



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I508737 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 11 月 21 日

(21)申請案號：100102456

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 01 月 24 日

(51)Int. Cl. : A61K38/27 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

C07K14/61 (2006.01)

(30)優先權：2010/01/22

歐洲專利局

10151405.7

(71)申請人：諾佛 農迪克股份有限公司 (丹麥) NOVO NORDISK A/S (DK)

丹麥

(72)發明人：班倫斯 卡爾森 BEHRENS, CARSTEN (DK)；約翰森 尼爾斯 郎格蘭
 JOHANSEN, NILS LANGELAND (DK)；安德森 漢瑞克 蘇尼 ANDERSEN,
 HENRIK SUNE (DK)；尼斯寇弗 勞瑞參 萊夫 (DK)；布賀哈特 珍斯
 BUCHARDT, JENS (DK)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

US 2007/0203058A1

WO 02/055532A2

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：2 共 237 頁

(54)名稱

具有延長的活體內功效的生長激素

GROWTH HORMONES WITH PROLONGED IN-VIVO EFFICACY

(57)摘要

本發明係關於具有延長特徵之生長激素化合物。該效果係藉由經由親水性間隔基將白蛋白結合殘基連接至生長激素變異體而獲得。進一步描述製備及使用該等化合物之方法。此等生長激素化合物基於其改變之特徵而認為尤其適用於治療。

The invention relates to growth hormone compounds with a protracted profile. The effect is obtained by linking an albumin binding residue via a hydrophilic spacer to growth hormone variants. Further described are methods of preparing and using such compounds. These growth hormone compounds are based on there althered profile considered particular useful in therapy.

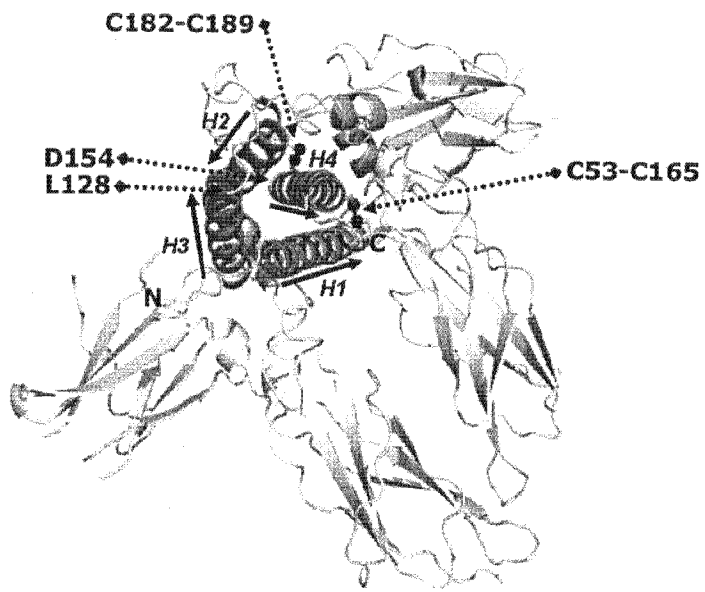


圖 1

100年7月22日修正替換頁

100年7月22日修正替換頁

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100102456

※申請日：100-1-24

※IPC 分類：A61K38/27 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

C07K14/61 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

具有延長的活體內功效的生長激素

Growth Hormones with Prolonged In-Vivo Efficacy

二、中文發明摘要：

本發明係關於具有延長特徵之生長激素化合物。該效果係藉由經由親水性間隔基將白蛋白結合殘基連接至生長激素變異體而獲得。進一步描述製備及使用該等化合物之方法。此等生長激素化合物基於其改變之特徵而認為尤其適用於治療。

三、英文發明摘要：

The invention relates to growth hormone compounds with a protracted profile. The effect is obtained by linking an albumin binding residue via a hydrophilic spacer to growth hormone variants. Further described are methods of preparing and using such compounds. These growth hormone compounds are based on there althered profile considered particular useful in therapy.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 1。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種經由親水性間隔基連接至白蛋白結合殘基之生長激素化合物，以及製備及使用該等化合物之方法。此等生長激素接合物增強蛋白水解降解之抗性以及延長作用特徵，且適用於治療。

【先前技術】

生長激素為由哺乳動物垂體前葉分泌之多肽激素。視物種而定，生長激素為由約 190 個胺基酸殘基構成之蛋白質，對應於約 22 kDa 之分子量。生長激素結合至細胞表面受體（亦即生長激素受體（growth hormone receptors, GHR））且經由該等細胞表面受體進行信號傳導。生長激素對促進生長、維持正常身體組成、合成代謝及脂質代謝起關鍵作用。其亦對中間代謝（諸如降低葡萄糖吸收、增加脂肪分解、增加胺基酸吸收及蛋白質合成）具有直接作用。該激素亦對其他組織（包括脂肪組織、肝、腸、腎、骨骼、結締組織及肌肉）發揮作用。重組人類生長激素（hGH）已有生產且可以例如以下購得：Genotropin™（Pharmacia Upjohn）、Nutropin™ 及 Protropin™（Genentech）、Humatrope™（Eli Lilly）、Serostim™（Serono）、諾德欣（Norditropin）（Novo Nordisk）、奧尼普（Omnitrope）（Sandoz）、紐德欣（Nutropin Depot）（Genentech 及 Alkermes）。另外，在 N-端具有一額外甲硫胺酸殘基之類似物亦以例如 Somatonorm™（Pharmacia Upjohn/Pfizer）銷售。

生長激素與生長激素蛋白質家族之其他成員（促乳素（Prolactin, PRL）及胎盤生乳素（Placental Lactogen, PL））共有共同拓撲。生長激素歸類為四螺旋束蛋白（圖 1），其展現「上-上-下-下式」拓撲且具有兩個保守之二硫鍵聯。特定而言，野生型人類生長激素（hGH）由 191 個胺基酸殘基構成且在位置 53、165、182 及 189 具有四個半胱胺酸殘基，該等半胱胺酸殘基藉由形成兩個分別連接 C53 與 C165 及連接 C182 與 C189 的分子內二硫鍵而穩定蛋白質之三維結構（圖 1）。hGH 之結構已藉由 X-射線結晶學呈自由形式（Chantalet L. 等人, *Protein and Peptide Letters* 3, 333-340, (1995)）及與其結合蛋白（人類 GHR（hGHR）之細胞外域）之複合物形式（Devos, A. M. 等人, *Science* 255, 306-312, (1992)）實驗測定。此等結構已寄存於蛋白質資料庫（Protein Data Bank, PDB）中，且可公開獲得（PDB 寄存代碼分別為 1HGU 及 1HWG）。因此，可自公開之 hGH 結構鑑別出對 hGH 與 hGHR 之結合重要之殘基。此外，已藉由核磁共振（NMR）光譜學研究 hGH 之動態性質（Kasimova M.R. 等人, *J. Mol. Biol.* 318, 679-695, (2002)）。X-射線及 NMR 資料組合時可將 hGH 中良好結構化及明確界定之區域與較少結構化及動態之區域相區分。hGH 之較少結構化及動態區域預期尤其易受蛋白水解裂解影響，且適當穩定化該等區域將使蛋白水解穩定性提高。

已對 hGH 進行廣泛突變誘發以試圖產生具有所需化學或生物性質之 hGH 類似物。特定而言，已描述用於若干目

的之半胱胺酸突變體。

US 2003/0162949 揭示 GH 超基因家族之成員的半胱胺酸變異體。提供產生此等蛋白質之位點特異性生物活性接合物的一般方法。該方法涉及使用定點突變誘發將半胱胺酸殘基添加至蛋白質之非必需區域或用半胱胺酸殘基取代蛋白質中之非必需胺基酸，及接著經由所添加之半胱胺酸殘基使半胱胺酸活性聚合物或其他類型之半胱胺酸活性部分共價偶合至蛋白質。

WO 02/055532 描述具有至少一個共價連接之非多肽部分的經遺傳工程改造之 hGH 突變體，尤其為使用引入之半胱胺酸殘基進行聚乙二醇化的 hGH 突變體。

US 5,951,972 描述經衍生化之生理活性天然及重組哺乳動物及人類蛋白質及多肽，其中蛋白質內之至少一個天然存在或併入之半胱胺酸殘基經各種取代基衍生化。

已詳細研究 hGH 之蛋白水解裂解。由殘基 128 至 154 構成之長環具有若干蛋白酶（諸如凝血酶、纖維蛋白溶酶、膠原蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶及類胰凝乳酶絲胺酸蛋白酶）之推定裂解位點。相應地，hGH 之此部分已證實尤其易受蛋白水解裂解影響（Lewis, U.J. *Ann. Rev. Physiol.* 46, 33-42, (1984)）。據報導降解 hGH 之酶包括凝血酶、纖維蛋白溶酶、枯草桿菌蛋白酶、類胰凝乳酶絲胺酸蛋白酶及激肽釋放酶（kallikrein）。

大鼠組織中 hGH 之降解已進行了研究（Garcia-Barros 等人, *J. Endocrinol. Invest.* 23, 748-754, (2000)）。

在大鼠甲狀腺中，最初發現偏好在龐大及親脂性胺基酸殘基處裂解之類胰凝乳酶蛋白酶裂解 Y143 與 S144 之間的肽鍵，產生一雙鏈分子，繼而在 Y42 與 S43 之間裂解，釋放 N-端肽 F1-Y42。藉由以類胰凝乳酶蛋白酶在 F146 與 D147 之間進一步裂解及進一步受羧肽酶作用來對該雙鏈分子中裂開之環進一步加工。

已報導產生針對蛋白水解降解穩定化之 hGH 類似物的若干方法。

Alam 等人, *J. Biotech.* **65**, 183-190, (1998)藉由特定點突變設計出對凝血酶及纖維蛋白溶酶具有抗性之 hGH 突變體。凝血酶在 R134 與 T135 之間特異性裂解 hGH，而雙重突變體 R134D、T135P 產生對凝血酶之裂解具有抗性之 hGH 變異體，而三重突變體 R134D、T135P、K140A 產生對纖維蛋白溶酶之抗性。此外，後一 hGH 突變體對人類血漿之蛋白質水解之抗性持續 7 天之時間。

EP 534568 描述藉由將 R134 突變成丙胺酸、白胺酸、蘇胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸或組胺酸而針對蛋白水解降解穩定化之 hGH 突變體。

WO 2004/022593/Nautilus 描述產生蛋白水解穩定性增強之經修飾細胞激素（包括 GH 變異體）的一般高產量定向進化方法。

WO 2006/048777/Nautilus 特別描述具有提高之蛋白水解穩定性的經修飾 hGH 類似物。類似物在位置 1-55、57、58、60-63、67-87、89-91、93、95-100、102-128、131-132、

135-139、141、142、144、148-182、184、185 及 187-191 含有 1 至 5 處突變。引入半胱胺酸殘基會潛在地導致形成不當二硫鍵連接之二聚體，且在 WO 2006/048777 中，用半胱胺酸取代胺基酸殘基特別自範疇中排除；在 WO 2006/048777（第 65 頁）中寫到：「明確避免以半胱胺酸殘基置換胺基酸，因為此變化會潛在地導致形成分子間二硫鍵」。

明顯需要研發對蛋白水解降解具有抗性之 hGH 化合物。該等穩定之化合物應針對蛋白水解裂解展現增強之穩定性，同時保留 hGH 之所需生物性質。該等 GH 分子將具有增強之穩定性、較慢之清除率及/或延長之活體內半衰期。

此外，熟知藉由將恰當改變肽之性質的基團接合至肽來修飾肽之性質及特徵。該種接合一般需要肽中的一些官能基與接合基團中之另一官能基反應。典型地，已使用胺基（諸如離胺酸中之 N-端胺基或 ϵ -胺基）與適合醃化試劑之組合。或者，可將聚乙二醇（PEG）或其衍生物連接至蛋白質。關於評述，請參見 *Exp. Opin. Ther. Patent.* 14, 859-894, (2004)。已展示將 PEG 連接至生長激素可對生長激素之血漿半衰期具有積極影響（WO 03/044056）。

早先已描述使用羧肽酶來修飾肽之 C-端。WO 92/05271 揭示使用羧肽酶及親核化合物對 C-端羧基進行醃胺化，且 WO 98/38285 揭示特別適用於此目的之羧肽酶 Y 之變異體。

EP 243 929 揭示使用羧肽酶來將多肽、信息基團或細胞毒性劑併入蛋白質或多肽之 C-端中。

WO 2005/035553 描述藉由在肽之 C-端酶催化地併入官能基來使肽選擇性接合的方法。

活化之鹵素衍生物及順丁烯二醯亞胺代表在將接合物併入至肽中之硫氫基時一些最常使用之官能基 (G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques* 第 2 版 2008, Elsevier)。

轉麩醯胺酸酶先前已用於改變肽之性質。在食品工業中且尤其在乳品工業中，多種技術可用於例如使用轉麩醯胺酸酶來交叉結合肽。其他文獻揭示使用轉麩醯胺酸酶改變生理活性肽之性質。EP 950665、EP 785276 及 Sato, *Adv. Drug Delivery Rev.* **54**, 487-504, (2002)揭示包含至少一個 Gln 之肽與經胺官能化之 PEG 或類似配位體之間在轉麩醯胺酸酶存在下直接反應，且 Wada, *Biotech. Lett.* **23**, 1367-1372, (2001)揭示 β -乳球蛋白與脂肪酸藉助於轉麩醯胺酸酶直接接合。公開為 WO 2005/070468 之國際專利申請案揭示使用轉麩醯胺酸酶來併入可供連接接合基團之柄狀物 (handle)。

生長激素為不僅參與調節體細胞生長而且亦參與調節蛋白質、碳水化合物及脂質之代謝的關鍵激素。生長激素之主要作用為促進生長。人類生長激素為具有以下序列之具有 191 個胺基酸殘基之蛋白質：

FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKE
QKYSFLQNPQTSLCFSES IPTPSNREETQQKSNLELLRISLLL
IQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQT

LMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLY
CFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEG SCGF (SEQ ID NO: 1)。

投予人類生長激素及其密切相關之變異體用於治療多種生長激素缺乏相關性疾病。作為多肽，生長激素係非經腸投予，亦即藉助於針非經腸投予。此外，生長激素之特徵在於半衰期相對較短，因此需要頻繁投予而給患者帶來相應疼痛及不便。因此，對提供具有改良之藥理學性質（諸如延長之半衰期）的生長激素化合物仍存在需要。

本發明提供具有改良之藥物動力學及藥理學性質之新穎生長激素化合物接合物以及其製備方法。

【發明內容】

皮下投予之醫藥化合物之生體可用率可與吸收速率相關。化合物通過皮下毛細血管之緊密連接的能力可能部分與其物理及化學性質以及化合物之分子大小或流體動力學體積相關。蛋白質接合物（諸如具有 40 kDa PEG 之聚乙二醇化 hGH (PEG-hGH)）具有 150-250 kDa 之表觀分子量。具有共價結合之白蛋白之 hGH 分子具有 87 kDa 之分子量，而具有非共價結合之白蛋白的 hGH 分子將耗費一部分時間與白蛋白解離且因此具有 22 kDa 之分子量。

預期解離狀態所耗費之時間至少部分取決於白蛋白結合部分之親和力。因此，具有非共價結合之白蛋白之 hGH 分子的吸收速率可快於 PEG-hGH 的吸收速率。當使用對白蛋白具有低親和力之白蛋白結合部分時可獲得增加之吸收速率。

另外，使白蛋白結合部分連接至 hGH 之連接子及/或間隔基之物理及化學性質將影響化合物之官能性。

本發明發明者已意外發現具有單一 Cys 突變及/或額外二硫橋鍵之生長激素化合物 (GH) 可經由親水性間隔基選擇性連接至白蛋白結合殘基，該親水性間隔基典型地以具有 $m\text{LogP} < 0$ 或 $c\text{LogP} < 0.5$ 之化學部分隔開 GH 與白蛋白結合殘基，從而獲得具有改良之性質之 GH 接合物，該等改良之性質為諸如高試管內效能或諸如活體內半衰期增加或諸如對蛋白水解降解之抗性增強，可能組合活體內作用特徵延長。藉由經由親水性間隔基將白蛋白結合殘基連接至單一 Cys 突變，可保留生物活性且可獲得一或多種上述改良。當經由親水性間隔基將白蛋白結合殘基連接至具有額外二硫橋鍵之生長激素（諸如連接至 hGH 之 N-端、位置 40 或位置 141）時，亦獲得該等改良。生長激素化合物亦可包含單一 Cys 突變及額外二硫橋鍵，在該態樣中，白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至單一 Cys 突變。

在一廣泛態樣中，本發明係關於包含生長激素化合物 (GH) 之生長激素接合物，該生長激素化合物 (GH) 具有

- a) 單一 Cys 突變，
- b) 額外二硫橋鍵，或
- c) 單一 Cys 突變及額外二硫橋鍵，

其中白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至該 GH，或其醫藥學上可接受之鹽。

在本發明之一具體實例中，穩定 hGH 化合物具有額外

二硫鍵。二硫鍵在半胱胺酸對之間形成，該等半胱胺酸中之一或兩者係藉由點突變引入野生型 hGH 序列中。

在本發明之另一具體實例中，穩定 hGH 化合物具有額外半胱胺酸。該等半胱胺酸係藉由點突變引入野生型 hGH 序列中。

在本發明之另一具體實例中，穩定 hGH 化合物具有額外二硫鍵及一或多個額外半胱胺酸。額外二硫鍵在額外半胱胺酸對之間形成且額外半胱胺酸係藉由點突變引入野生型 hGH 序列中。

此外，本發明係基於以下觀測結果：可選擇性進行經由親水性間隔基在人類生長激素 (hGH) 中引入白蛋白結合殘基，其中保留大部分活性。較佳地，白蛋白結合殘基經由親水性間隔基引入對應於所引入半胱胺酸之位置及/或具有 SEQ ID NO : 1 之序列的 hGH 中之位置麩醯胺酸 40 及/或位置麩醯胺酸 141 及/或 N-端。使用轉麩醯胺酸酶 (TGase)，且尤其來自茂原輪枝鏈黴菌 (*Streptoverticillium mobaraenae*) 或利迪鏈黴菌 (*Streptomyces lydicus*) 之 TGase 可將白蛋白結合殘基經由親水性間隔基選擇性引入位置 40 或位置 141，且保持剩餘 11 個麩醯胺酸殘基不受影響，儘管麩醯胺酸為轉麩醯胺酸酶之受質。

因此，在本發明之一具體實例中，生長激素化合物 (GH) 經由親水性間隔基連接至一個白蛋白結合殘基。典型地，白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至 hGH 之 N-端或位置 18、30、40、42、62、69、88、95、98、99、100、101、

102、108、135、141 或 154。在其他具體實例中，兩個白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至 hGH 之單一 Cys 突變及上述位置中之任一者，諸如 N-端、位置 40 或位置 141。

本發明之生長激素化合物接合物相較於聚乙二醇化 hGH 具有較快之皮下吸收，且因此產生程度較輕之皮下脂肪萎縮（lipoatrophy）或不產生皮下脂肪萎縮。此外，白蛋白結合殘基及親水性間隔基與 PEG 相反地具有生物可降解性。

本發明之另一目的在於提供改良 GH 之性質的方法，其係藉由根據本發明之方法使該蛋白質接合來達成。

在其他態樣中，本發明係關於包含單一 cys 突變、額外二硫鍵的經分離之生長激素化合物（GH）或包含單一 cys 突變及額外二硫鍵的生長激素化合物。在本發明之另一目的中，該等化合物為可溶的。

定義

在本發明之上下文中，如本文所用之術語「生長激素化合物（growth hormone compound）」意謂哺乳動物來源之生長激素（諸如人類、牛或豬生長激素）及重組生長激素（諸如重組人類、牛或豬生長激素）及該等生長激素之變異體以及突變體。如本文所用之「GH」與「生長激素化合物」可互換。當 GH 為哺乳動物來源之生長激素（諸如 hGH）及重組 hGH 之變異體時，該變異體應理解為藉由用另一天然或非天然胺基酸取代生長激素（例如 hGH）序列中之一或多個胺基酸殘基；及/或藉由將一或多個天然或非天然胺基

酸添加至生長激素（例如 hGH）序列中；及/或藉由使一或多個胺基酸殘基自生長激素（例如 hGH）序列中缺失所獲得之化合物，其中進行任何此等步驟之後可視情況對一或多個胺基酸殘基進行進一步衍生化。GH 典型地與 hGH 具有至少 80% 一致性，且其活性典型地為 hGH 之生長激素活性的至少 10%，如在本文之檢定 (I)（實施例 46）中所測定。

在本發明之上下文中，如本文所用之術語「白蛋白結合殘基 (albumin binding residue)」意謂非共價結合人類血清白蛋白之殘基。連接至生長激素化合物 (GH) 之白蛋白結合殘基典型地對人類血清白蛋白具有低於約 10 μ M 或甚至低於約 1 μ M 之結合親和力。已知含有 12-40 個碳原子之直鏈及分支鏈親脂性部分、具有環戊菲骨架之化合物及/或具有 10-45 個胺基酸殘基之肽等中有多種白蛋白結合殘基。白蛋白結合性質可藉由如 *J. Biol. Chem.* 277(38), 35035-35042, (2002) 中所述之表面電漿子共振來量測。

如本文所用之術語「親水性間隔基 (hydrophilic spacer)」意謂以包含至少 5 個非氫原子（其中該等非氫原子之 30%-50% 為 N 或 O）之化學部分隔開生長激素化合物與白蛋白結合殘基的間隔基。

在本發明之上下文中，術語「轉胺作用 (transamination)」及相關術語意欲指示麩醯胺酸側鏈中之醯胺氮與另一化合物之氮（尤其另一含氮親核劑之氮）交換的反應。

轉麩醯胺酸酶 (E.C.2.3.2.13) 亦稱作蛋白質-麩醯胺酸

- γ -麩胺醯基轉移酶且催化如下一般反應



$\text{Q}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ (胺接受體) 可表示含麩醯胺酸殘基之肽或蛋白質，且 $\text{Q}'-\text{NH}_2$ (胺供體) 表示含胺親核劑。或者， $\text{Q}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ 及 $\text{Q}'-\text{NH}_2$ 可分別表示胺接受體及含離胺酸之肽或蛋白質。然而，在本發明中， $\text{Q}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ 表示含麩醯胺酸殘基之生長激素，且 $\text{Q}'-\text{NH}_2$ 表示如上文所指示之含胺親核劑。

適用轉麩醯胺酸酶之實例包括微生物轉麩醯胺酸酶，諸如來自茂原鏈黴菌 (*Streptomyces mobaraense*)、肉桂鏈黴菌 (*Streptomyces cinnamoneum*) 及灰肉色鏈黴菌 (*Streptomyces griseocarneum*) (所有皆揭示於 US 5,156,956 中，該文獻以引用之方式併入本文中) 及淡紫鏈黴菌 (*Streptomyces lavendulae*) (揭示於 US 5,252,469 中，該文獻以引用之方式併入本文中) 及拉達卡鏈黴菌 (*Streptomyces ladakanum*) (JP 2003/199569，該文獻以引用之方式併入本文中) 的轉麩醯胺酸酶。應注意先前之輪枝鏈黴菌屬 (genus *Streptoverticillium*) 之成員現包括於鏈黴菌屬 (genus *Streptomyces*) 中 (Kaempfer, *J. Gen. Microbiol.* 137, 1831-1892, (1991))。其他適用微生物轉麩醯胺酸酶已自枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) (揭示於 US 5,731,183 中，該文獻以引用之方式併入本文中) 及各種黏菌 (*Myxomycetes*) 分離。適用微生物轉麩醯胺酸酶之其他實例為 WO 96/06931 (例如來自利迪桿菌 (*Bacillus lydicus*))

之轉麩醯胺酸酶)及 WO 96/22366 中所揭示之轉麩醯胺酸酶，該兩個文獻以引用的方式併入本文中。適用非微生物轉麩醯胺酸酶包括天竺鼠肝臟轉麩醯胺酸酶及來自各種海洋來源之轉麩醯胺酸酶，如扁魚真鯛 (*Pagrus major*) (揭示於 EP-0555649 中，該文獻以引用的方式併入本文中)及日本牡蠣正牡蠣 (*Crassostrea gigas*) (揭示於 US 5,736,356 中，該文獻以引用的方式併入本文中)。

在本發明之上下文中，術語「不可達 (not accessible)」意欲指示某物不存在或在不可達到之意義上事實上不存在。當說明在欲接合之蛋白質中官能基不可達時，意欲指示該官能基在蛋白質中不存在，或若存在，則被某種方式阻止參與反應。舉例而言，該官能基可能深埋於蛋白質之結構中使其被遮蔽而不能參與反應。公認官能基是否可達取決於反應條件。可預計例如在變性劑存在下或在高溫下，蛋白質可伸展從而暴露否則不可達之官能基。應瞭解，「不可達」意謂「在針對特定相關反應所選擇之反應條件下不可達」。

術語「烷烴 (alkane)」或「烷基 (alkyl)」意欲指示飽和直鏈、分支鏈及/或環狀烴。除非說明具有另一碳原子數，否則該術語意欲指示具有 1 至 30 個(兩者皆包括)碳原子，諸如 1 至 20 個(兩者皆包括)，諸如 1 至 10 個(兩者皆包括)，例如 1 至 5 個(兩者皆包括)碳原子之烴。術語烷基及伸烷基分別指相應基團及雙基。

術語「C₁₋₆ 烷基 (C₁₋₆ alkyl)」係指具有 1 至 6 個(兩

者皆包括) 碳原子之直鏈或分支鏈飽和烴。該等基團之實例包括(但不限於) 甲基、2-丙基、1-丁基、2-丁基、2-甲基-2-丙基、2-甲基-1-丁基及正己基。

術語「 C_{3-10} 環烷基 (C_{3-10} cycloalkyl)」典型地指環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基、環辛基、環壬基及環癸基。

術語「烯烴 (alkene)」意欲指示包含至少一個碳碳雙鍵之直鏈、分支鏈及/或環狀烴。除非說明具有另一碳原子數，否則該術語意欲指示具有 2 至 30 個(兩者皆包括) 碳原子，諸如 2 至 20 個(兩者皆包括)，諸如 2 至 10 個(兩者皆包括)，例如 2 至 5 個(兩者皆包括) 碳原子之烴。術語烯基及伸烯基分別指相應基團及雙基。

術語「炔烴 (alkyne)」意欲指示包含至少一個碳碳參鍵之直鏈、分支鏈及/或環狀烴，且其可視情況包含一或多個碳碳雙鍵。除非說明具有另一碳原子數，否則該術語意欲指示具有 2 至 30 個(兩者皆包括) 碳原子，諸如 2 至 20 個(兩者皆包括)，諸如 2 至 10 個(兩者皆包括)，例如 2 至 5 個(兩者皆包括) 碳原子之烴。術語炔基及伸炔基分別指相應基團及雙基。

術語「同素環芳族化合物 (homocyclic aromatic compound)」意欲指示芳族烴，諸如苯及萘。

術語「雜環化合物 (heterocyclic compound)」意欲指示包含 5、6 或 7 個環原子且其中 1、2、3 或 4 個環原子為選自 N、O 及/或 S 之雜原子的環狀化合物。實例包括雜環

芳族化合物，諸如噻吩、呋喃、哌喃、吡咯、咪唑、吡唑、異噻唑、異噁唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、嗒嗪，以及其部分或完全氫化等效物，諸如哌啶、吡嗪啶、吡咯啶、吡咯啉、咪唑啶、咪唑啉、哌嗪及嗎啉。

術語「雜烷烴 (hetero alkane)」、「雜烯烴 (hetero alkene)」及「雜炔烴 (hetero alkyne)」意欲指示如上文所定義之烷烴、烯烴及炔烴，其中一或多個雜原子或雜基團已插入該等部分之結構中。雜基團及雜原子之實例包括 -O-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-C(O)-、-C(S)-及 -N(R*)-，其中 R* 表示氫或 C₁-C₆ 烷基。雜烷烴之實例包括

$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\text{CH}_3$	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\underset{\text{H}}{\text{N}}-\text{CH}_3$	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{CH}_3$
$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\text{CH}_3$	$\text{H}_3\text{C}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{H}_2}{\text{N}}}-\text{CH}_3$ 及	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{H}_2}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\text{CH}_3$

術語「基團 (radical)」或「雙基 (biradical)」意欲指示已分別移除一或兩個氫原子之化合物。當明確說明時，基團亦可指示藉由自化合物形式上移除較大原子群（例如羥基）而形成之部分。

術語「鹵素 (halogen)」意欲指示週期表第七主族之成員，例如 F、Cl、Br 及 I。

在本發明之上下文中，術語「芳基 (aryl)」意欲指示碳環芳族環基團或至少一個環為芳族環的稠合芳族環系統

基團。典型芳基包括苯基、聯苯基、萘基及其類似基團。

如本文所用之術語「雜芳基 (heteroaryl/hetaryl)」單獨或組合時係指具有例如 5 至 7 個成員原子之芳族環基團，或指具有例如 7 至 18 個成員原子之稠合芳族環系統基團，其中至少一個環為芳族，其含有一或多個選自氮、氧或硫雜原子之雜原子作為環原子，其中 N-氧化物及硫單氧化物及硫 dioxide 為容許之雜芳族取代。實例包括呋喃基、噻吩基 (thienyl)、噻吩基 (thiophenyl)、吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、噻唑基、噁唑基、異噁唑基、噁二唑基、噻二唑基、異噻唑基、吡啶基、嗒吡基、吡吡基、嘧啶基、喹啉基、異喹啉基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基及吲唑基及其類似基團。

術語「接合物 (conjugate)」作為名詞意欲指示經修飾之蛋白質，亦即蛋白質具有鍵結於其之部分以修飾該蛋白質之性質。作為動詞，術語「接合 (conjugate)」意欲指示使部分鍵結於蛋白質以修飾該蛋白質之性質的方法。

術語「單一 cys (single cys)」或「自由半胱氨酸 (free cysteine)」係指未以雙鍵接合之半胱氨酸殘基。蛋白質因此除一或多個額外二硫橋鍵之外亦可包括一或多個單一 cys 殘基，只要該等單一 cys 不產生內部二硫橋鍵即可。

如本文所用之術語「前藥 (prodrug)」指示生物可水解醯胺及生物可水解酯，且亦包括：a) 在本發明化合物中包括該種前藥中之生物可水解官能基的化合物，及 b) 在指定官能基處可生物氧化或還原以產生本發明之藥物的化合

物。此等官能基之實例包括 1,4-二氫吡啶、N-烷基羰基-1,4-二氫吡啶、1,4-環己二烯、第三丁基及其類似基團。

如本文所用之術語「生物可水解酯 (biohydrolyzable ester)」為藥物 (在此狀況下為本發明化合物) 之酯，其 a) 不干擾母體物質之生物活性，但使該物質具有有利活體內性質，諸如作用持續時間、起始作用時間及其類似性質，或 b) 不具生物活性，但易於在活體內由個體轉化成生物活性成分。優勢為例如溶解性增加或生物可水解酯可經口自消化道吸收且在血漿中轉化成本發明之化合物。該等生物可水解酯之多種實例在此項技術中已知且包括例如低碳烷酯 (例如 C_1-C_4)、低碳醯氧基烷酯、低碳烷氧基醯氧基烷酯、烷氧基醯氧基酯、烷基醯胺基烷酯及膽鹼酯。

如本文所用之術語「生物可水解醯胺 (biohydrolyzable amide)」為藥物 (在此狀況下為本發明化合物) 之醯胺，其 a) 不干擾母體物質之生物活性，但使該物質具有有利活體內性質，諸如作用持續時間、起始作用時間及其類似性質，或 b) 不具生物活性，但易於在活體內由個體轉化成生物活性成分。優勢為例如溶解性增加或生物可水解醯胺可經口自消化道吸收且在血漿中轉化成本發明化合物。該等生物可水解醯胺之多種實例在此項技術中已知且包括例如低碳烷基醯胺、 α -胺基酸醯胺、烷氧基醯基醯胺及烷基胺基烷基羰基醯胺。

在本發明之上下文中，術語「醫藥學上可接受之鹽 (pharmaceutically acceptable salt)」意欲指示對患者無害之

鹽。該等鹽包括醫藥學上可接受之酸加成鹽、醫藥學上可接受之金屬鹽、銨鹽及烷基化銨鹽。酸加成鹽包括無機酸以及有機酸之鹽。適合無機酸之代表性實例包括鹽酸、氫溴酸、氫碘酸、磷酸、硫酸、硝酸及其類似物。適合有機酸之代表性實例包括甲酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、丙酸、苯甲酸、肉桂酸、檸檬酸、反丁烯二酸、乙醇酸、乳酸、順丁烯二酸、蘋果酸、丙二酸、杏仁酸、草酸、苦味酸、丙酮酸、水楊酸、琥珀酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、酒石酸、抗壞血酸、雙羥苯酸、雙亞甲基水楊酸、乙烷二磺酸、葡萄糖酸、檸檬酸、天門冬胺酸、硬脂酸、棕櫚酸、EDTA、乙醇酸、對氨基苯甲酸、麩胺酸、苯磺酸、對甲苯磺酸及其類似物。醫藥學上可接受之無機酸或有機酸加成鹽之其他實例包括 *J. Pharm. Sci.* 66, 2, (1977)(該文獻以引用的方式併入本文中) 中所列之醫藥學上可接受之鹽。金屬鹽之實例包括鋰鹽、鈉鹽、鉀鹽、鎂鹽及其類似物。銨鹽及烷基化銨鹽之實例包括銨鹽、甲銨鹽、二甲銨鹽、三甲銨鹽、乙銨鹽、羥基乙銨鹽、二乙銨鹽、丁銨鹽、四甲銨鹽及其類似物。

如本文所用之化合物之「治療有效量 (therapeutically effective amount)」意謂足以治癒、減輕或部分抑制指定疾病及其併發症之臨床表現的量。足以達成此目的之量定義為「治療有效量」。用於各目的之有效量將視疾病或損傷之嚴重程度以及個體之體重及一般狀況而定。應瞭解，可使用常規實驗，藉由建構值之矩陣且測試矩陣中之不同點來

確定適當劑量，其全部處於受訓醫師或獸醫之一般技能範圍內。

如本文所用之術語「治療 (treatment/treating)」意謂出於對抗病狀 (諸如疾病或病症) 之目的管理及護理患者。該術語意欲包括對於患者所罹患之指定病狀的全部範圍之治療，諸如投予活性化合物以減輕症狀或併發症、延遲疾病、病症或病狀之發展、減輕或緩解症狀及併發症及/或治癒或消除疾病、病症或病狀以及預防該病狀，其中預防應理解為出於對抗疾病、病狀或病症之目的管理及護理患者且包括投予活性化合物以預防症狀或併發症發作。待治療之患者較佳為哺乳動物；尤其為人類，但其亦可包括動物，諸如犬、貓、牛、綿羊及豬。

【實施方式】

在一廣泛態樣中，本發明係關於包含生長激素化合物 (GH) 之穩定生長激素接合物，該生長激素化合物具有

- a) 單一 Cys 突變，
- b) 額外二硫橋鍵，或
- c) 單一 Cys 突變及額外二硫橋鍵，

其中白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至該 GH，或其醫藥學上可接受之鹽。

當存在單一 Cys 突變時，白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至該 Cys 之硫殘基。當存在額外二硫橋鍵 (但無單一 Cys 突變) 時，則白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至如本文所述之生長激素化合物中之位置，諸如 hGH

之位置 40、位置 141 或 N-端。當兩個或兩個以上白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至生長激素化合物時，若存在單一 Cys 突變，則該等白蛋白結合殘基連接至該突變，或若僅存在額外二硫橋鍵，則白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至如本文所述之生長激素化合物中之位置。

在一具體實例中，生長激素化合物具有一處單一 Cys 突變。

在另一具體實例中，生長激素化合物具有兩處單一 Cys 突變。

在另一具體實例中，生長激素化合物具有額外二硫橋鍵。

在另一具體實例中，生長激素化合物具有一處單一 Cys 突變及一個額外二硫橋鍵。

在另一具體實例中，GH 表示包含與人類生長激素 (hGH) 之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 90% 一致性之胺基酸序列的生長激素化合物。在其他具體實例中，GH 與 hGH 具有至少 80%，諸如至少 85%，諸如至少 95% 一致性，與 SEQ ID NO: 1 具有諸如至少 96%，諸如至少 97%，諸如至少 98% 或諸如至少 99% 一致性。在其他具體實例中，該等與 hGH 之一致性與如在本文之檢定 I 中所測定活性為 hGH 生長激素活性之至少 10%，諸如至少 20%，諸如至少 40%，諸如至少 60%，諸如至少 80% 相結合。序列一致性具體實例中之任一者可與活性具體實例中之任一者組合，諸如 GH 與 hGH 具有至少 80% 一致性且結合 hGH 之

生長激素活性之至少 60%；GH 與 hGH 具有至少 90%一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 40%；GH 與 hGH 具有至少 95%一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 80%等。如本文所述，HG 可表示為 MetHG，其指示包含額外 N-端甲硫胺酸之序列。

在一具體實例中，GH 為引入了單一 Cys 突變之生長激素變異體。在其他具體實例中，GH 表示除單一 Cys 突變外亦含有 1 至 5 處突變之生長激素化合物。

在另一具體實例中，白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至單一 Cys 突變。在一具體實例中，單一 Cys 突變位於 GH 之 N-端、H1、H2、L2 或 H3 中。在其他具體實例中，單一 Cys 突變位於 N-端中，該突變為諸如 T3C、P5C、S7C 中之任一者；或位於 H1（對應於 AA 9-35）中，該突變為諸如 D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C 中之任一者；或位於 L1（對應於 AA 36-71）中，該突變為諸如 K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、S57C、P59C、S62C、E65C、Q69C 中之任一者或較佳為 Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C 中之任一者；或位於 H2、L2 或 H3（對應於 AA 72-98、AA 99-106 及 AA 107-127）中，該突變為諸如 hGH (SEQ ID NO: 1) 之 E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C 中之任一者；或位於 L3 或 H4（對應於 AA 128-154 及 AA 155-184）中，位於 L3 及 H4（128-154 及 AA 155-184）中，該突變為諸如 E129C、

D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180C 中之任一者；或位於 C-端中，該突變為諸如 E186C、G187C、G190C 中之任一者。

若在 hGH 變異體中存在單一 Cys 突變，則該突變位於相應胺基酸殘基中。

在 GH 之特定具體實例中，單一 Cys 突變已引入相當於母體 GH 亦即相當於 hGH (SEQ ID NO : 1) 中選自由以下組成之群之位置的位置：T3、P5、S7、D11、H18、Q29、E30、E33、A34、Y35、K38、E39、Y42、S43、D47、P48、S55、S57、P59、S62、E65、Q69、E88、Q91、S95、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、D107、S108、D112、Q122、G126、E129、D130、G131、P133、T135、G136、T142、D147、N149、D154、A155、L156、R178、E186、G187 及 G190，諸如由以下組成之群：T3、P5、S7、D11、H18、Q29、E30、E33、A34、Y35、E88、Q91、S95、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、D107、S108、D112、Q122 及 G126，GH 接合物進一步在該單一半胱胺酸殘基之側鏈上包含白蛋白結合部分。

在其他具體實例中，單一 Cys 突變位於 hGH 中之 AA 93-106 中或 hGH 變異體中之相應殘基中。在其他特定具體實例中，單一 Cys 突變位於 L2 中，諸如位於 AA 99-106 或 AA 99-103 或相應殘基中。

當在本發明之生長激素化合物接合物中存在單一 Cys

突變時，典型單一 Cys 突變為 E30C。另一典型單一 Cys 突變為 Y42C。另一典型單一 Cys 突變為 S55C。另一典型單一 Cys 突變為 S57C。另一典型單一 Cys 突變為 S62C。另一典型單一 Cys 突變為 Q69C。另一典型單一 Cys 突變為 S95C。另一典型單一 Cys 突變為 A98C。另一典型單一 Cys 突變為 N99C。另一典型單一 Cys 突變為 S100C。另一典型單一 Cys 突變為 L101C。另一典型單一 Cys 突變為 V102C。另一典型單一 Cys 突變為 S108C。

根據 rhGH/受體複合物之晶體結構 (PDB: 3HHR)，螺旋束由四個主要螺旋組成：殘基 9 至 34 之第一螺旋 (A)、殘基 72 至 92 及殘基 94 至 100 之第二螺旋 (B)、殘基 106 至 128 之第三螺旋 (C) 及殘基 155 至 184 之第四螺旋 (D) (M. R. Kasimova 等人, *J. Mol. Biol.* **318**, 679-695, (2002))。四個主要螺旋稱作蛋白質之核心。不為螺旋區之部分的殘基定義為環殘基，且可為可撓性區域、環、 β -轉角、髮夾及捲曲之部分。當 hGH 處於與其結合蛋白之複合物中時 (PDB: 1HWG) (其為上文所提及之螺旋定義)，獲得稍有不同之螺旋定位。

此外，本發明係關於一種包含至少一個引入之半胱氨酸殘基的 GH 接合物，該殘基已引入相當於 hGH 之螺旋或環區域中之位置的位置。特定而言，胺基酸殘基可引入螺旋或環區域中之表面暴露位置，例如在單獨 hGH 之模型結構中或在 hGH 與其兩個受體分子複合之模型結構中，該螺旋或環區域之側鏈超過 25% 暴露於表面，較佳其側鏈超過

50%暴露於表面。在一較佳具體實例中，螺旋或環中之位置相當於 hGH 之受體結合位點外部的位點。表面暴露之殘基可使用計算化學算法來鑑別。舉例而言，可用來自 Accelrys 公司之電腦程式 Quanta 2005，使用來自可公開獲得之結構 (PDB 寄存代碼：1HGU 及 1HWG 結構) 的原子座標及預設參數設定來計算相對表面可達性。關於算法之基本原則的描述可見於 B. Lee 及 F.M. Richards, 「The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility」 *J. Mol. Biol.* 55, 379-400, (1971) 中。

在另一具體實例中，白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至具有額外二硫橋鍵之 GH。典型地，白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至 hGH 之 N-端、位置 40 或位置 141。

在另一具體實例中，GH 在環區段與螺旋區段之間或在環區段內或在環區段之間或在螺旋區段之間包含額外二硫鍵。

在另一具體實例中，GH 包含額外二硫鍵，其中在環區段，諸如胺基酸殘基 128-154 (L3) 之環區段中存在至少一個半胱胺酸。

在另一具體實例中，GH 包含額外二硫鍵，其中該額外二硫鍵連接環區段與螺旋區段。

在另一具體實例中，GH 包含額外二硫鍵，其中該額外二硫鍵連接環區段與螺旋 B 或螺旋 2 (對應於 AA 72-98)。

在另一具體實例中，GH 包含額外二硫鍵，該額外二硫

鍵連接螺旋 2 (對應於 AA 72-98) 與環 3 (對應於 AA 128-154)。

在另一具體實例中，GH 在對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置的一個胺基酸對之間包含額外二硫鍵：
 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、
 D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、
 F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、
 I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、
 P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、
 L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、
 L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、
 S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、
 R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C
 及/或 V185C/S188C。

在另一具體實例中，GH 之額外二硫橋鍵位於對應於 hGH (SEQ ID NO: 1) 中以下之位置的至少一個胺基酸對之間：
 R16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、
 H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、
 F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、
 P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、
 L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、
 L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、
 F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、
 L156C/F146C、L156C/T148C 及/或 V185C/S188C。

在另一具體實例中，額外二硫鍵位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置之一個胺基酸對之間：A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及/或 R94C/D107C。

在另一具體實例中，額外二硫鍵位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置之一個胺基酸對之間：D26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及/或 R94C/D107C。

在另一具體實例中，額外二硫鍵位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置之一個胺基酸對之間：H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及/或 S85C/S144C。

在另一具體實例中，額外二硫鍵位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置之一個胺基酸對之間：S57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及/或 S85C/S144C。額外二硫橋鍵典型地為 Q84C/Y143C。

在另一具體實例中，白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至具有單一 Cys 突變及額外二硫橋鍵之 GH。白蛋白

結合殘基典型地經由親水性間隔基連接至單一 Cys 突變。在一特定具體實例中，GH 具有額外二硫橋鍵 Q84C/Y143C 及白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接之單一突變 L101C。

在其他具體實例中，GH 具有額外二硫鍵及選自 hGH (SEQ ID NO:1) 中以下任一者之單一 Cys 突變：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C 及 G190C，諸如以下任一者：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C，或 hGH 變異體中之相應殘基。

在一特定具體實例中，GH 具有額外二硫鍵及單一 Cys 突變，且該單一 Cys 突變已引入相當於母體 GH 亦即相當於 hGH (SEQ ID NO:1) 中選自由以下組成之群之位置的位置：T3、P5、S7、D11、H18、Q29、E30、E33、A34、Y35、K38、E39、Y42、S43、D47、P48、S55、S57、P59、S62、E65、Q69、E88、Q91、S95、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、D107、S108、D112、Q122、G126、E129、D130、

