es igual a una GH aislada. En otra forma de realización, la inmunogenicidad de un polipéptido modificado con CTP que comprende una GH modificada por CTP es comparable a una GH aislada. En otra forma de realización, la modificación de una GH como se describe en el presente documento con

péptidos CTP reduce la inmunogenicidad de la GH. En otra forma de realización, el polipéptido modificado por CTP que comprende una GH es tan activo como una proteína GH aislada. En otra forma de realización, el polipéptido modificado por CTP que comprende una GH es más activa que una GH aislada. En otra forma de realización, el polipéptido modificado por CTP que comprende una GH maximiza la capacidad protectora de la hormona del crecimiento contra la degradación mientras que minimiza las reducciones en la bioactividad.

En otra forma de realización, la GH modificada por CTP para su uso en la presente invención se proporciona al individuo *per se*. En una forma de realización, la GH modificada por CTP se proporciona al individuo como parte de una composición farmacéutica donde se mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra forma de realización, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En otra forma de realización, "principio activo" se refiere a la secuencia polipeptídica, que causa el efecto biológico.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona preparaciones combinadas. En una forma de realización, "una preparación combinada" define especialmente un "kit de partes" en el sentido de que los compañeros de combinación como se han definido anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de los compañeros de combinación es decir, simultáneamente, conjuntamente, por separado o secuencialmente. En otra forma de realización, las partes del kit de partes pueden después, por ejemplo, administrarse de forma simultánea o escalonarse cronológicamente, es decir, en diferentes puntos temporales y con intervalos temporales iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. La relación de las cantidades totales de los compañeros de combinación puede administrarse en la preparación combinada. La preparación combinada puede variarse, por ejemplo, para afrontar las necesidades de una subpoblación de pacientes para tratar o las necesidades del paciente individual cuyas necesidades diferentes pueden deberse a una enfermedad particular, gravedad de una enfermedad, edad, sexo o peso corporal como puede realizarse fácilmente por un experto en la técnica.

En otra forma de realización, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que pueden usarse de forma intercambiable se refieren a un vehículo o un diluyente que no provoca irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Se incluye un adyuvante en estas frases. En una forma de realización, uno de los ingredientes incluidos en el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidad en medios tanto acuosos como orgánicos (Mutter et al. (1979).

En otra forma de realización, "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. En una forma de realización, los excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

En otra forma de realización, las vías adecuadas de administración, por ejemplo, incluyen administración oral, rectal, transmucosa, transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

En otra forma de realización, la preparación o medicamento es para administrar de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección de la preparación directamente en una región específica del cuerpo de un paciente.

Se contemplan diversas formas de realización de intervalos de dosificación por esta invención.

En una forma de realización, la dosificación de GH dada a un sujeto es el 50% de la dosificación estándar administrada a un sujeto de referencia de la misma población de sujetos (por ejemplo, niños, ancianos, hombres, mujeres, con deficiencia de GH, una nacionalidad específica, etc.). En otra forma de realización, la dosificación es el

30% de la dosificación dada a un sujeto de una población específica de sujetos. En otra forma de realización, la dosificación es el 45% de la dosificación dada a un sujeto de una población específica de sujetos. En otra forma de realización, la dosificación es el 100% de la dosificación dada a un sujeto de una población específica de sujetos.

5 En esta invención, la dosificación es de 1-5 mg/semana. En otra forma de realización, la dosificación es de 2 mg/semana. En otra forma de realización, la dosificación es de 4 mg/semana. En otra forma de realización, la dosificación es de 1,2 mg/semana. En otra forma de realización, la dosificación es de 1,8 mg/semana. En otra forma de realización, la dosificación son aproximadamente las dosificaciones descritas en el presente documento.

10 En otra forma de realización, la dosificación es de 1-5 mg/administración. En otra forma de realización, la dosificación es de 2 mg/administración. En otra forma de realización, la dosificación es de 4 mg/administración. En otra forma de realización, la dosificación es de 1,2 mg/administración. En otra forma de realización, la dosificación es de 1,8 mg/administración. En esta invención, la composición se administra una vez a la semana.

15 En otra forma de realización, la GH modificada por CTP se formula en una forma de dosificación intranasal. En otra forma de realización, la GH modificada por CTP se formula en una forma de dosificación inyectable.

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

20 Como se divulga en el presente documento, los compuestos de GH modificada con CTP para su uso en la invención aumentan el cumplimiento de los pacientes afectados por enfermedades crónicas que necesitan una terapia con GH. En otra forma de realización, la modificación de la GH con CTP como se describe en el presente documento permite una reducción en la frecuencia de dosificación de una GH. En otra forma de realización, el término cumplimiento

25 comprende adherencia. En otra forma de realización, el cumplimiento de los pacientes que necesitan una terapia con GH se aumenta al reducir la frecuencia de administración de la GH. En otra forma de realización, la reducción de la frecuencia de administración de la GH se consigue debido a las modificaciones de CTP que hacen que la GH modificada por CTP sea más estable. En otra forma de realización, la reducción de la frecuencia de administración de la GH se consigue como resultado del aumento de la T_{1/2} de la hormona del crecimiento. En otra forma de

30 realización, la reducción de la frecuencia de administración de la GH se consigue como resultado del aumento del tiempo de depuración de la GH. En otra forma de realización, la reducción en la frecuencia de administración de la hormona del crecimiento se consigue como resultado del aumento de la medida del AUC de la hormona del crecimiento.

35 En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona un método para aumentar los niveles del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) en un sujeto humano, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de dicha hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de dicha hormona del crecimiento, aumentando de este modo los

40 niveles de IGF-1 en dicho sujeto. Los métodos para aumentar los niveles de IGF-1 se proporcionan en el Ejemplo 6, a continuación.

En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona un método para aumentar los niveles del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) a un intervalo terapéutico deseado en un sujeto humano, que comprende administrar

45 al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una hormona del crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de dicha hormona del crecimiento, aumentando de este modo los niveles de IGF-1 a un intervalo terapéutico deseado en el sujeto. En otra forma de realización, el sujeto humano es un adulto con deficiencia de GH. Los métodos para aumentar los niveles de IGF-1 a un nivel

50 terapéutico deseado se proporcionan en el Ejemplo 9, a continuación.

En una forma de realización, la presente divulgación proporciona un método para mantener los niveles del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) dentro de un intervalo terapéutico normal en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que comprende una hormona del

55 crecimiento, un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de la hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de la hormona del crecimiento, manteniendo de este modo los niveles de IGF-1 dentro de un intervalo terapéutico normal en el sujeto. Los métodos para mantener los niveles de IGF-1 dentro de un nivel terapéutico normal se proporcionan en el Ejemplo 9, a continuación.

En una forma de realización, mantener los niveles de IGF-1 en un intervalo terapéutico normal en un sujeto humano puede ser eficaz para tratar, prevenir o suprimir la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS, también conocida como "Enfermedad de Lou Gehrig"), lesiones por quemaduras graves y distrofia muscular miotónica (MMD).

En una forma de realización, el intervalo terapéutico deseado se define como entre ± 2 desviaciones estándar a -2 desviaciones estándar de los niveles promedio de IGF-1 esperados en una población normal, estratificada por grupo de edad y género, como se proporciona más adelante en el presente documento (véase el Ejemplo 9). Además, el ensayo midió los niveles de IGF-1 dentro de un intervalo más estrecho de $\pm 1,5$ desviaciones estándar con el fin de observar la varianza de los pacientes dentro del intervalo normal (véase el Ejemplo 9, a continuación).