G131、P133、T135、G136、T142、D147、N149、D154、A155、L156、R178、E186、G187 及 G190，較佳選自以下之群：T3、P5、S7、D11、H18、Q29、E30、E33、A34、Y35、E88、Q91、S95、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、D107、S108、D112、Q122 及 G126。GH 接合物進一步在該單一半胱氨酸殘基之側鏈上包含白蛋白結合部分。

在另一具體實例中，GH 包含單一 cys 突變及位於環區段與螺旋區段之間或環區段內或環區段之間或螺旋區段之間的額外二硫鍵。

在另一具體實例中，GH 包含單一 cys 突變及額外二硫鍵，其中至少一個半胱氨酸存在於環區段，諸如胺基酸殘基 128-154 (L3) 之環區段中。

在另一具體實例中，GH 包含單一 cys 突變及額外二硫鍵，其中該額外二硫鍵連接環區段 (諸如胺基酸殘基 128-154 之環區段) 與螺旋區段 (諸如螺旋 B 或螺旋 2 (對應於 AA 72-98))。

在另一具體實例中，GH 包含單一 cys 突變及額外二硫鍵，該額外二硫鍵連接螺旋 2 (對應於 AA 72-98) 與環 3 (對應於 AA 128-154)。

在另一具體實例中，GH 包含單一 cys 突變及位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置之一個胺基酸對之間的額外二硫鍵：R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、

F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C。

在另一具體實例中，GH 包含單一 cys 突變及位於對應於 hGH (SEQ ID NO: 1) 中以下之位置之至少一個胺基酸對之間的額外二硫橋鍵：R16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C。

在另一具體實例中，GH 包含單一 cys 突變及位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置之一個胺基酸對之間的額外二硫鍵：A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、

I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及 / 或 R94C/D107C。

在另一具體實例中，額外二硫鍵位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置之一個胺基酸對之間：D26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及 / 或 R94C/D107C。

在另一具體實例中，GH 包含單一 cys 突變及位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置之一個胺基酸對之間的額外二硫鍵：H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及 / 或 S85C/S144C。

在另一具體實例中，GH 包含單一 cys 突變及位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置之一個胺基酸對之間的額外二硫鍵：S57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及 / 或 S85C/S144C。

親水性間隔基 (B) 之溶解度可以其 logP 值描述。LogP 亦稱作分配係數，其為在平衡時化合物在兩種不可混溶溶劑之混合物的兩個相中之濃度比率的對數。典型地，一種溶劑為水，而第二溶劑係選自辛-1-醇、氯仿、環己烷及丙二醇二壬酸酯 (propylene glycol dipelargonate, PGDP)。以

此等不同溶劑量測之 LogP 值主要歸因於氫鍵結影響而顯示不同。辛醇可貢獻及接受氫鍵，而環己烷為惰性。氯仿可貢獻氫鍵，而 PGDP 僅可接受氫鍵。LogP 值可藉由此項技術中已知之標準方法來量測。

在本發明之一具體實例中，親水性間隔基在辛-1-醇、氯仿、環己烷及丙二醇二壬酸酯（PGDP）中具有低於 0，諸如低於 0.5 之 LogP。

在另一具體實例中，親水性間隔基在辛-1-醇、氯仿、環己烷及丙二醇二壬酸酯（PGDP）中具有低於 -1 之 LogP。

或者，可使用公開之算法（T. Fujita; J. Iwasa 及 C. Hansch, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 5175-5180, (1964) 「A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients」; C. A. Lipinski 等人, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **23**, 3-25, (1997) 「Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings」; 及 I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 976-978, (1994) 「Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods」) 將白蛋白結合劑部分或親水性間隔基部分之 LogP 值計算為 mLogP 及/或 cLogP。

在本發明之一具體實例中，親水性間隔基（B）具有 mLogP < 0。

在另一具體實例中，生長激素化合物（GH）經由親水

性間隔基 (B) 連接至一個白蛋白結合殘基。

在另一具體實例中，生長激素化合物 (GH) 經由偶合至生長激素化合物 (GH) 中之自由半胱胺酸的親水性間隔基 (B) 連接至白蛋白結合殘基。

在另一具體實例中，生長激素化合物 (GH) 經由一或兩個親水性間隔基連接至兩個白蛋白結合殘基。因此，在一實施例中，一個白蛋白結合殘基經由一個親水性間隔基 (B) 連接至單一 Cys 突變，且另一白蛋白結合殘基經由一個親水性間隔基 (B') 連接至位置 40 或位置 141 之麩醯胺酸，或者兩個白蛋白結合殘基經由一個親水性間隔基 (B) 連接至單一 Cys 突變或位置 40、位置 141 之麩醯胺酸或 N-端。在另一具體實例中，生長激素化合物 (GH) 經由一或多個親水性間隔基連接至三個白蛋白結合殘基。

在一具體實例中，親水性間隔基包含至少一個 OEG 基元，亦即基團 8-胺基-3,6-二氧雜辛酸，亦即 $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(O)-}$ 。在另一特定具體實例中，親水性間隔基包含至少兩個 OEG 基元。在一具體實例中，該或該等 OEG 基元之取向使得 -C(O)- 最靠近生長激素化合物但不連接生長激素化合物與白蛋白結合劑連接子，且 -NH- 最靠近白蛋白結合殘基。在包含兩個 OEG 基元之其他具體實例中，兩個基元具有相同取向或不同取向。在一具體實例中，該兩個 OEG 基元彼此相鄰定位，而在替代具體實例中，該等 OEG 基元由一或多個共價連接之原子隔開。

在一具體實例中，親水性間隔基包含至少一個麩胺酸

殘基。胺基酸麩胺酸包含兩個羧酸基團。其 γ -羧基可用於與離胺酸之 ϵ -胺基或與 OEG 分子（若存在）之胺基或與另一 Glu 殘基（若存在）之胺基形成醯胺鍵。 α -羧基可替代地用於與離胺酸之 ϵ -胺基或與 OEG 分子（若存在）之胺基或與另一 Glu 殘基（若存在）之胺基形成類似醯胺鍵。Glu 之胺基轉而可與白蛋白結合殘基之羧基，或與 OEG 基元（若存在）之羧基，或與另一 Glu（若存在）之 γ -羧基或 α -羧基形成醯胺鍵。一個 Glu 之胺基與第二 Glu 之 γ -羧基的連接可稱作「 γ -Glu」基元。

在一具體實例中，親水性間隔基包含至少一個組合之 OEG-Glu 基元
 $(-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OH})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-)$ 或至少一個組合之 Glu-OEG 基元
 $(-\text{NH}-\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OH})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-)$ 或其組合，其中該等 Glu-OEG 及 OEG-Glu 基元可由一或多個共價連接之原子隔開，或藉由 Glu 形成 γ -Glu 之醯胺鍵彼此直接鍵結。

在另一態樣中，本發明係關於一種生長激素接合物，其中該生長激素接合物具有式 (I)：

A-W-B-GH (I)

其中

GH 表示具有單一 Cys 突變之生長激素化合物，

B 表示連接至該 Cys 突變之硫殘基之親水性間隔基，

W 為連接 A 與 B 之化學基團，及

A 表示白蛋白結合殘基；及
其醫藥學上可接受之鹽。

在另一具體實例中，GH 表示包含與人類生長激素 (hGH) 之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 90% 一致性之胺基酸序列的生長激素化合物。在其他具體實例中，GH 與 hGH (SEQ ID NO: 1) 具有至少 80%，諸如至少 85%，諸如至少 95%，諸如至少 96%，諸如至少 97%，諸如至少 98% 或諸如至少 99% 一致性。在其他具體實例中，該等與 hGH 之一致性與如在本文之檢定 I 中所測定活性為 hGH 生長激素活性之至少 10%，諸如至少 20%，諸如至少 40%，諸如至少 60%，諸如至少 80% 相結合。序列一致性具體實例中之任一者可與活性具體實例中之任一者組合，諸如 GH 與 hGH 具有至少 80% 一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 60%；GH 與 hGH 具有至少 90% 一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 40%；GH 與 hGH 具有至少 95% 一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 80% 等。

在其他具體實例中，接合物之 GH 具有單一 Cys 突變，該單一 Cys 突變選自 GH 之 N-端、H1、H2、L2 或 H3 區域中之單一 Cys 突變中之任一者。在其他此類具體實例中，單一 Cys 突變位於 N-端中，該突變為諸如 T3C、P5C、S7C 中之任一者；或位於 H1 (對應於 AA 9-35) 中，該突變為諸如 D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C 中之任一者；或位於 L1 (對應於 AA 36-71) 中，該突變為諸如 K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、S57C、

P59C、S62C、E65C、Q69C 中之任一者或較佳為 Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C 中之任一者；或位於 H2、L2 或 H3（對應於 AA 72-98、AA 99-106 及 AA 107-127）中，該突變為諸如 hGH (SEQ ID NO: 1) 之 E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C 中之任一者；或位於 L3 或 H4（對應於 AA 128-154 及 AA 155-184）中，位於 L3 及 H4（128-154 及 AA 155-184）中，該突變為諸如 E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180C 中之任一者；或位於 C-端中，該突變為諸如 E186C、G187C、G190 中之任一者。

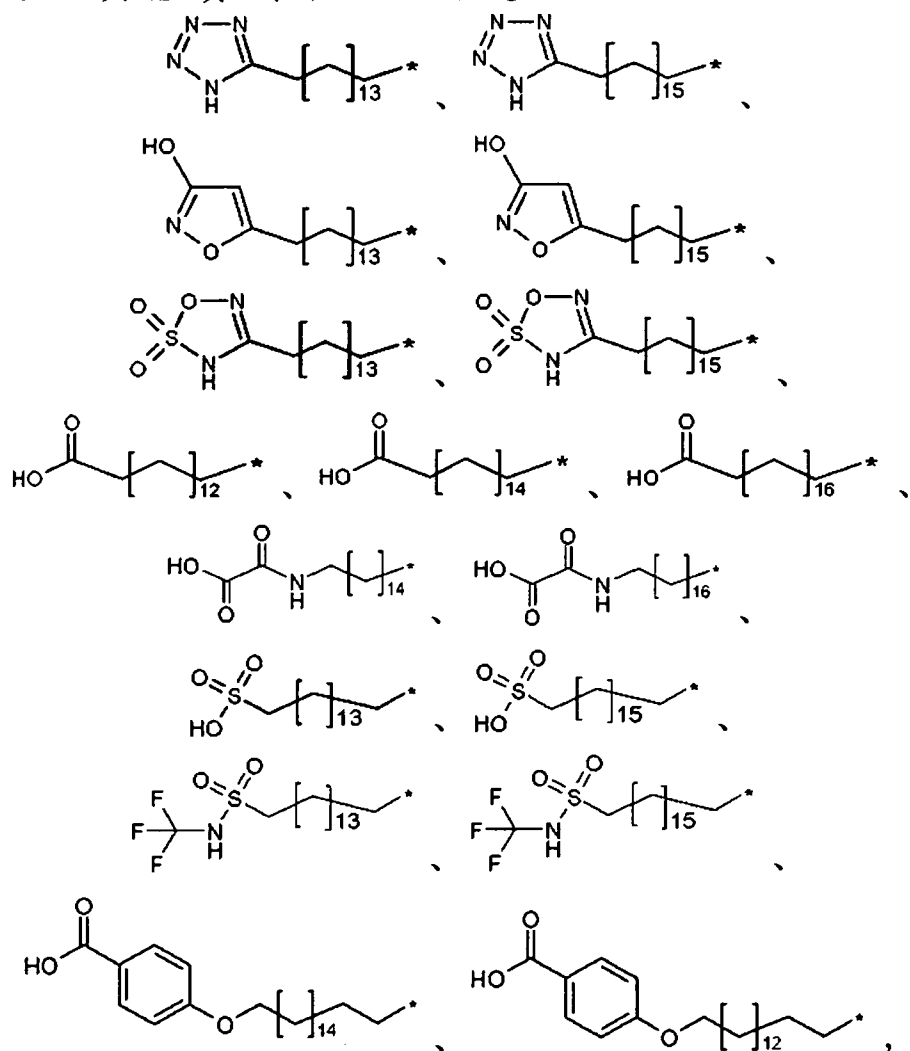
若在 hGH 變異體中存在單一 Cys 突變，則該突變位於相應胺基酸殘基中。

其他具體實例包括如下 GH 接合物，其中 GH 中之單一 cys 突變係選自 hGH (SEQ ID NO: 1) 之以下任一者：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C 及 G190C，諸如以下任一者：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、

E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C。

在其他具體實例中，單一 Cys 突變位於 hGH 中之 AA 93-106 中或 hGH 變異體中之相應殘基中。在其他特定具體實例中，單一 Cys 突變位於 L2 中，諸如位於 AA 99-106 或 AA 99-103 或相應殘基中。

在另一具體實例中，A 係選自



其中*表示經由 W 連接至 B。

在另一具體實例中，W 具有下式：

-W₇-Y-

其中

Y 為 $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ 環烷基 $-W_8-$ 或價鍵，

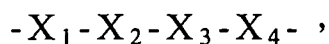
17 為 0-6，

W_7 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s3}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s3$ 為 0 或 1，

W_8 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s4}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s4$ 為 0 或 1。

在其他具體實例中，B 包含一或多個如上文所述之 OEG 及 / 或 γ -Glu 基元或由其組成。

在另一具體實例中，B 具有下式：



其中

X_1 為 $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ，

X_2 為 $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ，

X_3 為 $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ ，

X_4 為 $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ ，

11、12、13、14、15 及 16 獨立地選自 0-16，

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 及 $m7$ 獨立地選自 0-10，

m2 及 m5 獨立地選自 0-25，

n1、n2、n3 及 n4 獨立地選自 0-16，

F 為芳基、雜芳基、吡咯啉-2,5-二酮或價鍵，其中芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆ 烷基，

R¹、R²、R³、R⁴ 及 R⁵ 獨立地選自 氫、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆ 烷基、芳基或雜芳基；其中烷基、芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH，

D1、D2、E1 及 E2 獨立地選自 -O-、-N(R⁶)-、-N(C(O)R⁷)- 或價鍵；其中 R⁶ 及 R⁷ 獨立地表示 氫或 C₁₋₆ 烷基，

W₁ 至 W₅ 獨立地選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或價鍵；其中 s2 為 0 或 1，

W₆ 係選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s1}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆ 烷基、-C(O)NHC₁₋₆ 烷基或價鍵；其中 s1 為 0 或 1，且 C₁₋₆ 烷基視情況經以下基團取代：側氧基、吡咯啉-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH₂COOH 或

-NHC(O)CH₂CH*COOH；其中(*)指示 CH 之碳原子與 X₄ 之連接點。

在另一具體實例中，11、12、13、14、15 及 16 獨立地為 0-6。

在另一具體實例中，m1、m3、m4、m6 及 m7 獨立地為 0-6。

在另一具體實例中，m2 及 m5 獨立地為 0-10。

在另一具體實例中，n1、n2、n3 及 n4 獨立地為 0-10。

在另一具體實例中，D1 及 D2 獨立地選自 -O- 或 -N(R⁶)- 或價鍵。

在另一具體實例中，E1 及 E2 獨立地選自 -O- 或 -N(R⁶)- 或價鍵。

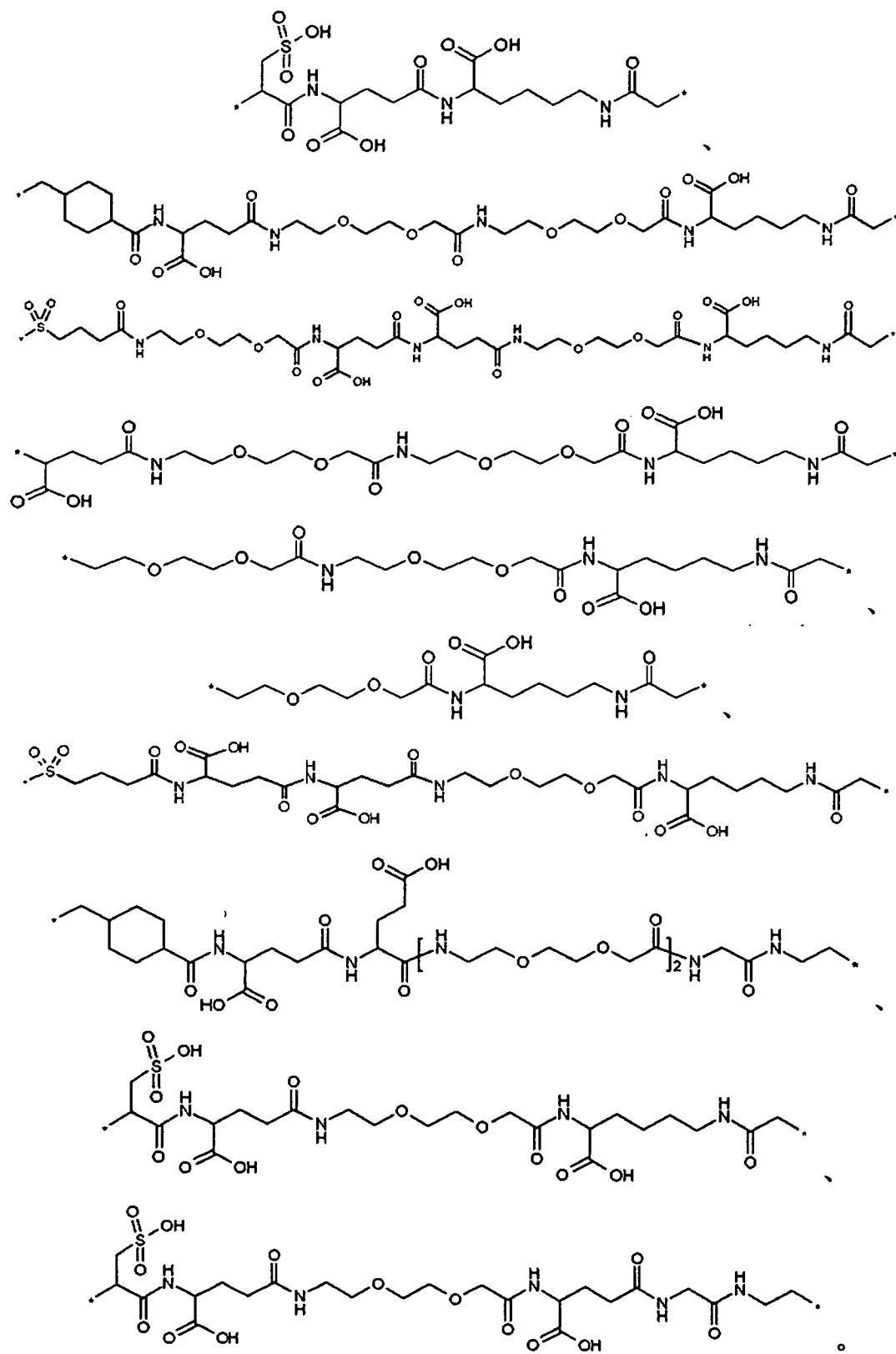
在另一具體實例中，W₁ 至 W₈ 獨立地選自由以下組成之群：
 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH₂NHC(O)-、
 -C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆ 烷基、
 -C(O)NHC₁₋₆ 烷基或價鍵；其中烷基視情況經以下基團取代：
 側氧基、吡咯啉-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH₂COOH 或
 -NHC(O)CH₂CH*COOH；其中(*)指示 CH 之碳原子與 X₄ 之連接點。

在另一具體實例中，R¹、R²、R³、R⁴ 及 R⁵ 獨立地選自
 氫、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆ 烷基；其中 C₁₋₆
 烷基視情況經 -C(O)OH、-C(O)NH₂ 或 -S(O)₂OH 取代。

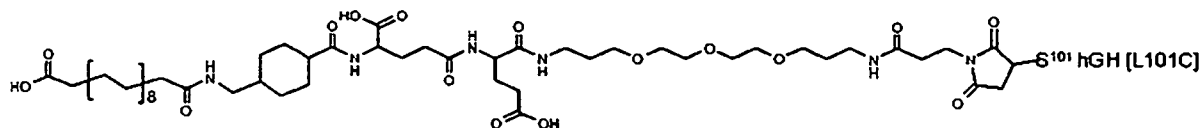
在另一具體實例中，
 -{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{l2}-W₃]_{m3}}_{n2}- 及 -{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-

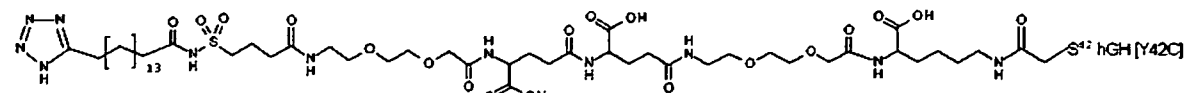
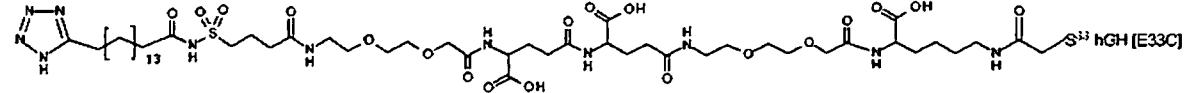
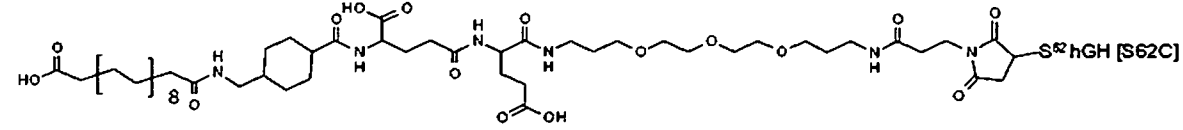
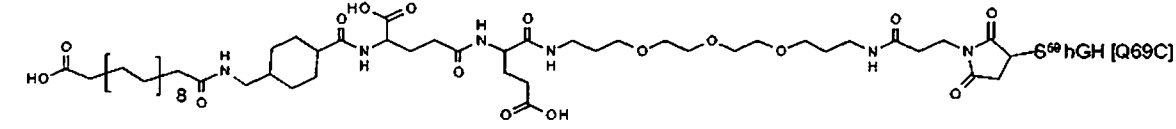
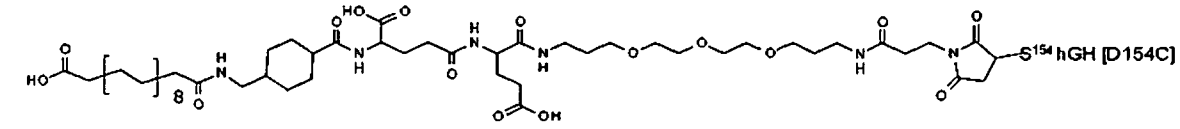
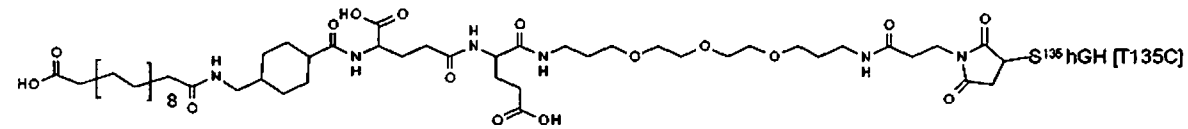
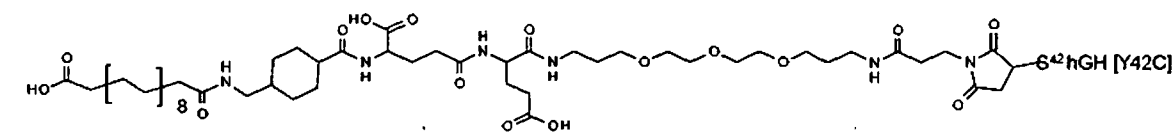
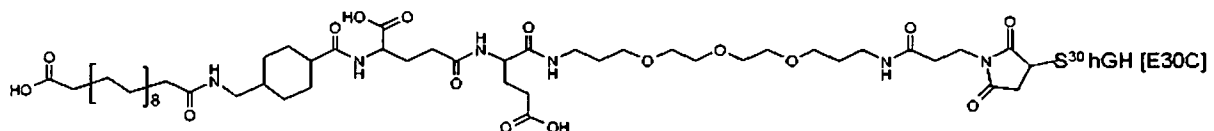
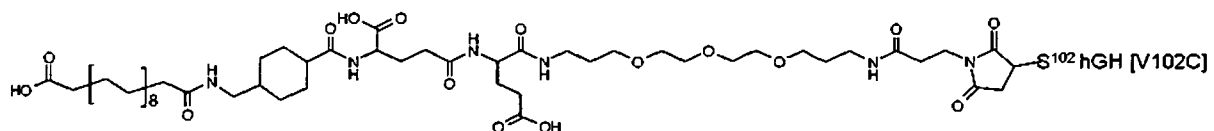
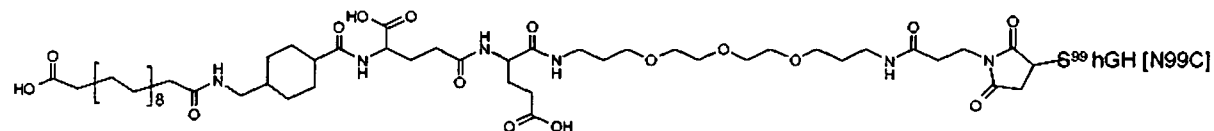
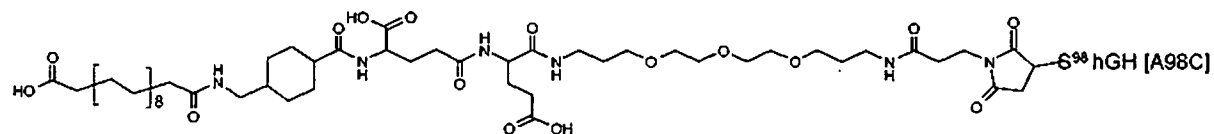
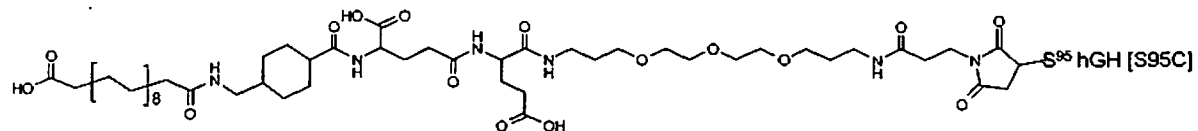
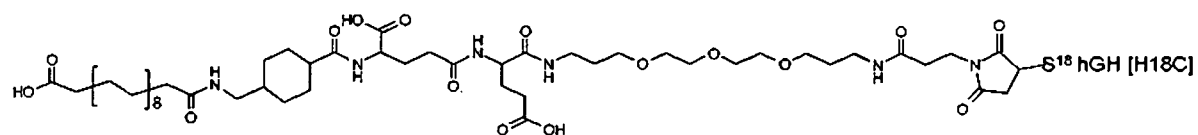
3

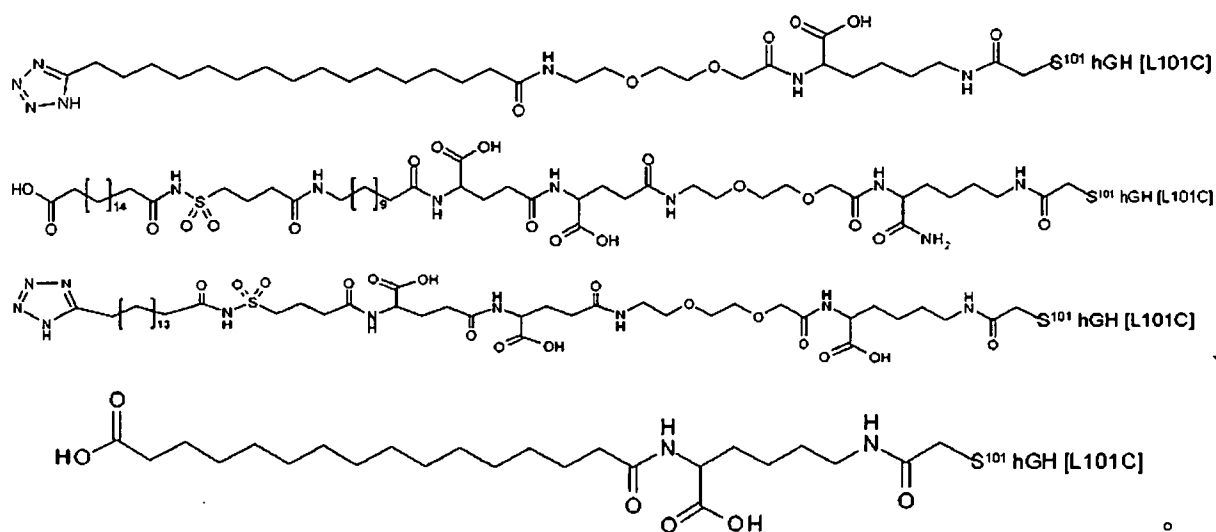




在另一具體實例中，GH 接合物係選自







在另一態樣中，本發明係關於具有式 (I) 之生長激素接合物：

A-W-B-GH (I)，

其中

GH 表示具有額外二硫橋鍵之生長激素化合物，

B 表示親水性間隔基，

W 為連接 A 與 B 之化學基團，及

A 表示白蛋白結合殘基；及

其醫藥學上可接受之鹽。

在另一具體實例中，GH 表示包含與人類生長激素 (hGH) 之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 90% 一致性之胺基酸序列的生長激素化合物。在其他具體實例中，GH 與 hGH (SEQ ID NO: 1) 具有至少 80%，諸如至少 85%，諸如至少 95%，諸如至少 96%，諸如至少 97%，諸如至少 98% 或諸如至少 99% 一致性。在其他具體實例中，該等與 hGH 之一致性與如在本文之檢定 I 中所測定活性為 hGH 生長激素活性之至少 10%，諸如至少 20%，諸如至少 40%，

諸如至少 60%，諸如至少 80%相結合。序列一致性具體實例中之任一者可與活性具體實例中之任一者組合，諸如 GH 與 hGH 具有至少 80%一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 60%；GH 與 hGH 具有至少 90%一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 40%；GH 與 hGH 具有至少 95%一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 80%等。

在另一具體實例中，接合物之 GH 在環區段與螺旋區段之間或在環區段內或在環區段之間或在螺旋區段之間包含額外二硫鍵。

在另一具體實例中，接合物之 GH 包含額外二硫鍵，其中至少一個半胱氨酸存在於環區段，諸如胺基酸殘基 128-154 之環區段中。

在另一具體實例中，接合物之 GH 包含額外二硫鍵，其中該額外二硫鍵連接環區段（諸如胺基酸殘基 128-154（H3）之環區段）與螺旋區段（諸如螺旋 B 或螺旋 2（對應於 AA 72-98））。

在另一具體實例中，接合物之 GH 包含額外二硫鍵，該額外二硫鍵連接螺旋 2（對應於 AA 72-98）與環 3（對應於 AA 128-154）。

在另一具體實例中，接合物之 GH 在對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置的一個胺基酸對之間包含額外二硫鍵：R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、

I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C。

在另一具體實例中，額外二硫橋鍵位於對應於 hGH (SEQ ID NO: 1) 中以下之位置的至少一個胺基酸對之間：

R16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C。

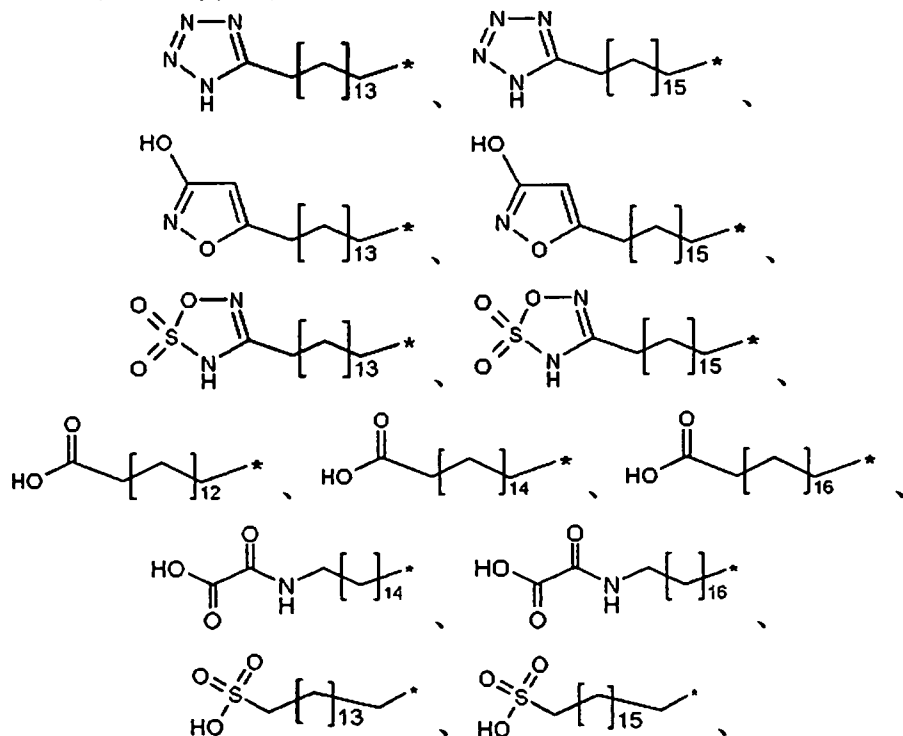
在另一具體實例中，接合物之 GH 在對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置的一個胺基酸對之間包含額外二硫鍵：A17C/E174C、H21C/M170C、D26CA/102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及 / 或 R94C/D107C。

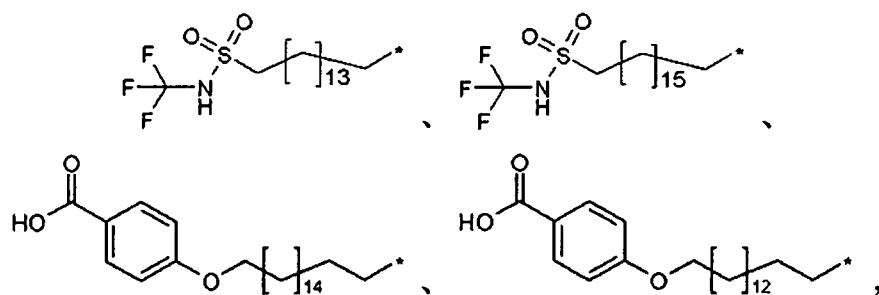
在另一具體實例中，額外二硫鍵位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置的一個胺基酸對之間：D26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及/或 R94C/D107C。

在另一具體實例中，接合物之 GH 在對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置的一個胺基酸對之間包含額外二硫鍵：H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及/或 S85C/S144C。

在另一具體實例中，接合物之 GH 在對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置的一個胺基酸對之間包含額外二硫鍵：S57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及/或 S85C/S144C。

在另一具體實例中，A 係選自





其中*表示經由 W 連接至 B。

在另一具體實例中，W 具有下式：

-W₇-Y-

其中

Y 為 -(CH₂)₁₇-C₃₋₁₀ 環烷基-W₈-或價鍵，

17 為 0-6，

W₇ 係選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、
-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、
-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、
-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-、-C(O)-、-C(O)O-、
-OC(O)-或價鍵；其中 s₃ 為 0 或 1，

W₈ 係選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、
-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、
-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、
-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-、-C(O)-、-C(O)O-、
-OC(O)-或價鍵；其中 s₄ 為 0 或 1。

在其他具體實例中，B 包含一或多個如上文所述之 OEG
及/或 γ-Glu 基元或由其組成。

在另一具體實例中，B 具有下式：

-X₁-X₂-X₃-X₄-，

其中

X_1 為 $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

X_2 為 $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

X_3 為 $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$,

X_4 為 $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$,

11、12、13、14、15 及 16 獨立地選自 0-16 ,

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 及 $m7$ 獨立地選自 0-10 ,

$m2$ 及 $m5$ 獨立地選自 0-25 ,

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 及 $n4$ 獨立地選自 0-16 ,

F 為芳基、雜芳基、吡咯啉-2,5-二酮或價鍵，其中芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} 烷基，

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及 R^5 獨立地選自氫、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 C_{1-6} 烷基、芳基或雜芳基；其中烷基、芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ 或 $-OH$ ，

$D1$ 、 $D2$ 、 $E1$ 及 $E2$ 獨立地選自 $-O-$ 、 $-N(R^6)-$ 、 $-N(C(O)R^7)-$ 或價鍵；其中 R^6 及 R^7 獨立地表示氫或 C_{1-6} 烷基，

W_1 至 W_5 獨立地選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s2$ 為 0 或 1，

W_6 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s1}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-NHC(O)C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)NHC_{1-6}$ 烷基或價鍵；其中 $s1$ 為 0 或 1 且 C_{1-6} 烷基視情況經以下基團取代：側氧基、吡咯啉-2,5-二酮、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ 或 $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ；其中 (*) 指示 CH 之碳原子與 X_4 之連接點。

在另一具體實例中，11、12、13、14、15 及 16 獨立地為 0-6。

在另一具體實例中， $m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 及 $m7$ 獨立地為 0-6。

在另一具體實例中， $m2$ 及 $m5$ 獨立地為 0-10。

在另一具體實例中， $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 及 $n4$ 獨立地為 0-10。

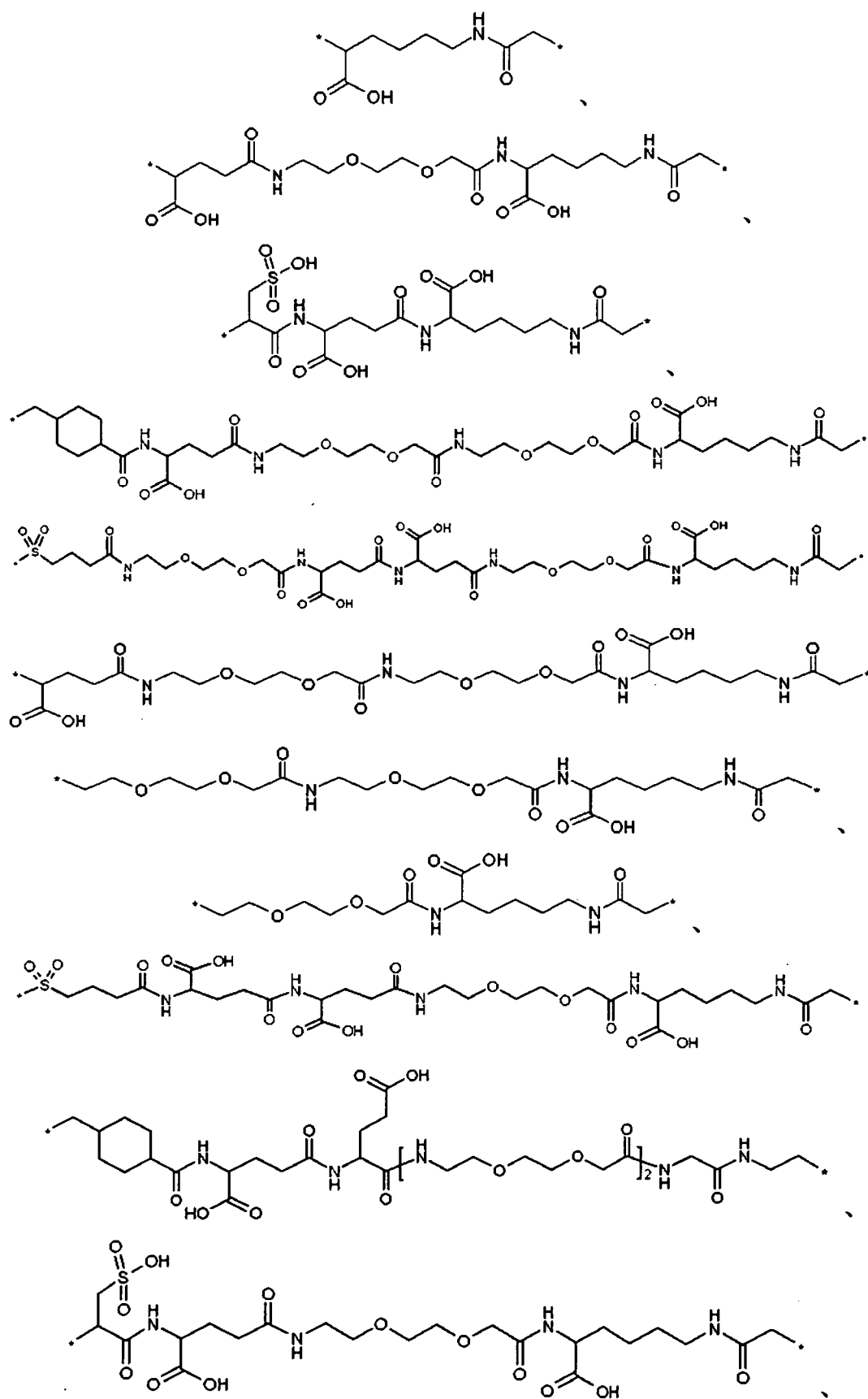
在另一具體實例中， $D1$ 及 $D2$ 獨立地選自 $-O-$ 或 $-N(R^6)-$ 或價鍵。

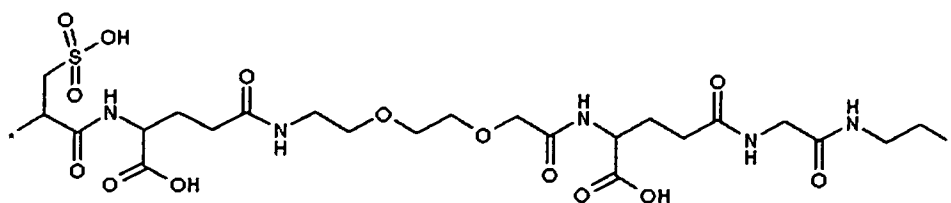
在另一具體實例中， $E1$ 及 $E2$ 獨立地選自 $-O-$ 或 $-N(R^6)-$ 或價鍵。

在另一具體實例中， W_1 至 W_8 獨立地選自由以下組成之群： $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-NHC(O)C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)NHC_{1-6}$ 烷基或價鍵；其中烷基視情況經以下基團取代：側氧基、吡咯啉-2,5-二酮、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ 或

•

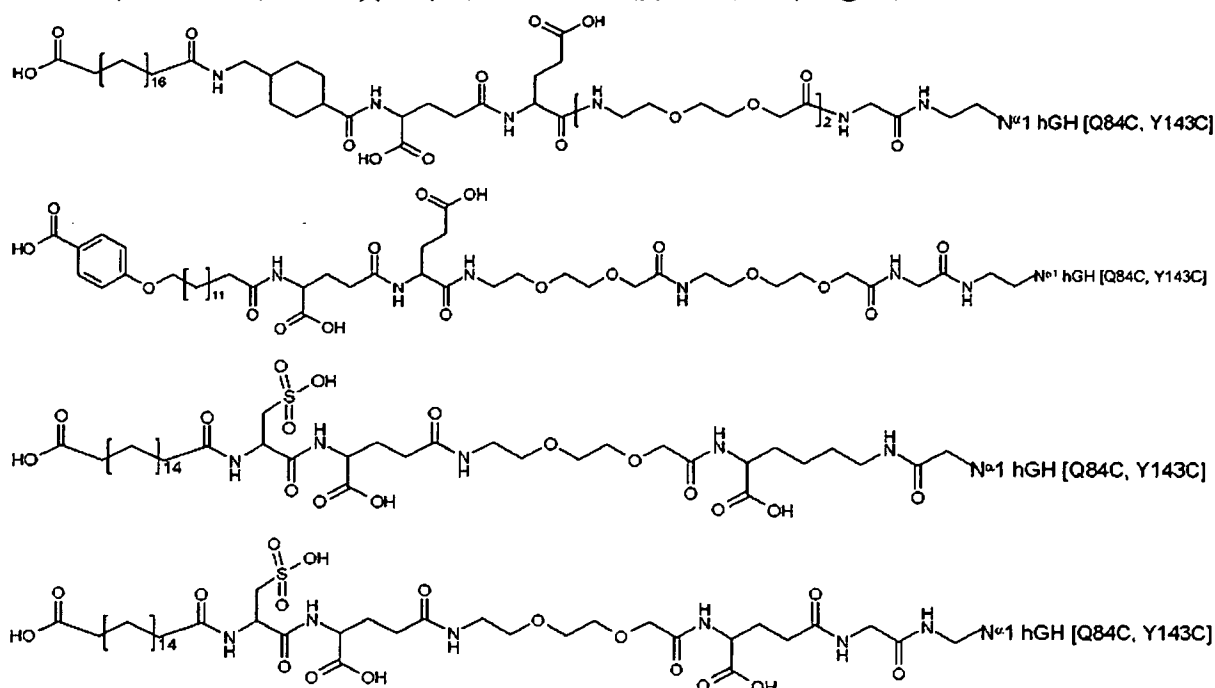






在另一具體實例中，A 經由 B 連接至對應於 SEQ ID NO: 1 中位置 40、位置 141 之位置之麩醯胺酸殘基或生長激素化合物之 N-端殘基。

在另一具體實例中，GH 接合物係選自



在另一態樣中，本發明係關於一種生長激素接合物，其中該生長激素接合物具有式 (I)：

A-W-B-GH (I)

其中

GH 表示具有單一 Cys 突變及額外二硫橋鍵之生長激素化合物，

B 表示連接至該 Cys 突變之硫殘基之親水性間隔基，

W 為連接 A 與 B 之化學基團，及

A 表示白蛋白結合殘基；及
其醫藥學上可接受之鹽。

在另一具體實例中，GH 表示包含與人類生長激素 (hGH) 之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 90% 一致性之胺基酸序列的生長激素化合物。在其他具體實例中，GH 與 hGH (SEQ ID NO: 1) 具有至少 80%，諸如至少 85%，諸如至少 95%，諸如至少 96%，諸如至少 97%，諸如至少 98% 或諸如至少 99% 一致性。在其他具體實例中，該等與 hGH 之一致性與如在本文之檢定 I 中所測定活性為 hGH 生長激素活性之至少 10%，諸如至少 20%，諸如至少 40%，諸如至少 60%，諸如至少 80% 相結合。序列一致性具體實例中之任一者可與活性具體實例中之任一者組合，諸如 GH 與 hGH 具有至少 80% 一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 60%；GH 與 hGH 具有至少 90% 一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 40%；GH 與 hGH 具有至少 95% 一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 80% 等。

在其他具體實例中，接合物之 GH 具有額外二硫鍵及單一 Cys 突變，該單一 Cys 突變選自 GH 之 N-端、H1、H2、L2 或 H3 區域中之單一 Cys 突變中之任一者。在其他此類具體實例中，單一 Cys 突變位於 N-端中，該突變為諸如 T3C、P5C、S7C 中之任一者；或位於 H1 (對應於 AA 9-35) 中，該突變為諸如 D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C 中之任一者；或位於 L1 (對應於 AA 36-71) 中，該突變為諸如 K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、

S57C、P59C、S62C、E65C、Q69C 中之任一者或較佳為 Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C 中之任一者；或位於 H2、L2 或 H3(對應於 AA 72-98、AA 99-106 及 AA 107-127)中，該突變為諸如 hGH(SEQ ID NO: 1)之 E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C 中之任一者；或位於 L3 或 H4(對應於 AA 128-154 及 AA 155-184)中，位於 L3 及 H4(128-154 及 AA 155-184)中，該突變為諸如 E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180C 中之任一者；或位於 C-端中，該突變為諸如 E186C、G187C、G190C 中之任一者。

若在 hGH 變異體中存在單一 Cys 突變，則該突變位於相應胺基酸殘基中。

其他具體實例包括在 GH 中具有額外二硫鍵及單一 cys 突變之 GH 接合物，該單一 cys 突變係選自 hGH(SEQ ID NO: 1)之以下任一者：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C 及 G190C，諸如以下任一者：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、

Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C。

在其他具體實例中，單一 Cys 突變位於 hGH 中之 AA 93-106 中或 hGH 變異體中之相應殘基中。在其他特定具體實例中，單一 Cys 突變位於 L2 中，諸如位於 AA 99-106 或 AA 99-103 或相應殘基中。

在其他具體實例中，額外二硫鍵可為位於環區段與螺旋區段之間或位於環區段內或位於環區段之間或位於螺旋區段之間的額外二硫鍵。

在另一具體實例中，GH 包含單一 cys 突變體及額外二硫鍵，其中至少一個半胱氨酸存在於環區段，諸如胺基酸殘基 128-154 (L3) 之環區段中。

在另一具體實例中，GH 包含單一 cys 突變體及額外二硫鍵，其中該額外二硫鍵連接環區段（諸如胺基酸殘基 128-154 之環區段）與螺旋區段（諸如螺旋 B 或螺旋 2（對應於 AA 72-98））。

在另一具體實例中，接合物之 GH 包含單一 cys 突變體及額外二硫鍵，該額外二硫鍵連接螺旋 2（對應於 AA 72-98）與環 3（對應於 AA 128-154）。

在另一具體實例中，接合物之 GH 包含單一 cys 突變體及位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置之一個胺基酸對之間的額外二硫鍵：R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、

Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 /或 V185C/S188C。

在另一具體實例中，額外二硫橋鍵位於對應於 hGH (SEQ ID NO: 1) 中以下之位置的至少一個胺基酸對之間：

R16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 /或 V185C/S188C。

在另一具體實例中，接合物之 GH 包含單一 cys 突變體及位於對應於 SEQ ID NO: 1 中以下之位置之一個胺基酸對之間的額外二硫鍵：A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、

L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、
F92C/T148C 及 /或 R94C/D107C。

在另一具體實例中，額外二硫鍵位於對應於 SEQ ID NO:
1 中以下之位置的一個胺基酸對之間：D26C/V102C、
D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、
S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、
F92C/T148C 及 /或 R94C/D107C。

在另一具體實例中，額外二硫鍵位於對應於 SEQ ID NO:
1 中以下之位置的一個胺基酸對之間：H21C/M170C、
D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、
S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、
I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、
Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及 /或 S85C/S144C。

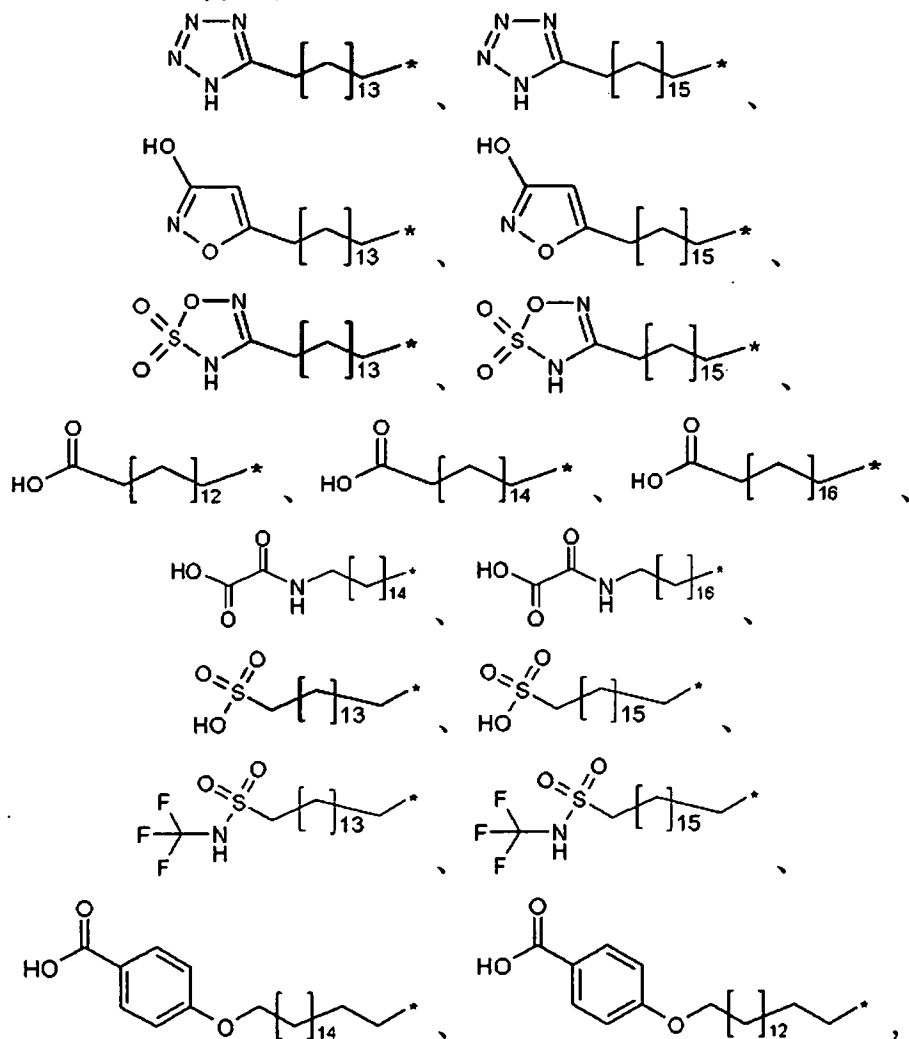
在另一具體實例中，額外二硫鍵位於對應於 SEQ ID NO:
1 中以下之位置的一個胺基酸對之間：S57C/Y143C、
Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及 /或 S85C/S144C。

在另一具體實例中，GH 在 L2 中包含單一半胱胺酸突
變，且包含連接環區段（諸如胺基酸殘基 128-154（H3）之
環區段）與螺旋區段（諸如螺旋 B 或螺旋 2（對應於 AA
72-98））的額外二硫鍵。

在一具體實例中，GH 包含選自以下群組之突變的組
合：A98C/Q84C/Y143C、A98C/S85C/Y143C、
A98C/S85C/S144C、N99C/Q84C/Y143C、
N99C/S85C/Y143C、N99C/S85C/S144C、

S101C/Q84C/Y143C 、 S101C/S85C/Y143C 、
 S101C/S85C/S144C 、 L101C/Q84C/Y143C 、
 L101C/S85C/Y143C 、 L101C/S85C/S144C 、
 C102C/Q84C/Y143C 、 C102C/S85C/Y143C 及
 C102C/S85C/S144C 。

在另一具體實例中，A 係選自



其中*表示經由 W 連接至 B。

在另一具體實例中，W 具有下式：

-W₇-Y-

其中

Y 為 -(CH₂)₁₇-C₃₋₁₀ 環烷基-W₈-或價鍵，

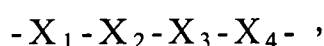
17 為 0-6，

W_7 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s3}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s3$ 為 0 或 1，

W_8 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s4}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s4$ 為 0 或 1。

在其他具體實例中，B 包含一或多個如上文所述之 OEG 及/或 γ -Glu 基元或由其組成。

在另一具體實例中，B 具有下式：



其中

X_1 為 $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ，

X_2 為 $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ，

X_3 為 $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ ，

X_4 為 $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ ，

11、12、13、14、15 及 16 獨立地選自 0-16，

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 及 $m7$ 獨立地選自 0-10，

$m2$ 及 $m5$ 獨立地選自 0-25，

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 及 $n4$ 獨立地選自 0-16，

F 為芳基、雜芳基、吡咯啉-2,5-二酮或價鍵，其中芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 或 C_{1-6} 烷基，

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及 R^5 獨立地選自氫、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、 C_{1-6} 烷基、芳基或雜芳基；其中烷基、芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ 或 $-\text{OH}$ ，

D1 、 D2 、 E1 及 E2 獨立地選自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^6)-$ 、 $-\text{N}(\text{C}(\text{O})\text{R}^7)-$ 或價鍵；其中 R^6 及 R^7 獨立地表示氫或 C_{1-6} 烷基，

W_1 至 W_5 獨立地選自 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{s2}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 或價鍵；其中 $s2$ 為 0 或 1，

W_6 係選自 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{s1}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ 烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHC}_{1-6}$ 烷基或價鍵；其中 $s1$ 為 0 或 1，且 C_{1-6} 烷基視情況經以下基團取代：側氧基、吡咯啉-2,5-二酮、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}^*\text{CH}_2\text{COOH}$ 或 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}^*\text{COOH}$ ；其中 (*) 指示 CH 之碳原子與 X_4 之連接點。

在另一具體實例中，11、12、13、14、15 及 16 獨立地為 0-6。

在另一具體實例中，m1、m3、m4、m6 及 m7 獨立地為 0-6。

在另一具體實例中，m2 及 m5 獨立地為 0-10。

在另一具體實例中，n1、n2、n3 及 n4 獨立地為 0-10。

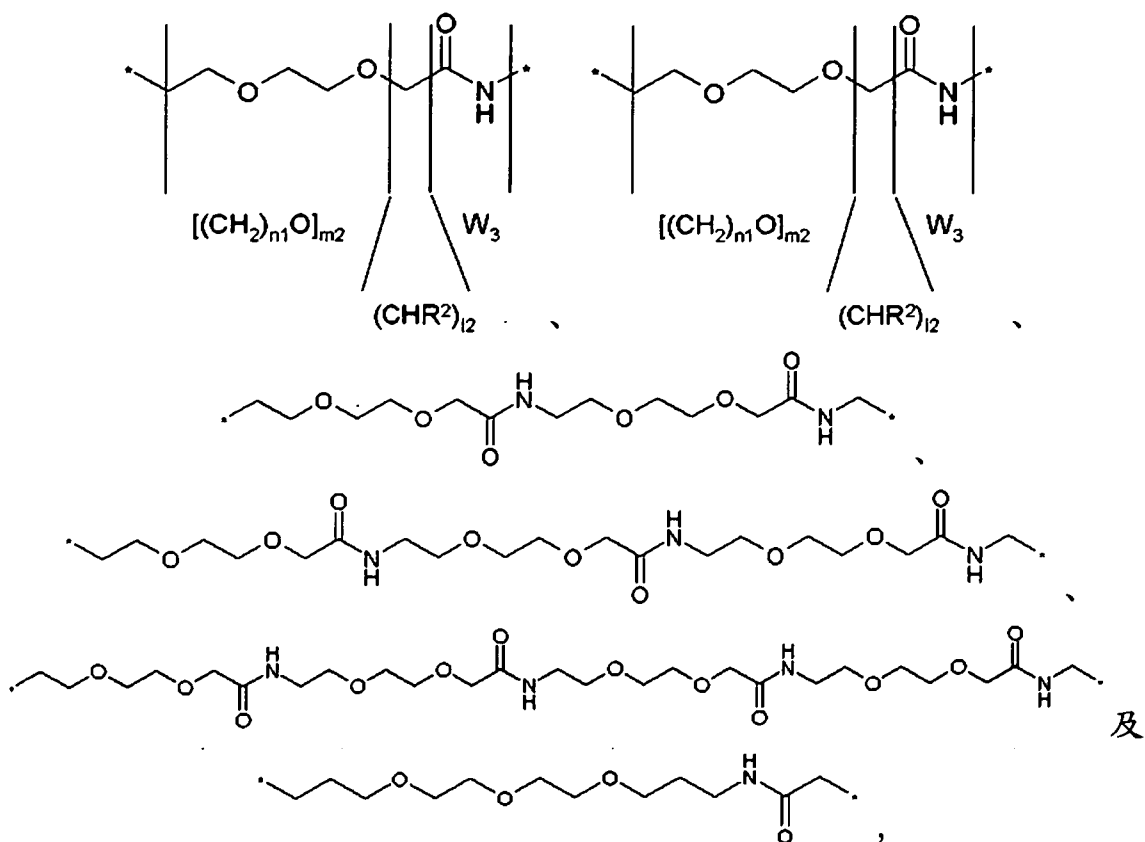
在另一具體實例中，D1 及 D2 獨立地選自 -O- 或 -N(R⁶)- 或價鍵。

在另一具體實例中，E1 及 E2 獨立地選自 -O- 或 -N(R⁶)- 或價鍵。

在另一具體實例中，W₁ 至 W₈ 獨立地選自由以下組成之群：
 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH₂NHC(O)-、
 -C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆ 烷基、
 -C(O)NHC₁₋₆ 烷基或價鍵；其中烷基視情況經以下基團取代：
 側氧基、吡咯啉-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH₂COOH 或
 -NHC(O)CH₂CH*COOH；其中(*)指示 CH 之碳原子與 X₄ 之
 連接點。

在另一具體實例中，R¹、R²、R³、R⁴ 及 R⁵ 獨立地選自
 氫、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆ 烷基；其中 C₁₋₆
 烷基視情況經 -C(O)OH、-C(O)NH₂ 或 -S(O)₂OH 取代。

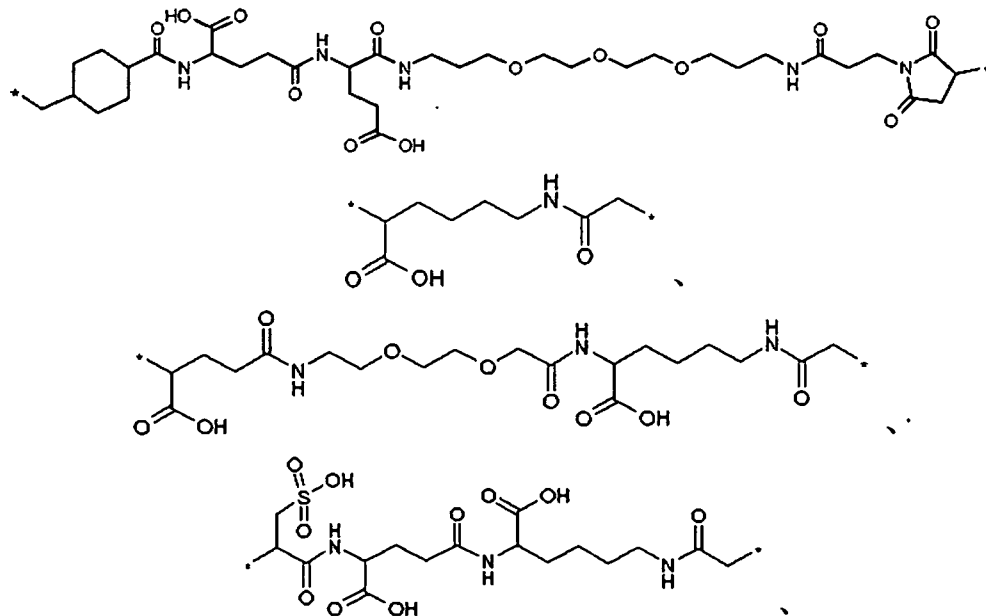
在另一具體實例中，
 -{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{l2}-W₃]_{m3}]_{n2}- 及 -{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-
 [(CHR⁴)_{l4}-W₅]_{m6}]_{n4}- (其中 E1 及 E2 為 -O-) 係選自

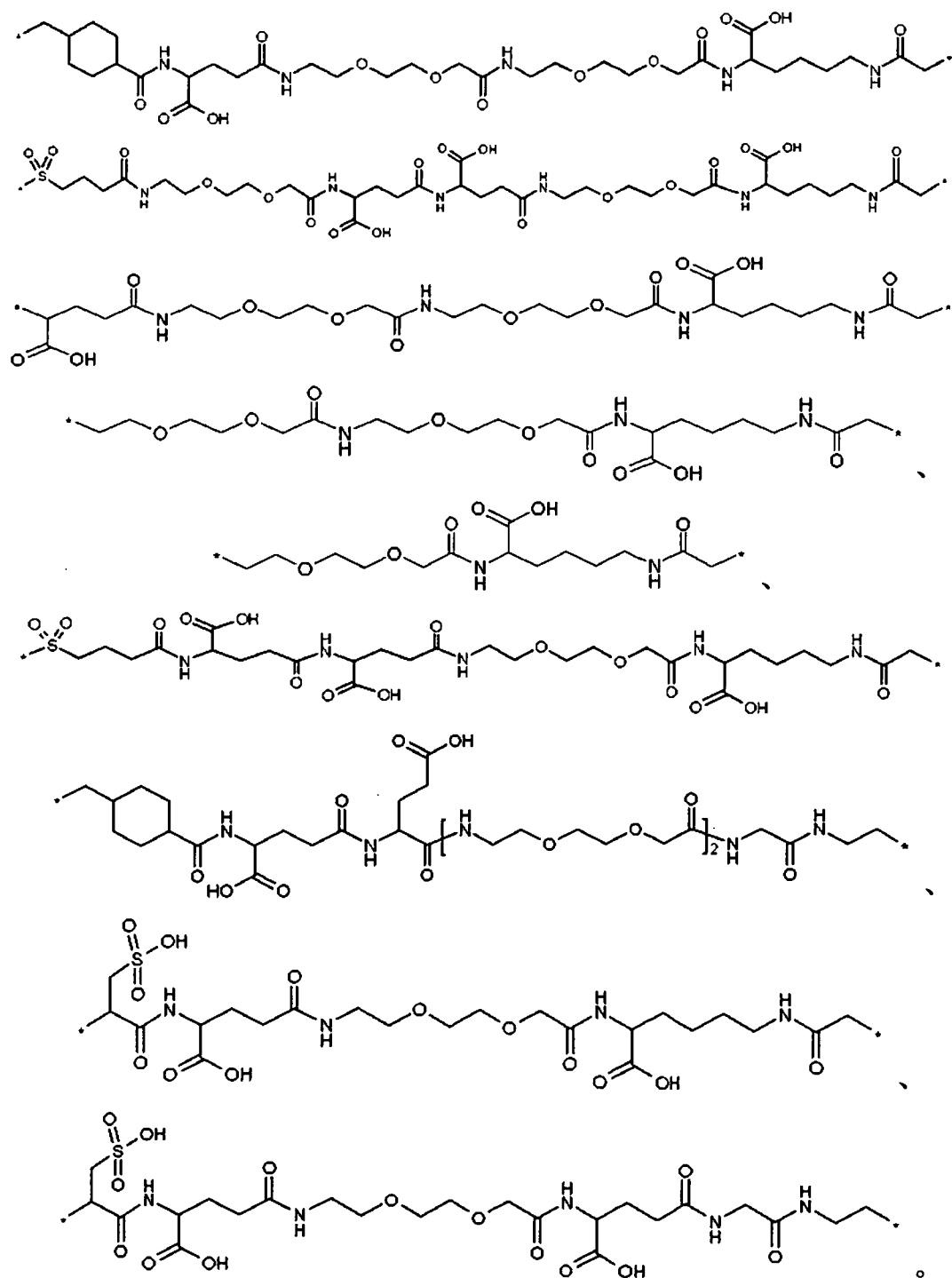


其中*意欲表示連接點，亦即開鍵。

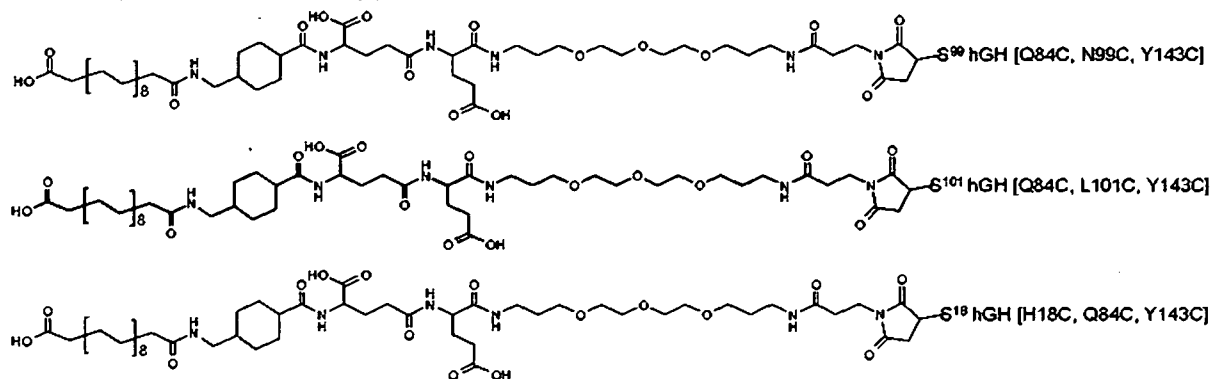
在另一具體實例中， X_4 為價鍵且 W_6 係選自吡咯啉-2,5-二酮、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ 或 $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ，其中(*)指示 CH 之碳原子與 GH 之連接點。

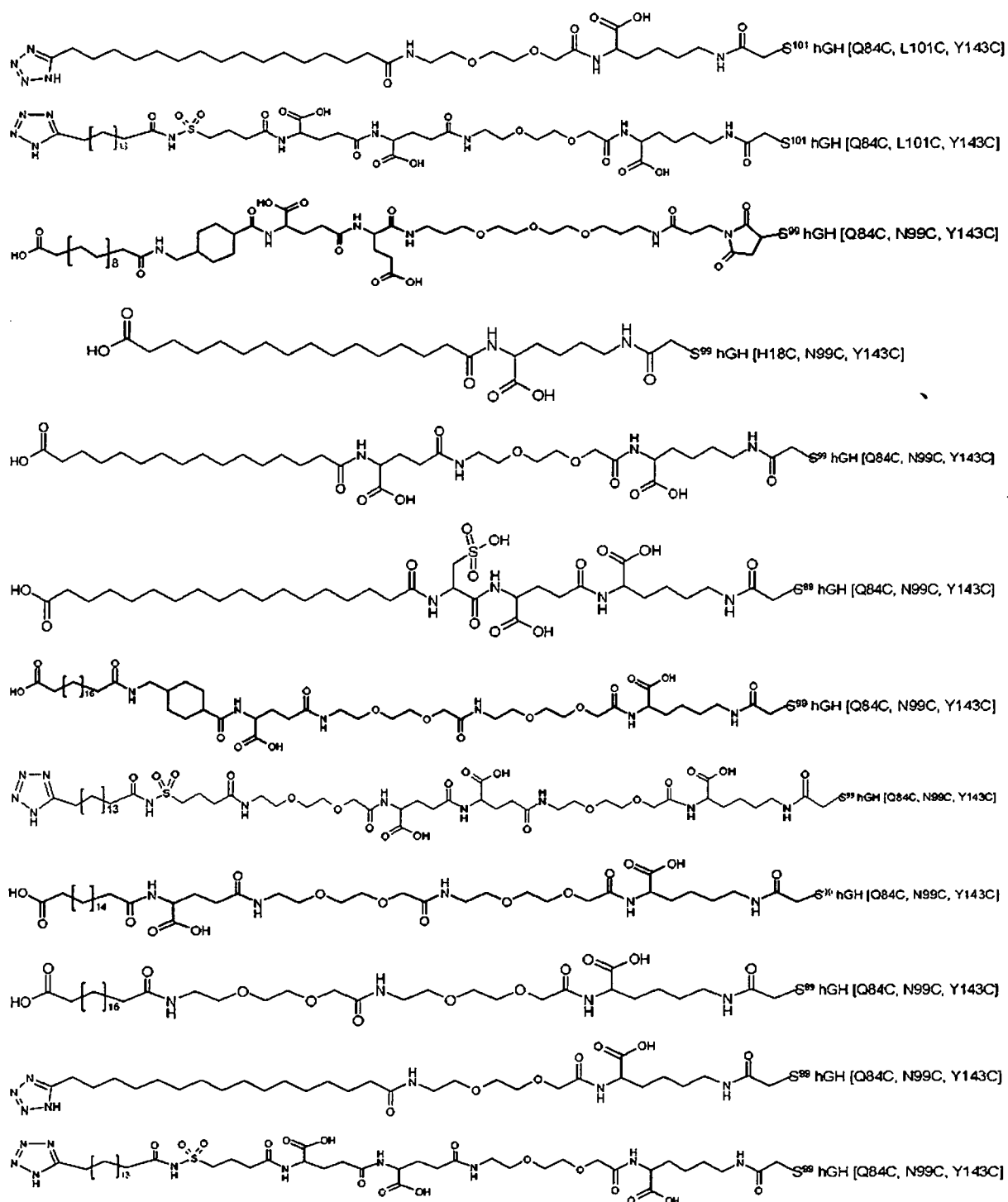
在另一具體實例中，B 係選自





在另一具體實例中，GH 接合物係選自

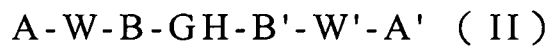




本發明之接合物典型地具有一個白蛋白結合殘基 (A) 經由親水性間隔基 (B) (諸如一個親水性間隔基 (B)) 連接至生長激素化合物 (GH)。

然而，生長激素化合物 (GH) 可經由親水性間隔基連接至兩個白蛋白結合殘基。

因此，在另一態樣中，本發明係關於式 (II) 之生長激素接合物：



其中

GH 表示具有單一 Cys 突變之生長激素化合物，

B 及 B' 獨立地為連接至該 Cys 突變之硫殘基的親水性間隔基，

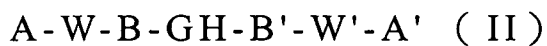
W 為連接 A 與 B 之化學基團，

W' 為連接 A' 與 B' 之化學基團，

A 及 A' 獨立地表示白蛋白結合殘基，及

其醫藥學上可接受之鹽。

此外，在另一態樣中，本發明係關於式 (II) 之生長激素接合物：



其中

GH 表示具有額外二硫橋鍵之生長激素化合物，

B 及 B' 獨立地為親水性間隔基，

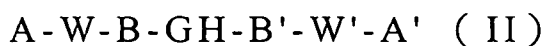
W 為連接 A 與 B 之化學基團，

W' 為連接 A' 與 B' 之化學基團，

A 及 A' 獨立地表示白蛋白結合殘基，及

其醫藥學上可接受之鹽。

在另一態樣中，本發明係關於式 (II) 之生長激素接合物：



其中

GH 表示具有單一 Cys 突變及額外二硫橋鍵之生長激素化合物，

B 及 B'獨立地為連接至該 Cys 突變之硫殘基的親水性間隔基，

W 為連接 A 與 B 之化學基團，

W'為連接 A'與 B'之化學基團，

A 及 A'獨立地表示白蛋白結合殘基，及其醫藥學上可接受之鹽。

在如上文所述之式 (II) 接合物中，W'係選自與 W 相同之群組，A'係選自與 A 相同之群組，且 B'係選自與 B 相同之群組，且應瞭解 W 與 W'、A 與 A'及 B 與 B'獨立地選自如本文所定義之個別群組中之任一者。因此，本文中 W、A 及 B 之任何具體實例亦為 W'、A'及 B'之具體實例。此外，適當時，本文所述之任一具體實例獨立地關於式 (I) 及 (II) 之接合物兩者，以及其廣泛態樣及具體實例。

除非說明一具體實例係關於本發明之某一態樣或某些態樣，否則上述具體實例以及下文將描述之具體實例應視為關於本文所述之任一態樣以及本文所述之任一具體實例。

在一具體實例中，GH 為 hGH 之變異體，其中變異體應理解為藉由用另一天然或非天然胺基酸取代 hGH 序列中之一或多個胺基酸殘基；及/或藉由將一或多個天然或非天然胺基酸添加至 hGH 序列中；及/或藉由使一或多個胺基酸殘

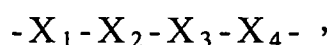
基自 hGH 序列中缺失所獲得之化合物，其中進行任何此等步驟後可視情況進一步對一或多個胺基酸殘基進行衍生化。

在另一具體實例中，GH 表示包含與人類生長激素 (hGH) 之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 90% 一致性之胺基酸序列的生長激素化合物。在其他具體實例中，GH 與 hGH (SEQ ID NO: 1) 具有至少 80%，諸如至少 85%，諸如至少 95%，諸如至少 96%，諸如至少 97%，諸如至少 98% 或諸如至少 99% 一致性。在其他具體實例中，該等與 hGH 之一致性與如在本文之檢定 I 中所測定活性為 hGH 生長激素活性之至少 10%，諸如至少 20%，諸如至少 40%，諸如至少 60%，諸如至少 80% 相結合。序列一致性具體實例中之任一者可與活性具體實例中之任一者組合，諸如 GH 與 hGH 具有至少 80% 一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 60%；GH 與 hGH 具有至少 90% 一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 40%；GH 與 hGH 具有至少 95% 一致性且結合 hGH 之生長激素活性之至少 80% 等。

在另一具體實例中，GH 為 hGH (SEQ ID NO: 1)。

在其他具體實例中，B 包含一或多個如上文所述之 OEG 及/或 γ -Glu 基元或由其組成。

在式 (I) 或 (II) 之接合物的另一具體實例中，親水性間隔基 B 具有下式：



其中

X_1 為 $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

X_2 為 $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

X_3 為 $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$,

X_4 為 $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$,

11、12、13、14、15 及 16 獨立地選自 0-16 ,

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 及 $m7$ 獨立地選自 0-10 ,

$m2$ 及 $m5$ 獨立地選自 0-25 ,

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 及 $n4$ 獨立地選自 0-16 ,

F 為芳基、雜芳基、吡咯啉-2,5-二酮或價鍵，其中芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} 烷基，

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及 R^5 獨立地選自氫、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 C_{1-6} 烷基、芳基或雜芳基；其中烷基、芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ 或 $-OH$ ，

$D1$ 、 $D2$ 、 $E1$ 及 $E2$ 獨立地選自 $-O-$ 、 $-N(R^6)-$ 、 $-N(C(O)R^7)-$ 或價鍵；其中 R^6 及 R^7 獨立地表示氫或 C_{1-6} 烷基，

W_1 至 W_5 獨立地選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s2$ 為 0 或 1，

W_6 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、

-CH₂NHC(O)- 、 -C(O)NHS(O)₂- 、 -S(O)₂NHC(O)- 、
 -OC(O)NH- 、 -NHC(O)O- 、 -C(O)CH₂- 、 -CH₂C(O)- 、
 -C(O)CH=CH- 、 -CH=CHC(O)- 、 -(CH₂)_{s1}- 、 -C(O)- 、 -C(O)O- 、
 -OC(O)- 、 -NHC(O)C₁₋₆ 烷基 、 -C(O)NHC₁₋₆ 烷基 或 價鍵 ； 其
 中 s1 為 0 或 1 且 烷基 視 情況 經 以下 基團 取代 ； 側 氧基 、 吡
 咯 啉 -2,5- 二 酮 、 -NHC(O)CH*CH₂COOH 或
 -NHC(O)CH₂CH*COOH ； 其中 (*) 指示 CH 之 碳 原子 與 X₄ 之
 連 接 點 。

在 另一 具體 實例 中 ， W₁ 係 選 自 -C(O)NH- 、 -NHC(O)- 、
 -C(O)NHCH₂- 、 -CH₂NHC(O)- 、 -C(O)NHS(O)₂- 、
 -S(O)₂NHC(O)- 或 價鍵 。 W₁ 典型 地 選 自 -C(O)NH- 、 -NHC(O)-
 或 -C(O)NHS(O)₂- 。

在 另一 具體 實例 中 ， W₂ 係 選 自 -C(O)NH- 、 -NHC(O)- 、
 -C(O)NHCH₂- 、 -CH₂NHC(O)- 、 -C(O)NHS(O)₂- 、
 -S(O)₂NHC(O)- 或 價鍵 。 W₂ 典型 地 選 自 -C(O)NH- 、 -NHC(O)-
 或 -C(O)NHS(O)₂- 。

在 另一 具體 實例 中 ， W₃ 係 選 自 -C(O)NH- 、 -NHC(O)- 、
 -C(O)NHCH₂- 、 -CH₂NHC(O)- 、 -C(O)NHS(O)₂- 、
 -S(O)₂NHC(O)- 或 價鍵 。 W₃ 典型 地 選 自 -C(O)NH- 、 -NHC(O)-
 或 -C(O)NHS(O)₂- 。

在 另一 具體 實例 中 ， W₄ 係 選 自 -C(O)NH- 、 -NHC(O)- 、
 -C(O)NHCH₂- 、 -CH₂NHC(O)- 、 -C(O)NHS(O)₂- 、
 -S(O)₂NHC(O)- 或 價鍵 。 W₄ 典型 地 選 自 -C(O)NH- 、 -NHC(O)-
 或 -C(O)NHS(O)₂- 。

在另一具體實例中， W_5 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 或價鍵。 W_5 典型地選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 或 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。

在另一具體實例中， W_6 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-NHC(O)C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)NHC_{1-6}$ 烷基或價鍵；其中烷基視情況經以下基團取代：吡咯啉-2,5-二酮、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ 或 $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ；其中(*)指示 CH 之碳原子與 X_4 之連接點。 W_6 典型地選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 或 $-NHC(O)C_{1-6}$ 烷基。

在另一具體實例中， $D1$ 、 $D2$ 、 F 皆為價鍵， 16 為 0 ，且 W_6 係選自吡咯啉-2,5-二酮、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ 或 $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ，其中(*)指示 CH 之碳原子與 GH 之連接點。

在另一具體實例中， R^1 係選自氫、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代： $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 。 R^1 典型地選自 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 C_{1-6} 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代： $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 $-S(O)_2OH$ 。

在另一具體實例中， R^2 係選自氫、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代： $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 。 R^2 典型地選自 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 C_{1-6} 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代：

-C(O)OH、-C(O)NH₂ 或 -S(O)₂OH。

在另一具體實例中，R³ 係選自氫、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆ 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代：-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH。R³ 典型地選自 -C(O)OH、-C(O)NH₂ 或 C₁₋₆ 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代：-C(O)OH、-C(O)NH₂ 或 -S(O)₂OH。

在另一具體實例中，R⁴ 係選自氫、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆ 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代：-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH。R⁴ 典型地選自 -C(O)OH、-C(O)NH₂ 或 C₁₋₆ 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代：-C(O)OH、-C(O)NH₂ 或 -S(O)₂OH。

在另一具體實例中，R⁵ 係選自氫、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆ 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代：-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH。R⁵ 典型地選自 -C(O)OH、-C(O)NH₂ 或 C₁₋₆ 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代：-C(O)OH、-C(O)NH₂ 或 -S(O)₂OH。

在另一具體實例中，E1 係選自 -O- 或 -N(R⁶)- 或價鍵。E1 典型地選自 -O-。

在另一具體實例中，E2 係選自 -O- 或 -N(R⁶)- 或價鍵。E2 典型地選自 -O-。

在另一具體實例中，E1 及 E2 皆為 -O-。

在另一具體實例中，E1 及 E2 皆為 -N(R⁶)-。

在另一具體實例中，F 為苯基、吡咯啉-2,5-二酮或價鍵。

在另一具體實例中，D1 係選自 -O- 或 -N(R⁶)- 或價鍵。

D1 典型地選自 $-N(R^6)-$ 。

在另一具體實例中，D2 係選自 $-O-$ 或 $-N(R^6)-$ 或價鍵。

D1 典型地選自 $-N(R^6)-$ 。

在另一具體實例中，11 為 0-6，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中，12 為 0-6，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中，13 為 0-6，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中，14 為 0-6，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。在另一具體實例中，15 為 0-6，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中，16 為 0-6，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中，m1 為 0-6，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中，m2 為 0-10，諸如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在另一具體實例中，m3 為 0-5，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中，m4 為 0-5，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中，m5 為 0-10，諸如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

在另一具體實例中， m_6 為 0-5，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中， m_7 為 0-5，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

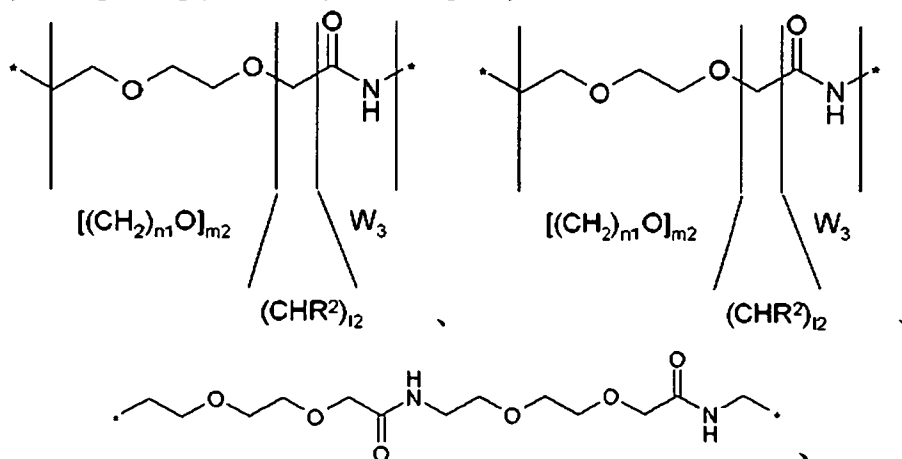
在另一具體實例中， n_1 為 0-10，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

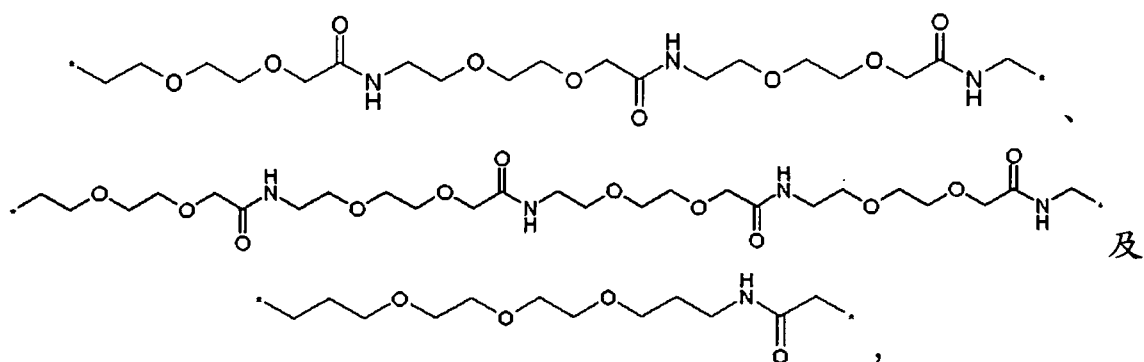
在另一具體實例中， n_2 為 0-10，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中， n_3 為 0-10，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中， n_4 為 0-10，諸如 0、1、2、3、4、5 或 6。

在另一具體實例中， X_1 為 $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 且 X_2 為 $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ，其中 $-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 及 $-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 係選自





其中*意欲表示連接點，亦即開鍵。

在另一具體實例中，該親水性間隔基之莫耳重量處於 80 道爾頓 (Dalton, D) 至 1500 D 之範圍內或處於 300 D 至 1100 D 之範圍內。

在另一具體實例中，W 具有下式：

-W₇-Y-

其中

Y 為 -(CH₂)₁₇-C₃₋₁₀ 環烷基-W₈-或價鍵，

17 為 0-6，

W₇ 係選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或價鍵；其中 s₃ 為 0 或 1，

W₈ 係選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或價鍵；其中 s₄ 為 0 或 1。

在 W 之一具體實例中，Y 為 $-(CH_2)_{17}$ -環己基- W_8 -。

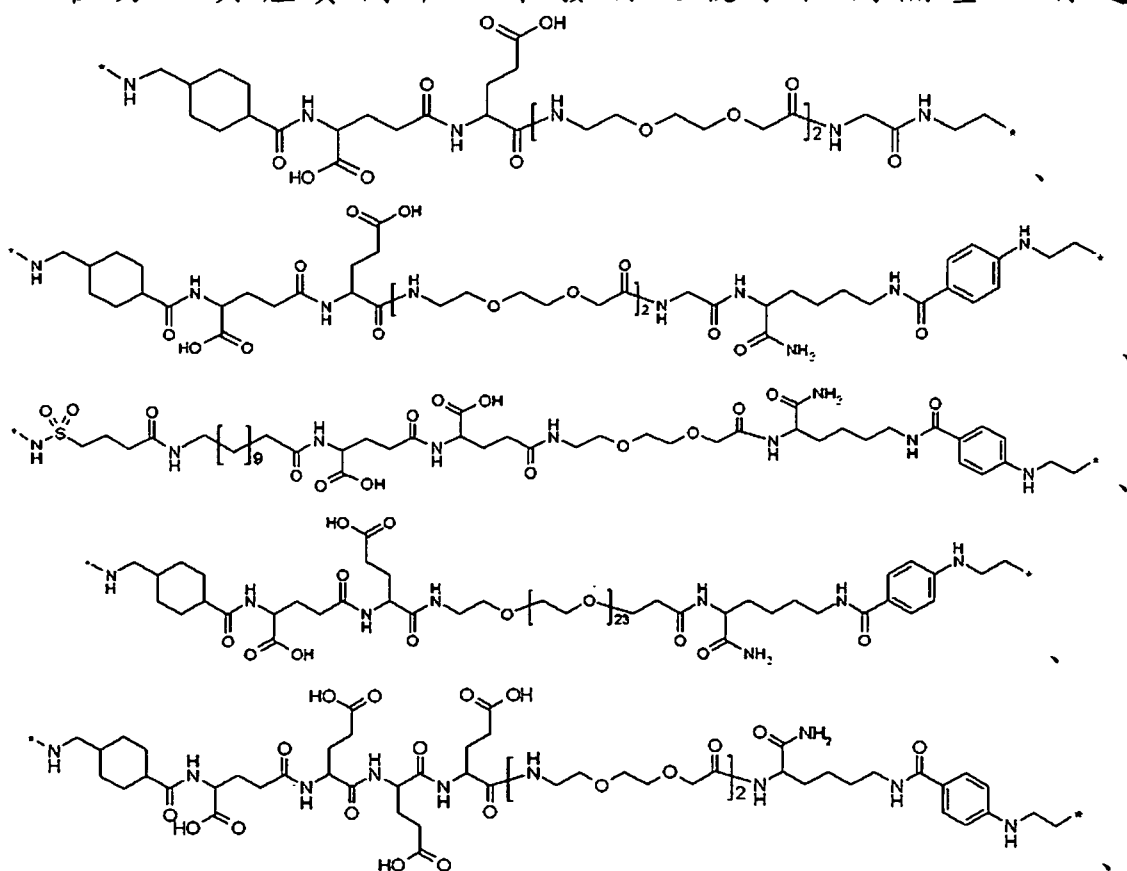
在另一具體實例中，Y 為價鍵。

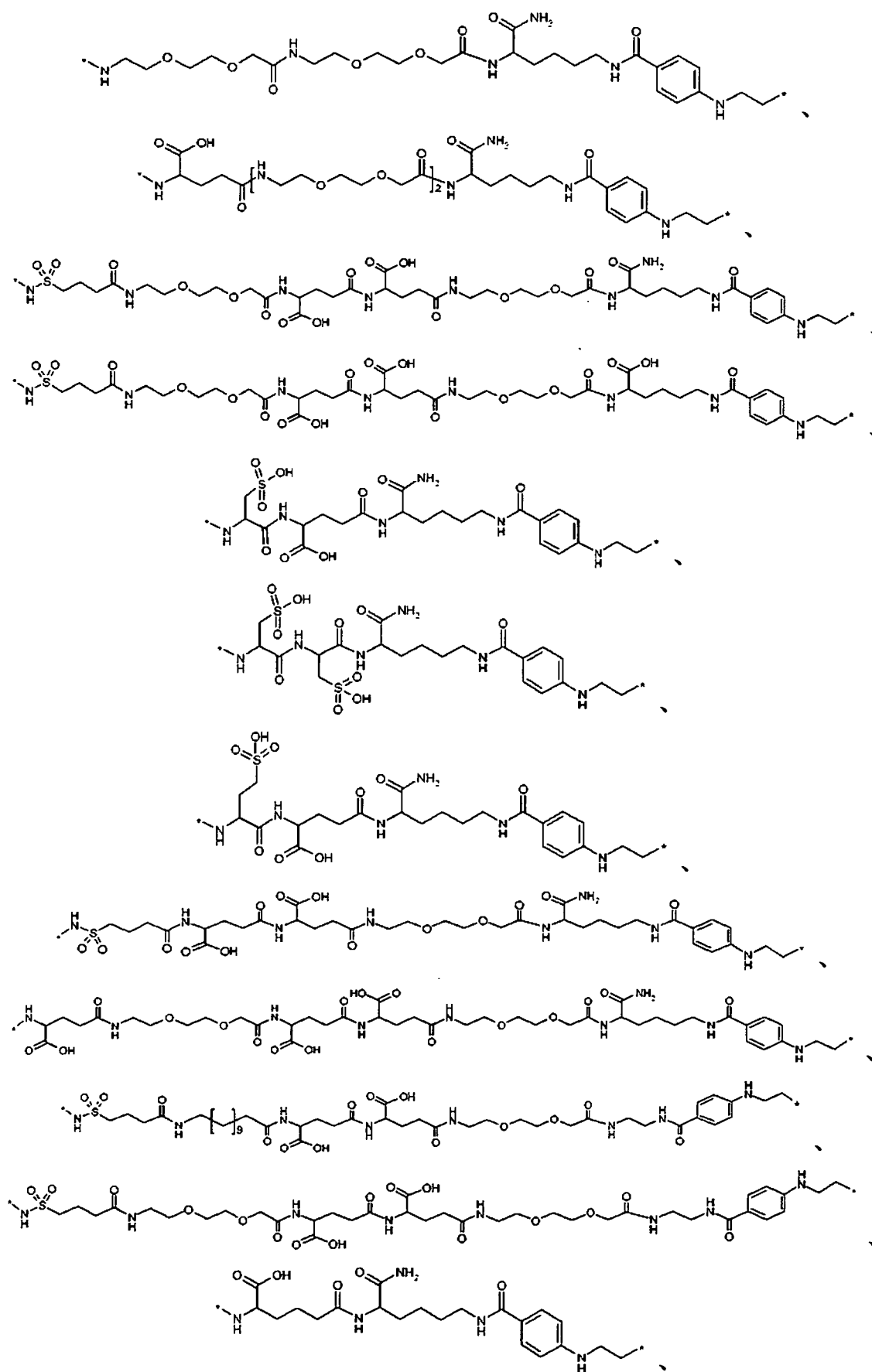
在一具體實例中， W_7 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 或價鍵。 W_7 典型地選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 或 $-C(O)NHS(O)_2$ 。