La administración oral, en una forma de realización, comprende una forma de dosificación unitaria que comprende comprimidos, cápsulas, grageas, comprimidos masticables, suspensiones, emulsiones y similares. Dichas formas de dosificación unitaria comprenden una cantidad segura y eficaz de la hormona de crecimiento deseada. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de formas de dosificación unitarias para administración peroral se conocen bien en la técnica. En algunas formas de realización, los comprimidos típicamente comprenden adyuvantes convencionales farmacéuticamente compatibles como diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, manitol, lactosa y celulosa; aglutinantes tales como almidón, gelatina y sacarosa; disgregantes tales como almidón, ácido algínico y croscarmelosa; lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. En una forma de realización, pueden usarse emolientes tales como dióxido de silicio para mejorar las características de flujo de la mezcla de polvos. En una forma de realización, pueden añadirse agentes colorantes, tales como colorantes FD&C, para determinar el aspecto. Los edulcorantes y agentes saboríferos, tales como aspartamo, sacarina, mentol, menta y sabores de frutas, son adyuvantes útiles para comprimidos masticables. Las cápsulas típicamente comprenden uno o más diluyentes sólidos desvelados anteriormente. En algunas formas de realización, la selección de componentes vehículo depende de consideraciones secundarias como el sabor, el coste y la estabilidad en almacenamiento, que no son críticas para los fines de la presente invención, y puede realizarse fácilmente por un experto en la técnica.

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

Las composiciones perorales, en algunas formas de realización, comprenden soluciones, emulsiones, suspensiones líquidas, y similares. En algunas formas de realización, se conocen bien en la técnica vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la preparación de dichas composiciones. En algunas formas de realización, las composiciones orales líquidas comprenden de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 0,933% del compuesto o los compuestos deseados, o en otra forma de realización, de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 10%.

En algunas formas de realización, las composiciones para su uso en esta invención comprenden soluciones o emulsiones, que en algunas formas de realización son soluciones o emulsiones acuosas que comprenden una cantidad segura y eficaz de los compuestos de la GH modificada por CTP y opcionalmente otros compuestos, diseñadas para administración intranasal tópica. En algunas formas de realización, las composiciones comprenden de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 10,0% p/v de una GH modificada por CTP, más preferiblemente de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 2,0%, que se usa para administración sistémica de los compuestos por la vía intranasal.

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

forma de realización, las composiciones farmacéuticas se administrarán por vía intramuscular y por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para administración intramuscular.

Además, en otra forma de realización, las composiciones farmacéuticas se administrarán por vía tópica a superficies corporales, y por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, pomadas, cremas, lociones, gotas y similares. Para administración tópica, los compuestos de GH modificada por CTP se combinan con un agente o agentes terapéuticos apropiados adicionales, preparados y aplicados como soluciones, suspensiones o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un vehículo farmacéutico.

10

En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas se fabrican por procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, forma de realización de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

15 En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas se formulan de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que pueden usarse de forma farmacéutica. En una forma de realización, la formulación depende de la vía de administración seleccionada.

20 En una forma de realización, se formulan inyectables en soluciones acuosas. En una forma de realización, se formulan inyectables en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. En algunas formas de realización, para administración transmucosa, se usan penetrantes apropiados para la barrera para permear en la formulación. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica.

25 En una forma de realización, las preparaciones descritas en el presente documento se formulan para administración parenteral, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. En algunas formas de realización, se presentan formulaciones para inyección en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. En algunas formas de realización, las composiciones son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículo oleosos o acuosos, y contienen agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o de dispersión.

30

Las composiciones también comprenden, en algunas formas de realización, conservantes, tales como cloruro de benzalconio y timerosal, y similares; agentes quelantes, tales como edetato sódico y otros; tampones tales como fosfato, citrato y acetato; agentes de tonicidad tales como cloruro sódico, cloruro potásico, glicerina, manitol y otros; antioxidantes tales como ácido ascórbico, acetilcistina, metabisulfato sódico y otros; agentes aromáticos; agentes de ajuste de viscosidad, tales como polímeros, incluyendo celulosa y derivados de la misma; y alcohol polivinílico y ácido y bases para ajustar el pH de estas composiciones acuosas según sea necesario. Las composiciones también comprenden, en algunas formas de realización, anestesia local u otros activos. Las composiciones pueden usarse como pulverizaciones, nebulizaciones, gotas y similares.

40

En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, se preparan suspensiones de los principios activos, en algunas formas de realización, como suspensiones de inyección a base de agua u oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados, incluyen, en algunas formas de realización, aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa contienen, en algunas formas de realización, sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. En otra forma de realización, la suspensión también contiene estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

50

En otra forma de realización, el compuesto activo puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véanse Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez- Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibíd.*, págs. 317-327; véase en general *ibíd.*).

55

En otra forma de realización, la composición farmacéutica suministrada en un sistema de liberación controlada se formula para infusión intravenosa, bomba osmótica implantable, parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una forma de realización, se usa una bomba (véanse Langer, anteriormente; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574

(1989). En otra forma de realización, pueden usarse materiales poliméricos. En otra forma de realización más, puede situarse un sistema de liberación controlada en proximidad a la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984). Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

En algunas formas de realización, el principio activo está en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, solución a base de agua sin pirógenos, estéril, antes de su uso. Las composiciones se formulan, en algunas formas de realización, para administración por atomización e inhalación. En otra forma de realización, las composiciones están contenidas en un recipiente con medios de atomización unidos.

En una forma de realización, la preparación se formula en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

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

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

Algunos ejemplos de sustancias que pueden actuar como vehículos farmacéuticamente aceptables o componentes de los mismos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa y metil celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; lubricantes sólidos, tales como ácido esteárico y estearato de magnesio; sulfato cálcico; aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de theobroma; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ácido alginico; emulsionantes tales como los emulsionantes de la marca Tween™; agentes humectantes, tales como lauril sulfato sódico; agentes colorantes; agentes saporíferos; agentes de formación de comprimidos, estabilizadores; antioxidantes; conservantes; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; y soluciones de tampón fosfato. La elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar junto con el compuesto se determina básicamente por el modo en que va a administrarse el compuesto. Si el compuesto objeto se va a inyectar, en una forma de realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es solución salina fisiológica estéril, con un agente de suspensión compatible con la sangre, cuyo pH se ha ajustado a aproximadamente 7,4.

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

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

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

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

10

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

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

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

20

25

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

30

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

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

En otra forma de realización, una GH modificada por CTP se administra mediante administración sistémica. En otra forma de realización, una hormona del crecimiento como se describe en el presente documento se administra por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. En otra forma de realización, una GH modificada por CTP es una preparación liofilizada (es decir, secada por congelación) en combinación con excipientes orgánicos complejos y estabilizantes tales como agentes tensioactivos no iónicos (es decir, tensioactivos), diversos azúcares, polioles orgánicos y/o albúmina sérica humana. En otra forma de realización, una composición farmacéutica comprende una GH liofilizada modificada por CTP como se describe en agua estéril para inyección. En otra forma de realización, una composición farmacéutica comprende una hormona de crecimiento liofilizada como se describe en PBS estéril para inyección. En otra forma de realización, una composición farmacéutica comprende una hormona de crecimiento liofilizada como se describe en NaCl al 0,9% estéril para inyección.

40

45

50 En otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento y portadores complejos tales como albúmina sérica humana, polioles, azúcares y agentes estabilizantes tensioactivos aniónicos. Véase, por ejemplo, el documento WO 89/10756 (Hara et al.- que contiene poliol y p-hidroxibenzoato). En otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende una hormona del crecimiento como se describe en el presente documento y ácido lactobiónico y un tampón de acetato/glicina. En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento y los aminoácidos, tales como arginina o glutamato, que aumentan la solubilidad de las composiciones de interferón en agua. En otra forma de realización, la composición farmacéutica comprende una GH liofilizada modificada por CTP como se describe en el presente documento, y glicina o albúmina sérica humana (HSA), un tampón (por ejemplo, acetato) y un agente isotónico (por ejemplo, NaCl). En otra forma de realización, la

55

composición farmacéutica comprende una GH liofilizada modificada por CTP como se describe en el presente documento y tampón fosfato, glicina y HSA.