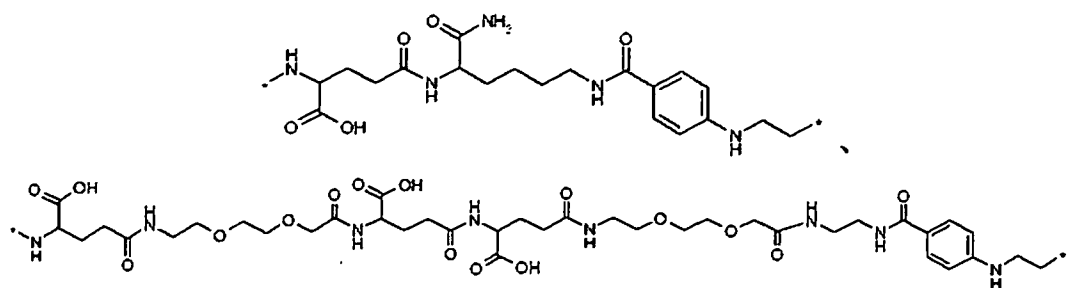
在另一具體實例中， W_8 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 或價鍵。 W_8 典型地選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 或 $-C(O)NHS(O)_2$ 。

在另一具體實例中，17 為 0 或 1。

在另一具體實例中，本發明之親水性間隔基 B 係選自







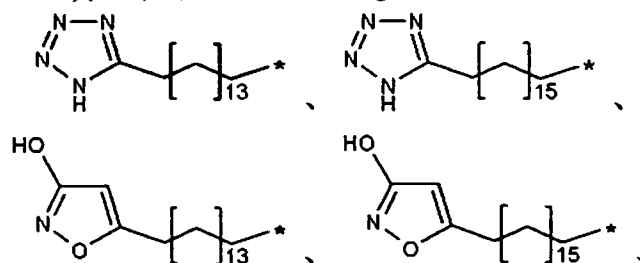
其中*意欲表示連接點，亦即開鍵。

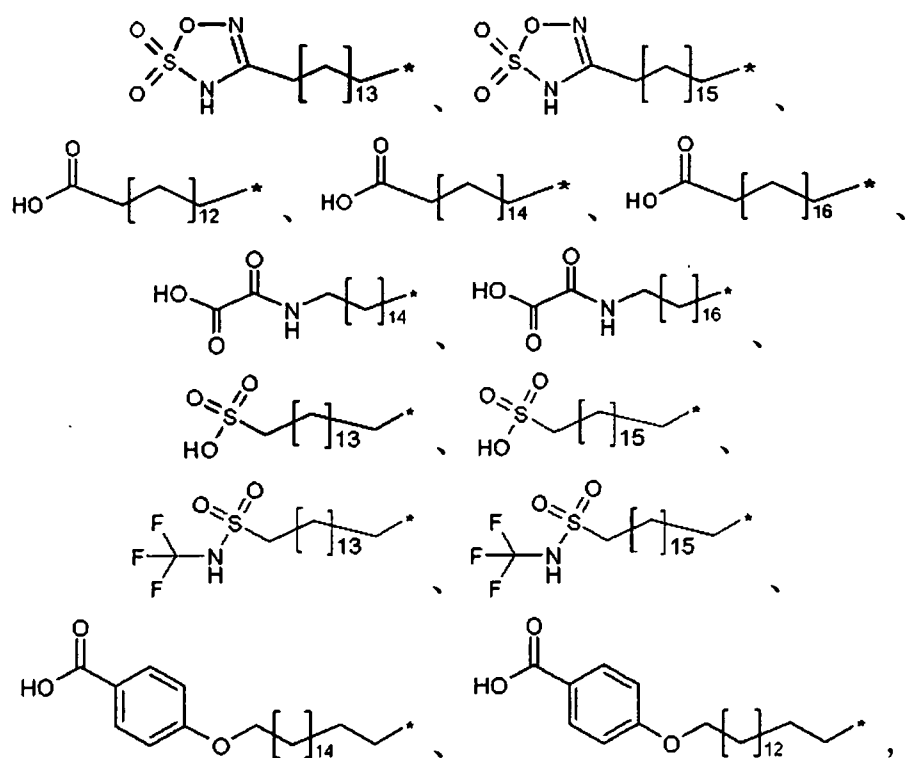
連接至本發明之生長激素化合物之白蛋白結合殘基(上述式(I)或(II)中之取代基A)為非共價結合白蛋白之親脂性殘基。白蛋白結合殘基典型地在生理pH值下帶負電，且對人類血清白蛋白具有低於約10 μM 或甚至低於約1 μM 之結合親和力。

在本發明之生長激素化合物之另一具體實例中，白蛋白結合殘基係選自直鏈烷基、分支鏈烷基、具有 ω -羧酸基團或 ω -羧酸同電子排列體(isoster)之基團。白蛋白結合殘基典型地具有6至40個碳原子。在另一具體實例中，白蛋白結合殘基具有8至26個碳原子。在另一具體實例中，白蛋白結合殘基具有8至20個碳原子。

在另一具體實例中，A具有14至26個碳原子且包含 ω -羧酸基團。在另一具體實例中，A具有14至26個碳原子且包含 ω -羧酸同電子排列體(諸如四唑)。

在另一具體實例中，A係選自





其中*表示經由 W 連接至 B。

親水性間隔基 (B) 較佳以選擇性方式引入生長激素化合物 (GH) 之位置以便能夠控制應將一個抑或兩個白蛋白結合殘基 (A) 併入生長激素化合物中。親水性間隔基 (B) 可連接至 GH 化合物之胺基酸側鏈。該等胺基酸側鏈可為 GH 化合物之經化學修飾之胺基酸側鏈。另一此類胺基酸側鏈可為 GH 化合物之經酶催化地修飾之胺基酸側鏈。較佳地，使用轉麩醯胺酸酶將親水性間隔基引入對應於 SEQ ID NO: 1 中位置 40 或位置 141 之位置的麩醯胺酸殘基中。另一選擇性引入親水性間隔基之方式為引入生長激素化合物 (諸如 hGH (SEQ ID NO: 1)) 之 N-端殘基中。

在式 (I) 之生長激素接合物中，片段 A-W-B 可為線性或分支片段。在一具體實例中，A-W-B 不為線性肽。

在另一具體實例中，白蛋白結合殘基經由親水性間隔

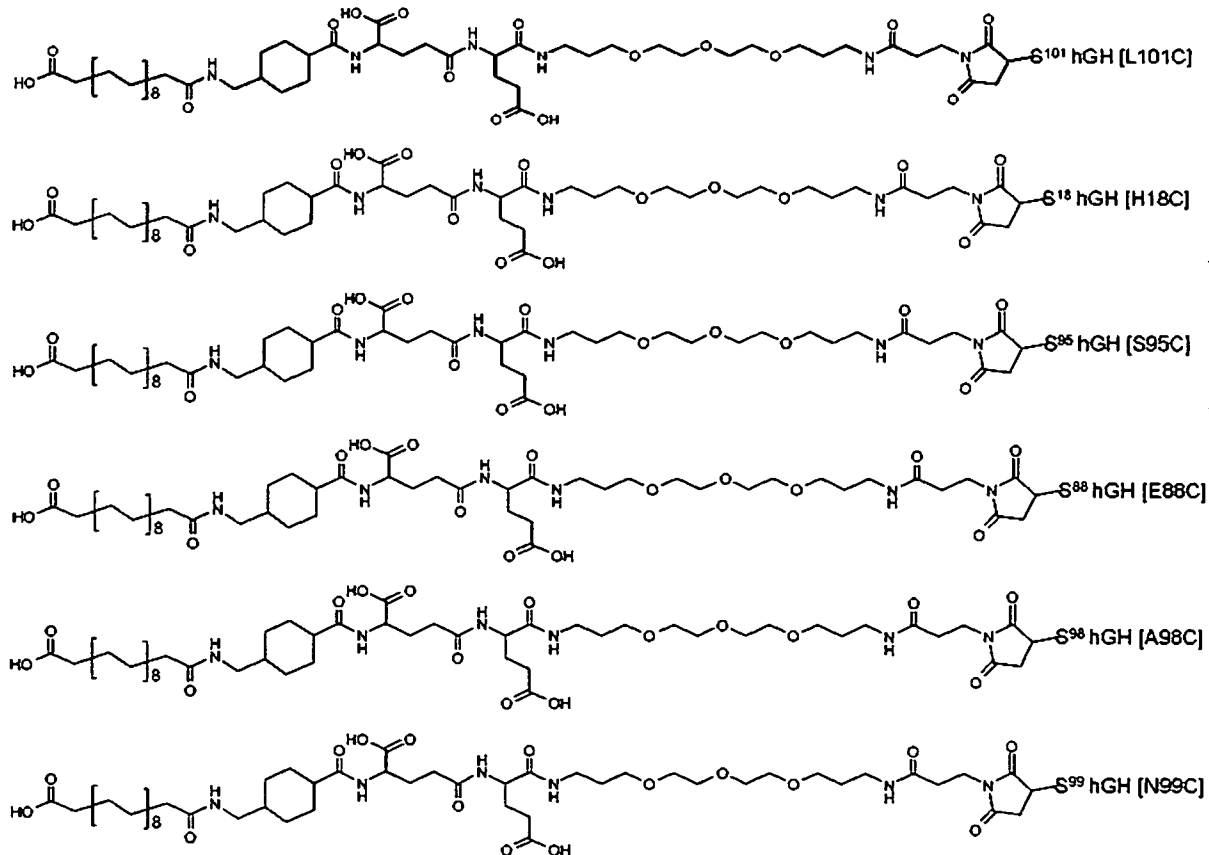
基連接至對應於 SEQ ID NO: 1 中位置 40 之位置之麩醯胺酸殘基。

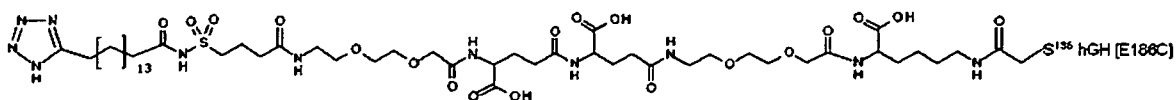
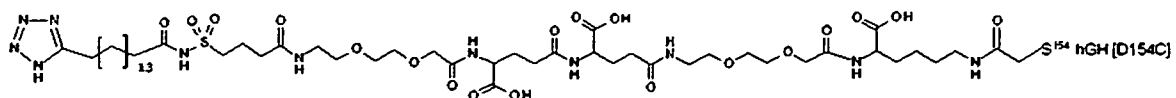
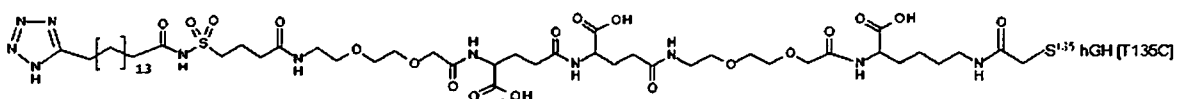
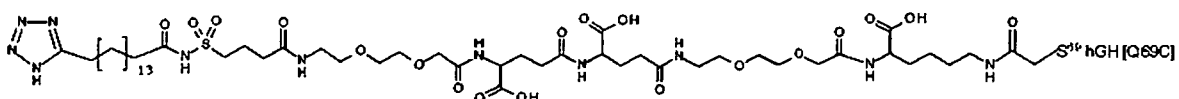
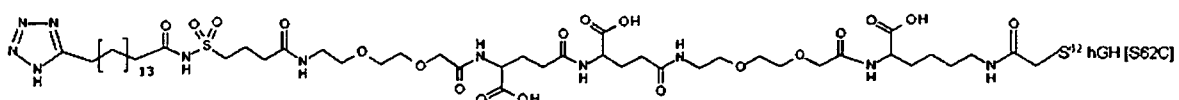
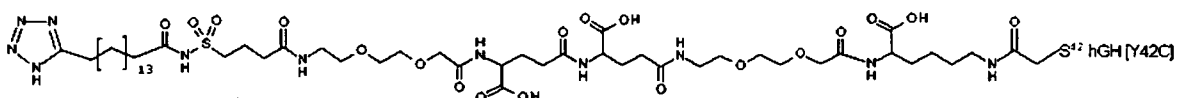
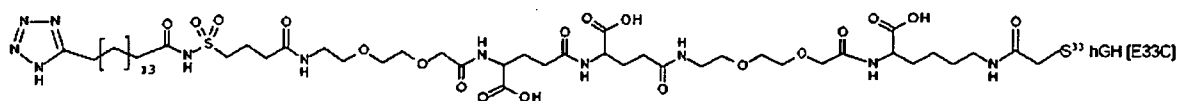
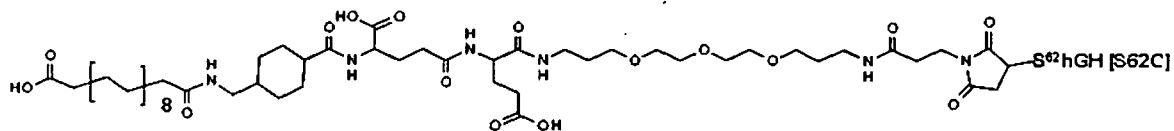
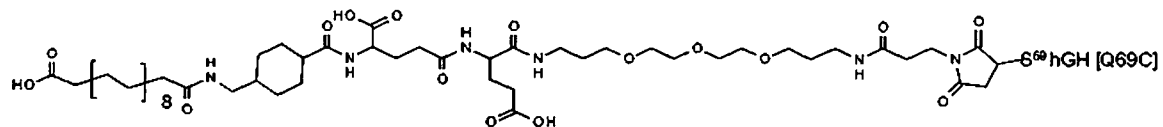
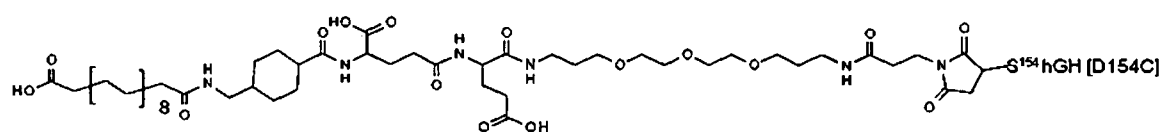
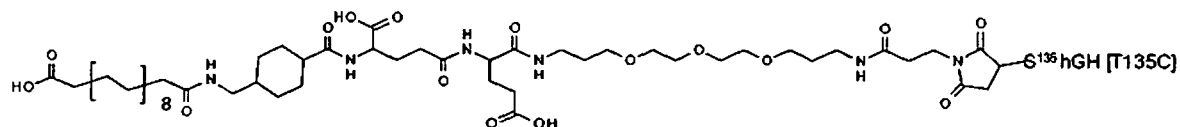
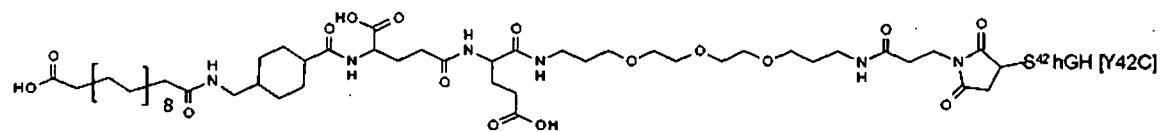
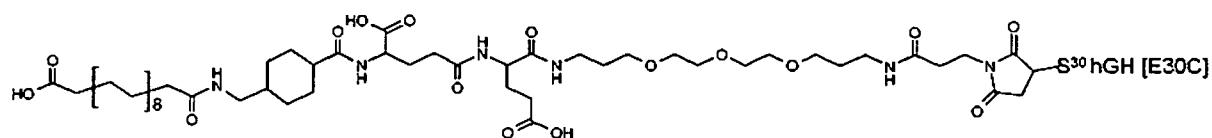
在另一具體實例中，白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至對應於 SEQ ID NO: 1 中位置 141 之位置的麩醯胺酸殘基。

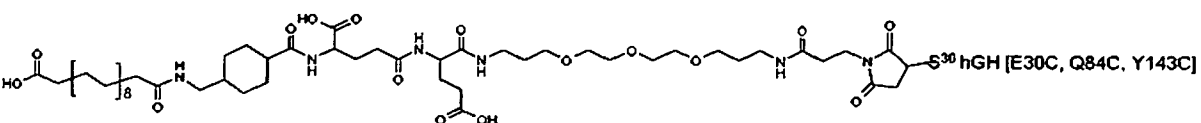
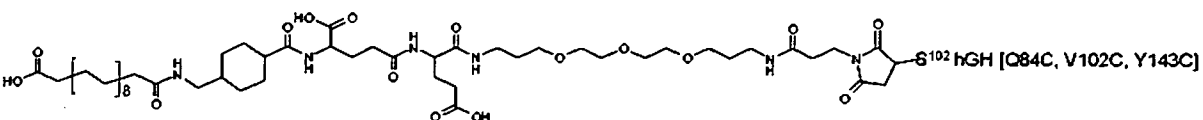
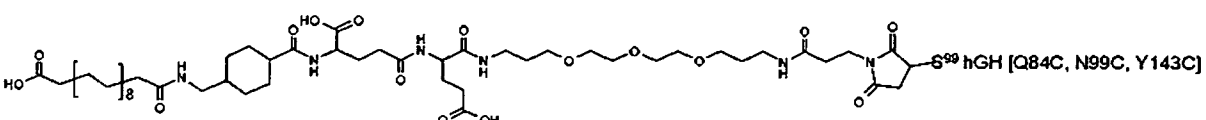
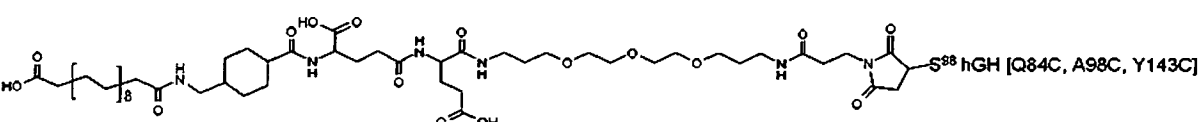
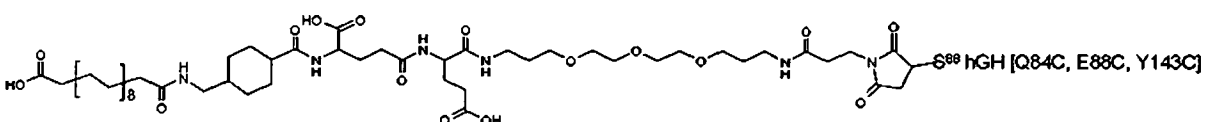
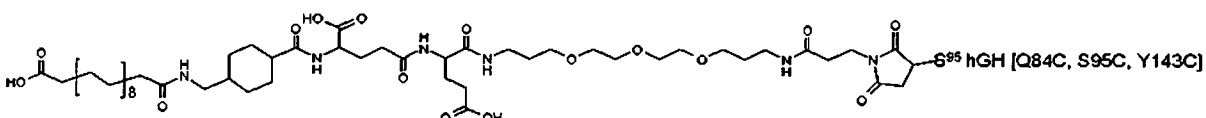
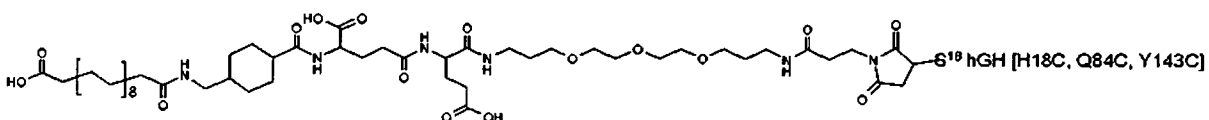
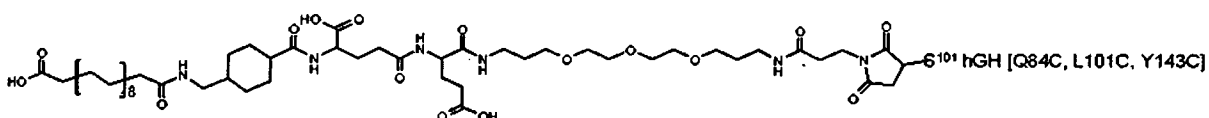
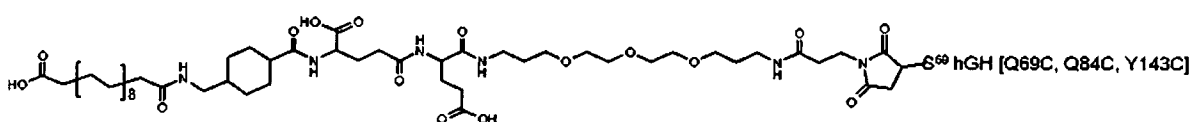
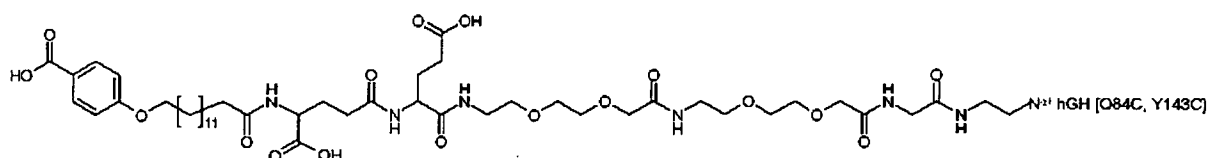
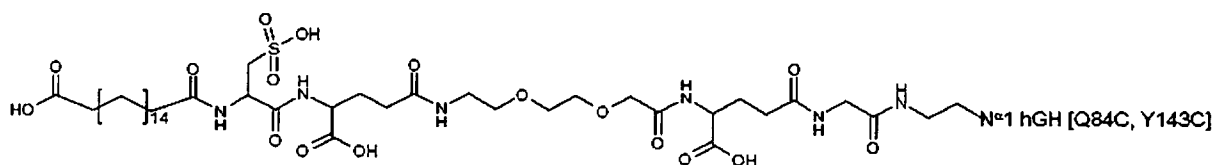
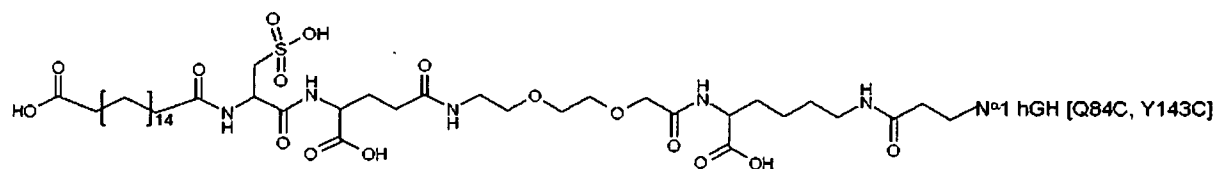
在另一具體實例中，白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至生長激素化合物（諸如 hGH (SEQ ID NO: 1)）之 N-端殘基。

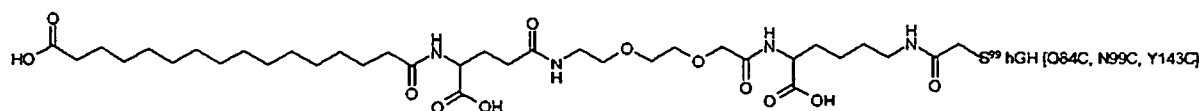
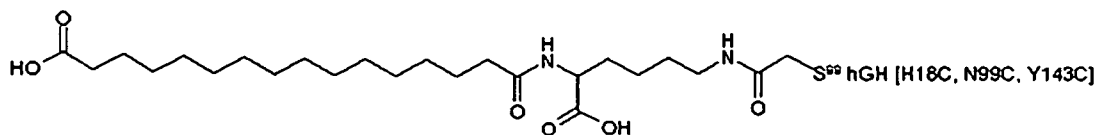
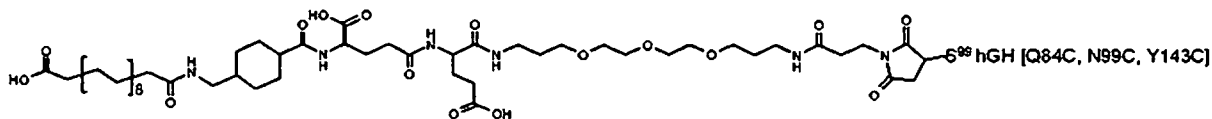
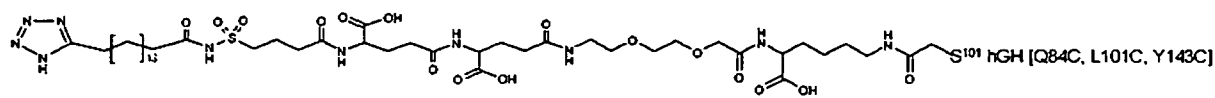
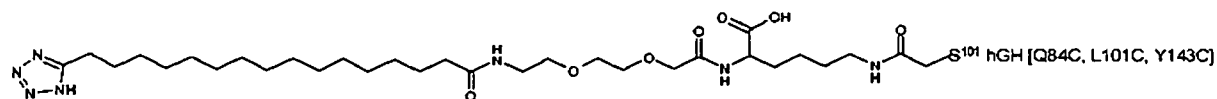
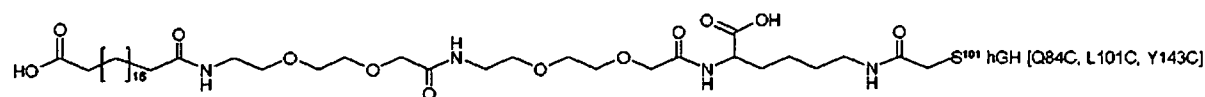
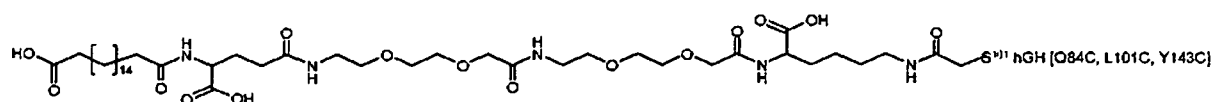
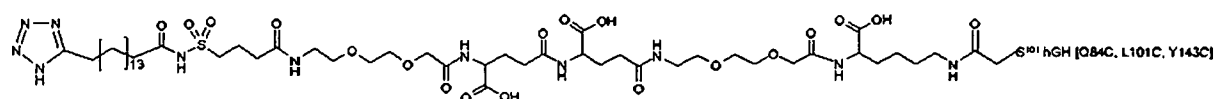
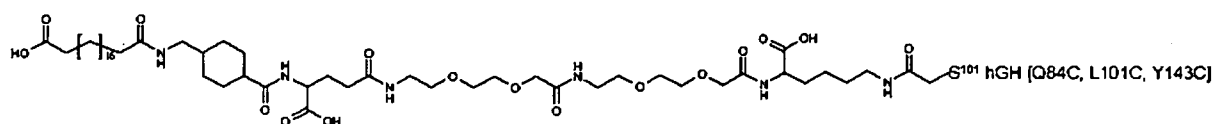
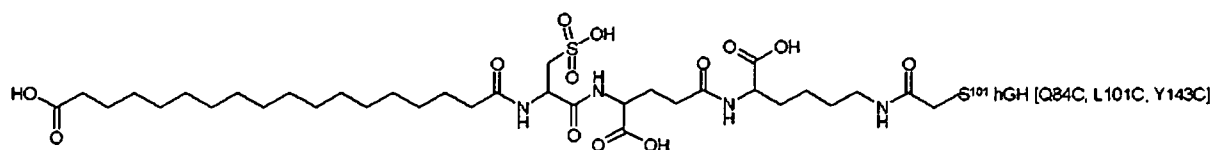
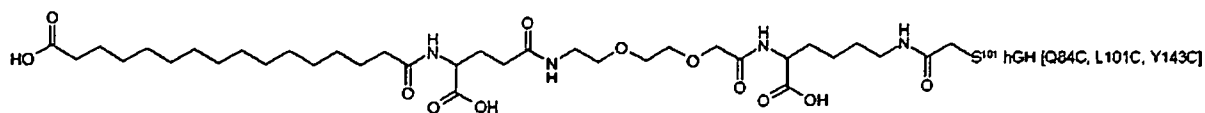
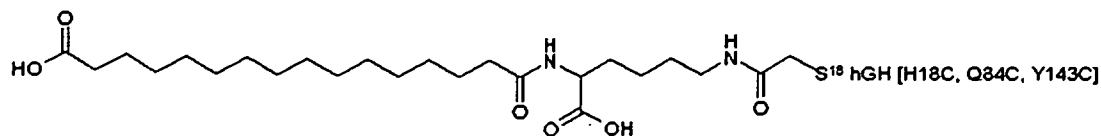
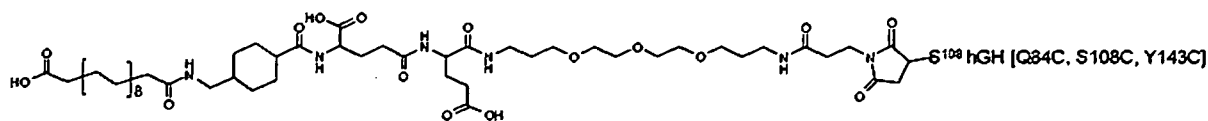
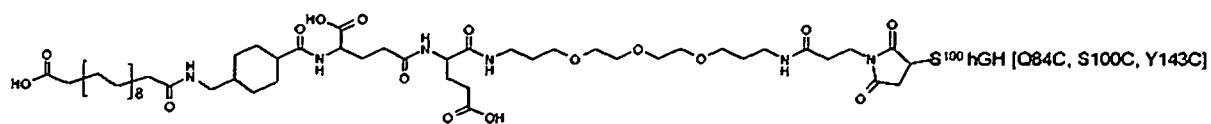
在另一具體實例中，白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至生長激素化合物（諸如 hGH (SEQ ID NO: 1)）中對應於位置 40、位置 141 之位置之麩醯胺酸殘基及 N-端殘基。

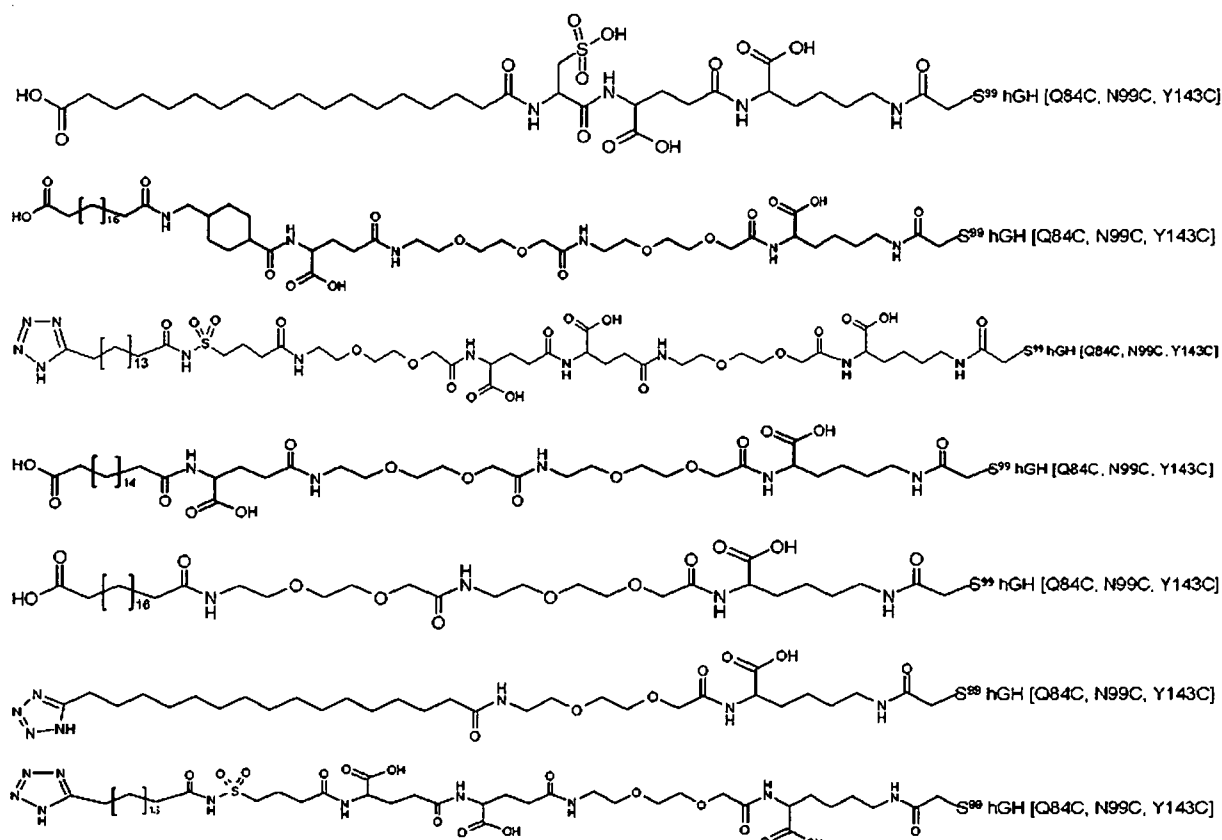
本發明之生長激素接合物係選自











在另一態樣中，本發明係關於生長激素變異體，諸如本文所述之生長激素化合物（GH）。生長激素變異體可適用作治療劑或適用作製備生長激素接合物之中間物。生長激素化合物可藉由此項技術中已知或如本文所述之重組方法製備。在一具體實例中，生長激素變異體可溶。

在另一態樣中，本發明係關於包含如本文所述之生長激素變異體的組成物。

在一具體實例中，該組成物包含生長激素變異體，該生長激素變異體包含選自以下群組之單一 cys 突變：P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C。

在本發明之一具體實例中，組成物之生長激素變異體

在生長激素化合物之 N-端 (AA 1-8)、螺旋 1、環 1、螺旋 2、環 2 或螺旋 3 中具有單一 Cys 突變。

在一具體實例中，單一 Cys 突變位於 N-端中，該突變為諸如 P5C、S7C 中之任一者。在一具體實例中，單一 Cys 突變位於 H1 (對應於 AA 9-35) 中，諸如 D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C 中之任一者。在一具體實例中，單一 Cys 突變位於 L1 (對應於 AA 36-71) 中，該突變為諸如 K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、S57C、P59C、S62C、E65C、Q69C 中之任一者，或較佳為 Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C 中之任一者。在一具體實例中，單一 Cys 突變位於 H2 (AA 72-98) 中，諸如 E88C、Q91C、S95C 及 A98C 中之任一者。在一具體實例中，單一 Cys 突變位於 AA 99-127 中。在一具體實例中，單一 Cys 突變位於 L2 (AA 99-106) 中，諸如 N99C、S100C、L101C、V102C 及 Y103C 中之任一者。在一具體實例中，單一 Cys 突變位於 H3 (AA 107-127) 中，該突變為諸如 hGH (SEQ ID NO: 1) 之 D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C 中之任一者；或位於 L3 或 H4 (對應於 AA 128-154 及 AA 155-184) 中，該突變為諸如 E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180C 中之任一者；或位於 C-端中，該突變為諸如 E186C、G187C 及 G190C 中之任一者。若在 hGH 變異體中存在單一 Cys 突變，則該突變位於相應胺基酸殘基中。在其他具體實例中，單一 Cys 突變位於 hGH 中之 AA 93-106

中或 hGH 變異體中之相應殘基中。在其他特定具體實例中，單一 Cys 突變位於 L2 中，諸如位於 AA 99-106 或 AA 99-104 或相應殘基中。

在一具體實例中，本發明組成物包含生長激素變異體，該生長激素變異體包含單一 cys 突變及額外二硫鍵。在一具體實例中，單一 cys 突變為上述單一 cys 突變中之任一者。在一具體實例中，GH 中之單一 cys 突變係選自 hGH(SEQ ID NO: 1) 之以下任一者：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C 及 G190C，諸如以下任一者：P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C，或相應殘基。在一具體實例中，額外二硫鍵係選自半胱胺酸突變對之以下群組：R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、

L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、
L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、
P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、
V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或
V185C/S188C。在一具體實例中，生長激素變異體包含單一半
胱氨酸及額外二硫鍵，該額外二硫鍵係選自以下半胱氨酸
突變對：S57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及 / 或
S85C/S144C。

在一具體實例中，生長激素變異體在 L2 中包含單一半
胱氨酸突變，且包含連接環區段（諸如胺基酸殘基 128-154
（H3）之環區段）與螺旋區段（諸如螺旋 B 或螺旋 2（對應
於 AA 72-98））之額外二硫鍵。在一具體實例中，生長激素
變異體包含選自以下群組之突變之組合：

A98C/Q84C/Y143C	、	A98C/S85C/Y143C	、
A98C/S85C/S144C	、	N99C/Q84C/Y143C	、
N99C/S85C/Y143C	、	N99C/S85C/S144C	、
S101C/Q84C/Y143C	、	S101C/S85C/Y143C	、
S101C/S85C/S144C	、	L101C/Q84C/Y143C	、
L101C/S85C/Y143C	、	L101C/S85C/S144C	、
C102C/Q84C/Y143C	、	C102C/S85C/Y143C	及

C102C/S85C/S144C。在一具體實例中，生長激素變異體包
含選自以下群組之突變之組合：A98C/Q84C/Y143C、
N99C/Q84C/Y143C、S101C/Q84C/Y143C、
L101C/Q84C/Y143C 及 C102C/Q84C/Y143C。在一具體實例

中，生長激素變異體包含突變 L101C、Q84C 及 Y143C。

在另一態樣中，本發明係關於包含生長激素化合物 (GH) 經由親水性間隔基連接至白蛋白結合殘基的生長激素接合物，或其醫藥學上可接受之鹽，其係用於治療。此外，在本發明之生長激素接合物中，GH、白蛋白結合殘基及親水性間隔基係選自上述具體實例中之任一者，特定而言，生長激素接合物具有式 (I) 或 (II)。

在另一態樣中，本發明係關於一種醫藥組成物，其包含生長激素接合物或醫藥學上可接受之鹽視情況與醫藥學上可接受之賦形劑組合，該生長激素接合物包含生長激素化合物 (GH) 經由親水性間隔基連接至白蛋白結合殘基。

如此項技術中已知之術語「一致性 (identity)」係指兩個或兩個以上蛋白質之序列之間藉由比較該等序列所確定的關係。在此項技術中，「一致性」亦意謂蛋白質之間如由具有兩個或兩個以上胺基酸殘基之串之間的匹配數目所確定之序列相關性程度。「一致性」量測兩個或兩個以上序列中較小者之間的一致匹配百分比，其中空隙比對 (若存在) 利用特定數學模型或電腦程式 (亦即「算法」) 處理。相關蛋白質之一致性可易於藉由已知方法來計算。該等方法包括 (但不限於) 以下參考文獻中所述之方法：Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 編, Oxford University Press, New York, 1988；Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 編, Academic Press, New York, 1993；Computer Analysis of Sequence Data, 第 1 部分,

Griffin, A. M. 及 Griffin, H. G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994 ; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987 ; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 及 Devereux, J. 編, M. Stockton Press, New York, 1991 ; 及 Carillo 等人, SIAM *J. Applied Math.*, 48, 1073, (1988)。

測定一致性之較佳方法經設計以得到所測試序列之間的最大匹配。測定一致性之方法描述於可公開獲得之電腦程式中。測定兩個序列之間之一致性的較佳電腦程式方法包括 GCG 程式包, 包括 GAP (Devereux 等人, *Nucl. Acid. Res.*, 12, 387, (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)、BLASTP、BLASTN 及 FASTA (Altschul 等人, *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410, (1990))。BLASTX 程式可自美國國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 及其他來源公開獲得 (BLAST Manual, Altschul 等人, NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul 等人, 同上)。熟知之 Smith Waterman 算法亦可用於測定一致性。

舉例而言, 使用電腦算法 GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), 將欲測定序列一致性百分比之兩個蛋白質進行對準以使其個別胺基酸最佳匹配 (「匹配跨度 (matched span)」, 如由該算法所測定)。空隙空位罰分 (gap opening penalty) (其計算為平均對角線的 3 倍; 「平均對角線」為所用比較矩陣之對角線

的平均值；「對角線」為由特定比較矩陣分配給各完全胺基酸匹配的分數或數值）及空隙擴展罰分（gap extension penalty）（其通常為空隙空位罰分之{分數(1/10)}倍）以及比較矩陣（諸如 PAM 250 或 BLOSUM 62）聯合該算法一起使用。該算法亦使用標準比較矩陣（關於 PAM 250 比較矩陣，請參見 Dayhoff 等人，Atlas of Protein Sequence and Structure, 第 5 卷，增刊 3, (1978)；關於 BLOSUM 62 比較矩陣，請參見 Henikoff 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89, 10915-10919, (1992)）。

用於蛋白質序列比較之較佳參數包括以下：

算法：Needleman 等人，*J. Mol. Biol*, 48, 443-453, (1970)；比較矩陣：Henikoff 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10915-10919, (1992)之 BLOSUM 62；空隙罰分：12，空隙長度罰分：4，相似度臨界值：0。

GAP 程式適用於上述參數。上述參數為使用 GAP 算法進行蛋白質比較（且對於末端空隙無罰分）之預設參數。

本發明化合物相較於相應未接合生長激素（其亦稱作母體化合物）具有改良之藥理學性質。該等藥理學性質之實例包括功能性活體內半衰期、免疫原性、腎臟過濾、蛋白酶保護及白蛋白結合。

術語「功能性活體內半衰期（functional *in vivo* half-life）」以其通常含義使用，亦即在身體/目標器官中仍存在 GH 或 GH 接合物之生物活性的 50%之時間，或 GH 或 GH 接合物之活性為其初始值之 50%的時間。作為測定功能

性活體內半衰期之替代方法，可測定「活體內血漿半衰期」，亦即在清除前於血漿或血流中有 50% 之 GH 或 GH 接合物循環的時間。測定血漿半衰期通常比測定功能性半衰期簡便，且血漿半衰期之量值通常可良好指示功能性活體內半衰期之量值。血漿半衰期之替代術語包括血清半衰期、循環半衰期 (circulating half-life/circulatory half-life)、血清清除率、血漿清除率及清除半衰期。

與功能性活體內半衰期或血漿半衰期結合使用之術語「增加 (increased)」用於指示 GH 接合物之相關半衰期相對於如在可比條件下所測定之母體 GH 之相關半衰期統計上顯著增加。舉例而言，相關半衰期可增加至少約 25%，諸如至少約 50%，例如至少約 100%、150%、200%、250% 或 500%。在一具體實例中，本發明化合物之半衰期相對於母體 GH 之半衰期增加至少約 5 小時，較佳增加至少約 24 小時，更佳增加至少約 72 小時且最佳增加至少約 7 天。

可以如文獻中所述之多種方式進行活體內血漿半衰期之量測。活體內血漿半衰期之增加可定量為清除率 (clearance, CL) 降低或平均滯留時間 (mean residence time, MRT) 增加。如以適合檢定所測定 CL 降至母體 GH 之 CL 的 70% 以下，諸如 50% 以下，諸如 20% 以下，諸如 10% 以下的本發明之接合型 GH 視為具有增加之活體內血漿半衰期。在適合檢定中 MRT 增加至母體 GH 之 MRT 的 130% 以上，諸如 150% 以上，諸如 200% 以上，諸如 500% 以上的本發明之接合型 GH 視為具有增加之活體內血漿半衰期。可

使用適合測試動物在標準藥物動力學研究中評估清除率及平均滯留時間。選擇適用於指定蛋白質之測試動物處於熟習此項技術者的能力範圍內。當然，在人類進行測試代表最終測試。適合測試動物包括正常史泊格多利 (Sprague-Dawley) 雄性大鼠、小鼠及食蟹獼猴。典型地，小鼠及大鼠以單次皮下快速注射 (bolus) 進行注射，而猴可以單次皮下快速注射或單次靜脈內給藥進行注射。注射量視測試動物而定。隨後，對於評估 CL 及 MRT 酌情經 1 至 5 天之時段取血液樣品。血液樣品宜藉由 ELISA 技術進行分析。

術語化合物之「免疫原性 (Immunogenicity)」係指化合物在投予人類時引起有害免疫反應 (體液、細胞抑或兩者) 的能力。在任何人類子群中，可能存在對投予之特定蛋白質顯示敏感性的個體。免疫原性可藉由使用此項技術中已知之習知方法定量敏感個體體內生長激素抗體及/或生長激素反應性 T 細胞的存在來量測。在一具體實例中，本發明之接合型 GH 對敏感個體之免疫原性相對於母體 GH 對該個體之免疫原性降低至少約 10%，較佳降低至少約 25%，更佳降低至少約 40% 且最佳降低至少約 50%。如本文所用之術語「蛋白酶保護 (protease protection/protease protected)」意欲指示本發明之接合型 GH 相較於母體 GH 對血漿肽酶或蛋白酶更具抗性。血漿中存在之蛋白酶及肽酶已知參與降解循環蛋白質，諸如循環肽激素，諸如生長激素。該蛋白酶保護可藉由本文所述之實施例 A 之方法來

量測。

生長激素可能對例如凝血酶、纖維蛋白溶酶、枯草桿菌蛋白酶及類胰凝乳酶絲胺酸蛋白酶的降解敏感。測定此等蛋白酶降解之檢定描述於 *J. Biotech.*, **65**, 183, (1998) 中。在一具體實例中，GH 接合物之水解速率為母體 GH 水解速率的 70% 以下，諸如 40% 以下，諸如 10% 以下。

哺乳動物物種之循環血液中最豐富之蛋白質組分為血清白蛋白，其通常以每 100 毫升全血約 3 至 4.5 公克之濃度存在。血清白蛋白為在循環系統中具有若干重要功能之具有約 65,000 道爾頓之血液蛋白質。其充當血液中存在之多種有機分子的輸送體，充當各種代謝物（諸如脂肪酸及膽紅素（bilirubin））經由血液之主要輸送體且由於其量豐富而充當循環血液之滲透調節劑。血清白蛋白之半衰期超過一週，且增加蛋白質之血漿半衰期的一種途徑為將結合血清白蛋白之基團接合至該蛋白質。白蛋白結合性質可如 *J. Med. Chem.*, **43**, 1986, (2000) 中所述來測定，該文獻以引用的方式併入本文中。

式（I）或（II）之生長激素接合物發揮生長激素活性且因而可用於治療將受益於循環生長激素之量增加的疾病或病況。詳言之，本發明提供治療以下疾病之方法：生長激素缺乏（growth hormone deficiency, GHD）；透納氏症候群（Turner Syndrome）；普拉德-威利症候群（Prader-Willi syndrome, PWS）；努南氏症候群（Noonan syndrome）；唐氏症候群（Down syndrome）；慢性腎臟疾病；青少年類風

濕性關節炎；囊腫性纖維化；接受 HAART 治療之兒童的 HIV 感染（HIV/HALS 兒童）；出生時小於胎齡（SGA）之矮小兒童（born short children born short for gestational age）；出生時出生體重極低（very low birth weight, VLBW）但 SGA 之兒童的身材矮小；骨骼發育不良；軟骨生成減退；軟骨發育不全；特發性身材矮小（idiopathic short stature, ISS）；成人 GHD；長骨，諸如脛骨、腓骨、股骨、肱骨、橈骨、尺骨、鎖骨、掌骨、蹠骨及指骨中之骨折或其骨折；鬆質骨（spongy bone），諸如頭蓋骨、手基部及足基部中之骨折或其骨折；例如手、膝或肩部腱或韌帶手術後之患者；有或經歷牽張成骨術（distraction osteogenesis）之患者；髖或關節盤置換、半月板修復、脊柱融合術或諸如膝、髖、肩、肘、腕或頷部之修復體安裝後之患者；已安裝了骨縫合材料（諸如釘、螺釘及板）之患者；骨折未接合或接合不良之患者；例如脛骨或第一腳趾骨切開術後之患者；移植物植入後之患者；由創傷或關節炎所致之膝關節軟骨退化；併發透納氏症候群之患者骨質疏鬆症；男性骨質疏鬆症；成年長期透析患者（adult patients in chronic dialysis, APCD）；APCD 之營養不良相關性心血管疾病；APCD 之惡病質逆轉；APCD 之癌症；APCD 之慢性阻塞性肺病；APCD 之 HIV；老年 APCD；APCD 之慢性肝病；APCD 之疲勞症候群；克羅恩氏病（Crohn's disease）；肝功能異常；患有 HIV 感染之男性；短腸症候群；向心性肥胖；HIV 相關性脂質營養不良症候群（HIV-associated lipodystrophy）

syndrome, HALS); 男性不育症; 大型非急需手術後之患者; 酒精/藥物解毒或神經創傷; 老化; 老年人虛弱; 骨關節炎; 創傷性軟骨損傷; 勃起功能障礙; 肌肉纖維疼痛; 記憶障礙; 抑鬱症; 創傷性腦損傷; 蛛網膜下出血; 出生體重極低; 代謝症候群; 糖皮質激素肌病; 或由糖皮質激素治療所致之兒童身材矮小, 該方法包含投予有需要之患者治療有效量之式 (I) 或 (II) 之生長激素接合物。

在另一態樣中, 本發明提供加速肌肉組織、神經組織或創口之癒合; 加速或改善受損組織之血流; 或降低受損組織之感染率的方法, 該方法包含投予有需要之患者治療有效量之式 (I) 或 (II) 之生長激素接合物。

在另一具體實例中, 本發明係關於式 (I) 或 (II) 之生長激素接合物之用途, 其係用於製造受益於生長激素血漿含量增加之疾病, 諸如上述疾病。

典型非經腸劑量處於每次投藥每公斤體重 10^{-9} mg 至約 100 mg 之範圍內。典型投藥劑量為每次投藥每公斤體重約 0.0000001 至約 10 mg。確切劑量將視例如適應症、藥物、頻率及投藥方式; 所治療個體之性別、年齡及一般狀況; 所治療之疾病或病狀之性質及嚴重程度; 所需治療效果; 及其他對於熟習此項技術者明顯之因素而定。

典型給藥頻率為每天兩次、每天一次、每兩天一次、每週兩次、每週一次或給藥時間間隔更久。由於本發明之融合蛋白延長之半衰期, 所以給藥時間間隔較長 (諸如每週兩次、每週一次或給藥時間間隔更久) 的給藥方案為本

發明之一特定具體實例。

多種疾病在治療中使用同時投予或依序投予一種以上藥物來治療。因此，在本發明範疇內，在治療上述疾病之一的治療方法中將式 (I) 或 (II) 之生長激素接合物與一或多種通常用於治療該等疾病之其他治療活性化合物組合使用。同樣，亦在本發明範疇內，將式 (I) 或 (II) 之生長激素接合物與通常用於治療上述疾病之一的其他治療活性化合物組合使用來製造用於該疾病之藥物。

一般方法

酶接合：

在製備本發明之生長激素接合物中，典型地藉由使用如下文實施例中所說明之酶來製備在製備式 (I) 之 A-W-B-GH 接合物中形成之至少一個共價鍵。該酶可例如選自由轉麩醯胺酸酶、絲胺酸蛋白酶及半胱胺酸蛋白酶組成之群。該酶典型地為轉麩醯胺酸酶。該轉麩醯胺酸酶可例如選自由微生物轉麩醯胺酸酶、組織轉麩醯胺酸酶及因子 XIII 及其變異體組成之群。在另一具體實例中，該酶為半胱胺酸蛋白酶。本發明之生長激素接合物可藉由多種不同方法製備，非限制性實例展示於下文中。

本發明亦提供製備式 (I) 之 A-W-B-GH 接合物的方法。

轉麩醯胺酸酶

如上文所述，可藉由使用轉麩醯胺酸酶來製備在製備本發明之 A-W-B-GH 接合物中形成之至少一個共價鍵。轉麩醯胺酸酶可包括微生物轉麩醯胺酸酶，諸如自以下鏈徵

菌屬物種分離者：茂原鏈黴菌、肉桂鏈黴菌、灰肉色鏈黴菌（US5156956，其係以引用之方式併入本文中）、淡紫鏈黴菌（US5252469，其係以引用之方式併入本文中）及拉達卡鏈黴菌（JP 2003/199569，其係以引用之方式併入本文中）。其他適用微生物轉麩醯胺酸酶已自枯草桿菌（揭示於US5731183中，該文獻以引用之方式併入本文中）及各種黏菌分離。適用微生物轉麩醯胺酸酶之其他實例為W01996/06931（例如來自利迪桿菌之轉麩醯胺酸酶）及W01996/22366中所揭示之轉麩醯胺酸酶，該等文獻均以引用的方式併入本文中。適用非微生物轉麩醯胺酸酶包括天竺鼠肝臟轉麩醯胺酸酶及來自各種海洋來源之轉麩醯胺酸酶，如扁魚真鯛（揭示於EP0555649中，該文獻以引用的方式併入本文中）及日本牡蠣正牡蠣（揭示於US5736356中，該文獻以引用的方式併入本文中）。其功能性類似物及衍生物亦可適用。

本發明方法中所用之TGase典型地為微生物轉麩醯胺酸酶。在一具體實例中，TGase來自茂原鏈黴菌，或其變異體，例如如WO2007/020290及WO2008/020075中所述。在另一具體實例中，TGase來自拉達卡鏈黴菌，或其變異體，例如如WO2008/020075中所述。

可藉由TGase介導之修飾使得GH化合物之序列中視所用受質而定特定離胺酸（Lys）或麩醯胺酸（Gln）位置上發生選擇性改變來達成本發明GH與A-W-B之接合。使用胺作為受質將產生麩醯胺酸之修飾，而使用一級醯胺將產生

離胺酸之修飾。hGH (SEQ ID NO: 1) 在位置 38、41、70、115、140、145、158、168 及 172 具有 9 個離胺酸殘基，且在位置 22、29、40、46、49、68、69、84、91、122、137、141 及 181 具有 13 個麩醯胺酸殘基，然而並非所有此等殘基皆易於進行修飾或適用於修飾，因為此操作將會導致與生長激素結合蛋白之結合效能減弱，從而導致生物活性降低。hGH 與其結合蛋白之間的 X 射線蛋白質晶體結構 (pdb: 3HHR) 揭示至少 4 個離胺酸 (38、41、168 及 172) 參與與結合蛋白結合，而可能僅一個麩醯胺酸 (Gln 46) 參與與結合蛋白結合。此使得麩醯胺酸用作選擇性引入白蛋白結合劑連接子的目標更具吸引力。此等結構考慮進一步得到由 N. Chene 等人在 *Reprod. Nutr. Develop.* **29**, 1-25 (1989) 中所概述之研究結果支持，其中該文獻推斷，已發現影響離胺酸之化學修飾對 GH 之活體內生物活性及與肝臟受體之結合能力具有負面影響。

化學反應 I

在一態樣中，本發明係關於式 (I) 生長激素接合物之製備，其中使用 TGase 催化之化學反應用改良性質之基團處理 GH 化合物。最初，藉由兩步反應，使用胺基醇且隨後用高碘酸鹽處理該等胺基醇以藉由氧化裂解產生醛或酮官能基來安置醛或酮官能基。僅供說明之胺基醇的非限制性實例包括 1,3-二胺基-2-丙醇及 1-胺基-2,3-二羥基丙烷。

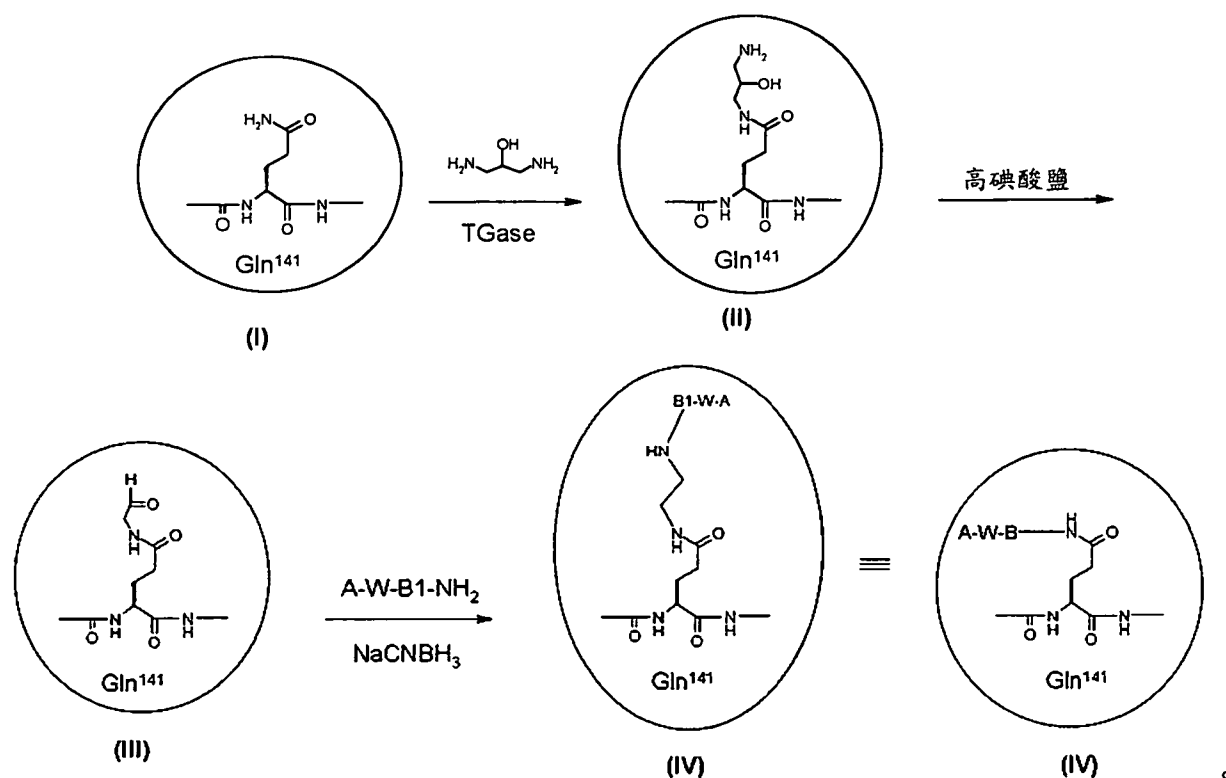
在另一態樣中，本發明係關於式 (I) 生長激素接合物之製備，其包含用改良性質之基團衍生之苯胺或雜芳基胺

處理自 GH 化合物衍生之醛或酮來產生胺 (III→IV)。

在一具體實例中，用改良性質之基團衍生之苯胺或雜芳基胺處理自 GH 化合物衍生之醛。

術語「GH 化合物衍生之醛 (或酮) (GH compound derived aldehyde (or ketone))」或「自 GH 化合物衍生之醛或酮 (an aldehyde or ketone derived from GH compound)」意欲指示醛或酮官能基已共價連接至 GH 化合物，或 GH 化合物上已產生了醛或酮官能基。GH 化合物衍生之醛 (諸如下文所說明之化合物 (III)) 的製備為熟習此項技術者所熟知，且可使用任何此等已知程序來製備實現本文所揭示之本發明所需的 GH 化合物衍生之醛 (III)。

在一具體實例中，如下文所說明製備接合物 A-W-B-GH (IV)：

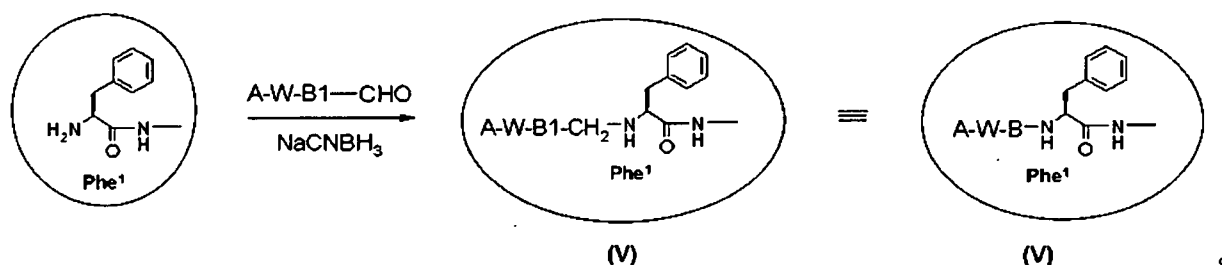


利用 GH (I) 進行 TGAse 介導之酶催化反應使得位置

141 及 / 或 40 之 Gln 得到修飾，產生 (II)。用高碘酸鹽處理經修飾之 GH (II) 以裂解胺基醇，得到 GH 衍生之醛 (III)。經由還原性烷基化使 GH 醛 (III) 與 A-W-B1-NH₂ 接合 (III → IV)。如本文所例示之還原性烷基化在此項技術中為公認的，且產生位置 Gln (141) 及 / 或 40 經修飾之 GH 化合物 (IV)。

化學反應 II

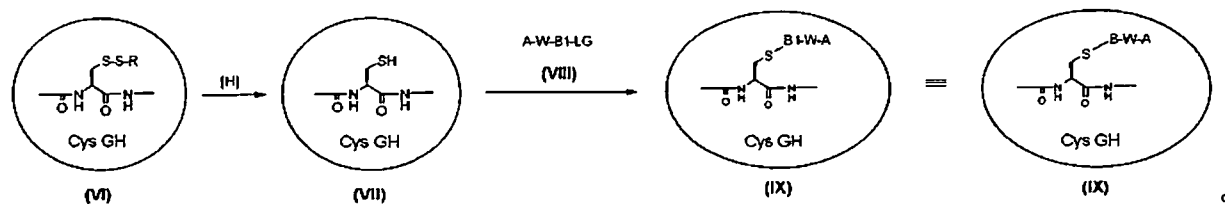
在一具體實例中，如下文所說明在 GH 之 N-端中使用還原性胺化來製備接合物 A-W-B-GH：



經由還原性烷基化使 GH 與 A-W-B1-CHO 接合 (GH → V)。如上文所例示之還原性烷基化在此項技術中公認可用於修飾 GH 之 N-端。

化學反應 III

在一具體實例中，如下文所說明製備接合物 A-W-B-GH：



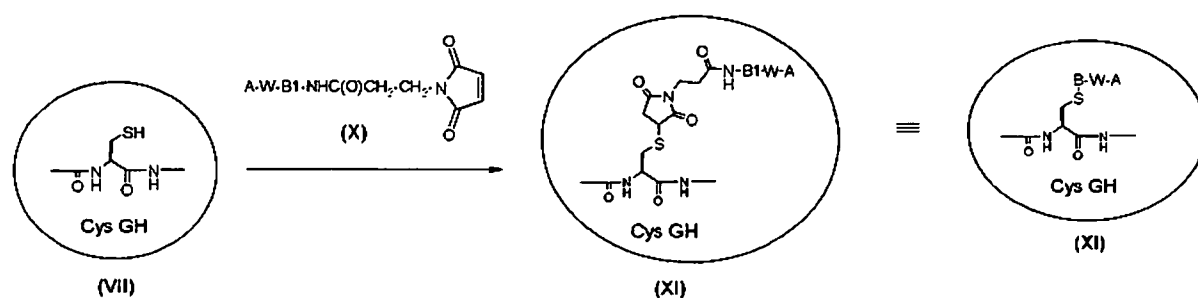
其中半胱胺酸殘基視情況經保護成混合二硫醚 (VI) (GH-S-S-R)，其中 R 為小有機部分。混合二硫醚之非限制性實例可包括胱胺 (R = -CH₂CH₂NH₂)；半胱胺酸

($R = -CH_2CH(C(O)OH)NH_2$) ; 高 半 胱 胺 酸
($R = -CH_2CH_2CH(C(O)OH)NH_2$) ; 及 麩 胱 甘 肽
($R = -CH_2CH(C(O)NH-CH_2C(O)OH)NH-C(O)CH_2CH_2CH(C(O)OH)NH_2$) 之 間 的 二 硫 醚 。

衍生化方法利用白蛋白結合連接子 A-W-B1-LG，其中 LG 表示無機離去基，諸如 -Cl、-Br、-I；或有機離去基，諸如甲磺酸酯基或甲苯磺酸酯基。經由親核取代使 GH 與 A-W-B1-LG 接合 (VII $\rightarrow$ IX)。

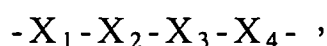
化學反應 IV

在一具體實例中，如下文所說明製備接合物 A-W-B-GH：



可使如上文自 (VI) 獲得之 Cys 脫除保護基之 GH 化合物 (VII) 與經順丁烯二醯亞胺取代之白蛋白結合劑連接子 (X) 反應，得到 GH 接合物 A-W-B1-NHC(O)CH₂CH₂-吡咯啉-2,5-二酮-3-GH (XI)，

其中親水性間隔基 B1 具有下式：



其中

X_1 為 $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ，

X_2 為 $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ，

X_3 為 $-[(CHR^5)_{15}]_{m7}-$,

X_4 為價鍵 ,

11、12、13、14 及 15 獨立地選自 0-16 ,

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 及 $m7$ 獨立地選自 0-10 ,

$m2$ 及 $m5$ 獨立地選自 0-25 ,

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 及 $n4$ 獨立地選自 0-16 ,

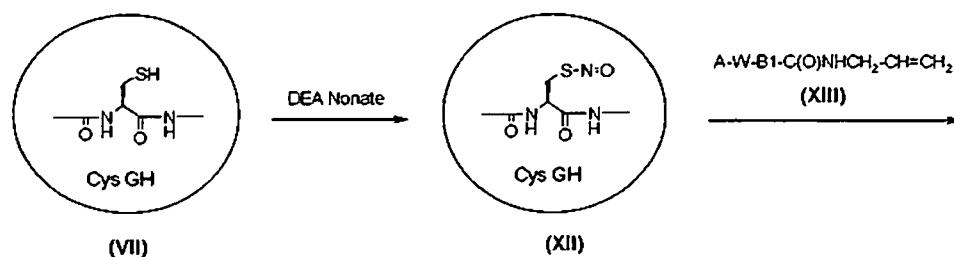
R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及 R^5 獨立地選自 氫、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 C_{1-6} 烷基、芳基或雜芳基；其中烷基、芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ 或 $-OH$,

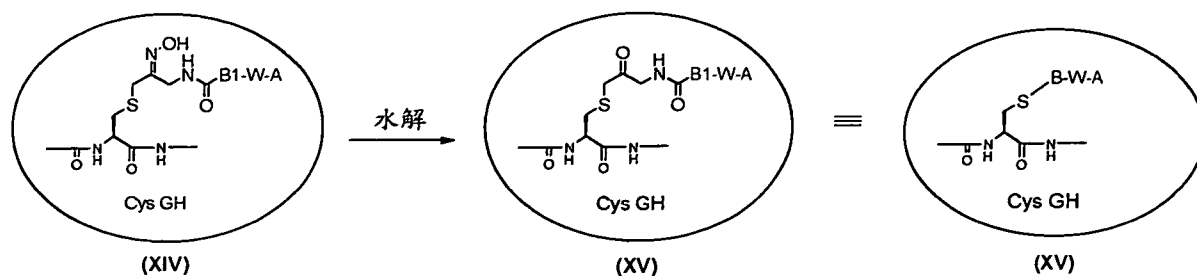
$E1$ 及 $E2$ 獨立地選自 $-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-N(COR^7)-$ 或價鍵；其中 R^6 及 R^7 獨立地表示 氫或 C_{1-6} 烷基 ,

W_1 至 W_5 獨立地選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s2$ 為 0 或 1。

化學反應 V

在一具體實例中，如下文所說明製備接合物 A-W-B-GH：

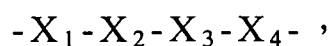




可使用如 WO2009/024791 中所述之 S-亞硝鹽基化學反應將白蛋白結合劑連接至單一 cys GH 衍生物。

藉由添加 NO 供體(諸如 DEA NOate(Sigma Aldrich))對 Cys 脫除保護基之 GH 化合物(VII)進行 S-亞硝鹽基化。接著使亞硝鹽基化之單一 cys GH(XII)與經烯丙胺取代之白蛋白結合劑(XIII)反應，得到肟(XIV)，該肟在水解後得到 GH 接合物 A-W-B1-C(O)NHCH₂C(O)CH₂-Cys GH(XV)，

其中親水性間隔基 B1 具有下式：



其中

X₁ 為 -W₁-[(CHR¹)₁₁-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)₁₂-W₃]_{m3}}_{n2}-，

X₂ 為 -[(CHR³)₁₃-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)₁₄-W₅]_{m6}}_{n4}-，

X₃ 為 -[(CHR⁵)₁₅]_{m7}-，

X₄ 為價鍵，

11、12、13、14 及 15 獨立地選自 0-16，

m1、m3、m4、m6 及 m7 獨立地選自 0-10，

m2 及 m5 獨立地選自 0-25，

n1、n2、n3 及 n4 獨立地選自 0-16，

R¹、R²、R³、R⁴ 及 R⁵ 獨立地選自 氫、-C(O)OH、

-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆ 烷基、芳基或雜芳基；其中烷基、芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH，

E1 及 E2 獨立地選自 -O-、-N(R⁶)-、-N(C(O)R⁷)-或價鍵；其中 R⁶ 及 R⁷ 獨立地表示氫或 C₁₋₆ 烷基，

W₁ 至 W₅ 獨立地選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或價鍵；其中 s2 為 0 或 1。

與天然肽關係密切一般視為包含投予此天然肽之變異體或類似物之治療性干預具有優勢，因為其使得例如任何不必要之抗體產生之風險降至最低。

GH 可在其 C-端中如 WO2007/093594 所述藉由使用羧胺酶 Y (EC. 3.4.16.5) 及適合經修飾受質來進行修飾。兩步程序如由 B. Peschke 等人，「C-Terminally PEGylated GH derivatives」 *Bioorg. Med. Chem.* 15, 4382-4395, (2007)所述，其中將 C 端丙胺酸酶催化地交換成 N^ε-(4-乙醯基苯甲醯基)離胺酸，繼而與本發明之白蛋白結合劑衍生物反應。

如自上文顯而易見，本發明進一步係關於製備接合物 A-W-B-GH 中所用之中間連接子。該連接子化合物可使用式 (III) 描述：

A-W-B1-U (III)

其中 A 表示白蛋白結合殘基，

B1 表示親水性間隔基，

W 為連接 A 與 B1 之化學基團，且 U 表示接合部分。

基於上述內容，接合部分將視所應用之接合方法而變化，其最後亦可見於最終 hGH 化合物 (A-W-B-GH) 中。

在化合物 A-W-B1-U 之其他具體實例中，A 及 W 係如任何上述具體實例中所定義。

當應用上文描述為化學反應 IV 之方法時，化合物 A-W-B1-U 可進一步定義為如下具體實例，其中 U 包含芳基、雜芳基、經取代之順丁烯二醯亞胺或吡咯啉-2,5-二酮 (諸如 $\text{-NHC(O)CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ 吡咯啉-2,5-二酮) 或由其組成。

在化合物 A-W-B1-U 之替代具體實例中，U 包含 $\text{D1-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-D2}$ ，其中 D1 及 D2 獨立地選自 -O- 、 -N(R6)- 、 -NC(O)R7- 或價鍵；其中 R6 及 R7 獨立地表示氫或 C_{1-6} 烷基。

同樣地，應用如上文所述之化學反應 III 則應用如下連接子化合物，其中 U 包含離去基 (諸如 Cl、Br、I、 -OH 、 $\text{-OS(O)}_2\text{Me}$ 、 $\text{-OS(O)}_2\text{CF}_3$ 或 -OTs) 或由其組成；或較佳應用式 (III) 化合物，其中離去基為選自 Cl、Br 及 I 之鹵素化合物，較佳為 Br。

連接子化合物 (其應用於化學反應 V 中) 之其他具體實例根據本發明由式 (III) 定義，其中 U 包含烯丙胺 ($\text{H}_2\text{C=CH-CH}_2\text{-NH}_2$) (諸如 $\text{-C(O)NHCH}_2\text{-CH=CH}_2$) 或由其組成。

當應用上文描述為化學反應 I 之方法時，化合物

A-W-B1-U 可進一步定義為如下具體實例，其中 U 包含胺 ($-\text{NH}_2$) 或由其組成。

在替代具體實例中，U 可包含醛（諸如 $-\text{CHO}$ ）或由其組成。

該等化合物可隨後接合至包括「U」能夠接合之接受基團的任何類別之治療化合物。在一較佳具體實例中，治療化合物為多肽。肽可天然地包括可充當接受基團之 AA 殘基，諸如 Gln 殘基、Phe 殘基及 Cys 殘基。或者，可將該等胺基酸殘基引入多肽中之適當位置。

醫藥組成物

另一目的在於提供一種醫藥組成物，其包含本發明之生長激素接合物，諸如式 (I) 或 (II) 之生長激素接合物，其以 10^{-15} mg/mL 至 200 mg/mL，諸如 10^{-10} mg/mL 至 5 mg/mL 之濃度存在，且其中該組成物具有 2.0 至 10.0 之 pH 值。組成物可進一步包含醫藥賦形劑，諸如緩衝系統、防腐劑、張力劑、螯合劑、穩定劑及界面活性劑。在本發明之一具體實例中，醫藥組成物為水性組成物，亦即組成物包含水。該組成物典型地為溶液或懸浮液。在本發明之另一具體實例中，醫藥組成物為水溶液。術語「水性組成物 (aqueous composition)」定義為包含至少 50% w/w 水之組成物。同樣，術語「水溶液 (aqueous solution)」定義為包含至少 50% w/w 水之溶液，且術語「水性懸浮液 (aqueous suspension)」定義為包含至少 50% w/w 水之懸浮液。

在另一具體實例中，醫藥組成物為冷凍乾燥組成物，

醫師或患者臨使用前向其中添加溶劑及/或稀釋劑。

在另一具體實例中，醫藥組成物為準備不經任何預先溶解即供使用之乾燥組成物（例如冷凍乾燥或噴霧乾燥）。

在另一態樣中，本發明係關於一種醫藥組成物，其包含生長激素接合物（諸如式（I）或（II）之生長激素接合物）及緩衝劑之水溶液，其中該 GH 接合物以 0.1-100 mg/mL 或 100 mg/mL 以上之濃度存在，且其中該組成物具有約 2.0 至約 10.0 之 pH 值。

在本發明之另一具體實例中，組成物之 pH 值係選自由以下組成之清單：2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 及 10.0。

在本發明之另一具體實例中，緩衝劑係選自由以下組成之群：乙酸鈉、碳酸鈉、檸檬酸鹽、甘胺鹽甘胺酸、組胺酸、甘胺酸、離胺酸、精胺酸、磷酸二氫鈉、磷酸氫二鈉、磷酸鈉及參(羥甲基)-胺基甲烷、N-二(羥乙基)甘胺酸 (bicine)、N-三(羥甲基)甲基甘胺酸 (tricine)、蘋果酸、丁二酸鹽、順丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、天門冬胺酸或其混合物。此等特定緩衝劑中之每一者構成本發明之一

替代具體實例。

在本發明之另一具體實例中，組成物進一步包含醫藥學上可接受之防腐劑。在本發明之另一具體實例中，防腐劑係選自由以下組成之群：苯酚、鄰甲酚、間甲酚、對甲酚、對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸丙酯、2-苯氧基乙醇、對羥基苯甲酸丁酯、2-苯基乙醇、苯甲醇、氯丁醇及硫柳汞 (thiomerosal)、溴硝丙二醇 (bronopol)、苯甲酸、咪唑啉基脲 (imidurea)、雙氯苯雙胍己烷 (chlorohexidine)、去氫乙酸鈉、氯甲酚、對羥基苯甲酸乙酯、苄索氯銨 (benzethonium chloride)、氯苯甘醚 (chlorphenesine) (3-(對氯苯氧基)丙烷-1,2-二醇) 或其混合物。在本發明之另一具體實例中，防腐劑以 0.1 mg/mL 至 20 mg/mL 之濃度存在。在本發明之另一具體實例中，防腐劑以 0.1 mg/mL 至 5 mg/mL 之濃度存在。在本發明之另一具體實例中，防腐劑以 5 mg/mL 至 10 mg/mL 之濃度存在。在本發明之另一具體實例中，防腐劑以 10 mg/mL 至 20 mg/mL 之濃度存在。此等特定防腐劑中之每一者構成本發明之一替代具體實例。在醫藥組成物中使用防腐劑為熟習此項技術者所熟知。為方便起見，請參考 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 20 版, 2000。

在本發明之另一具體實例中，組成物進一步包含等張劑。在本發明之另一具體實例中，等張劑係選自由以下組成之群：鹽（例如氯化鈉）、糖或糖醇、胺基酸（例如 L-甘胺酸、L-組胺酸、精胺酸、離胺酸、異白胺酸、天門冬胺

酸、色胺酸、蘇胺酸)、醛糖醇(例如甘油(丙三醇)、1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)、聚乙二醇(例如 PEG 400), 或其混合物。可使用任何糖, 諸如單糖、二糖或多糖, 或水溶性葡聚糖, 包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麥芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、聚葡萄糖、聚三葡萄糖、糊精、環糊精、可溶性澱粉、羥乙基澱粉及羧甲基纖維素鈉。在一具體實例中, 糖添加劑為蔗糖。糖醇定義為具有至少一個-OH 基團之 C4-C8 烴, 且包括例如甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、甜醇、木糖醇及阿糖醇。在一具體實例中, 糖醇添加劑為甘露糖醇。上述糖或糖醇可個別或組合使用。所用量不存在固定限制, 只要糖或糖醇可溶於液體製劑中且不會不利地影響使用本發明方法所獲得之穩定作用即可。在一具體實例中, 糖或糖醇濃度在約 1 mg/mL 與約 150 mg/mL 之間。在本發明之另一具體實例中, 等張劑以 1 mg/mL 至 50 mg/mL 之濃度存在。在本發明之另一具體實例中, 等張劑以 1 mg/mL 至 7 mg/mL 之濃度存在。在本發明之另一具體實例中, 等張劑以 8 mg/mL 至 24 mg/mL 之濃度存在。在本發明之另一具體實例中, 等張劑以 25 mg/mL 至 50 mg/mL 之濃度存在。此等特定等張劑中之每一者構成本發明之一替代具體實例。在醫藥組成物中使用等張劑為熟習此項技術者所熟知。為方便起見, 請參考 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 20 版, 2000。

在本發明之另一具體實例中, 組成物進一步包含螯合

劑。在本發明之另一具體實例中，螯合劑係選自乙二胺四乙酸 (EDTA)、檸檬酸及天門冬胺酸之鹽及其混合物。在本發明之另一具體實例中，螯合劑以 0.1 mg/mL 至 5 mg/mL 之濃度存在。在本發明之另一具體實例中，螯合劑以 0.1 mg/mL 至 2 mg/mL 之濃度存在。在本發明之另一具體實例中，螯合劑以 2 mg/mL 至 5 mg/mL 之濃度存在。此等特定螯合劑中之每一者構成本發明之一替代具體實例。在醫藥組成物中使用螯合劑為熟習此項技術者所熟知。為方便起見，請參考 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 20 版, 2000。

在本發明之另一具體實例中，組成物進一步包含穩定劑。在醫藥組成物中使用穩定劑為熟習此項技術者所熟知。為方便起見，請參考 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 20 版, 2000。

更特定而言，本發明之組成物為穩定液體醫藥組成物，其治療活性組分包括可能在儲存期間於液體醫藥組成物中顯示聚集體形成之蛋白質。「聚集體形成」意指蛋白質分子之間導致形成可保持可溶之寡聚物或自溶液中沈澱之可見大聚集體的物理相互作用。「在儲存期間」意指液體醫藥組成物或組成物在製備後不即刻投予個體。而是在製備後，將其以液體形式、冷凍狀態或用於在以後復原成液體形式或適合於投予個體之其他形式的乾燥形式封裝以供儲存。「乾燥形式」意指藉由冷凍乾燥（亦即凍乾；參見例如 Williams 及 Polli, *J. Parenteral Sci. Technol.*, 38, 48-59,

(1984))、噴霧乾燥 (參見 Masters (1991), *Spray-Drying Handbook* (第 5 版; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), 第 491-676 頁; Broadhead 等人, *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18, 1169-1206, (1992); 及 Mumenthaler 等人, *Pharm. Res.*, 11, 12-20, (1994)) 或空氣乾燥 (Carpenter 及 Crowe, *Cryobiology* 25, 459-470, (1988); 及 Roser, *Biopharm.* 4, 47-53, (1991)) 使液體醫藥組成物或組成物乾燥。在液體醫藥組成物儲存期間蛋白質形成聚集體會不利地影響該蛋白質之生物活性, 使得醫藥組成物之治療功效喪失。此外, 聚集體形成可能引起其他問題, 諸如在使用輸注系統投予含蛋白質之醫藥組成物時會阻塞管道、膜或泵。

本發明之醫藥組成物可進一步包含足以在組成物儲存期間減少蛋白質聚集體形成之量的胺基酸鹼。「胺基酸鹼」意指胺基酸或胺基酸組合, 其中任何指定胺基酸以其自由鹼形式或其鹽形式存在。在使用胺基酸組合時, 所有胺基酸可以其自由鹼形式存在, 所有胺基酸可以其鹽形式存在, 或一些胺基酸可以其自由鹼形式存在, 而其他胺基酸以其鹽形式存在。在一具體實例中, 用於製備本發明組成物之胺基酸為具有帶電側鏈之胺基酸, 諸如精胺酸、離胺酸、天門冬胺酸及麩胺酸。特定胺基酸 (甲硫胺酸、組胺酸、精胺酸、離胺酸、異白胺酸、天門冬胺酸、色胺酸、蘇胺酸及其混合物) 之任何立體異構體 (亦即 L 或 D 異構體或其混合物) 或此等立體異構體之組合或甘胺酸或有機鹼 (諸如 (但不限於) 咪唑) 可存在於本發明之醫藥組成

物中，只要特定胺基酸或有機鹼以其自由鹼形式或其鹽形式存在即可。在一具體實例中，使用胺基酸之 L-立體異構體。在一具體實例中，使用 L-立體異構體。本發明之組成物亦可用此等胺基酸之類似物來調配。「胺基酸類似物」意指天然存在之胺基酸之衍生物，其在本發明之液體醫藥組成物儲存期間達成減少蛋白質聚集體形成的所需效果。適合精胺酸類似物包括例如胺基胍、鳥胺酸及 N-單乙基 L-精胺酸，適合甲硫胺酸類似物包括乙硫胺酸 (ethionine) 及丁硫胺酸 (buthionine)，且適合半胱胺酸類似物包括 S-甲基-L-半胱胺酸。如同其他胺基酸，胺基酸類似物以其自由鹼形式或其鹽形式併入組成物中。在本發明之另一具體實例中，胺基酸或胺基酸類似物以足以防止或延遲蛋白質聚集之濃度使用。

在本發明之另一具體實例中，當充當治療劑之蛋白質為包含至少一個易受氧化影響之甲硫胺酸殘基的蛋白質時，可添加甲硫胺酸（或其他含硫胺基酸或胺基酸類似物）以抑制甲硫胺酸殘基氧化成甲硫胺酸亞砷。「抑制」意指使甲硫胺酸氧化物質隨時間推移之聚集最少。抑制甲硫胺酸氧化使得蛋白質在更大程度上保持其適當分子形式。可使用甲硫胺酸之任何立體異構體（L 或 D 異構體）或其任何組合。添加量應為足以抑制甲硫胺酸殘基氧化以使甲硫胺酸亞砷之量可為管理機構所接受的量。此典型地意謂組成物含有不超過約 10% 至約 30% 甲硫胺酸亞砷。一般而言，此可藉由添加甲硫胺酸以使所添加甲硫胺酸與甲硫胺酸殘

基之比率處於約 1:1 至約 1000:1，諸如 10:1 至約 100:1 之範圍內來達成。

在本發明之另一具體實例中，組成物進一步包含選自高分子量聚合物或低分子化合物之群的穩定劑。在本發明之另一具體實例中，穩定劑係選自聚乙二醇（例如 PEG 3350）、聚乙烯醇（polyvinyl alcohol, PVA）、聚乙烯吡咯啉酮、羧基/羥基纖維素或其衍生物（例如 HPC、HPC-SL、HPC-L 及 HPMC）、環糊精、含硫物質（如單硫代甘油、硫代乙醇酸及 2-甲基硫代乙醇）及不同鹽（例如氯化鈉）。此等特定穩定劑中之每一者構成本發明之一替代具體實例。

醫藥組成物亦可包含進一步增強其中所含治療活性蛋白質之穩定性的其他穩定劑。本發明特別關注之穩定劑包括（但不限於）甲硫胺酸及 EDTA，其保護蛋白質以防甲硫胺酸氧化；及非離子型界面活性劑，其保護蛋白質以防與冷凍-解凍或機械剪切相關之聚集。

在本發明之另一具體實例中，組成物進一步包含界面活性劑。在本發明之另一具體實例中，界面活性劑係選自清潔劑；乙氧基化蓖麻油；聚乙二醇化甘油酯；乙醯化單酸甘油酯；脫水山梨糖醇脂肪酸酯；聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段聚合物（例如泊洛沙姆（poloxamer），諸如 Pluronic®F68、泊洛沙姆 188 及 407、粹通（Triton）X-100）；聚氧乙烯脫水山梨糖醇脂肪酸酯；聚氧乙烯及聚乙烯衍生物，諸如烷基化及烷氧基化衍生物（吐溫（tween），例如吐溫-20、吐溫-40、吐溫-80 及 Brij-35）、其單酸甘油酯或乙氧基化衍生

物、其二酸甘油酯或聚氧乙烯衍生物；醇；甘油；凝集素 (lectin)；及磷脂（例如磷脂醯絲胺酸、磷脂醯膽鹼、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯肌醇、二磷脂醯甘油及鞘磷脂）；磷脂衍生物（例如二軟脂醯基磷脂酸）及溶血磷脂衍生物（例如軟脂醯基溶血磷脂醯-L-絲胺酸及乙醇胺、膽鹼、絲胺酸或蘇胺酸之 1-醯基-sn-甘油-3-磷酸酯）；及溶血磷脂醯及磷脂醯膽鹼之烷基、烷氧基（烷酯）、烷氧基（烷基醚）衍生物，例如溶血磷脂醯膽鹼之月桂醯及肉豆蔻醯衍生物、二軟脂醯基磷脂醯膽鹼，及極性頭基之修飾，亦即膽鹼、乙醇胺、磷脂酸、絲胺酸、蘇胺酸、甘油、肌醇及帶正電 DODAC、DOTMA、DCP、BISHOP，溶血磷脂醯絲胺酸及溶血磷脂醯蘇胺酸，及甘油磷脂（例如腦磷脂）、甘油糖脂（例如吡喃半乳糖苷）、神經鞘糖脂（例如神經醯胺、神經節苷脂）、十二烷基磷醯基膽鹼、雞蛋溶血卵磷脂、夫西地酸 (fusidic acid) 衍生物（例如牛磺二氫夫西地酸鈉等）、C₆-C₁₂ 長鏈脂肪酸及其鹽（例如油酸及辛酸）、醯基肉鹼及衍生物；離胺酸、精胺酸或組胺酸之 N^α-醯化衍生物，或離胺酸或精胺酸之側鏈醯化衍生物；包含離胺酸、精胺酸或組胺酸與中性或酸性胺基酸之任何組合之二肽的 N^α-醯化衍生物；包含中性胺基酸與兩個帶電胺基酸之任何組合之三肽的 N^α-醯化衍生物；DSS（多庫酯鈉 (docusate sodium)，CAS 登記號 [577-11-7]；多庫酯鈣，CAS 登記號 [128-49-4]；多庫酯鉀，CAS 登記號 [7491-09-0])；SDS（十二烷基硫酸鈉或月桂基硫酸鈉）；辛酸鈉；膽酸或其衍生物；膽汁酸及其