En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento se estabiliza cuando se pone en soluciones tamponadas que tienen un pH entre aproximadamente 4 y 7,2. En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento se estabiliza con un aminoácido como agente estabilizante y en algunos casos una sal (si el aminoácido no contiene una cadena lateral cargada).

10 En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento es una composición líquida que comprende un agente estabilizante entre aproximadamente el 0,3% y el 5% en peso, que es un aminoácido.

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

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

25 En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra forma de realización, la composición farmacéutica inyectable que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento comprende lípidos sólidos como material de matriz. En otra forma de realización, la producción de micropartículas lipídicas mediante congelación por pulverización fue descrita por Speiser (Speiser et al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54) seguido de nanogránulos de lípidos para administración oral (Speiser, documento EP 0167825 (1990)). En otra forma de realización, los lípidos, que se usan, son bien tolerados por el cuerpo (por ejemplo, glicéridos compuestos de ácidos grasos que están presentes en las emulsiones para nutrición parenteral).

35 En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento está en forma de liposomas (J. E. Diederichs et al., Pharm./nd. 56 (1994) 267-275).

En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento comprende micropartículas poliméricas. En otra forma de realización, la composición farmacéutica inyectable que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento comprende micropartículas poliméricas. En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento comprende nanopartículas. En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento comprende liposomas. En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento comprende una emulsión lipídica. En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento comprende microesferas. En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento comprende nanopartículas lipídicas. En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento comprende nanopartículas lipídicas que comprenden lípidos anfifílicos. En otra forma de realización, la composición farmacéutica que comprende una GH modificada por CTP como se describe en el presente documento comprende nanopartículas lipídicas que comprenden un fármaco, una matriz lipídica y un tensioactivo. En otra forma de realización, la matriz lipídica tiene un contenido de monoglicéridos que es de al menos el 50% p/p.

55 En una forma de realización, las composiciones para su uso en la presente invención se presentan en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. En una forma de realización, el envase, por ejemplo, comprende papel metálico o plástico, tal como un envase de blíster. En una forma de realización, el envase o dispositivo dosificador se

acompaña de instrucciones para la administración. En una forma de realización, el envase o dosificador se acompaña de un aviso asociado con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, siendo dicho aviso reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o administración humana o veterinaria. Dicho aviso, en una forma de realización, es una etiqueta aprobada por la U.S. Food and Drug Administration para fármacos de prescripción o de un prospecto de producto aprobado.

En una forma de realización, se apreciará que la GH modificada por CTP para su uso en la presente invención pueden proporcionarse al individuo con agentes activos adicionales para conseguir un efecto terapéutico mejorado en comparación con el tratamiento con cada agente por sí solo. En otra forma de realización, se toman medidas (por ejemplo, dosificación y selección del agente complementario) para efectos secundarios adversos que se asocian con terapias de combinación.

Resultarán evidentes para un experto habitual en la técnica objetos, ventajas y características nuevas adicionales de la presente invención tras el examen de los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas formas de realización y aspectos de la presente invención como se han indicado anteriormente en el presente documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones posteriormente encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

20 **Ejemplos**

En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías como se exponen en las Pat. de Estados Unidos N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); se describen extensamente inmunoensayos disponibles en la patente y la bibliografía científica, véanse, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 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 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan a lo largo de este documento otras referencias generales.

45 **EJEMPLO 1**

Generación de construcciones de hGH

50 **MATERIALES Y MÉTODOS**

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

Tabla 1

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

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

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

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

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

- Construcción de 402-1-p83-5 (hGH-CTP) - SEQ ID NO: 9 y 402-2-p72-3(hGH-CTP_{x2}) - SEQ ID NO: 10:** hGH-CTP es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 1 copias del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). El casete de CTP de hGH-CTP se unió al extremo C (un casete). hGH-CTP-CTP es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 2 copias del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). Los dos casetes de CTP de hGH-CTP-CTP se unieron con el extremo C (dos casetes).

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

- hGH-CTP y hGH-CTP-CTP se expresaron en células DG-44 CHO. Las células se cultivaron en medio sin proteínas. El peso molecular de hGH-CTP es ~30,5 kD ya que la hGH tiene un PM de 22 kD mientras que cada "casete de CTP" contribuye con 8,5 kD con respecto al peso molecular total (véase la Figura 1). El peso molecular de hGH-CTP-CTP es ~39 kD (véase la Figura 1).

- Construcción de 402-3-p81-4 (CTP-hGH-CTP-CTP) - SEQ ID NO: 11 y 402-4-p82-9(CTP*hGH-CTP-CTP) - SEQ ID NO: 12:** CTP-hGH-CTP-CTP es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusionó con 3 copias del péptido C terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). Los tres casetes de CTP de CTP-hGH-CTP-CTP se unieron tanto al extremo N (un casete) como al extremo C (dos casetes). tCTP-hGH-CTP-CTP es una hormona del crecimiento humana recombinante que se fusiona con 1 copia truncada y 2 copias completas del péptido C-terminal de la cadena beta de Gonadotropina Coriónica humana (CTP). El casete de CTP truncado de tCTP-hGH-CTP-CTP se unió con el extremo N y dos casetes de CTP se unieron con el extremo C (dos casetes).

- Se realizaron tres reacciones de PCR. La primera reacción se realizó con el cebador 25 y el cebador 35^R y ADN plasmídico de p401-3-p12-5 o 401-4-p22-1 como plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 265 o 220 pb. La segunda reacción se realizó con el cebador 34 y el cebador 37^R y ADN plasmídico de TA-hGH-2-q65-1 como plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 695 pb. La

última reacción se realizó con los cebadores 25 y 37^R y una mezcla de los productos de las dos reacciones anteriores como plantilla; como resultado de la amplificación por PCR, se formó un producto de 938 o 891 pb y se ligó en el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se ligó un fragmento Xba I -Not I que contenía una secuencia hGH en este vector de expresión eucariota pCI-dhfr.

5

CTP-hGH-CTP-CTP y tCTP-hGH-CTP-CTP se expresaron en células DG-44 CHO. Las células se cultivaron en medio sin proteínas. El peso molecular de CTP-hGH-CTP-CTP es ~47,5 kD (véase la Figura 1) y el peso molecular de tCTP-hGH-CTP-CTP es ~43,25 kD (véase la Figura 1).

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

Construcción de 402-5-p96-4 (CTP-hGH) - SEQ ID NO: 14: La reacción por PCR se realizó usando el cebador 25 y

15 el cebador 39^R y el plásmido de ADN de pCI-dhfr- ctp-EPO-ctp (402-6-p95a-8) como plantilla; como resultado de una amplificación por PCR, se formó un producto de 763 pb y se ligó con el vector de clonación TA (Invitrogen, catálogo K2000-01). Se ligó un fragmento Xba I -Not I que contenía una secuencia de ctp-hGH en este vector de expresión eucariota pCI-dhfr para producir el clon 402-5-p96-4.

20 EJEMPLO 2

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

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratas hipofisectomizadas hembras (60 -100 g) recibieron una inyección S.C. semanal de 21,7 µg de polipéptidos de hGH-CTP o una inyección S.C. de 5 µg al día una vez de rhGH comercial de control.

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

Tabla 2

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

RESULTADOS

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

CONCLUSIÓN

3 dosis semanales (Días de inyecciones: 1, 7, y 13) de 21,7 µg de CTP-hGH-CTP-CTP (SEQ ID NO: 11) y tCTP-hGH-CTP-CTP (SEQ ID NO: 12) indujeron un aumento de peso del 30% mayor en ratas hipofisectomizadas en comparación con las ratas a las que se inyectó rhGH comercial a la misma dosis acumulada que se administró una vez al día a una dosis de 5 µg durante 13 días.