鹽以及甘胺酸或牛磺酸接合物、熊去氧膽酸、膽酸鈉、去氧膽酸鈉、牛磺膽酸鈉、甘膽酸鈉、N-十六基-N,N-二甲基-3-胺基-1-丙烷磺酸鹽、陰離子型（烷基-芳基-磺酸根）單價界面活性劑、兩性離子型界面活性劑（例如 N-烷基-N,N-二甲基胺基-1-丙烷磺酸鹽、3-膽鹼胺基-1-丙基二甲基胺基-1-丙烷磺酸鹽）、陽離子型界面活性劑（四級銨鹼）（例如溴化十六烷基-三甲基銨、氯化十六烷基吡啶）、非離子型界面活性劑（例如十二烷基 β -D-葡萄糖吡喃糖苷）、針酸胺（poloxamine）（例如 Tetronic's）（其為藉由將環氧丙烷及環氧乙烷依序加成至乙二胺所獲得之四官能性嵌段共聚物），或界面活性劑可選自咪唑啉衍生物或其混合物之群。此等特定界面活性劑中之每一者構成本發明之一替代具體實例。

在醫藥組成物中使用界面活性劑為熟習此項技術者所熟知。為方便起見，請參考 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 20 版, 2000。

在本發明之醫藥組成物中可存在其他成分。該等其他成分可包括濕潤劑、乳化劑、抗氧化劑、增積劑、張力調節劑、螯合劑、金屬離子、油性媒劑、蛋白質（例如人類血清白蛋白、明膠或蛋白質）及兩性離子（例如胺基酸，諸如甜菜鹼、牛磺酸、精胺酸、甘胺酸、離胺酸及組胺酸）。當然該等其他成分應不會不利地影響本發明醫藥組成物之總體穩定性。

含有本發明生長激素接合物之醫藥組成物可投予需要

該治療之患者的若干部位，例如局部部位，例如皮膚及黏膜部位；繞過吸收之部位，例如投予動脈、靜脈、心臟中；以及涉及吸收之部位，例如投予皮膚中、皮膚下、肌肉中或腹中。

本發明醫藥組成物可經由若干投藥途徑投予需要該治療之患者，該等投藥途徑為例如經舌、舌下、經頰、口腔內、經口、胃部及腸道內、經鼻、肺部（例如經由細支氣管及肺泡或其組合）、表皮、真皮、經皮、陰道、直腸、眼部（例如經由結膜）、尿道以及非經腸投藥。

本發明之組成物可以若干劑型投予，例如溶液、懸浮液、乳液、微乳液、多重乳液、發泡體、油膏、糊劑、藥膏、軟膏、錠劑、包衣錠劑、漂洗劑、膠囊（例如硬明膠膠囊及軟明膠膠囊）、栓劑、直腸膠囊、滴劑、凝膠劑、噴霧劑、散劑、氣霧劑、吸入劑、滴眼劑、眼用軟膏、眼用漂洗劑、陰道子宮托、陰道環、陰道軟膏、注射溶液、原位轉化溶液（例如原位膠凝、原位沈積、原位沈澱、原位結晶）、輸注溶液及植入物。

本發明之組成物可進一步例如經由共價、疏水及靜電相互作用混配於或連接至藥物載體、藥物傳遞系統及高級藥物傳遞系統以進一步增強生長激素接合物之穩定性、提高生體可用率、增加溶解度、減少不利影響、達成熟習此項技術者所熟知之時間治療（chronotherapy）及提高患者順應性或其任何組合。載體、藥物傳遞系統及高級藥物傳遞系統之實例包括（但不限於）聚合物，例如纖維素及衍生

物、多醣（例如聚葡萄糖及衍生物）、澱粉及衍生物、聚（乙烯醇）、丙烯酸酯及甲基丙烯酸酯聚合物、聚乳酸及聚乙醇酸及其嵌段共聚物、聚乙二醇、載體蛋白（例如白蛋白）、凝膠（例如熱膠凝系統，例如熟習此項技術者所熟知之嵌段共聚合系統）、微胞、脂質體、微球體、奈米微粒、液晶及其分散液、L2相及其分散液（為熟習脂質-水系統中之相性質之技術者所熟知）、聚合微胞、多重乳液、自乳化劑、自微乳化劑、環糊精及其衍生物以及樹枝狀聚合物。

本發明之組成物適用於使用例如定劑量吸入器、乾粉吸入器及噴霧器（所有裝置皆為熟習此項技術者所熟知）肺部投予生長激素接合物之固體、半固體、粉末及溶液的組成物中。

本發明之組成物特別適用於控制、持續、延長、延遲及緩慢釋放藥物傳遞系統之組成物中。更特定而言（但不限於），組成物適用於熟習此項技術者所熟知之非經腸控制釋放及持續釋放系統（兩種系統均使得投藥次數成倍減少）之組成物中。甚至更佳地，為皮下投予之控制釋放及持續釋放系統。不限制本發明之範疇，適用控制釋放系統及組成物之實例為水凝膠、油性凝膠、液晶、聚合微胞、微球體、奈米粒子。

產生適用於本發明之組成物之控制釋放系統的方法包括（但不限於）結晶、冷凝、共結晶、沈澱、共沈澱、乳化、分散、高壓均質化、膠囊化、噴霧乾燥、微膠囊化、凝聚、相分離、溶劑蒸發產生微球體、擠壓及超臨界流體

方法。一般參考 *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release* (Wise, D.L. 編, Marcel Dekker, New York, 2000); 及 *Drug and the Pharmaceutical Sciences* 第 99 卷: *Protein Composition and Delivery* (MacNally, E.J. 編, Marcel Dekker, New York, 2000)。

非經腸投藥可藉助於注射器 (視情況為筆式注射器) 藉由皮下、肌肉內、腹膜內或靜脈內注射來進行。或者, 非經腸投藥可藉助於輸注泵來進行。另一選擇為組成物可為用於以經鼻或經肺噴霧之形式投予生長激素接合物之溶液或懸浮液。作為另一選擇, 含有本發明生長激素接合物之醫藥組成物亦可適於例如藉由無針注射或自貼片 (視情況為離子滲透性貼片) 經皮投予或經黏膜 (例如經頰) 投予。

術語「穩定組成物 (stabilized composition)」係指組成物之物理穩定性增強、化學穩定性增強或物理及化學穩定性增強。

如本文所用之術語蛋白質組成物之「物理穩定性 (physical stability)」係指由於蛋白質暴露於熱機械應力及/或與使其去穩定之界面及表面 (諸如疏水性表面及界面) 相互作用引起蛋白質形成無生物活性及/或不可溶之蛋白質聚集體的趨向。水性蛋白質組成物之物理穩定性係在使填充於適合容器 (例如濾筒或小瓶) 中之組成物在不同溫度下暴露於機械/物理應力 (例如攪動) 各種時段後藉助於目測檢查及/或濁度量測來評估。在黑暗背景下以銳聚焦光對

組成物進行目測檢查。組成物之濁度藉由例如以 0 至 3 標度對濁度進行目測評分來特性化（組成物顯示無濁度對應於目測評分 0 分，且在日光下組成物顯示可見濁度對應於目測評分 3 分）。在組成物於日光下顯示可見濁度時，關於蛋白質聚集將組成物分類為具有物理不穩定性。或者，組成物之濁度可藉由熟習此項技術者熟知之簡便濁度量測來評估。水性蛋白質組成物之物理穩定性亦可藉由使用蛋白質之構形狀態之光譜劑或探針來評估。探針較佳為優先結合蛋白質之非天然構象異構體之小分子。蛋白質結構之小分子光譜探針之一實例為硫代黃素 T (Thioflavin T)。硫代黃素 T 為已廣泛用於偵測類澱粉原纖維之螢光染料。在原纖維及或許其他蛋白質構型存在下，硫代黃素 T 當結合於原纖維蛋白質形式時在約 450 nm 下產生新激發最大值且在約 482 nm 下產生增強之發射。未結合之硫代黃素 T 在該等波長下基本上無螢光。

其他小分子可用作蛋白質結構自天然狀態變為非天然狀態之探針。舉例而言，優先結合蛋白質之暴露疏水性補丁 (hydrophobic patch) 之「疏水性補丁」探針。疏水性補丁在蛋白質呈天然狀態時一般嵌埋於該蛋白質之三級結構中，但隨著蛋白質開始伸展或變性而暴露。此等小分子光譜探針之實例為芳族疏水性染料，諸如蔥、吡啶、啡啉或其類似物。其他光譜探針為金屬-胺基酸錯合物，諸如疏水性胺基酸（諸如苯丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸及纈胺酸）之鈷金屬錯合物，或其類似物。

如本文所用之術語蛋白質組成物之「化學穩定性 (chemical stability)」係指導致形成與天然蛋白質結構相比生物效能潛在較低及/或免疫原性性質潛在增強之化學降解產物的蛋白質結構之化學共價變化。可形成各種化學降解產物，視天然蛋白質之類型及性質以及蛋白質所暴露之環境而定。化學降解之消除很有可能不會完全避免，且在儲存及使用蛋白質組成物期間通常可見化學降解產物之量增加，如熟習此項技術者所熟知。大部分蛋白質傾向於脫醯胺，此為麩醯胺醯基或天門冬醯胺醯基殘基中之側鏈醯胺基水解形成自由羧酸的過程。其他降解路徑涉及形成高分子量轉化產物，其中兩種或兩種以上蛋白質分子經由轉醯胺及/或雙硫相互作用彼此共價結合，導致形成共價結合之二聚體、寡聚物及聚合物降解產物 (*Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahem. T.J. & Man-ning M.C., Plenum Press, New York 1992*)。氧化 (例如甲硫胺酸殘基之氧化) 可作為化學降解之另一變化形式提及。蛋白質組成物之化學穩定性可藉由在暴露於不同環境條件 (例如降解產物形成常因例如溫度升高而加速) 後於不同時間點量測化學降解產物之量來評估。各個別降解產物之量常藉由使用各種層析技術 (例如 SEC-HPLC 及/或 RP-HPLC) 視分子大小及/或電荷對降解產物進行分離來測定。

因此，如上文所概述之「穩定組成物」係指組成物之物理穩定性增強、化學穩定性增強或物理及化學穩定性增強。一般而言，組成物須在使用及儲存 (遵照建議之使用

及儲存條件) 期間穩定直至到達失效日期為止。

在本發明之一具體實例中，包含式 (I) 或 (II) 之生長激素接合物之醫藥組成物可穩定使用超過 6 週且穩定儲存超過 3 年。

在本發明之另一具體實例中，包含式 (I) 或 (II) 之生長激素接合物之醫藥組成物可穩定使用超過 4 週且穩定儲存超過 3 年。

在本發明之另一具體實例中，包含式 (I) 或 (II) 之生長激素接合物之醫藥組成物可穩定使用超過 4 週且穩定儲存超過 2 年。

在本發明之另一具體實例中，包含式 (I) 或 (II) 之生長激素接合物之醫藥組成物可穩定使用超過 2 週且穩定儲存超過 2 年。

本文所引用之所有參考案 (包括公開案、專利申請案及專利) 係以引用的方式併入本文中，其引用程度如同各參考案經個別地且特定地指示以引用的方式併入本文中且在本文中全文闡述一般。

本文中之所有標題及子標題僅出於方便之目的使用，而不應視作以任何方式限制本發明。

除非本文另外指示或者上下文明顯矛盾，否則本發明涵蓋上述要素之任何組合的所有可能變化形式。

除非本文另外指示或上下文明顯矛盾，否則如描述本發明之上下文中所用之術語「一 (a/an)」及「該 (the)」以及類似指示物應解釋為涵蓋單數及複數兩者 (亦即一或

多個)。

除非本文另外指示，否則本文引述值之範圍僅欲用作個別提及屬於該範圍內之各個別值之簡寫方法，且各個別值係併入本說明書中，如同其在本文中經個別引述一般。除非另作說明，否則本文所提供之所有確切值表示相應近似值（例如，關於特定因數或量測值所提供之所有例示性確切值可視為亦提供適當時經「約」修飾之相應近似量測值）。

除非本文另外指示或者上下文明顯矛盾，否則本文所述之所有方法可以任何適合次序執行。

除非另外指示，否則使用本文所提供之任何及所有實例或例示性語言（例如「諸如」）僅欲更好地闡明本發明且不對本發明範疇構成限制。除非同樣明確說明，否則本說明書中之語言不應解釋為表明任何要素對於實施本發明必不可少。

本文引用及併入專利文件僅出於方便起見且不反映對該等專利文件之合法性、專利性及/或可執行性的任何觀點。

下文提供描述本發明之具體實例的非詳盡清單。

具體實例清單：

具體實例 1：一種生長激素接合物，其包含具有以下之生長激素化合物（GH）：

- a) 單一 Cys 突變，
- b) 額外二硫橋鍵，或
- c) 單一 Cys 突變及額外二硫橋鍵，

其中白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至該 GH，或其醫藥學上可接受之鹽。

2.如具體實例 1 之接合物，其中 GH 表示包含與人類生長激素（hGH）之胺基酸序列（SEQ ID NO: 1）具有至少 80%一致性，諸如與 hGH 具有至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%一致性之胺基酸序列的生長激素化合物，或 GH 為 hGH（SEQ ID NO: 1）。

3.如具體實例 1 之接合物，其中 GH 或 GH 接合物具有 hGH 之生長激素活性之至少 80%。

4.如具體實例 1 至 3 中任一具體實例之接合物，其中該白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至具有單一 Cys 突變之 GH。

5.如具體實例 4 之接合物，其中該單一 Cys 突變位於選自 GH 之 N-端、H1、H2、L2 或 H3 之區域中之任一者中。

6.如具體實例 5 之接合物，其中該 GH 具有選自以下任一者之單一 Cys 突變：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C。

7.如具體實例 1 至 3 中任一具體實例之接合物，其中該白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至具有額外二硫橋鍵之 GH。

8.如具體實例 7 之接合物，其中該額外二硫鍵位於環區段與螺旋區段之間或位於環區段內或位於環區段之間或位

於螺旋區段之間。

9.如具體實例 7 至 8 中任一具體實例之接合物，其中該 GH 包含額外二硫鍵，其中至少一個半胱胺酸存在於環區段中，諸如胺基酸殘基 128 至 154 (L3) 之環區段中。

10.如具體實例 7 至 9 中任一具體實例之接合物，其中該 GH 包含額外二硫鍵，其中該額外二硫鍵連接環區段與螺旋區段（諸如螺旋 B 或 H2）。

11.如具體實例 7 至 10 中任一具體實例之接合物，其中該額外二硫鍵連接 L3 與 H2。

12.如具體實例 7 至 11 中任一具體實例之接合物，其中該額外二硫橋鍵位於對應於 hGH (SEQ ID NO: 1) 中以下之位置之至少一個胺基酸對之間：R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C，諸如 Q84C/Y143C。

13.如具體實例 1 至 3 中任一具體實例之接合物，其中該白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至具有單一 Cys

突變及額外二硫橋鍵之 GH。

14.如具體實例 13 之接合物，其中該 GH 具有選自以下任一者之單一 Cys 突變：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C。

15.如具體實例 13 至 14 中任一具體實例之接合物，其中該額外二硫鍵位於環區段與螺旋區段之間或位於環區段內或位於環區段之間或位於螺旋區段之間。

16.如具體實例 13 至 15 中任一具體實例之接合物，其中該 GH 包含額外二硫鍵，其中至少一個半胱氨酸存在於環區段中，諸如胺基酸殘基 128 至 154 (L3) 之環區段中。

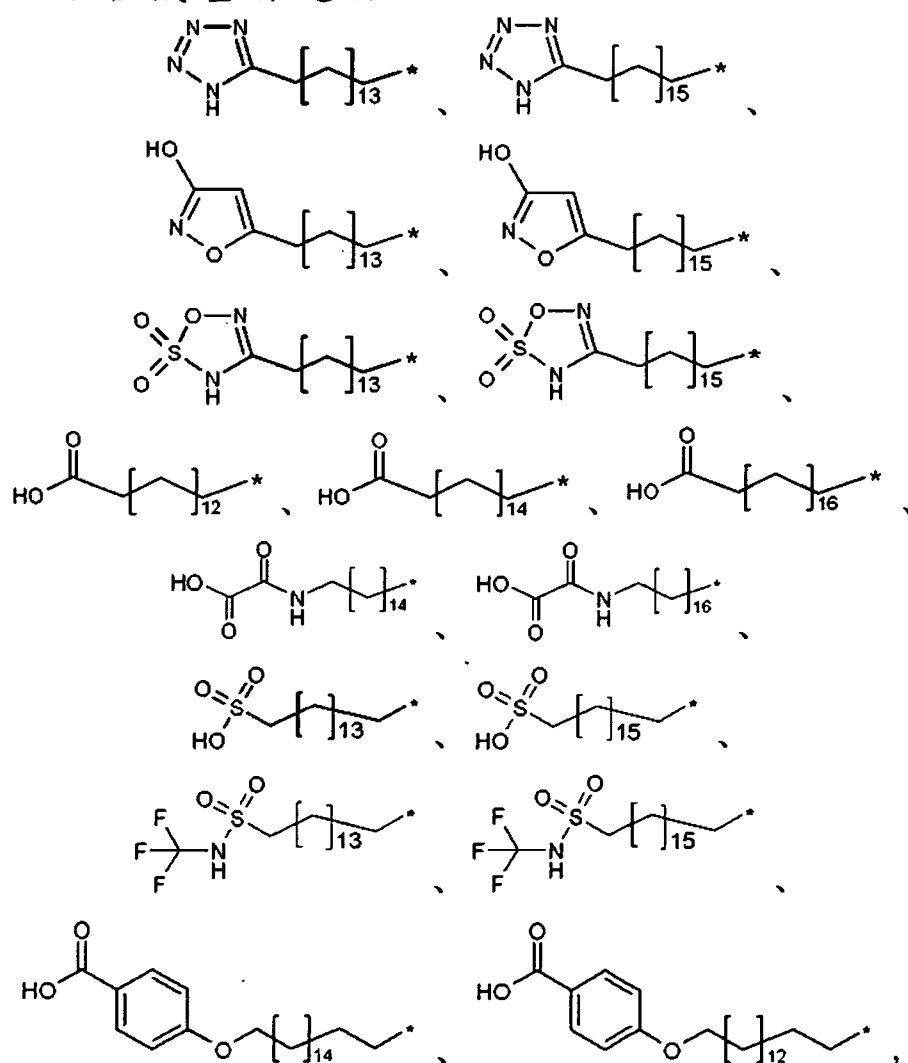
17.如具體實例 13 至 16 中任一具體實例之接合物，其中該 GH 包含額外二硫鍵，其中該額外二硫鍵連接環區段與螺旋區段（諸如螺旋 B 或 H2）。

18.如具體實例 13 至 17 中任一具體實例之接合物，其中該額外二硫鍵連接環區段（諸如胺基酸殘基 128 至 154L3 之環區段）與螺旋 B 或 H2。

19.如具體實例 13 至 18 中任一具體實例之接合物，其中該額外二硫橋鍵位於對應於 hGH (SEQ ID NO: 1) 中以下之位置之至少一個胺基酸對之間：R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、

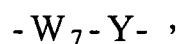
F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、
I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、
P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、
R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、
Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、
P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、
V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或
V185C/S188C，諸如 Q84C/Y143C。

20. 如具體實例 1 至 19 中任一具體實例之接合物，其中
該白蛋白結合殘基係選自



其中*表示經由連接白蛋白結合殘基與親水性間隔基之化學基團連接至親水性間隔基。

21.如具體實例 1 至 20 中任一具體實例之接合物，其中連接該白蛋白結合殘基與該親水性間隔基之該化學基團具有下式：



其中

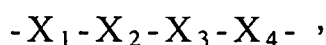
Y 為 $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ 環烷基 $-W_8$ -或價鍵，

17 為 0-6，

W_7 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s3}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s3$ 為 0 或 1，

W_8 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s4}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s4$ 為 0 或 1。

22.如具體實例 1 至 21 中任一具體實例之接合物，其中該親水性間隔基具有下式：



其中

X_1 為 $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ，

X_2 為 $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

X_3 為 $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$,

X_4 為 $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$,

11、12、13、14、15 及 16 獨立地選自 0-16 ,

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 及 $m7$ 獨立地選自 0-10 ,

$m2$ 及 $m5$ 獨立地選自 0-25 ,

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 及 $n4$ 獨立地選自 0-16 ,

F 為芳基、雜芳基、吡咯啉-2,5-二酮或價鍵，其中芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} 烷基，

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及 R^5 獨立地選自氫、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 C_{1-6} 烷基、芳基或雜芳基；其中烷基、芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ 或 $-OH$ ，

$D1$ 、 $D2$ 、 $E1$ 及 $E2$ 獨立地選自 $-O-$ 、 $-N(R^6)-$ 、 $-N(C(O)R^7)-$ 或價鍵；其中 R^6 及 R^7 獨立地表示氫或 C_{1-6} 烷基，

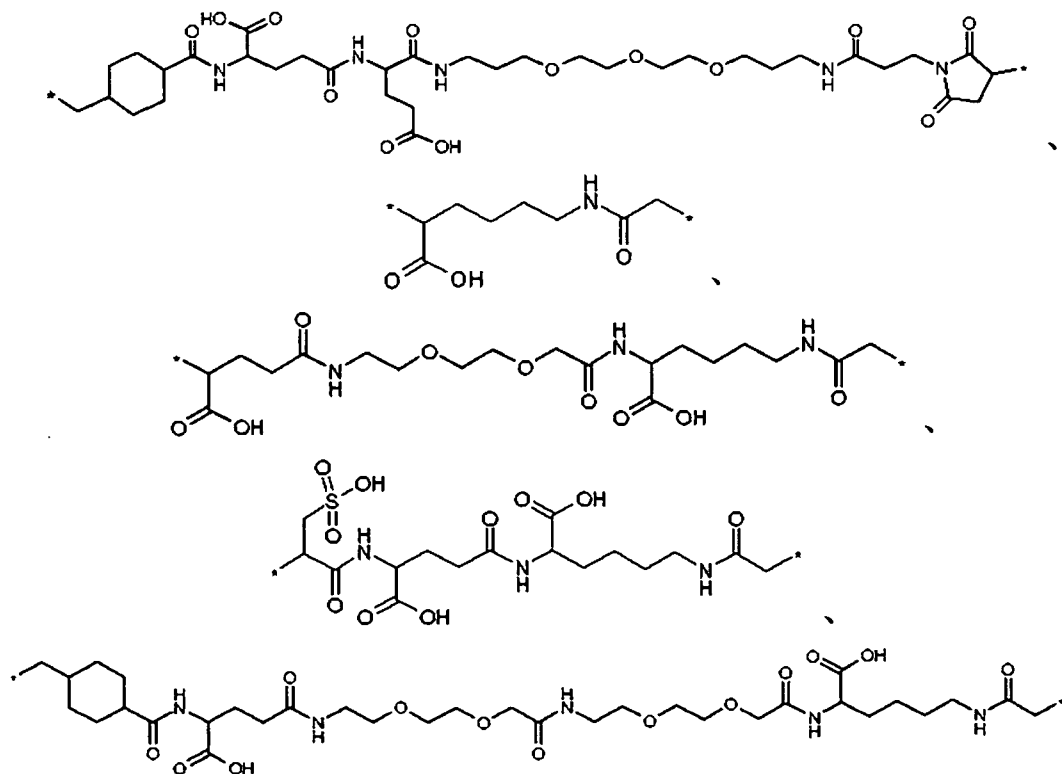
W_1 至 W_5 獨立地選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s2$ 為 0 或 1，

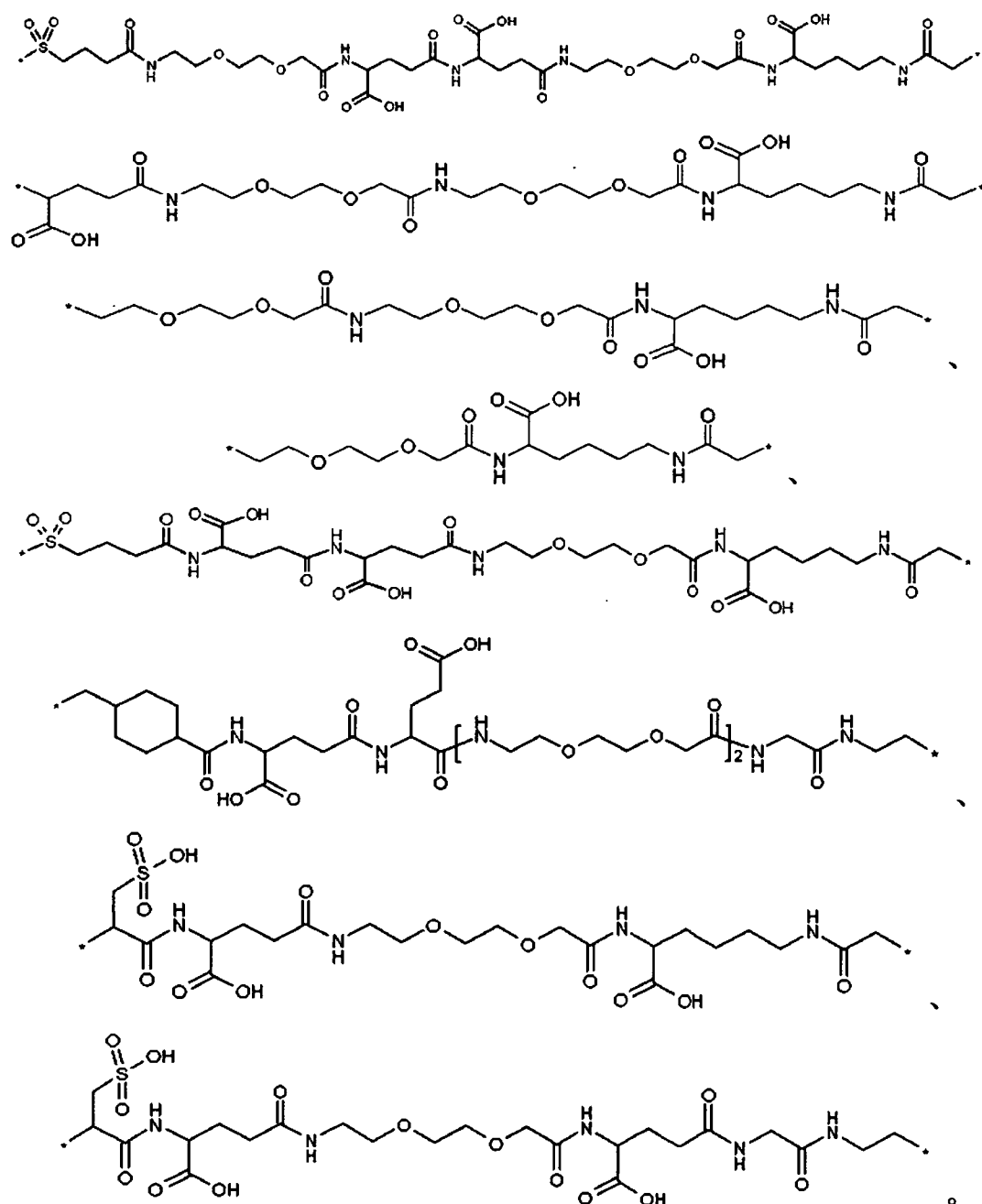
W_6 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、

-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、
-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s1}-、-C(O)-、-C(O)O-、
-OC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆ 烷基、-C(O)NHC₁₋₆ 烷基或價鍵；其
中 s1 為 0 或 1，且 C₁₋₆ 烷基視情況經以下基團取代：側氧
基、吡咯啉-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH₂COOH 或
-NHC(O)CH₂CH*COOH；其中(*)指示 CH 之碳原子與 X₄ 之
連接點。

23.如具體實例 1 至 22 中任一具體實例之接合物，其中
X₄ 為價鍵且 W₆ 係選自吡咯啉-2,5-二酮、
-NHC(O)CH*CH₂COOH 或 -NHC(O)CH₂CH*COOH，其中(*)
指示 CH 之碳原子與 GH 之連接點。

24.如具體實例 22 之接合物，其中該親水性間隔基係選
自





25. 一種生長激素接合物，其中該生長激素接合物具有式 (I)：

A-W-B-GH (I)

其中

GH 表示具有單一 Cys 突變之生長激素化合物，

B 表示連接至該 Cys 突變之硫殘基之親水性間隔基，

W 為連接 A 與 B 之化學基團，及

A 表示白蛋白結合殘基；及

其醫藥學上可接受之鹽。

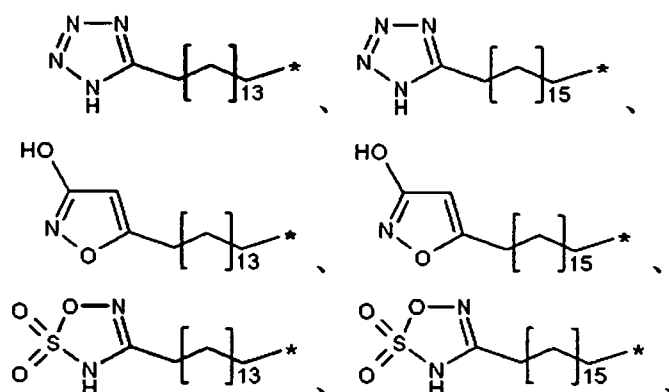
26.如具體實例 25 之接合物，其中 GH 表示包含與人類生長激素 (hGH) 之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 80% 一致性，諸如與 hGH 具有至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 一致性之胺基酸序列的生長激素化合物，或 GH 為 hGH (SEQ ID NO: 1)。

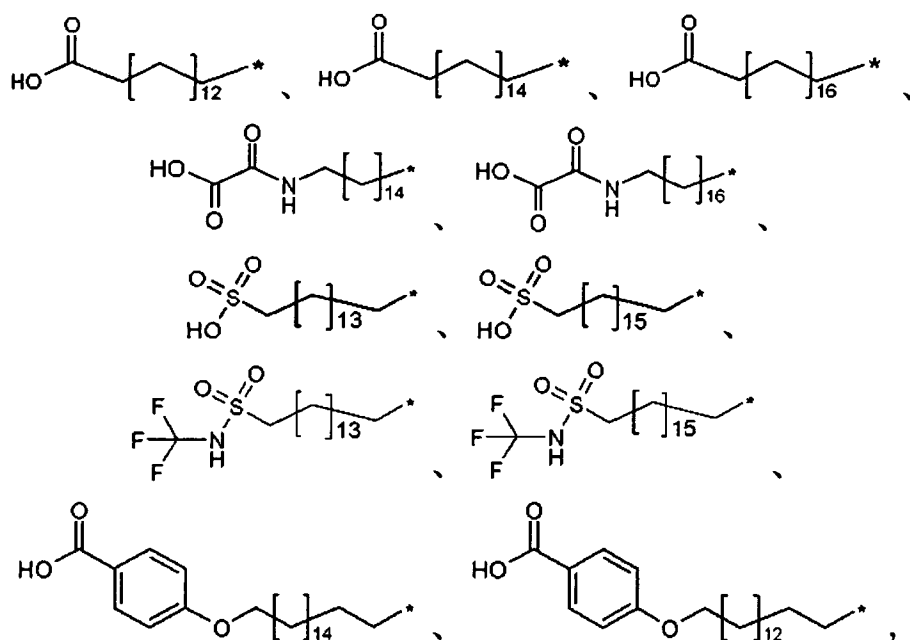
27.如具體實例 25 之接合物，其中 GH 或 GH 接合物具有 hGH 之生長激素活性之至少 80%。

28.如具體實例 25 至 27 中任一具體實例之接合物，其中該單一 Cys 突變位於選自 GH 之 N-端、H1、H2、L2 或 H3 之區域中之任一者中。

29.如具體實例 25 至 28 中任一具體實例之接合物，其中該 GH 具有選自以下任一者之單一 Cys 突變：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C。

30.如具體實例 25 至 29 中任一具體實例之接合物，其中 A 係選自





其中*表示經由 W 連接至 B。

31.如具體實例 25 至 30 中任一具體實例之接合物，其中 W 具有下式：

-W₇-Y-

其中

Y 為 -(CH₂)₁₇-C₃₋₁₀ 環烷基-W₈-或價鍵，

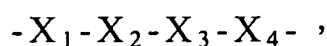
17 為 0-6，

W₇ 係選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或價鍵；其中 s₃ 為 0 或 1，

W₈ 係選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-、-C(O)-、-C(O)O-、

-OC(O)-或價鍵；其中 s_4 為 0 或 1。

32.如具體實例 25 至 31 中任一具體實例之接合物，其中 B 具有下式：



其中

X_1 為 $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ，

X_2 為 $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ，

X_3 為 $-[(CHR^5)_{l5}-W_6]_{m7}-$ ，

X_4 為 $F-D1-(CH_2)_{l6}-D2-$ ，

$l1$ 、 $l2$ 、 $l3$ 、 $l4$ 、 $l5$ 及 $l6$ 獨立地選自 0-16，

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 及 $m7$ 獨立地選自 0-10，

$m2$ 及 $m5$ 獨立地選自 0-25，

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 及 $n4$ 獨立地選自 0-16，

F 為芳基、雜芳基、吡咯啉-2,5-二酮或價鍵，其中芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆ 烷基，

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及 R^5 獨立地選自氫、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆ 烷基、芳基或雜芳基；其中烷基、芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH，

$D1$ 、 $D2$ 、 $E1$ 及 $E2$ 獨立地選自 -O-、-N(R⁶)-、-N(C(O)R⁷)-或價鍵；其中 R^6 及 R^7 獨立地表示氫或 C₁₋₆ 烷基，

W_1 至 W_5 獨立地選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、

-C(O)NHCH₂- 、 -CH₂NHC(O)- 、 -C(O)NHS(O)₂- 、
 -S(O)₂NHC(O)- 、 -OC(O)NH- 、 -NHC(O)O- 、 -C(O)CH₂- 、
 -CH₂C(O)- 、 -C(O)CH=CH- 、 -CH=CHC(O)- 、 -(CH₂)_{s2}- 、
 -C(O)- 、 -C(O)O- 、 -OC(O)-或價鍵；其中 s2 為 0 或 1，

W₆ 係選自 -C(O)NH- 、 -NHC(O)- 、 -C(O)NHCH₂- 、
 -CH₂NHC(O)- 、 -C(O)NHS(O)₂- 、 -S(O)₂NHC(O)- 、
 -OC(O)NH- 、 -NHC(O)O- 、 -C(O)CH₂- 、 -CH₂C(O)- 、
 -C(O)CH=CH- 、 -CH=CHC(O)- 、 -(CH₂)_{s1}- 、 -C(O)- 、 -C(O)O- 、
 -OC(O)- 、 -NHC(O)C₁₋₆ 烷基 、 -C(O)NHC₁₋₆ 烷基或價鍵；其
 中 s1 為 0 或 1，且 C₁₋₆ 烷基視情況經以下基團取代：側氧
 基 、 吡 咯 啉 -2,5- 二 酮 、 -NHC(O)CH*CH₂COOH 或
 -NHC(O)CH₂CH*COOH；其中(*)指示 CH 之碳原子與 X₄ 之
 連接點。

33.如具體實例 25 至 32 中任一具體實例之接合物，其
 中

11、12、13、14、15 及 16 獨立地為 0-6，

m1、m3、m4、m6 及 m7 獨立地為 0-6，

m2 及 m5 獨立地為 0-10，及

n1、n2、n3 及 n4 獨立地為 0-10。

34.如具體實例 25 至 33 中任一具體實例之接合物，其
 中 D1 及 D2 獨立地選自 -O-或-N(R⁶)-或價鍵。

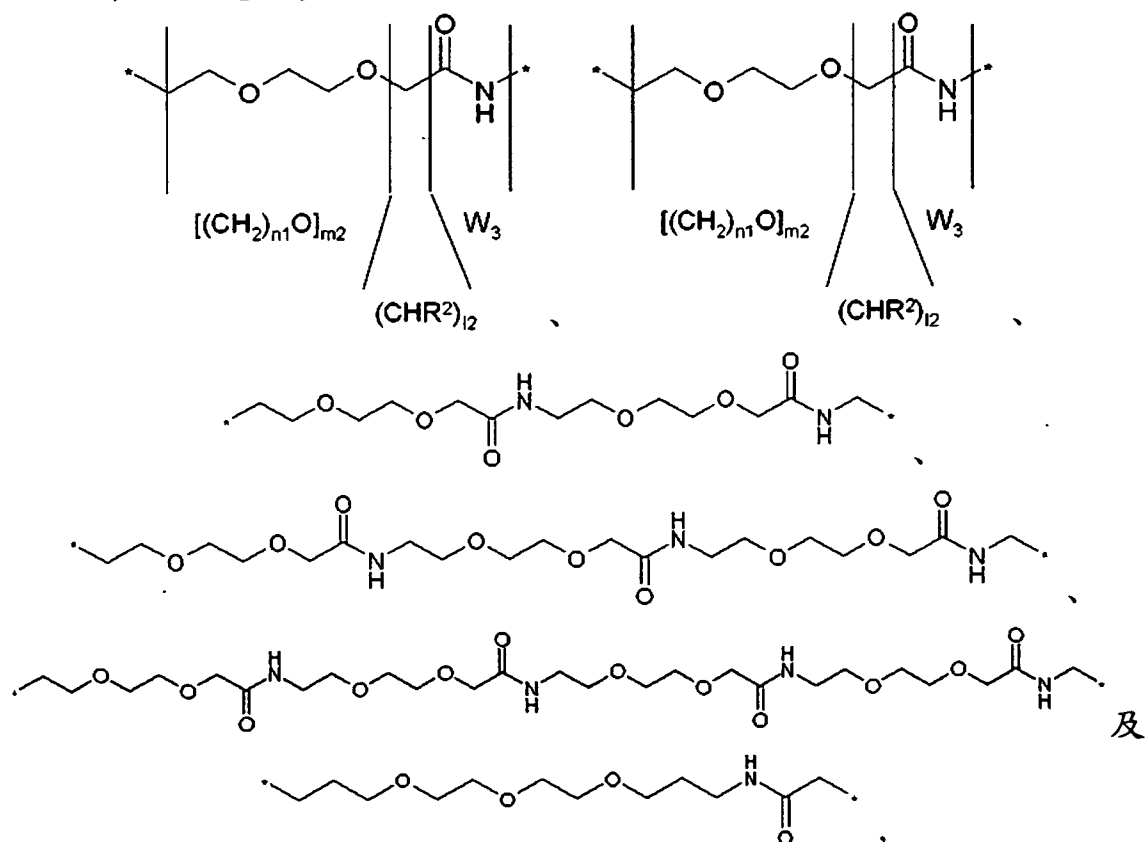
35.如具體實例 25 至 34 中任一具體實例之接合物，其
 中 E1 及 E2 獨立地選自 -O-或-N(R⁶)-或價鍵。

36.如具體實例 25 至 35 中任一具體實例之接合物，其

中 W_1 至 W_8 獨立地選自由以下組成之群： $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-NHC(O)C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)NHC_{1-6}$ 烷基或價鍵；其中烷基視情況經以下基團取代：側氧基、吡咯啉-2,5-二酮、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ 或 $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ；其中(*)指示 CH 之碳原子與 X_4 之連接點。

37. 如具體實例 25 至 36 中任一具體實例之接合物，其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及 R^5 獨立地選自氫、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代： $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 $-S(O)_2OH$ 。

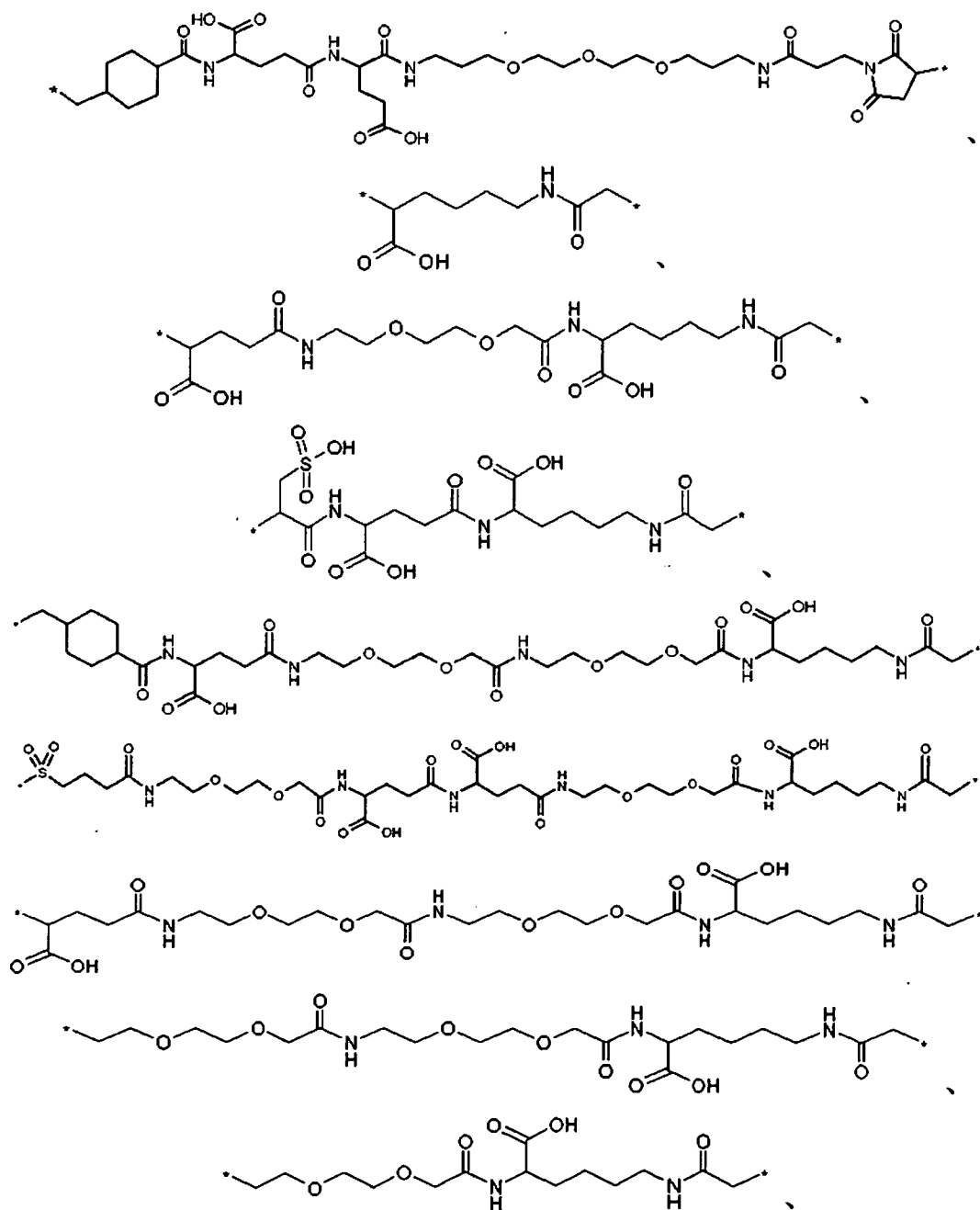
38. 如具體實例 25 至 37 中任一具體實例之接合物，其中 $- \{ [(CH_2)_{n1}E1]_{m2} - [(CHR^2)_{l2} - W_3]_{m3} \}_{n2} -$ 及 $- \{ [(CH_2)_{n3}E2]_{m5} - [(CHR^4)_{l4} - W_5]_{m6} \}_{n4} -$ (其中 $E1$ 及 $E2$ 為 $-O-$) 係選自

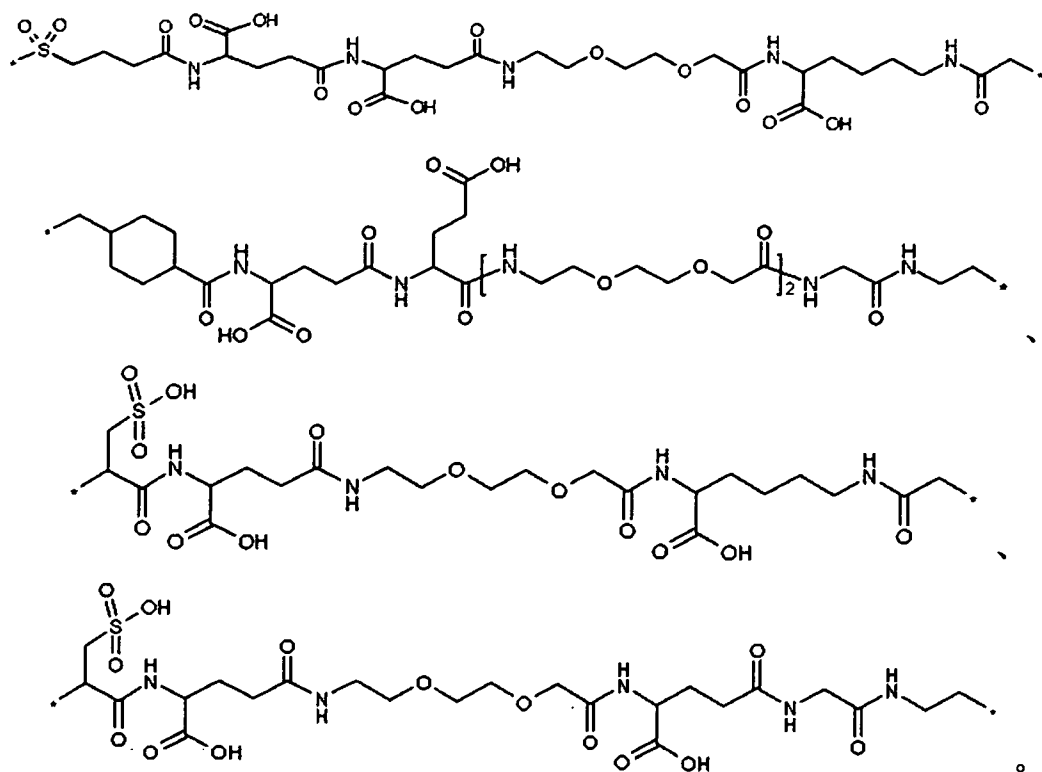


其中*意欲表示連接點，亦即開鍵。

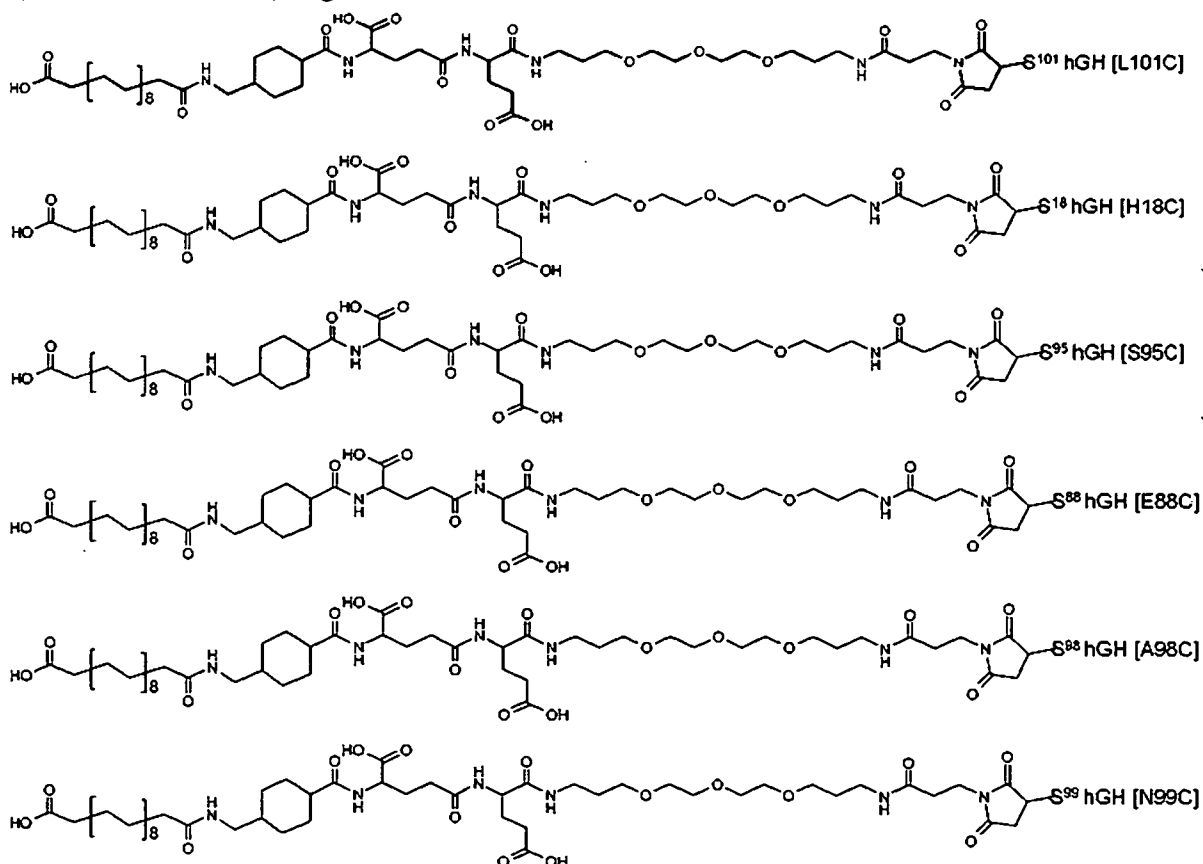
39.如具體實例 25 至 38 中任一具體實例之接合物，其中 X_4 為價鍵且 W_6 係選自吡咯啉-2,5-二酮、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ 或 $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ，其中(*)指示 CH 之碳原子與 GH 之連接點。

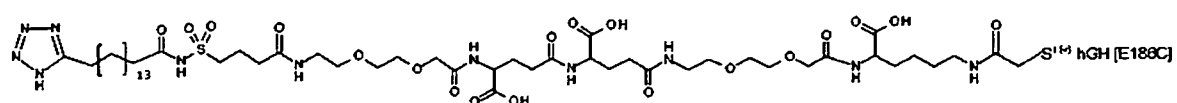
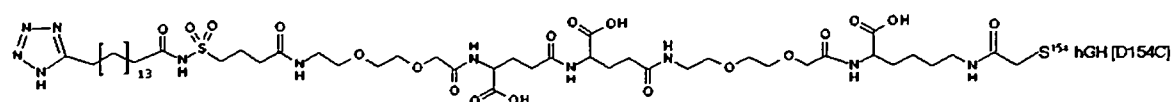
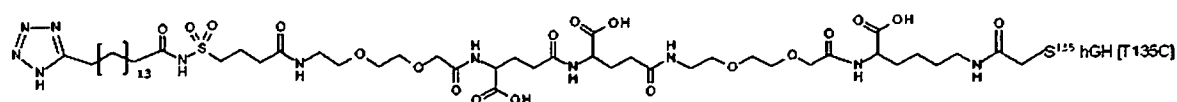
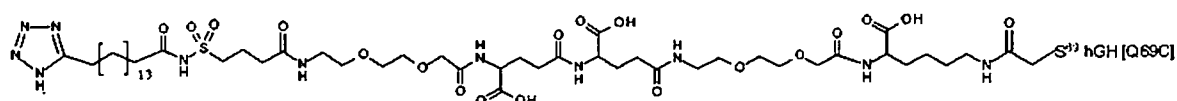
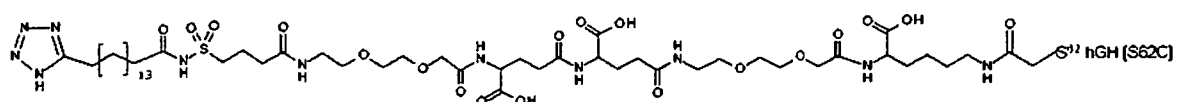
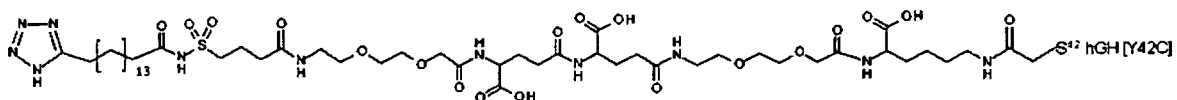
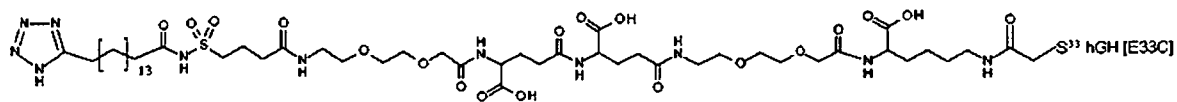
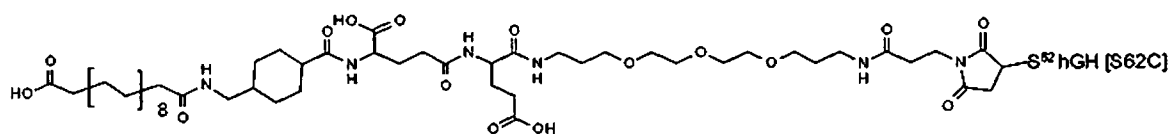
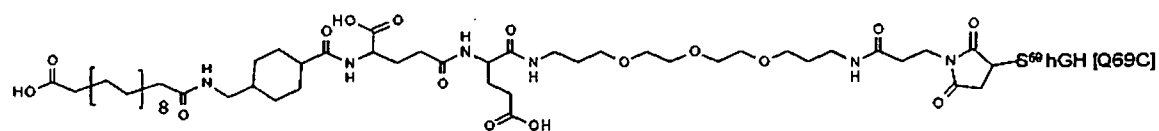
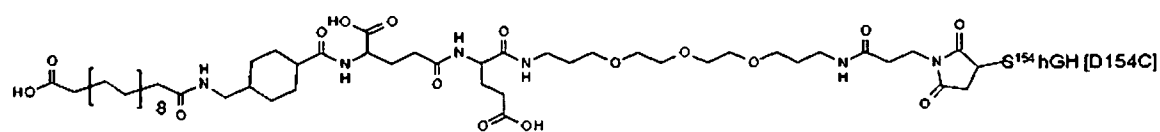
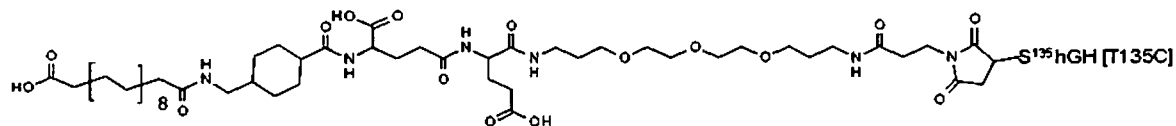
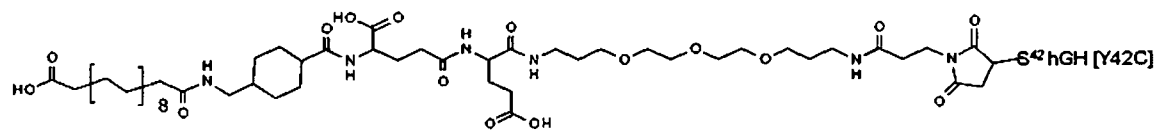
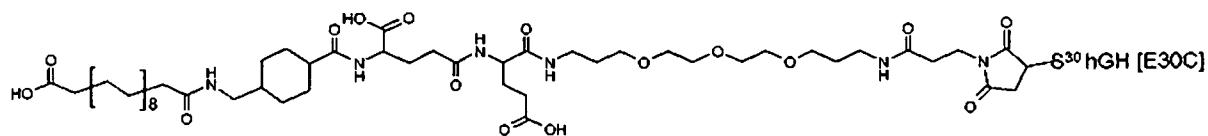
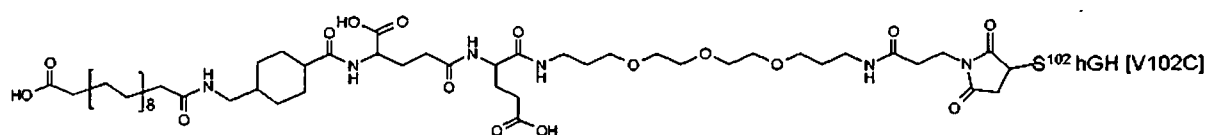
40.如具體實例 25 至 39 中任一具體實例之接合物，其中 B 係選自

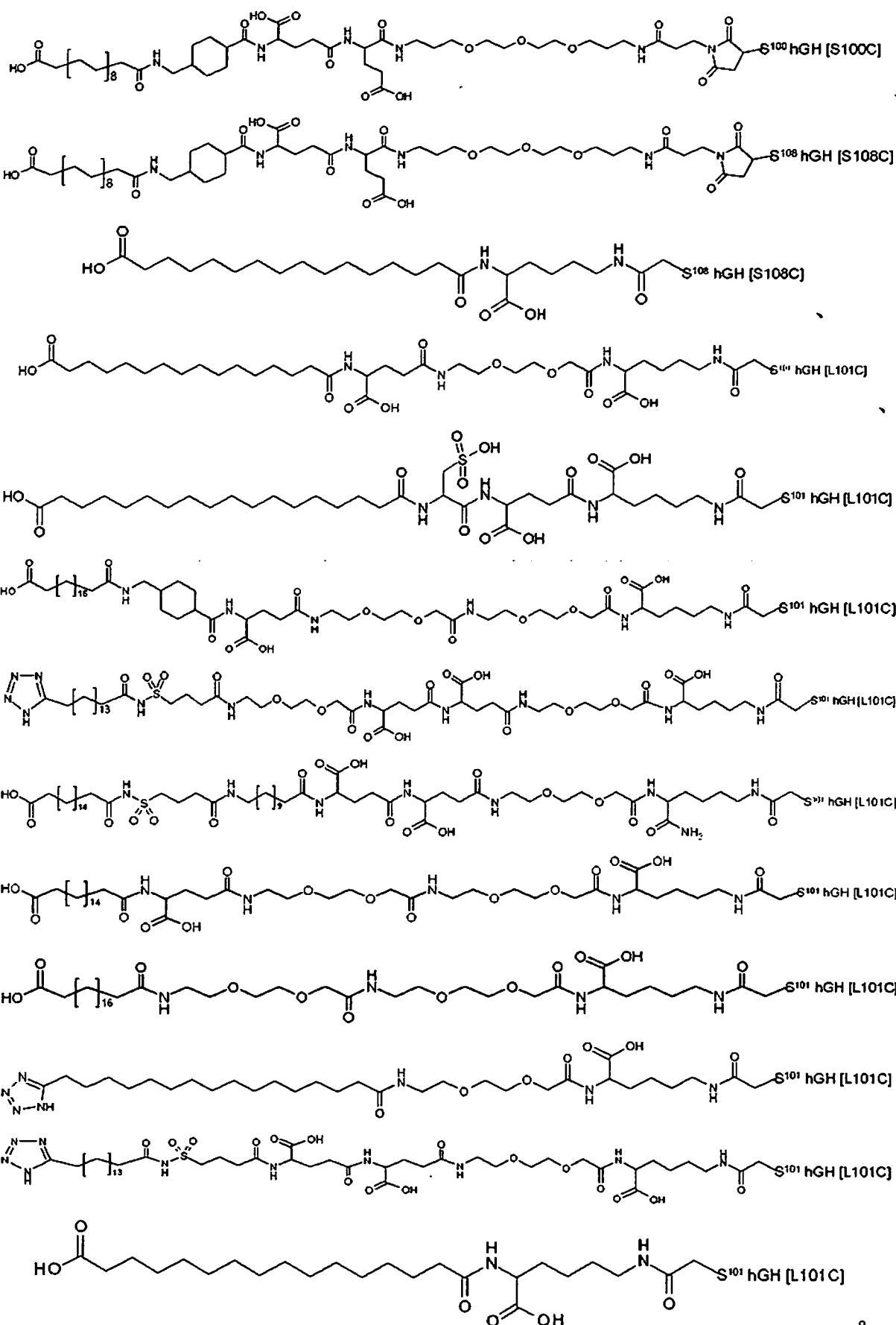




41.如具體實例 25 至 40 中任一具體實例之接合物，其中該化合物係選自







42. 一種生長激素接合物，其中該生長激素接合物具有

式 (I) :

A-W-B-GH (I)

其中

GH 表示具有額外二硫橋鍵之生長激素化合物，

B 表示親水性間隔基，

W 為連接 A 與 B 之化學基團，及

A 表示白蛋白結合殘基；及

其醫藥學上可接受之鹽。

43.如具體實例 42 之接合物，其中 GH 表示包含與人類生長激素 (hGH) 之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 80% 一致性，諸如與 hGH 具有至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 一致性之胺基酸序列的生長激素化合物，或 GH 為 hGH (SEQ ID NO: 1)。

44.如具體實例 42 之接合物，其中 GH 或 GH 接合物具有 hGH 之生長激素活性之至少 80%。

45.如具體實例 44 之接合物，其中該活性係在試管內 BAF 檢定 (檢定 I) 中量測。

46.如具體實例 42 至 45 中任一具體實例之接合物，其中該 GH 在環區段與螺旋區段之間或在環區段內或在環區段之間或在螺旋區段之間包含額外二硫鍵。

47.如具體實例 42 至 46 中任一具體實例之接合物，其中該 GH 包含額外二硫鍵，其中至少一個半胱胺酸存在於環區段中，諸如胺基酸殘基 128 至 154 (L3) 之環區段中。

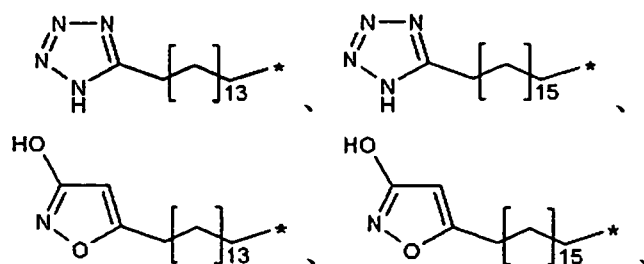
48.如具體實例 42 至 47 中任一具體實例之接合物，其

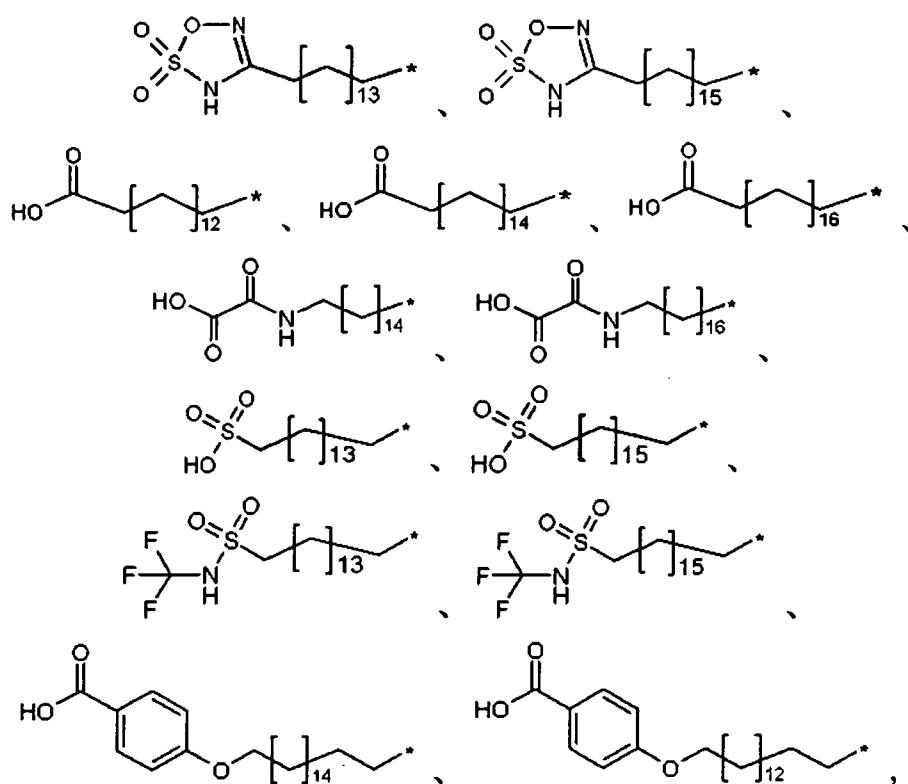
中該 GH 包含額外二硫鍵，其中該額外二硫鍵連接環區段與螺旋區段（諸如螺旋 B 或螺旋 2）。

49.如具體實例 42 至 48 中任一具體實例之接合物，其中該 GH 包含額外二硫鍵，其中該額外二硫鍵連接 L3（128-154）與螺旋 B 或螺旋 2。

50.如具體實例 42 至 49 中任一具體實例之接合物，其中該額外二硫橋鍵位於對應於 hGH（SEQ ID NO: 1）中以下之位置之至少一個胺基酸對之間：R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C，諸如 Q84C/Y143C。

51.如具體實例 42 至 50 中任一具體實例之接合物，其中 A 係選自





其中*表示經由 W 連接至 B。

52.如具體實例 42 至 51 中任一具體實例之接合物，其中 W 具有下式：

-W₇-Y-

其中

Y 為 -(CH₂)₁₇-C₃₋₁₀ 環烷基-W₈-或價鍵，

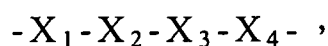
17 為 0-6，

W₇ 係選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或價鍵；其中 s3 為 0 或 1，

W₈ 係選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、

-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、
-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-、-C(O)-、-C(O)O-、
-OC(O)-或價鍵；其中 s₄ 為 0 或 1。

53.如具體實例 42 至 52 中任一具體實例之接合物，其中 B 具有下式：



其中

X₁ 為 -W₁-[(CHR¹)₁₁-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)₁₂-W₃]_{m3}}_{n2}-，

X₂ 為 -[(CHR³)₁₃-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)₁₄-W₅]_{m6}}_{n4}-，

X₃ 為 -[(CHR⁵)₁₅-W₆]_{m7}-，

X₄ 為 F-D1-(CH₂)₁₆-D2-，

11、12、13、14、15 及 16 獨立地選自 0-16，

m₁、m₃、m₄、m₆ 及 m₇ 獨立地選自 0-10，

m₂ 及 m₅ 獨立地選自 0-25，

n₁、n₂、n₃ 及 n₄ 獨立地選自 0-16，

F 為芳基、雜芳基、吡咯啉-2,5-二酮或價鍵，其中芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆ 烷基，

R¹、R²、R³、R⁴ 及 R⁵ 獨立地選自氫、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆ 烷基、芳基或雜芳基；其中烷基、芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH，

D1、D2、E1 及 E2 獨立地選自 -O-、-N(R⁶)-、-N(C(O)R⁷)-

或價鍵；其中 R^6 及 R^7 獨立地表示氫或 C_{1-6} 烷基，

W_1 至 W_5 獨立地選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s2$ 為 0 或 1，

W_6 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s1}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-NHC(O)C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)NHC_{1-6}$ 烷基或價鍵；其中 $s1$ 為 0 或 1，且 C_{1-6} 烷基視情況經以下基團取代：側氧基、吡咯啉-2,5-二酮、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ 或 $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ；其中(*)指示 CH 之碳原子與 X_4 之連接點。

54.如具體實例 42 至 53 中任一具體實例之接合物，其中

11 、 12 、 13 、 14 、 15 及 16 獨立地為 $0-6$ ，

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 及 $m7$ 獨立地為 $0-6$ ，

$m2$ 及 $m5$ 獨立地為 $0-10$ ，及

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 及 $n4$ 獨立地為 $0-10$ 。

55.如具體實例 42 至 54 中任一具體實例之接合物，其中 $D1$ 及 $D2$ 獨立地選自 $-O-$ 或 $-N(R^6)-$ 或價鍵。

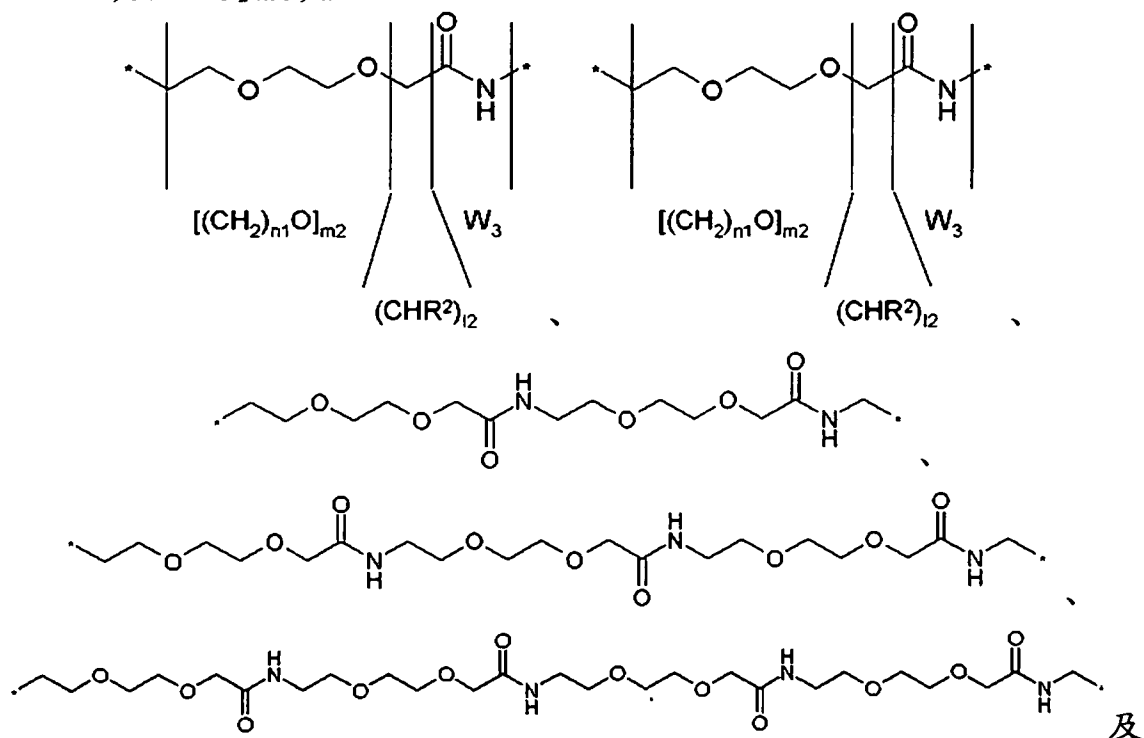
56.如具體實例 42 至 55 中任一具體實例之接合物，其

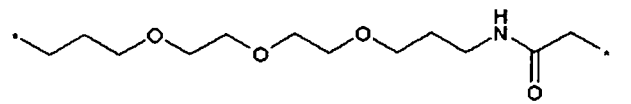
中 E1 及 E2 獨立地選自 -O- 或 -N(R⁶)- 或價鍵。

57. 如具體實例 42 至 56 中任一具體實例之接合物，其中 W₁ 至 W₈ 獨立地選自由以下組成之群：-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆ 烷基或 -C(O)NHC₁₋₆ 烷基或價鍵；其中烷基視情況經以下基團取代：側氧基、吡咯啉-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH₂COOH 或 -NHC(O)CH₂CH*COOH；其中(*)指示 CH 之碳原子與 X₄ 之連接點。

58. 如具體實例 42 至 57 中任一具體實例之接合物，其中 R¹、R²、R³、R⁴ 及 R⁵ 獨立地選自氫、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆ 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代：-C(O)OH、-C(O)NH₂ 或 -S(O)₂OH。

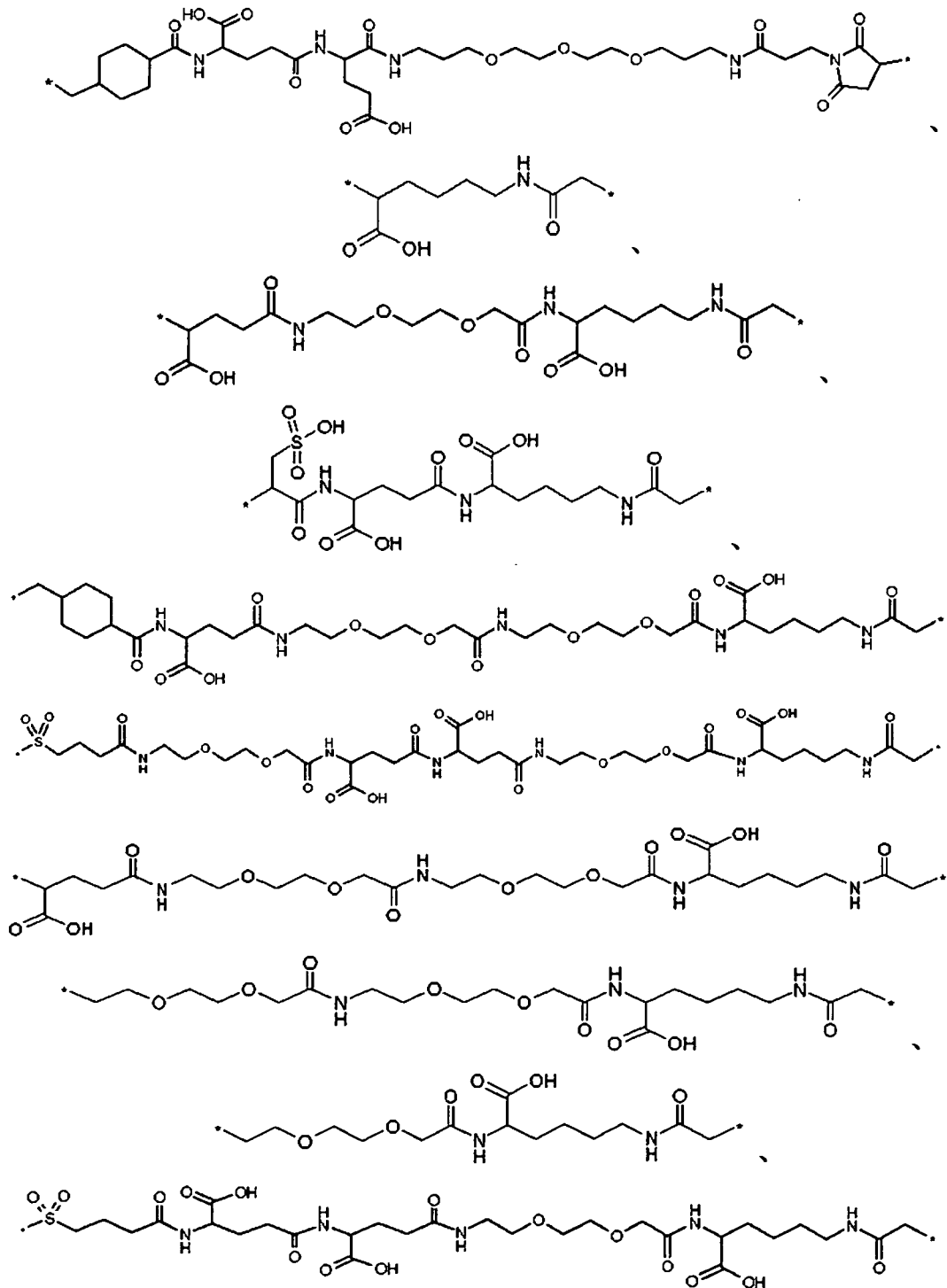
59. 如具體實例 42 至 58 中任一具體實例之接合物，其中 -{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{l2}-W₃]_{m3}}_{n2}- 及 -{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)_{l4}-W₅]_{m6}}_{n4}- (其中 E1 及 E2 為 -O-) 係選自

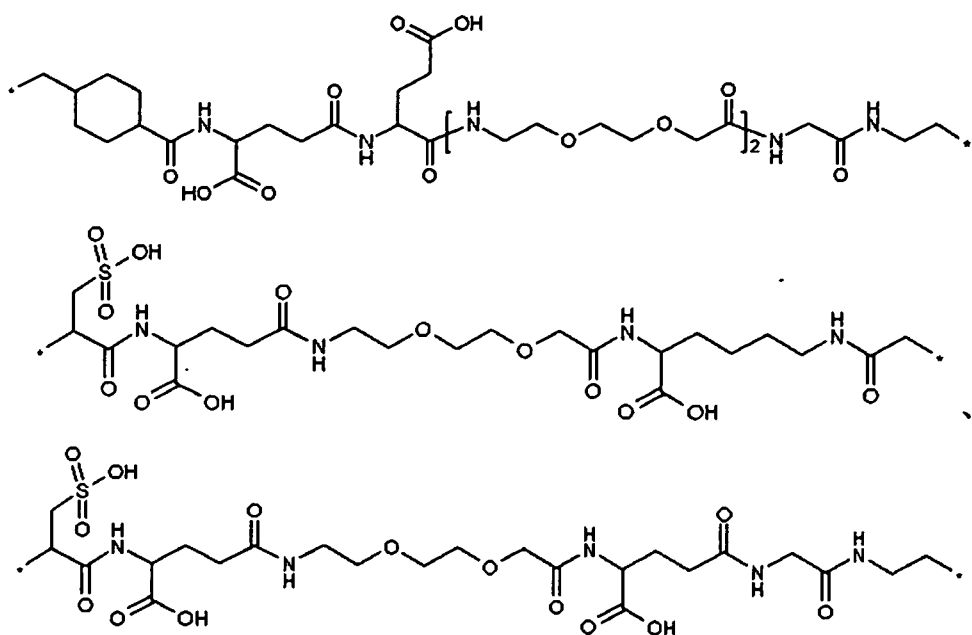




其中*意欲表示連接點，亦即開鍵。

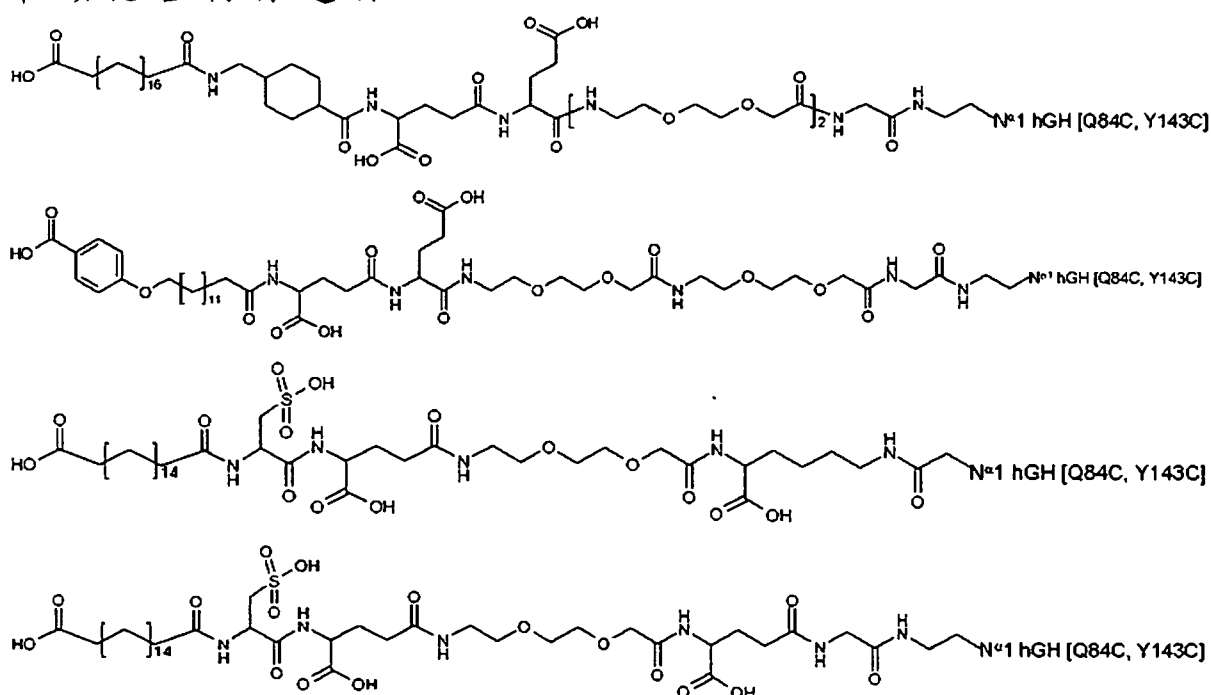
60.如具體實例 42 至 59 中任一具體實例之接合物，其中 B 係選自





61.如具體實例 42 至 60 中任一具體實例之接合物，其中 A 經由 B 連接至對應於 hGH SEQ ID NO: 1 中位置 40、位置 141 之位置之麩醯胺酸殘基或生長激素化合物之 N-端殘基。

62.如具體實例 42 至 61 中任一具體實例之接合物，其中該化合物係選自



63.一種生長激素接合物，其中該生長激素接合物具有

式 (I) :

A-W-B-GH (I)

其中

GH 表示具有單一 Cys 突變及額外二硫橋鍵之生長激素化合物，

B 表示連接至該 Cys 突變之硫殘基之親水性間隔基，

W 為連接 A 與 B 之化學基團，及

A 表示白蛋白結合殘基；及

其醫藥學上可接受之鹽。

64. 如具體實例 63 之接合物，其中 GH 表示包含與人類生長激素 (hGH) 之胺基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 80% 一致性，諸如與 hGH 具有至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 一致性之胺基酸序列的生長激素化合物，或 GH 為 hGH (SEQ ID NO: 1)。

65. 如具體實例 64 之接合物，其中 GH 或 GH 接合物具有 hGH 之生長激素活性之至少 80%。

66. 如具體實例 63 至 65 中任一具體實例之接合物，其中該單一 Cys 突變位於選自 GH 之 N-端、H1、H2、L2 或 H3 之區域中之任一者中。

67. 如具體實例 63 至 66 中任一具體實例之接合物，其中該 GH 具有選自以下任一者之單一 Cys 突變：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、

N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C 及 G190C，諸如以下任一者：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C。

68.如具體實例 63 至 67 中任一具體實例之接合物，其中該額外二硫鍵位於環區段與螺旋區段之間或位於環區段內或位於環區段之間或位於螺旋區段之間。

69.如具體實例 63 至 68 中任一具體實例之接合物，其中該 GH 包含額外二硫鍵，其中至少一個半胱氨酸存在於環區段中，諸如胺基酸殘基 128 至 154 (L3) 之環區段中。

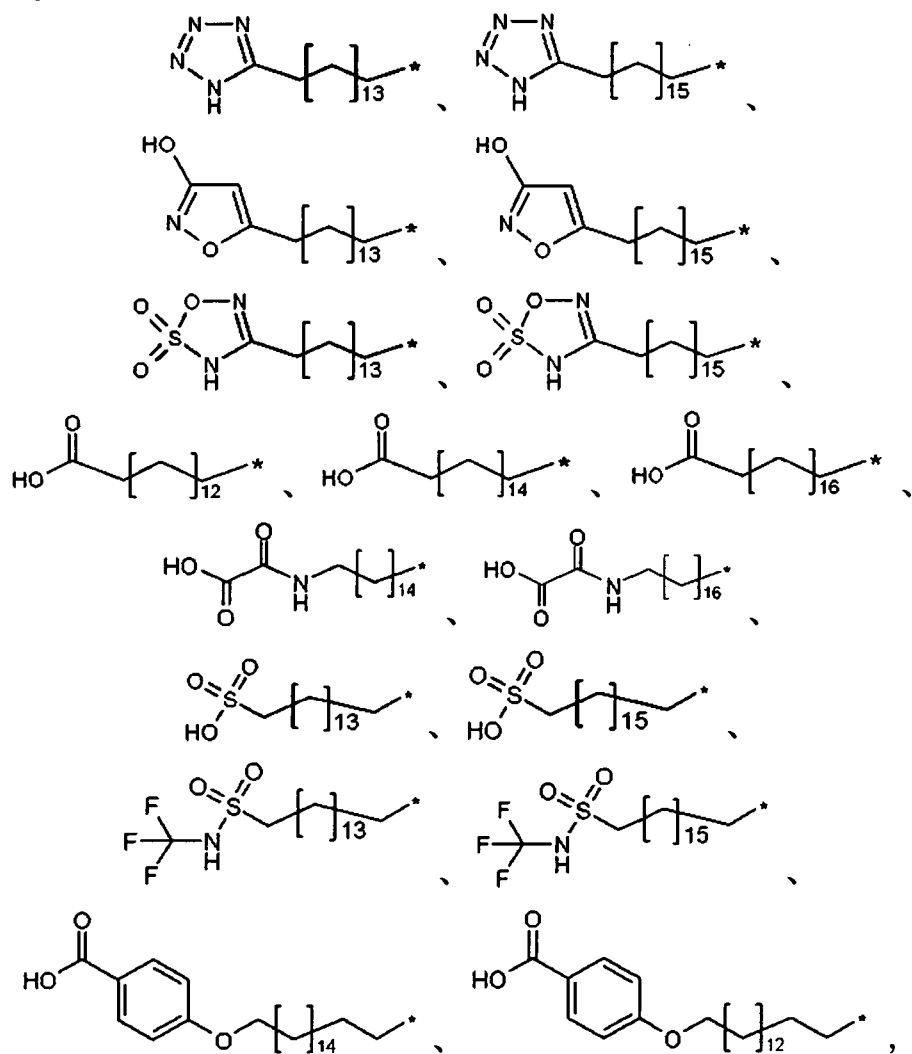
70.如具體實例 63 至 69 中任一具體實例之接合物，其中該額外二硫鍵連接環區段與螺旋區段 (諸如 H2)。

71.如具體實例 63 至 70 中任一具體實例之接合物，其中該額外二硫鍵連接 L3 與螺旋 H2。

72.如具體實例 63 至 71 中任一具體實例之接合物，其中該額外二硫橋鍵位於對應於 hGH (SEQ ID NO: 1) 中以下之位置之至少一個胺基酸對之間：R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、

I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、
P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、
R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、
Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、
P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、
V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或
V185C/S188C，諸如 Q84C/Y143C。

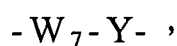
73. 如具體實例 63 至 72 中任一具體實例之接合物，其
中 A 係選自



其中*表示經由 W 連接至 B。

74. 如具體實例 63 至 73 中任一具體實例之接合物，其

中 W 具有下式：



其中

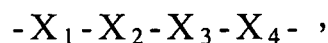
Y 為 $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ 環烷基 $-W_8$ -或價鍵，

17 為 0-6，

W_7 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s3}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s3$ 為 0 或 1，

W_8 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s4}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s4$ 為 0 或 1。

75.如具體實例 63 至 74 中任一具體實例之接合物，其中 B 具有下式：



其中

X_1 為 $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ，

X_2 為 $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ，

X_3 為 $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ ，

X_4 為 $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ ，

11、12、13、14、15 及 16 獨立地選自 0-16，

m_1 、 m_3 、 m_4 、 m_6 及 m_7 獨立地選自 0-10，

m_2 及 m_5 獨立地選自 0-25，

n_1 、 n_2 、 n_3 及 n_4 獨立地選自 0-16，

F 為芳基、雜芳基、吡咯啉-2,5-二酮或價鍵，其中芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆ 烷基，

R¹、R²、R³、R⁴ 及 R⁵ 獨立地選自氫、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆ 烷基、芳基或雜芳基；其中烷基、芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH，

D1、D2、E1 及 E2 獨立地選自 -O-、-N(R⁶)-、-N(C(O)R⁷)- 或價鍵；其中 R⁶ 及 R⁷ 獨立地表示氫或 C₁₋₆ 烷基，

W₁ 至 W₅ 獨立地選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或價鍵；其中 s2 為 0 或 1，

W₆ 係選自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s1}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆ 烷基、-C(O)NHC₁₋₆ 烷基或價鍵；其中 s1 為 0 或 1，且 C₁₋₆ 烷基視情況經以下基團取代：側氧

基、吡咯啉-2,5-二酮、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}^*\text{CH}_2\text{COOH}$ 或 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}^*\text{COOH}$ ；其中(*)指示 CH 之碳原子與 X_4 之連接點。

76.如具體實例 63 至 75 中任一具體實例之接合物，其中 11、12、13、14、15 及 16 獨立地為 0-6，

m_1 、 m_3 、 m_4 、 m_6 及 m_7 獨立地為 0-6，

m_2 及 m_5 獨立地為 0-10，及

n_1 、 n_2 、 n_3 及 n_4 獨立地為 0-10。

77.如具體實例 63 至 75 中任一具體實例之接合物，其中 D_1 及 D_2 獨立地選自 $-\text{O}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}^6)-$ 或價鍵。