EJEMPLO 3

Estudios farmacocinéticos de la GH modificada con CTP

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

Para comparar la farmacocinética de CTP-hGH-CTP-CTP y GH en las ratas, se hicieron cuatro grupos de ratas Sprague-Dawley (270-290 g), de tres a seis ratas macho por grupo. Las ratas se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos de tratamiento (véase la Tabla 3). A las ratas se les administró una sola inyección s.c. o i.v. de GH (50 µg/kg i.v. o s.c.) o CTP-hGH-CTP-CTP (108 µg/kg i.v. o s.c.). Con la excepción de la muestra previa a la dosis, que se recogió bajo anestesia con isoflurano, la recogida de sangre se realizó en animales no anestesiados. Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 0,25 ml) en microrecipientes recubiertos con EDTA para los análisis ELISA de la concentración plasmática de CTP-hGH-CTP-CTP en los tiempos descritos en la Tabla 3. Después de cada muestreo, el volumen de sangre se reemplazó con un volumen igual de solución salina al 0,9% estéril. Las muestras se almacenaron en hielo durante hasta 1 h antes de la centrifugación y la recogida de plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a aproximadamente -20 °C antes del análisis.

Tabla 3. Diseño experimental de estudio farmacocinético en ratas

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

3 ratas por punto de tiempo.

Se usó un kit ELISA tipo sándwich comercial específico para la detección de la hormona del crecimiento humana (Roche Diagnostics) para la evaluación de las muestras de plasma de rata. Este kit detecta la hormona del crecimiento humana en plasma mediante un formato ELISA de tipo sándwich de anticuerpos. Este kit se utilizó inicialmente para medir la concentración de CTP-hGH-CTP-CTP en plasma de rata. Para estas muestras de plasma, se utilizó una curva estándar de CTP-hGH-CTP-CTP (1,2-100 ng/ml) y se interpolaron las concentraciones de CTP-hGH-CTP-CTP en plasma de rata a partir de esta curva.

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

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

EJEMPLO 4

Farmacocinética de la GH modificada por CTP en ratas SD

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

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

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

35 Análisis estadístico de datos

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

Los parámetros que se determinaron incluyen: AUC, MRT, $t_{1/2}$, $C_{\text{máx}}$, y $T_{\text{máx}}$. La Figura 4 demuestra el perfil farmacocinético superior de la concentración plasmática de CTP-hGH-CTP-CTP en comparación con concentraciones de GH (pg/ml) después de una sola dosis i.v. o s.c. de CTP-hGH-CTP-CTP o GH en ratas ($n = 3-6$ por dosis/vía).

Después de una única inyección S.C. de 50 $\mu\text{g/kg}$, la depuración de CTP-hGH-CTP-CTP de la sangre de rata SD fue significativamente más lenta que la de CTP-hGH-CTP y de Biotropin. Los tiempos de semivida calculados

correspondientes y las AUC fueron:

Biotropin	T1/2 1,7 h, AUC 41 h*ng/ml
CTP-hGH-CTP	T1/2 8,5 h, AUC 424 h*ng/ml
CTP-hGH-CTP-CTP	T1/2 9,0 h, AUC 680 h*ng/ml

Conclusión:

- 5 Se eligió CTP-hGH-CTP-CTP como el candidato final entre otras 6 variantes. CTP-hGH-CTP-CTP demostró un rendimiento superior en términos de actividad biológica y farmacocinética.

EJEMPLO 5

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

- Se obtuvieron ratas macho hipofisectomizadas (método interaural), de 3-4 semanas de edad, de CRL Laboratories. Durante un periodo de aclimatación posquirúrgica de 3 semanas, se examinaron las ratas y se pesaron dos veces por semana para eliminar a los animales que se consideraba que tenían una hipofisectomía incompleta evidenciada por un aumento de peso similar al de las ratas operadas de forma simulada. Las ratas con hipofisectomización incompleta fueron eliminadas del estudio. El peso corporal promedio de las hipofisectomizadas fue de 70-90 gramos, en el momento del experimento. Este es el bioensayo estándar de USP y EP para hGH. Las ratas hipofisectomizadas (ratas de las que se extrajo la glándula pituitaria) pierden su capacidad para ganar peso. Las inyecciones de hGH (y de CTP-hGH-CTP-CTP) en estas ratas dan como resultado un aumento de peso. Basándose en el aumento de peso medido a lo largo de un periodo de tiempo definido y la cantidad de hGH inyectada, se determina la actividad específica de la hGH (y CTP-hGH-CTP-CTP). A las ratas se les administró una dosis única s.c. de 0,4, 0,8 y 4 mg/kg o dosis s.c. repetidas de 0,6 y 1,8 mg/kg con 4 días de diferencia durante 3 semanas. Los pesos corporales individuales de todos los animales se determinan al azar, antes de la primera dosificación, posteriormente cada dos días o en caso de fallecidos en el momento de la muerte, y antes del sacrificio.

Ensayo de aumento de peso de dosis única y dosis repetidas

- Los resultados que comparan la respuesta de crecimiento de todo el cuerpo después de diferentes patrones de dosificación de CTP-hGH-CTP-CTP en ratas hipofisectomizadas se demuestran en la Figura 5. Los resultados demuestran que una única inyección de 0,4 y 0,8 mg/kg/día de dosis de hGH-CTP fue equivalente a 4 inyecciones diarias de 0,1 mg/kg/día de Biotropin. El pico del efecto hGH-CTP fue después de 2 días.

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

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

EJEMPLO 6

45 **Estudios de farmacodinámica/farmacocinética de la GH modificada por CTP**

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

- 55 A las ratas se les administró una sola dosis s.c. con CTP-hGH-CTP-CTP, vehículo, hormona del crecimiento humana CTP-hGH-CTP-CTP o se administró s.c. hormona del crecimiento humana (20 µg/rata) en un volumen de inyección

de 0,2 ml/rata. La dosis de GH fue de 0,35 y 1,05 µg/kg, una dosis de hormona del crecimiento que era equimolar con la cantidad de GH en una dosis correspondiente de 0,6 y 1,8 µg/kg de CTP-hGH-CTP-CTP. Los grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 4. Después de la inyección, se obtuvieron muestras de plasma para los análisis de IGF-1 en los tiempos descritos en la Tabla 5. Las muestras se analizaron para determinar la concentración de IGF-1 utilizando un ELISA comercial (R&D systems).

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

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

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

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

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

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

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

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

sobre los niveles séricos de IGF-1 en ratas hipofisectomizadas. La Figura 9 presenta los resultados de los niveles séricos de IGF-1 en ratas hipofisectomizadas después de la inyección SC de CTP-hGH-CTP-CTP y hGH comercial.

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

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

EJEMPLO 7

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

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

Glucoperfil con análisis de secuencia

El glucoperfil se realizó por Ludger Ltd. Se tomaron dos muestras (EN648 y RS0708) a través de liberaciones por triplicado y cada liberación también se analizó por HPLC por triplicado. Las muestras triplicadas de 300 µg de EN648 y RS0708 y una muestra única de 100 µl de tampón citrato/cloruro de sodio, más un control positivo de fetuina (250 µg) y un control negativo de 100 µl de agua, se ultrafiltraron mediante centrifugación utilizando una membrana de corte de peso molecular de 10.000 Da para reemplazar el tampón con agua, luego se tomaron a través de hidrazinolisis en condiciones de modo O (6 h a 60 °C). Los glicanos liberados se volvieron a *N*-acetilar y se limpiaron con cartuchos LudgerClean CEX. Una alícuota de los glicanos liberados se marcó entonces con 2-aminobenzamida (2AB), se limpió con cartuchos Ludger Clean S y se analizó mediante HILIC-HPLC LudgerSep-N2.

Contenido de monosacáridos

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

Perfil de ácido siálico

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

Glucuanálisis de CTP-hGH-CTP-CTP

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

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

3	1,79		Galβ1-3GalNAc	2,3	67,7	69,4	17,1 ^h
4 ^g	2,25		NeuNAcα2-3Gal	19,8	13,0 ^h		
*	2,57			1,5	1,9	1,1	1,1
5	2,90		NeuNAcα2-3Galβ1-3 GalNAc	70,6			
*	3,58			0,6	0,7	0,6	
6	3,22		Galβ1-3[NeuNAcα2-6] GalNAc	0,9	2,3		
7	4,42		NeuNAcα2-3Galβ1-3 [NeuNAcα2-6]GalNAc	1,8			

Los perfiles de monosacáridos indican que las muestras de glucoproteínas CTP-hGH-CTP-CTP contienen glicanos de tipo de enlace O predominantemente. El pico principal de O-glicano es el núcleo sialilado 1 (Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAc). El ácido siálico principal es Neu5Ac y hay algunos picos menores que sugieren la presencia del 3-4% de ácido siálico diacetilado ácido *N*-acetil-9-O-acetilneuramínico (Neu5, 9Ac2) y menos del 1% de ácido *N*-glicolilneuramínico. También hay pequeñas cantidades de Neu5Acα2-6(Galβ1-3)GalNAc.

EJEMPLO 8

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

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

15

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

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

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

El AUC fue aproximadamente proporcional a la dosis con un AUC ligeramente mayor que el AUC proporcional a la dosis más alta, lo que produjo una estimación ligeramente inferior de CL/F y Vz/F en comparación con la dosis más baja. No es posible decir si CL y Vz son más bajos con la dosis más alta o si F es más bajo con la dosis más baja. Hubo superposición entre los grupos, por lo que es cuestionable que esto represente una diferencia significativa en CL/F y Vz/F.

30 Los parámetros farmacocinéticos estimados por el modelo fueron muy similares a los del análisis no compartimental. Las semividas de absorción y eliminación se muestran en la Tabla 9 a continuación:

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

Dosis	T _{1/2} abs (h)	T _{1/2} el (h)
1,8 mg/kg	1,17 ± 0,40	10,41 ± 2,36
90 mg/kg	6,49 ± 1,87	7,26 ± 1,85

Los datos indican que las tasas de eliminación son bastante similares entre los grupos con una T_{1/2} ligeramente mayor en el grupo de dosis más baja. Sin embargo, la absorción es más de 5 veces más lenta después de la administración subcutánea de 90 mg/kg en comparación con la siguiente dosis de 1,8 mg/kg. Como en el caso del análisis no compartimental, el modelado indicó una T_{máx} posterior a la dosis alta.

0230] Aunque la suplementación con GH es eficaz en el tratamiento de la deficiencia de GH en niños y adultos, las desventajas de las inyecciones diarias durante periodos prolongados de tiempo limitan su uso por parte de los médicos en ciertas poblaciones de pacientes y aumentan el riesgo de error de dosificación, el número de los cuidadores, el coste del tratamiento y/o el incumplimiento. Especialmente importante en ciertas poblaciones, tal como niños de baja estatura que pueden no entender las implicaciones de no seguir el régimen de dosificación de GH prescrito, es la necesidad de cumplimiento para lograr el beneficio óptimo de la terapia con GH. El problema de encontrar una alternativa más adecuada a las inyecciones diarias de GH y el cumplimiento posterior cobra mayor importancia a medida que los niños con deficiencia de GH hacen la transición a adultos con una necesidad continua de tratamiento con GH. El requisito de la terapia diaria se debe en gran parte a la corta semivida en plasma de la GH recombinante y ha conducido al desarrollo de una forma de liberación sostenida de la GH (Reiter EO, Attire KM., Mashing TJ, Silverman BL, Kemp SF, Neolith RB, Ford KM, y Sanger P. A multimember study of the efficacy and safety of sustained release GH in the treatment of naive pediatric patients with GH deficiency. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86 (2001), págs. 4700-4706.).

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

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

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

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

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

extrapolación alométrica para seres humanos admite inyecciones semanales o de una vez/2 s.

El presente concepto que utiliza una construcción CTP-GH, reduce la frecuencia de dosificación en comparación con el producto recombinante de GH comercial. Nutropin Depot® es una formulación de liberación sostenida de GH aprobada para su uso en poblaciones pediátricas; sin embargo, las comparaciones con los controles históricos han revelado que las tasas de crecimiento a 1 y 2 años son significativamente más bajas ($p < 0,001$) en los niños que recibieron Nutropin Depot® (tasa de crecimiento a 1 año de $8,2 \pm 1,8$ cm/año) que en los niños tratados con GH (tasa de crecimiento anual de $10,1 \pm 2,8$ cm/año) (Silverman BL. Blethen SL. Reiter EO. Attie KM. Neuwirth RB. y Ford KM. A long-acting human growth hormone (Nutropin Depot®): efficacy and safety following two years of treatment in children with growth hormone deficiency. J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 15 (2002), págs. 715-722.). Los efectos locales de Nutropin Depot® administrado por vía subcutánea incluyen nódulos, eritema, dolor en el sitio de inyección, cefalea y vómitos. Los estudios de toxicología preclínica tanto en ratas como en monos han demostrado que la administración s.c. de CTP-hGH-CTP no produce reacciones locales en comparación con el vehículo. Dada la necesidad médica de una forma administrada con menos frecuencia de GH, las propiedades farmacológicas de CTP-hGH-CTP en este estudio en ratas sugieren que este producto también es favorable en términos de toxicología y cumplimiento del paciente. La actividad sostenida de CTP-hGH-CTP en la rata apoya su utilidad potencial como agente que requiere solo una administración intermitente para lograr un beneficio terapéutico que se logra actualmente con la dosificación diaria.

20 EJEMPLO 9

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

Se realizó un ensayo clínico de fase II al azar y abierto para evaluar la seguridad, la tolerabilidad, la farmacocinética y las propiedades farmacodinámicas de la hGH-CTP inyectada semanalmente o dos veces al mes en pacientes que actualmente reciben inyecciones diarias de hormona del crecimiento. El ensayo se realizó en varios sitios en seis países. Las tres cohortes principales en el ensayo recibieron una dosis semanal única de hGH-CTP, que contenía el 30%, 45% o el 100% de la dosis comercial equivalente acumulativa de hGH que los pacientes adultos con deficiencia de hormona de crecimiento reciben en el transcurso de siete días en la forma de inyecciones diarias (denominadas cohortes al "30%," "45%" y "100%", respectivamente). Los datos reflejan los resultados de 39 pacientes, 13 en cada cohorte. Se incluyeron 2 mujeres en cada cohorte.

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

La eficacia de las tres cohortes principales que reciben una inyección semanal única de hGH-CTP se define midiendo los niveles diarios de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) dentro del intervalo terapéutico deseado durante un periodo de siete días (durante la última semana de tratamiento en el estudio). El intervalo terapéutico deseado se define como entre +2 desviaciones estándar a -2 desviaciones estándar de los niveles promedio de IGF-1 esperados en una población normal, estratificada por grupo de edad y género. Además, el ensayo midió los niveles de IGF-1 dentro de un intervalo más estrecho de $\pm 1,5$ desviaciones estándar con el fin de observar la varianza de los pacientes dentro del intervalo normal.

Resultados:

La Tabla 10 contiene el porcentaje promedio de días dentro del intervalo terapéutico normal (± 2 DE), el porcentaje promedio de días dentro de un intervalo terapéutico normal más estrecho ($\pm 1,5$ DE) y la $C_{\max}$ promedio (nivel de concentración más alto) de IGF-1 para los hombres, medido durante la última semana de tratamiento, expresado en desviaciones estándar de los niveles medios de IGF-1 de la población normal.

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

Cohorte	% de días dentro del intervalo normal estrecho de IGF-1 ($\pm 1,5$ DE)	% de días dentro del intervalo normal de IGF-1 (± 2 DE)	Prom. $C_{\max}$ de IGF-1 (preferida por debajo de +2 DE)
30%	57%	100%	-0,9

45%	100%	100%	0,1
100%	86%	100%	0,4

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

5

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

10 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Prolor Biotech Inc.

15

<120> HORMONA DEL CRECIMIENTO DE ACCIÓN PROLONGADA Y MÉTODOS PARA PRODUCIR LA MISMA

<130> P-9520-PC4

20

<140> PCT/US12/999999

<141> 01-08-2012

<150> 12/476.916

<151> 02-06-2009

25

<150> 13/195.931

<151> 02-08-2011

<150> 12/509.188

<151> 24-07-2009

30

<150> 12/476.916

<151> 02-06-2009

<150> 12/401.746

<151> 11-03-2009

35

<150> 11/700.910

<151> 01-02-2007

40

<150> 60/764.761

<151> 03-02-2006

<160> 26

45

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

50

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 706 734 T3

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

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

Gln

<210> 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

ES 2 706 734 T3

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

5 <210> 6
<211> 192
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 6

ES 2 706 734 T3

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

5 <210> 7
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <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

ES 2 706 734 T3

<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

ES 2 706 734 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ile Leu Pro Gln
245

5

<210> 10
<211> 273

ES 2 706 734 T3

<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

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

ES 2 706 734 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln

<210> 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 Ser Lys Ala
20 25 30

5

10

ES 2 706 734 T3

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
 35 40 45
 Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
 50 55 60
 Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
 65 70 75 80
 Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
 85 90 95
 Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
 100 105 110
 Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
 115 120 125
 Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
 130 135 140
 Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
 165 170 175
 Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
 180 185 190
 Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
 195 200 205
 Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
 210 215 220
 Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
 225 230 235 240
 Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
 245 250 255
 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 260 265 270
 Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
 275 280 285
 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 290 295 300

5

<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 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

ES 2 706 734 T3

210 215 220

Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
225 230 235 240

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
245 250 255

Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
260 265 270

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
275 280 285

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

5

<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 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

10

ES 2 706 734 T3

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 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

5

10

ES 2 706 734 T3

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> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60
 cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct 120
 gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac 180
 catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct 240
 ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag 300
 cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca ccccagcaa 360
 cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat 420
 ccagagctgg ctggagcccg tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctggtgta 480
 cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac 540
 cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagaccta 600

ES 2 706 734 T3

cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct 660
gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag 720
aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gcccctcccc cgagcctgcc 780
ctccccaagc aggctgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgcctcagt gatgaaggtc 840
tggatgcggc cgc 853

<210> 16
<211> 937
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 16
tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct 120
gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agttccccac 180
catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct 240
ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag 300
cttcctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa 360
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat 420
ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctggtgta 480
cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac 540
cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagacct 600
cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgccctg ctgaagaact acgggctgct 660
gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag 720
aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gcccctcccc cgagcctgcc 780
ctccccaagc aggctgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgccacaga gcagctcctc 840
taaggccct cctccatccc tgccatcccc ctcccggtg cctggccct ctgacacccc 900
tactctgcct cagtgatgaa ggtctggatg cggccgc 937

<210> 17
<211> 889
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 17
tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccgagcct 120
gcccctcccc accatcccc tgagcaggct gttcgacaac gccatgctga gggctcacag 180
gctgcaccag ctggcctttg acacctacca ggagtctgag gaagcctaca tccccaaagga 240
gcagaagtac agcttcctgc agaaccccca gacctccctg tgcttcagcg agagcatccc 300

ES 2 706 734 T3

	cacccccagc aacagagagg agaccagca gaagagcaac ctggagctgc tgaggatctc	360
	cctgtgctg atccagagct ggctggagcc cgtgcagttc ctgagaagcg tgttcgcaa	420
	cagcctggtg tacggcgcca gcgacagcaa cgtgtacgac ctgctgaagg acctggagga	480
	gggcatccag accctgatgg gccggctgga ggacggcagc cccaggaccg gccagatctt	540
	caagcagacc tacagcaagt tcgacaccaa cagccacaac gacgacgccc tgctgaagaa	600
	ctacgggctg ctgtactgct tcagaaagga catggacaag gtggagacct tcctgaggat	660
	cgtgcagctg agaagcgtgg agggcagctg cggcttcagc tccagcagca aggccctcc	720
	cccgagcctg ccctcccaa gcaggctgcc tgggccctcc gacacaccaa tcctgccaca	780
	gagcagctcc tctaaggccc ctctccatc cctgccatcc ccctcccggc tgctggccc	840
	ctctgacacc cctatcctgc ctcagtgatg aaggtctgga tgcggccgc	889
5	<210> 18 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo XbaI para construcciones HGH-CTPP 10	
	<400> 18 ctctagagga catggccac	19
15	<210> 19 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador inverso para construcciones HGH-CTP	
	<400> 19 acagggaggt ctgggggttc tgca	24
25	<210> 20 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador directo para construcciones HGH-CTP	
	<400> 20 tgagaaccc ccagacctc ctgtgc	26
35	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220>	

<223> Cebador inverso para construcciones HGH-CTP

<400> 21
ccaaactcat caatgtatct ta 22

5

<210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador directo Xbal para construcciones HGH-CTPP 10

<400> 22
ctctagagga catggccac 19

15

<210> 23
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Cebador inverso para construcciones HGH-CTP

25

<400> 23
cgaactcctg gtaggtgtca aaggc 25

30

<210> 24
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Cebador directo para construcciones HGH-CTP

<400> 24
gccttgaca cctaccagga gttcg 25

40

<210> 25
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Cebador inverso para construcciones HGH-CTP

<400> 25
acgcggccgc atccagacct tcactactga ggc 33

50

<210> 26
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Cebador inverso para construcciones HGH-CTP

<400> 26
gcggccgcgg actcatcaga agccgcagct gcc 34

60

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido modificado con el péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica que comprende una hormona del crecimiento para su uso en un método para tratar la deficiencia de hormona del crecimiento en un sujeto adulto humano medida manteniendo los niveles del factor de crecimiento insulínico (IGF-1) dentro de un intervalo terapéutico normal, en el que dicho polipéptido modificado con CTP comprende un péptido carboxi terminal (CTP) de gonadotropina coriónica unido al extremo amino de dicha hormona del crecimiento, y dos CTP de gonadotropina coriónica unidos al extremo carboxi de dicha hormona del crecimiento, y opcionalmente un péptido señal unido al extremo amino de dicho CTP amino terminal, en donde el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido modificado con CTP que comprende una dosis de 1-5 mg/semana administrada una vez a la semana.
2. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos un CTP está glucosilado.
3. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que al menos un CTP está unido a dicha hormona del crecimiento a través de un enlazador.
4. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho enlazador es un enlace peptídico.
5. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de al menos un CTP está codificada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
6. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la hormona del crecimiento es la hormona del crecimiento humana.
7. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento comprende al menos un 80% de homología con la SEQ ID NO: 5.
8. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la secuencia de aminoácidos del péptido señal comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3.
9. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido comprende la secuencia de los aminoácidos 27-301 de SEQ ID NO: 11.
10. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 11.
11. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido está codificado por la SEQ ID NO: 16.
12. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido modificado con CTP que comprende una dosis semanal de 1,2 mg.
13. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido modificado con CTP que comprende una dosis semanal de 1,8 mg.
14. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido modificado con CTP que comprende una dosis semanal de 2 mg.
15. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido

modificado con CTP que comprende una dosis semanal de 4 mg.

16. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que el sujeto humano es un hombre.

5

17. El polipéptido modificado con CTP para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que dicha hormona del crecimiento se administra por vía subcutánea a dicho sujeto.

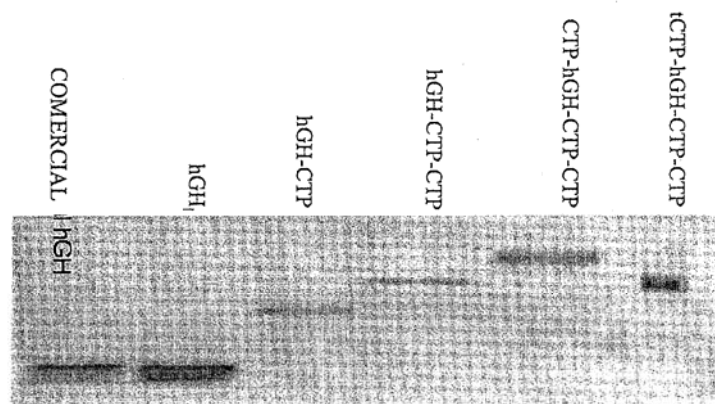


FIGURA 1

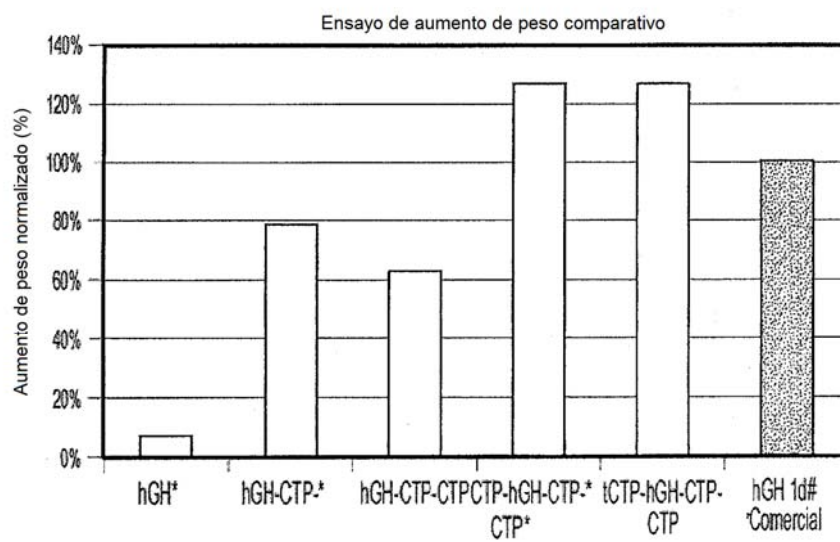


FIGURA 2

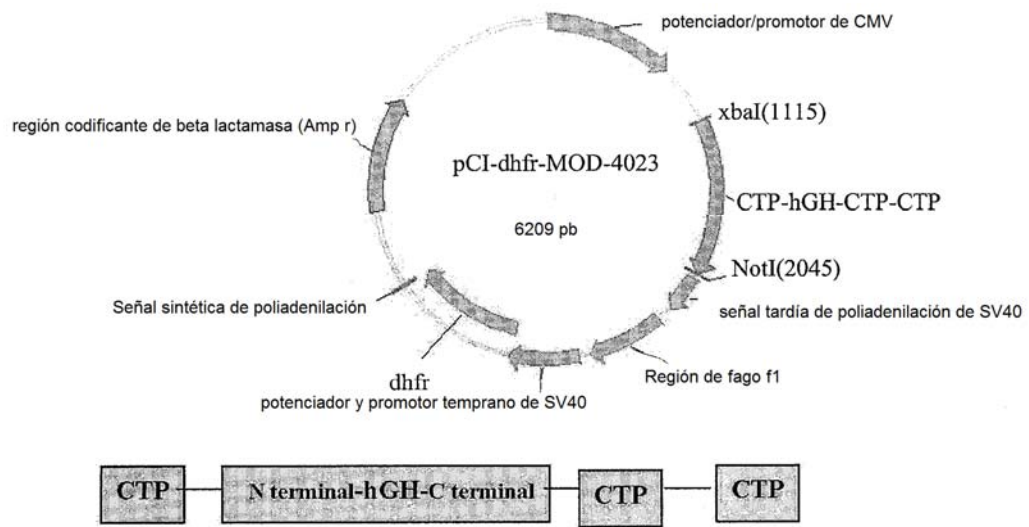


FIGURA 3

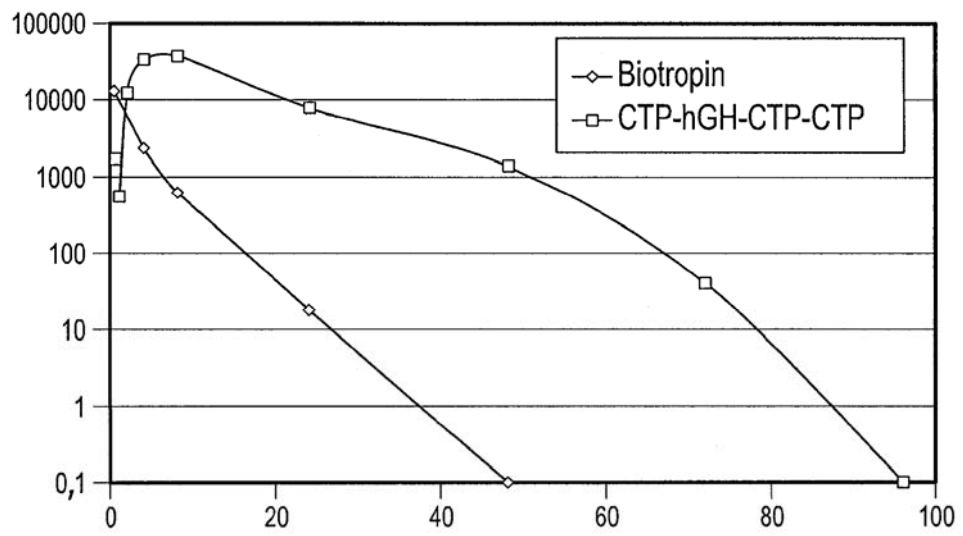


FIGURA 4A

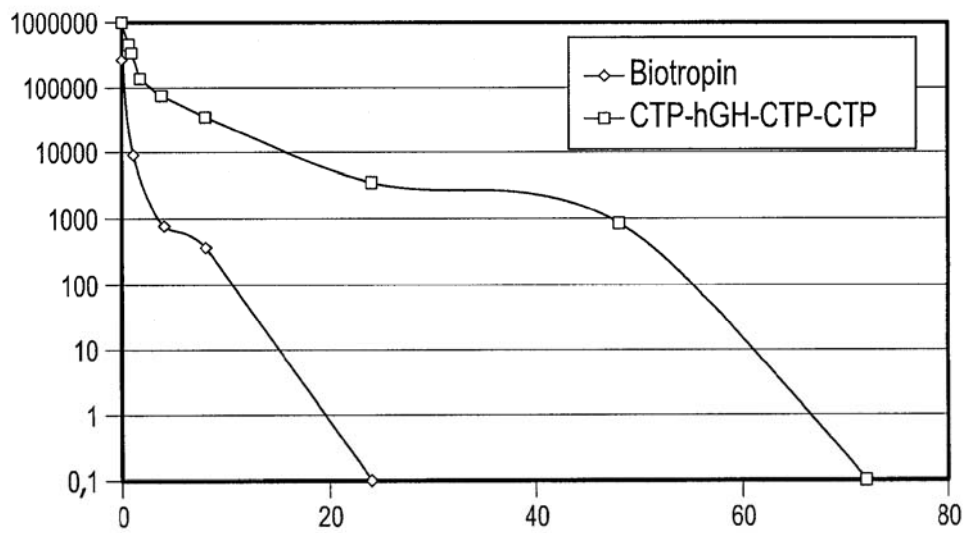


FIGURA 4B

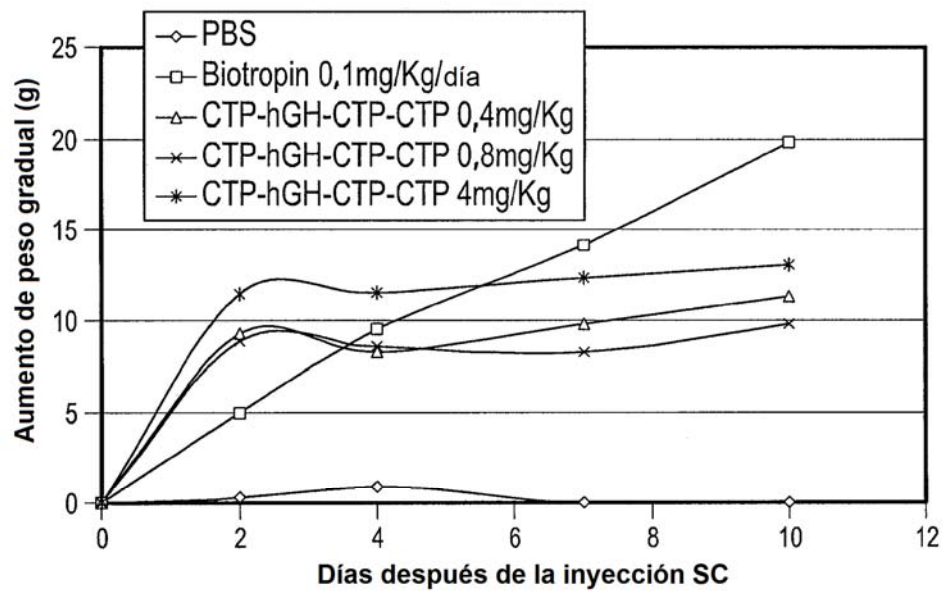


FIGURA 5

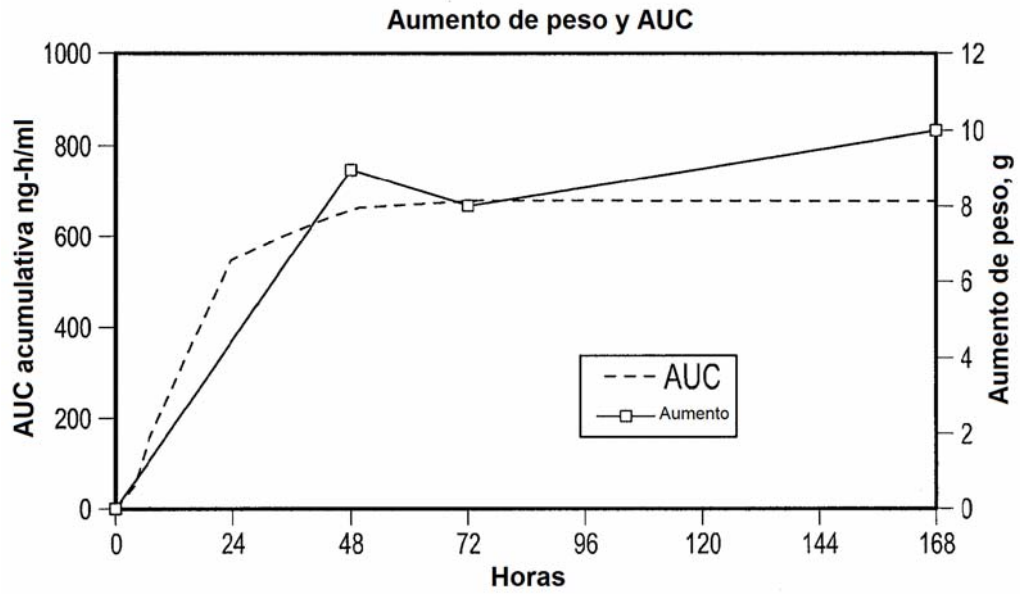
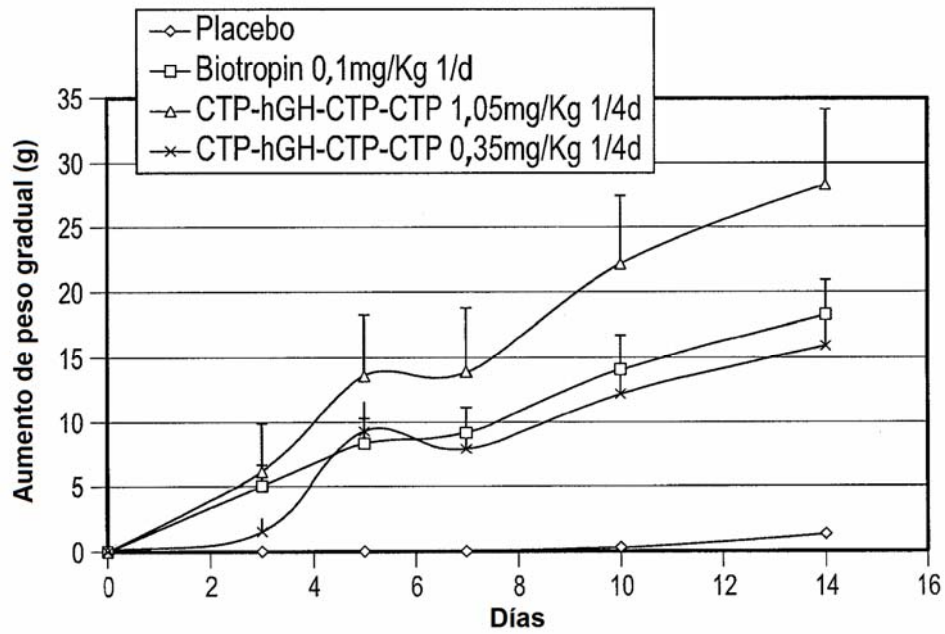


FIGURA 6



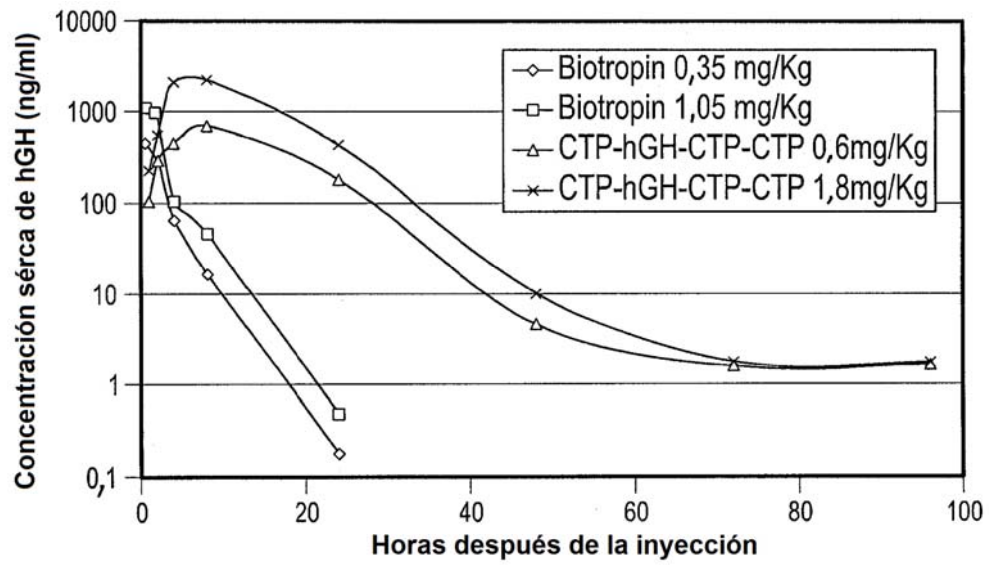


FIGURA 8