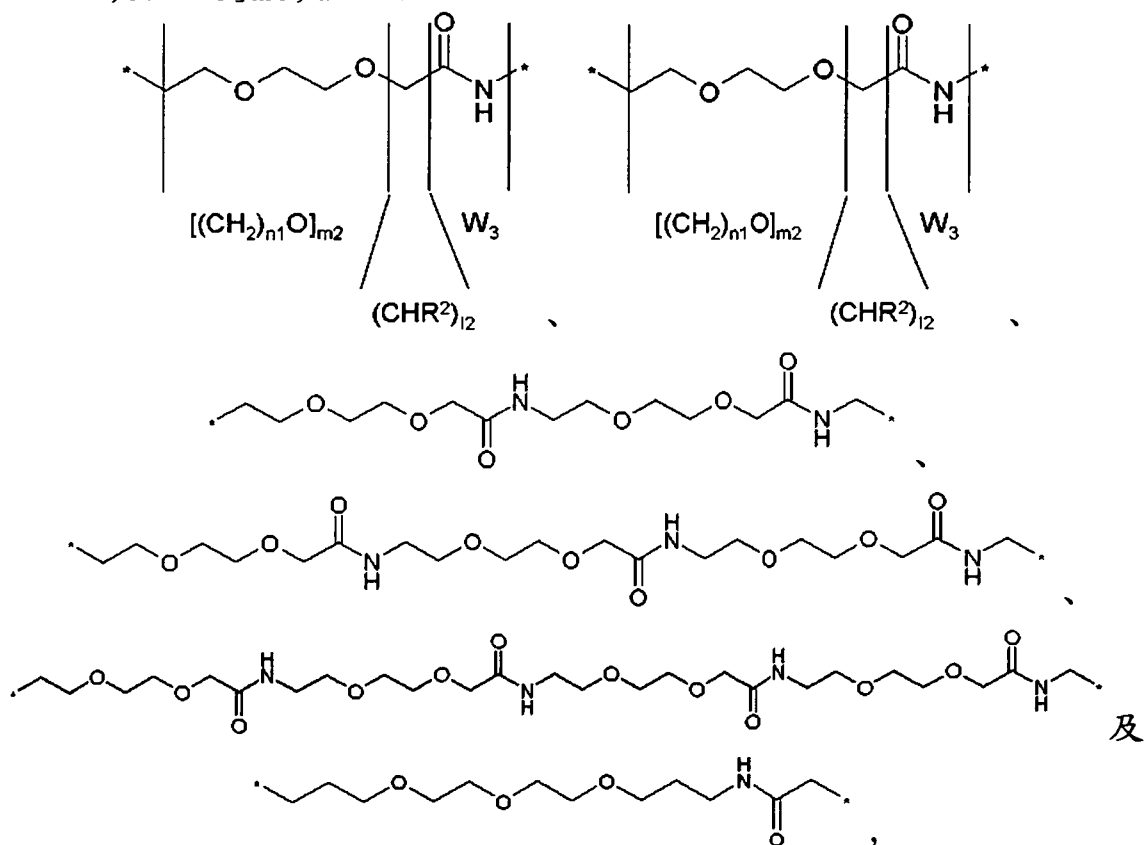
78.如具體實例 63 至 77 中任一具體實例之接合物，其中 E_1 及 E_2 獨立地選自 $-\text{O}-$ 或 $-\text{N}(\text{R}^6)-$ 或價鍵。

79.如具體實例 63 至 78 中任一具體實例之接合物，其中 W_1 至 W_8 獨立地選自由以下組成之群： $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ 烷基或 $-\text{C}(\text{O})\text{NHC}_{1-6}$ 烷基或價鍵；其中烷基視情況經以下基團取代：側氧基、吡咯啉-2,5-二酮、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}^*\text{CH}_2\text{COOH}$ 或 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}^*\text{COOH}$ ；其中(*)指示 CH 之碳原子與 X_4 之連接點。

80.如具體實例 63 至 79 中任一具體實例之接合物，其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及 R^5 獨立地選自氫、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 或 C_{1-6} 烷基；其中烷基視情況經以下基團取代： $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 或 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 。

81.如具體實例 63 至 80 中任一具體實例之接合物，其

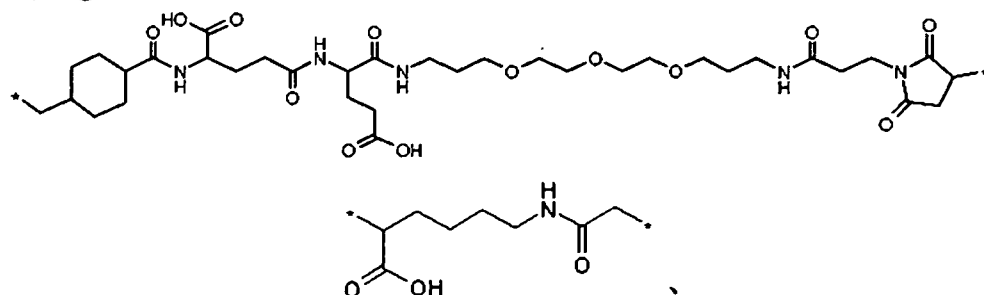
中 $-\{[(CH_2)_{n_1}E1]_{m_2}-[(CHR^2)_{l_2}-W_3]_{m_3}\}_{n_2}-$ 及 $-\{[(CH_2)_{n_3}E2]_{m_5}-[(CHR^4)_{l_4}-W_5]_{m_6}\}_{n_4}-$ (其中 E1 及 E2 為 -O-) 係選自

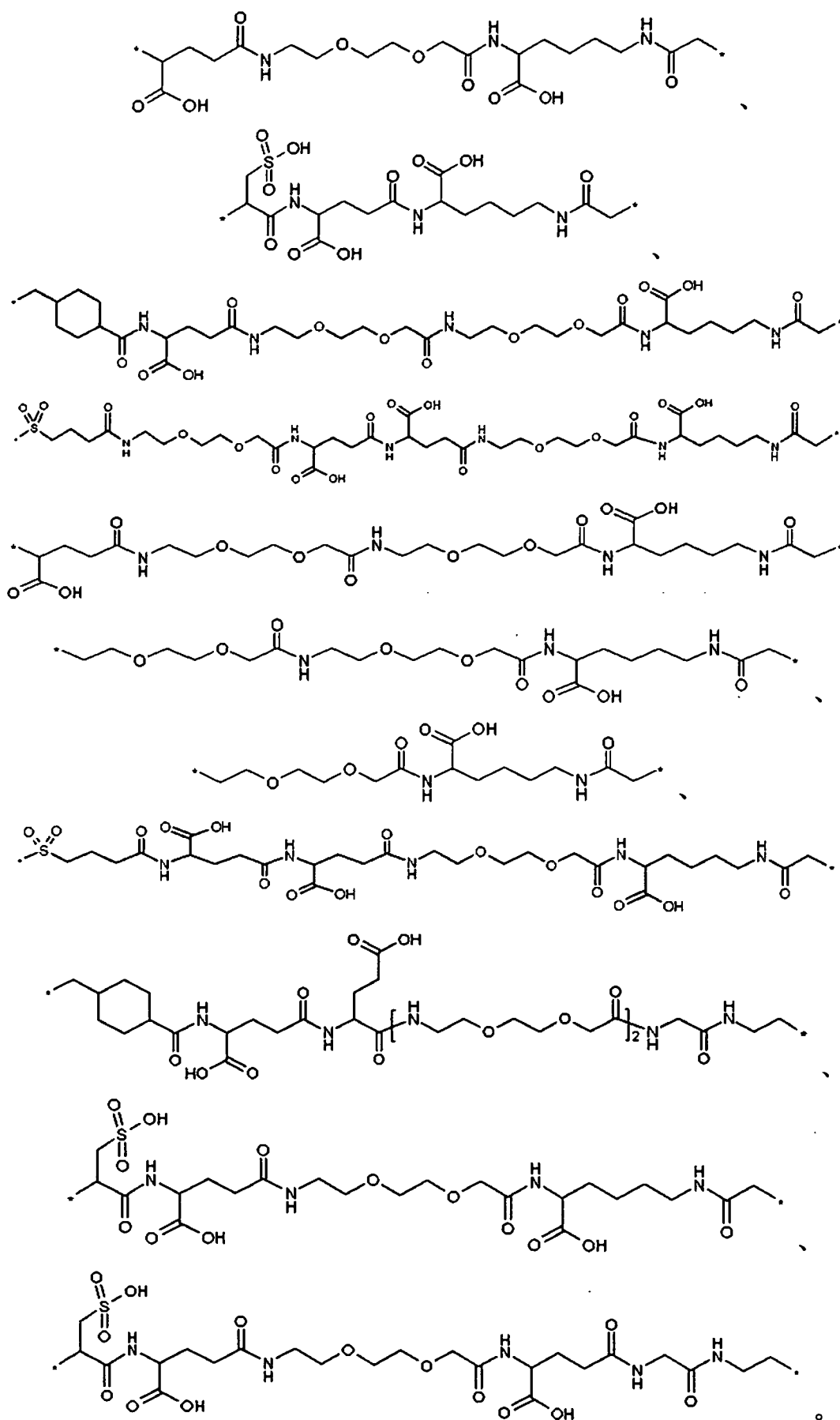


其中 * 意欲表示連接點，亦即開鍵。

82. 如具體實例 63 至 81 中任一具體實例之接合物，其中 X_4 為價鍵且 W_6 係選自吡咯啉-2,5-二酮、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ 或 $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ ，其中 (*) 指示 CH 之碳原子與 GH 之連接點。

83. 如具體實例 63 至 82 中任一具體實例之接合物，其中 B 係選自

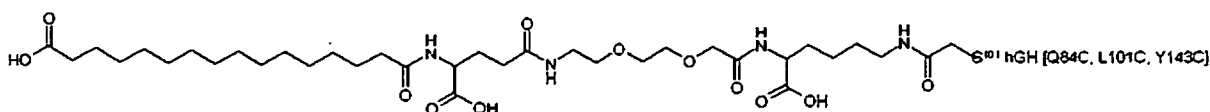
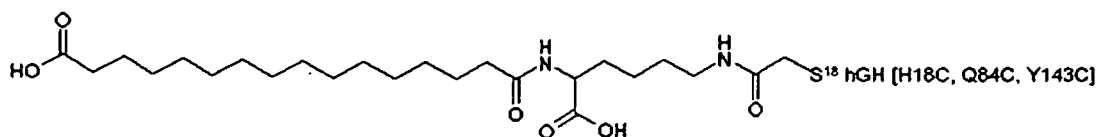
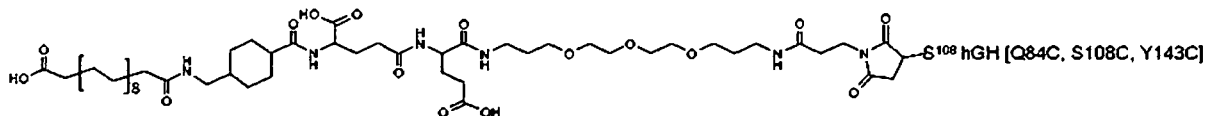
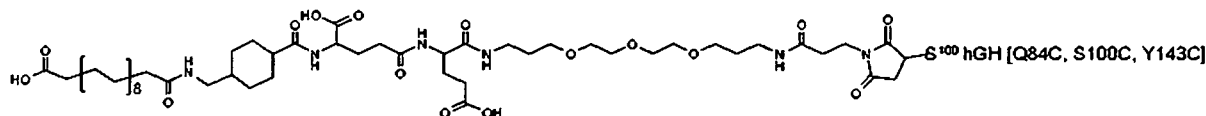
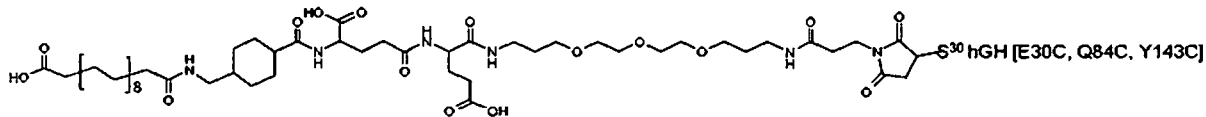
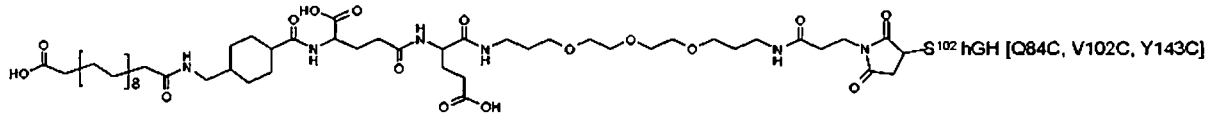
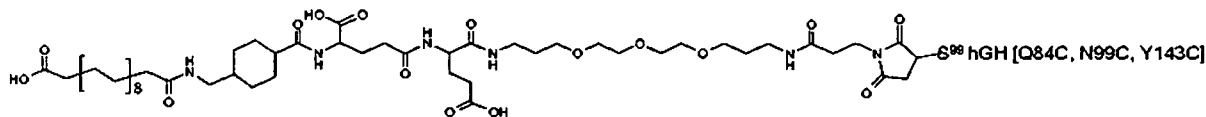
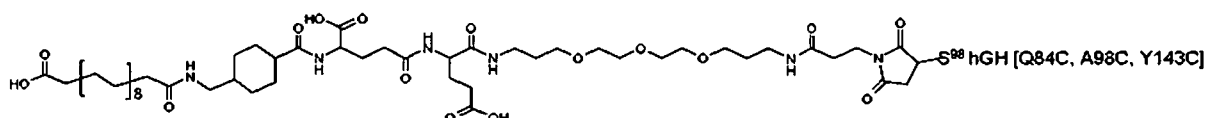
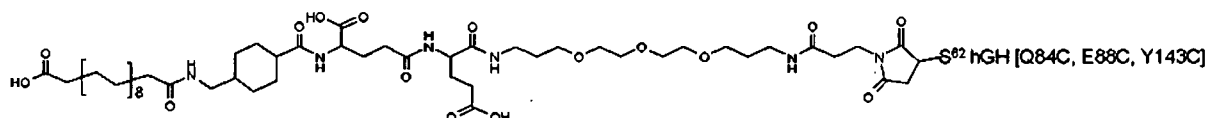
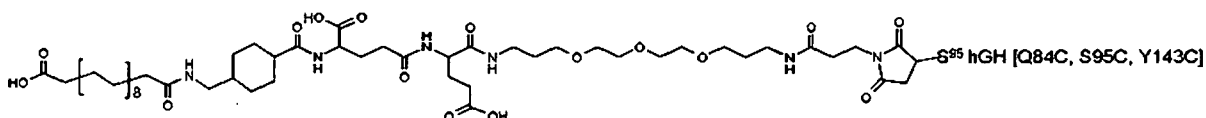
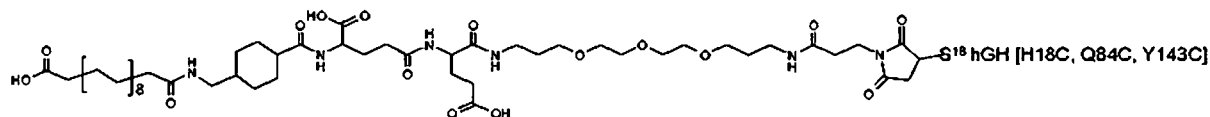
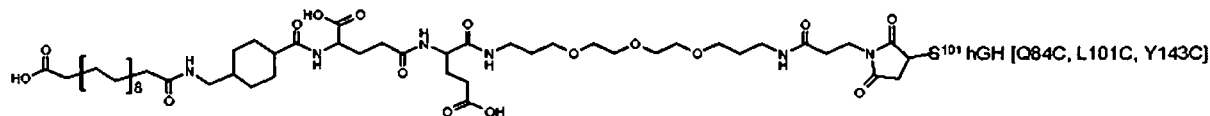




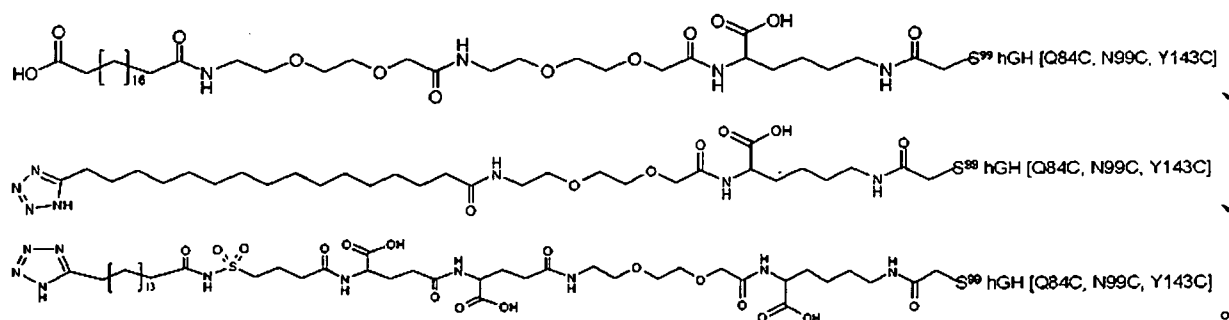
84.如具體實例 1 至 83 中任一具體實例之接合物，其中

一個白蛋白結合殘基 (A) 經由親水性間隔基 (B) 連接至該 GH。

85. 如具體實例 63 至 84 中任一具體實例之接合物，其中該化合物係選自







86.如具體實例 1 至 85 中任一具體實例之接合物，其中親水性間隔基具有 $mLogP < 0$ 。

87.如具體實例 1 至 86 中任一具體實例之接合物，其中該親水性間隔基之莫耳重量處於 80 D 至 1500 D 之範圍內，或處於 300 D 至 1100 D 之範圍內。

88.如具體實例 1 至 87 中任一具體實例之接合物，其中該白蛋白結合殘基為親脂性殘基。

89.如具體實例 1 至 88 中任一具體實例之接合物，其中該白蛋白結合殘基非共價結合至白蛋白。

90.如具體實例 1 至 89 中任一具體實例之接合物，其中該白蛋白結合殘基在生理 pH 值下帶負電。

91.如具體實例 1 至 90 中任一具體實例之接合物，其中該白蛋白結合殘基對人類血清白蛋白具有低於約 $10 \mu M$ 或低於約 $1 \mu M$ 之結合親和力。

92.如具體實例 1 至 91 中任一具體實例之接合物，其中該白蛋白結合殘基係選自直鏈烷基、分支鏈烷基、具有 ω -羧酸基團或 ω -羧酸同電子排列體之基團。

93.如具體實例 1 至 92 中任一具體實例之接合物，其中該白蛋白結合殘基具有 6 至 40 個碳原子、8 至 26 個碳原子或 8 至 20 個碳原子。

94.如具體實例 1 至 93 中任一具體實例之接合物，其中該白蛋白結合殘基為肽，諸如包含少於 40 個胺基酸殘基之肽。

95.如具體實例 1 至 94 中任一具體實例之接合物，其中兩個白蛋白結合殘基（A）經由親水性間隔基（B）連接至該 GH。

96.如具體實例 1 至 95 中任一具體實例之接合物，其係用於治療。

97.一種醫藥組成物，其包含如具體實例 1 至 95 中任一具體實例之接合物，視情況與醫藥學上可接受之賦形劑組合。

98.如具體實例 97 之醫藥組成物，其中該組成物可經由舌、舌下、經頰、口腔內、經口、胃部及腸道內、經鼻、肺部、表皮、真皮、經皮及非經腸投予患者。

99.一種治療生長激素缺乏（GHD）之方法，該方法包含投予有需要之患者治療有效量之如具體實例 1 至 95 中任一具體實例之接合物。

100.一種治療以下疾病之方法：透納氏症候群；普拉德-威利症候群（PWS）；努南氏症候群；唐氏症候群；慢性腎臟疾病；青少年類風濕性關節炎；囊腫性纖維化；接受 HAART 治療之兒童的 HIV 感染（HIV/HALS 兒童）；出生時小於胎齡（SGA）之矮小兒童；出生時出生體重極低（VLBW）但 SGA 之兒童的身材矮小；骨骼發育不良；軟骨生成減退；軟骨發育不全；特發性身材矮小（ISS）；成人 GHD；長骨，

諸如脛骨、腓骨、股骨、肱骨、橈骨、尺骨、鎖骨、掌骨、蹠骨及指骨中之骨折或其骨折；鬆質骨，諸如頭蓋骨、手基部及足基部中之骨折或其骨折；例如手、膝或肩部腱或韌帶手術後之患者；有或經歷牽張成骨術之患者；髖或關節盤置換、半月板修復、脊柱融合術或諸如膝、髖、肩、肘、腕或頷部之修復體安裝後之患者；已安裝了骨縫合材料（諸如釘、螺釘及板）之患者；骨折未接合或接合不良之患者；例如脛骨或第一腳趾骨切開術後之患者；移植物植入後之患者；由創傷或關節炎所致之膝關節軟骨退化；併發透納氏症候群之患者骨質疏鬆症；男性骨質疏鬆症；成年長期透析患者（APCD）；APCD之營養不良相關性心血管疾病；APCD之惡病質逆轉；APCD之癌症；APCD之慢性阻塞性肺病；APCD之HIV；老年APCD；APCD之慢性肝病；APCD之疲勞症候群；克羅恩氏病；肝功能異常；患有HIV感染之男性；短腸症候群；向心性肥胖；HIV相關性脂質營養不良症候群（HALS）；男性不育症；大型非急需手術後之患者；酒精/藥物解毒或神經創傷；老化；老年人虛弱；骨關節炎；創傷性軟骨損傷；勃起功能障礙；肌肉纖維疼痛；記憶障礙；抑鬱症；創傷性腦損傷；蛛網膜下出血；出生體重極低；代謝症候群；糖皮質激素肌病；由糖皮質激素治療所致之兒童身材矮小，加速肌肉組織、神經組織或創口癒合；加速或改善受損組織血流；或降低受損組織感染率，該方法包含投予有需要之患者治療有效量之如具體實例1至95中任一具體實例之接合物。

101.一種如具體實例 1 至 95 中任一具體實例之接合物的用途，其係用於製造用於治療生長激素缺乏（GHD）之藥物。

102.一種如具體實例 1 至 95 中任一具體實例之接合物的用途，其係用於製造用於治療以下疾病之藥物：透納氏症候群；普拉德-威利症候群（PWS）；努南氏症候群；唐氏症候群；慢性腎臟疾病；青少年類風濕性關節炎；囊腫性纖維化；接受 HAART 治療之兒童的 HIV 感染（HIV/HALS 兒童）；出生時小於胎齡（SGA）之矮小兒童；出生時出生體重極低（VLBW）但 SGA 之兒童的身材矮小；骨骼發育不良；軟骨生成減退；軟骨發育不全；特發性身材矮小（ISS）；成人 GHD；長骨，諸如脛骨、腓骨、股骨、肱骨、橈骨、尺骨、鎖骨、掌骨、蹠骨及指骨中之骨折或其骨折；鬆質骨，諸如頭蓋骨、手基部及足基部中之骨折或其骨折；例如手、膝或肩部腱或韌帶手術後之患者；有或經歷牽張成骨術之患者；髌或關節盤置換、半月板修復、脊柱融合術或諸如膝、髌、肩、肘、腕或頷部之修復體安裝後之患者；已安裝了骨縫合材料（諸如釘、螺釘及板）之患者；骨折未接合或接合不良之患者；例如脛骨或第一腳趾骨切開術後之患者；移植物植入後之患者；由創傷或關節炎所致之膝關節軟骨退化；併發透納氏症候群之患者骨質疏鬆症；男性骨質疏鬆症；成年長期透析患者（APCD）；APCD 之營養不良相關性心血管疾病；APCD 之惡病質逆轉；APCD 之癌症；APCD 之慢性阻塞性肺病；APCD 之 HIV；老年

APCD；APCD 之慢性肝病；APCD 之疲勞症候群；克羅恩氏病；肝功能異常；患有 HIV 感染之男性；短腸症候群；向心性肥胖；HIV 相關性脂質營養不良症候群（HALS）；男性不育症；大型非急需手術後之患者；酒精/藥物解毒或神經創傷；老化；老年人虛弱；骨關節炎；創傷性軟骨損傷；勃起功能障礙；肌肉纖維疼痛；記憶障礙；抑鬱症；創傷性腦損傷；蛛網膜下出血；出生體重極低；代謝症候群；糖皮質激素肌病；由糖皮質激素治療所致之兒童身材矮小；加速肌肉組織、神經組織或創口癒合；加速或改善受損組織血流；或降低受損組織感染率。

103.一種式（III）化合物，

A-W-B1-U （III）

其中 A 表示白蛋白結合殘基，

B1 表示親水性間隔基，

W 為連接 A 與 B1 之化學基團，且 U 表示接合部分。

104.如具體實例 103 之化合物，其中 A 及 W 係如上述具體實例中任一具體實例所定義。

105.如具體實例 103 或具體實例 104 之化合物，其中 U 包含芳基、雜芳基、經取代之順丁烯二醯亞胺或吡咯啉-2,5-二酮（諸如 -NHC(O)CH₂CH₂-吡咯啉-2.5-二酮），或由其組成。

106.如具體實例 103 或具體實例 104 之化合物，其中 U 包含 D1-(CH₂)₁₆-D2，其中 D1 及 D2 獨立地選自 -O-、-N(R6)-、-NC(O)R7-或價鍵；其中 R6 及 R7 獨立地表示氫

或 C₁₋₆ 烷基。

107.如具體實例 103 或具體實例 104 之化合物，其中 U 包含離去基（諸如 Cl、Br、I、-OH、-OS(O)₂Me、-OS(O)₂CF₃、-Ots）或由其組成。

108.如具體實例 107 之化合物，其中離去基為選自 Cl、Br 及 I 之鹵素化合物，較佳為 Br。

109.如具體實例 103 或具體實例 104 之化合物，其中 U 包含烯丙胺（H₂C=CH-CH₂-NH₂）（諸如 -C(O)NHCH₂-CH=CH₂）或由其組成。

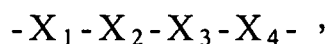
110.如具體實例 103 或具體實例 104 之化合物，其中 U 包含胺（諸如 -NH₂）或由其組成。

111.如具體實例 103 至 110 中任一具體實例之化合物，其中該治療化合物為多肽。

112.如具體實例 103 至 110 中任一具體實例之化合物，其中該治療化合物為具有單一自由胺酸之多肽。

113.如具體實例 103 或具體實例 104 之化合物，其中 U 包含醛（諸如 -CHO）或由其組成。

114.如具體實例 103 至 113 中任一具體實例之化合物，其中親水性間隔基 B1 具有下式：



其中

X₁ 為 -W₁-[(CHR¹)₁₁-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)₁₂-W₃]_{m3}}_{n2}-，

X₂ 為 -[(CHR³)₁₃-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)₁₄-W₅]_{m6}}_{n4}-，

X₃ 為 -[(CHR⁵)₁₅]_{m7}-，

X_4 為價鍵，

11、12、13、14 及 15 獨立地選自 0-16，

m_1 、 m_3 、 m_4 、 m_6 及 m_7 獨立地選自 0-10，

m_2 及 m_5 獨立地選自 0-25，

n_1 、 n_2 、 n_3 及 n_4 獨立地選自 0-16，

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 及 R^5 獨立地選自 氫、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 C_{1-6} 烷基、芳基或雜芳基；其中烷基、芳基及雜芳基視情況經以下基團取代：鹵素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ 或 $-OH$ ，

E_1 及 E_2 獨立地選自 $-O-$ 、 $-N(R^6)-$ 、 $-N(C(O)R^7)-$ 或價鍵；其中 R^6 及 R^7 獨立地表示 氫或 C_{1-6} 烷基，

W_1 至 W_5 獨立地選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 s_2 為 0 或 1。

除非上下文另作說明或明顯矛盾，否則本文中關於要素使用諸如「包含 (comprising)」、「具有 (having)」、「包括 (including)」或「含有 (containing)」之術語對本發明之任何態樣或具體實例進行描述意欲支持「由特定要素組成」、「基本上由特定要素組成」或「實質上包含」特定要素之本發明類似態樣或具體實例（例如，除非上下文另作說明或明顯矛盾，否則本文描述為包含特定要素之組成物

應理解為亦描述由該要素組成之組成物)。

本發明包括本文所呈現之態樣或申請專利範圍中所述之標的物之所有修改及等效物達適用法律准許之最大程度。

本發明進一步由以下實施例說明，然而，該等實施例不應視作限制保護範疇。上文描述及下文實施例中所揭示之特徵單獨及呈其任何組合形式時可為以不同形式實現本發明之材料。

實施例

縮寫：

amu=原子質量單位

CV=管柱體積

hr(s)=小時

Hz=赫茲

L=公升

M=莫耳濃度

mbar=毫巴

mg=毫克

min.=分鐘

mL=毫升

mM=毫莫耳濃度

mm=毫米

mmol=毫莫耳

nmol=奈莫耳

mol=莫耳

μL =微升

N=當量濃度

nm=奈米

sec=秒

ppm=百萬分率

ESI=電噴霧電離

i.v.=靜脈內

m/z =質荷比

MS=質譜

HPLC=高壓液相層析

RP=逆相

HPLC-MS=高壓液相層析-質譜

NMR=核磁共振光譜

p.o.=經口

rt 或 RT=室溫

s.c.=皮下

tr=滯留時間

Boc=第三丁氧羰基

O-*t*-Bu=第三丁酯

t-Bu=第三丁基

Boc-4-ABZ-OH=4-第三丁氧羰基胺基-苯甲酸

DCM=二氯甲烷、 CH_2Cl_2 、亞甲基氯

DIC=二異丙基碳化二亞胺

DIPEA=N,N-二異丙基乙胺

DMF=N,N-二甲基甲醯胺

DMSO=二甲亞砜

DTT=二硫蘇糖醇

EDAC=1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸

鹽

Et₂O=乙醚

EtOAc=乙酸乙酯

Fmoc=9H-芴-9-基甲氧基羰基

Fmoc-Glu-O-*t*-Bu=N-Fmoc-麩胺酸-1-第三丁酯

Fmoc-Lys(Mtt)-OH=(S)-6-[(二苯基-對甲苯基-甲基)-胺基]-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基胺基)-己酸

Fmoc-OEG-OH=(2[2-(Fmoc-胺基)乙氧基]乙氧基)乙酸

OEG=(2[2-(胺基)乙氧基]乙氧基)乙醯基

Fmoc-Thx-OH=N-Fmoc-反-4-胺基甲基環己烷甲酸

H₂O=水

HOBt=1-羥基苯并三唑

MeCN=乙腈

MeOH=甲醇

MTP=3-甲基-硫代-1-丙醇

NaCl=氯化鈉

NaOH=氫氧化鈉

NMP=N-甲基吡咯啉-2-酮

OEG=(2[2-(胺基)乙氧基]乙氧基)乙酸

TFA=三 氟 乙 酸

THF=四 氫 呋 喃

TIS=三 異 丙 基 矽 烷

CDCl_3 =氘 代 氯 仿

CD_3OD =四 氘 代 甲 醇

$\text{DMSO}-d_6$ =六 氘 代 二 甲 亞 砜

TNBS=三 硝 基 苯 磺 酸

TSTU=四 氘 硼 酸 O-(N-丁 二 氫 亞 胺)-1,1,3,3-四 甲 基 錫

實施例亦利用以下一般方法：

製 備 hGH 化 合 物 之 一 般 方 法

將編碼生長激素化合物之基因重組插入質體載體中。隨後使用質體載體轉型適合大腸桿菌 (*E. coli.*) 菌株。所表現之 hGH 或 GH 變異體可具有 N-端甲硫胺酸或呈 MEAE 融合體形式，MEAE 序列隨後自其裂解。

在 25%甘油中製備細胞儲備液且儲存於 -80°C 下。將甘油儲備液菌株接種於 LB 培養板中且隨後在 37°C 下培育隔夜。用 LB 培養基洗滌各培養板之內容物且在 500 mL LB 培養基中稀釋以供表現。在 37°C 下在 220 rpm 振盪下培育培養物直至 OD_{600} 達到 0.6。在 25°C 下使用 0.2 mM IPTG 進行後續誘導 6 小時。最終藉由離心收集細胞。

隨後將細胞懸浮於含有 0.05%吐溫 20、2.5 mM EDTA、10 mM 半胱胺及 4 M 尿素之 10 mM Tris-HCl($\text{pH}=9.0$)中，且使用細胞破碎機在 30 kPSI 下破碎。藉由離心收集上清液且隨後進行層析純化。

使用離子交換層析及疏水性相互作用進行純化，繼而使用由 CHO 細胞表現之人類二肽基肽酶 I (human dipeptidyl peptidase I, hDPPI) 移除肽標籤。藉由同種沈澱 (isoprecipitation) 及離子交換層析達成最終純化。純化亦可藉由使用 (但不限於) 熟習此項技術者已知之離子交換層析、疏水性相互作用層析、親和層析、尺寸排阻層析及基於膜之分離技術來達成。

經純化之生長激素化合物之蛋白質化學特性化

使用 MALDI-MS 分析完整純化蛋白質。所觀測到之質量對應於自胺基酸序列推導出之理論質量。預期鍵聯二硫鍵可藉由使用胰蛋白酶及 AspN 消化繼而在用 DTT 還原二硫鍵之前及之後對消化物進行 MALDI-MS 分析以進行肽定位來證明。

量測 GH 及 hGH 化合物接合物之蛋白酶降解速率的檢定

在適當緩衝液 (例如 PBS 或碳酸氫銨) 中於 37°C 下利用相關蛋白酶 (胰蛋白酶、胰凝乳酶、胃蛋白酶、彈性蛋白酶、因子 VIIa、因子 Xa、蛋白酶 K、羧肽酶、DPPIV、中性肽鏈內切酶、顆粒溶解酶 B (Granzyme B)、脯胺酸-肽鏈內切酶、葡萄球菌肽酶 I (Staphylococcal peptidase I)、嗜熱菌蛋白酶 (Thermolysin)、凝血酶、Arg-C 蛋白酶、Asp-N 肽鏈內切酶、卡斯蛋白酶 1-10 (Caspase 1-10)、梭菌蛋白酶 (Clostripain)、腸激酶 (Enterokinase)、麩胺鹽基肽鏈內切酶、顆粒溶解酶 B、LysC、LysN、脯胺酸-肽鏈內切酶

及葡萄球菌肽酶 I 或組織萃取物) 消化相關化合物達 24 小時。藉由 HPLC 檢定評估蛋白水解降解。

蛋白水解消化：

在 37°C 下利用酶降解 100 μ L 測試化合物於碳酸氫銨緩衝液中之 1 mg/mL 溶液達 24 小時。在不同時間點取子樣品，且藉由於 1% TFA 中 10 倍稀釋以便酸化樣品來停止蛋白水解反應。藉由逆相 HPLC 分析此等經稀釋之樣品以評估蛋白水解消化程度。

HPLC 方法：

將 10 μ L 上述溶液注射於逆相 Vydac C4 2 $\times$ 150 mm 管柱上，用 30 分鐘時間內 0.1% TFA 水溶液至含 0.1% TFA 之 100% 乙腈的線性梯度以 0.2 毫升/分鐘之流速溶離。在 214 nm 下進行 UV 吸收度峰值偵測。由時間點 $t=T$ 時之峰面積 (A_T) 及 $t=0$ 時之峰面積 (A_0) 根據 $(A_T/A_0) \times 100\%$ 計算時間點 $t=T$ 時完整化合物之百分比 (%)。使用 GraphPad Prims 軟體版本 5.01 繪製完整化合物百分比 (%) 相對於時間的曲線。亦藉由 GraphPad Prism 軟體以單相衰變計算半衰期 ($T_{1/2}$)。可使用之酶之實例為彈性蛋白酶 (Sigma，來自豬胰臟) 及胰凝乳酶 (Roche，定序級)。緩衝液之實例為 50 mM 碳酸氫銨 ($pH=8.5$)。

毛細管電泳：

使用 Agilent Technologies 3DCE 系統 (Agilent Technologies) 進行毛細管電泳。使用 Agilent Technologies 3DCE ChemStation 進行資料擷取及信號處理。毛細管為

64.5 cm (56.0 cm 有效長度) 且內徑為 50 μm 之「延長光路毛細管 (Extended Light Path Capillary)」(來自 Agilent)。在 200 nm 下 (16 nm Bw, 參照 380 nm 及 50 nm Bw) 進行 UV 偵測。電泳電解質為 50 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 7) (方法 A)。用 0.1 M NaOH 調節毛細管 3 分鐘, 接著用 Milli-Q 水調節毛細管 2 分鐘且用電解質調節毛細管 3 分鐘。各次電泳後, 用 milli-Q 水沖洗毛細管 2 分鐘, 接著用磷酸沖洗 2 分鐘, 且用 milli-Q 水沖洗 2 分鐘。在 50 毫巴下進行流體動力注射 4.0 秒。電壓為 +25 kV。毛細管溫度為 30°C 且操作時間為 10.5 分鐘。

Maldi-Tof 質譜:

使用 Autoflex Maldi-Tof 儀器 (Bruker) 測定分子量。使用 α -氰基-4-羥基-肉桂酸作為基質製備樣品。

RP-HPLC:

在 Agilent 1100 系統上使用 Vydac 218TP54 4.6 mm $\times$ 250 mm 5 μm C-18 二氧化矽管柱 (The Separations Group, Hesperia) 進行 RP-HPLC 分析。利用 UV 在 214 nm、254 nm、280 nm 及 301 nm 下偵測。管柱用 0.1% 三氟乙酸/H₂O 平衡且樣品用 0% 至 90% 乙腈對 0.1% 三氟乙酸/H₂O 之適合梯度溶離。

LC-MS:

在裝備有兩個 Perkin Elmer 系列 200 微型泵、Perkin Elmer 系列 200 自動取樣器、Applied Biosystems 785A UV 偵測器及 Sedex 75 蒸發光散射偵測器之 PE-Sciex API 100

或 150 質譜儀上進行 LC-MS 分析。在室溫下以 1.5 毫升/分鐘溶離 Waters Xterra 3.0 mm×50 mm 5 μ C-18 二氧化矽管柱。該管柱用 5% MeCN/0.1% TFA/H₂O 平衡且用 5% MeCN/0.1% TFA/H₂O 溶離 1.0 分鐘，且接著用 7 分鐘內至 90% MeCN/0.1% TFA/H₂O 之線性梯度溶離。藉由在 214 nm 下之 UV 偵測及蒸發光散射進行偵測。將管柱溶離液之溶離份引入 PE-Sciex API 100 質譜儀之離子噴霧界面中。在操作期間每 2 秒掃描質量範圍 300-2000 amu。

蛋白質定量：

藉由使用 NanoDrop ND-1000 UV-光譜光度計在 280 nm 下量測吸光度來評估蛋白質濃度。

確定衍生化位點之酶催化肽定位：

利用 Asp-N 消化還原及烷基化之蛋白質來進行肽定位。首先，根據標準程序用 DTT 及碘乙醯胺處理蛋白質。使用 HPLC 純化烷基化產物。隨後，用內切蛋白酶 Asp-N (Boehringer) 以 1:100 之酶:受質比率消化烷基化之經純化產物隔夜。使用 C-18 管柱及標準 TFA/MeCN 緩衝系統對消化物進行 HPLC 分離。將所得肽圖與未衍生化之 hGH 的肽圖進行比較，且收集滯留時間不同之溶離份且使用 Maldi-tof 質譜進一步分析。

SDS page：

使用 NuPAGE 4%-12% Bis-Tris 凝膠 (Invitrogen NP0321BOX) 進行 SDS 聚丙稀醯胺凝膠電泳。對凝膠進行銀染色 (Invitrogen LC6100) 或庫馬斯 (Coomassie) 染色

(Invitrogen LC6065)，且相關時亦如 M. M. Kurfurst, *Anal. Biochem.* 200(2), 244-248, (1992)所述用碘化鋇對 PEG 進行染色。

蛋白質層析：

在 Äkta Explorer 層析系統及管柱（來自 GE Health Care）上進行蛋白質層析。使用 Q-瓊脂糖 HP 26/10 管柱進行陰離子交換。起始緩衝液為 20 mM 三乙醇胺緩衝液（pH 8.5），且溶離緩衝液為起始緩衝液+0.2 M NaCl。典型地用 15 管柱體積內 0%-75%溶離緩衝液之梯度溶離化合物。使用 HiPrep 26/10 管柱進行去鹽及緩衝液交換。

TNBS 測試

製備 10% DIPEA 於 DMF 中之溶液（溶液 1）及 1 M TNBS 水溶液（溶液 2）。將數個樹脂珠粒置放於小試管中，且添加 1-3 滴各溶液（1 及 2）。在短暫混合後，將混合物靜置於室溫下 10 分鐘，且檢查珠粒。強橙色或紅色珠粒指示陽性結果（亦即存在自由胺）；黃色或微橙色珠粒指示微陽性，且無色珠粒為陰性。

LogP 計算

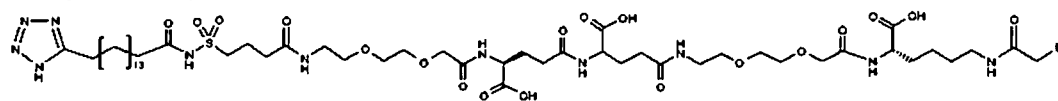
可使用公開之算法（*J. Am. Chem. Soc.*, 86, 5175-5180, (1964) 「A New Substituent Constant, σ , Derived from Partition Coefficients」；C. A. Lipinski 等人, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25 (1997), 「Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development

Settings」；及 I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, *Chem. and Pharm. Bull.*, 42, 976-978, (1994) 「Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods」) 將白蛋白結合劑部分及/或親水性間隔基部分之 LogP 值計算為 mLogP 及/或 cLogP。本文中用 Tripos (<http://www.tripos.com>) clogP 算法版本 4.2 之 Sybyl 7.0 以及如由 BioByte 公司所提供之其相關片段資料庫版本 22 (<http://www.biobyte.com/>) 計算 clogP (亦即珀瑪納學院 logP (Pomona College logP)) (辛醇/水分配係數)。

製備白蛋白結合劑

實施例 1

4-(1H-四唑-16-基-十六鹽基胺磺鹽基)丁鹽基-OEG- γ Glu- γ Glu-OEG-N^ε(C(O)CH₂Br)Lys-OH (I):

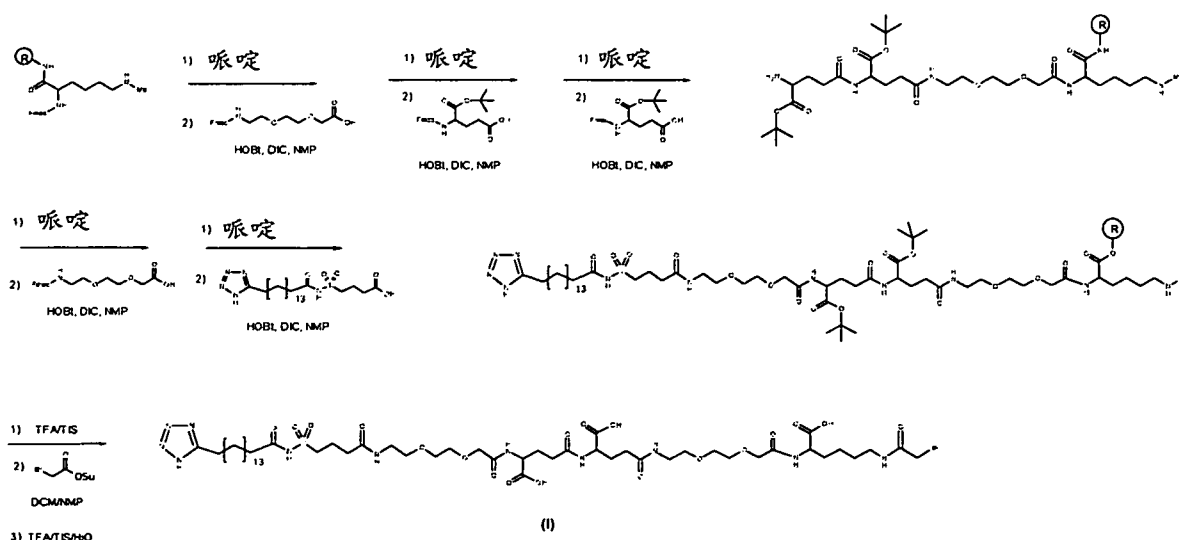


(I)

根據流程 1 利用 ABI433 合成器使用標準 Fmoc-肽化學以 1 mM 規模於固體支撐物上合成化合物 (I)。使用經 Fmoc-OEG-OH 及 Fmoc-Glu-OtBu 保護之胺基酸將肽組裝於 Fmoc-Lys(MTT)-王樹脂 (Wang resin) 上。4-(16-1H-四唑-5-基-十六鹽基胺磺鹽基)使用 2 當量含 DIC/NHS 之 DCM/NMP 手動偶合 4-(16-1H-四唑-5-基-十六鹽基胺磺鹽基)丁酸隔夜, TNBS 測試展示反應完成。接著用 50 mL DCM/TFA/TIS/水 (94:2:2:2) 以流過配置處理樹脂直至黃色消失為止 (約

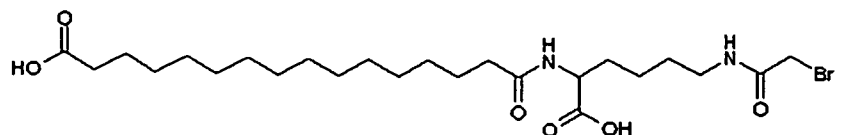
20 分鐘)，繼而用 DIPEA/DMF 洗滌及中和。用 NHS 與 DIC 之 1 mM 混合物活化 DCM/NMP(1:1) 中之溴乙酸(4 mM)，過濾且在再添加 1 mM DIPEA 下添加至樹脂中。1 小時後，反應完成。用 80 mL TFA/TIS//水(95:2.5:2.5)處理樹脂 1 小時。與 N₂ 流一起蒸發，藉由添加 Et₂O 進行沈澱且用 Et₂O 洗滌且乾燥。以製備型 HPLC(2 次操作)用 30%-80% 0.1 TFA/MeCN 對 0.1% TFA 水溶液之梯度純化粗產物。收集分離份且與約 50% MeCN 一起凍乾，得到化合物(I)。TOF-MS: 質量 1272.52 (M+1)。

流程 1



實施例 2

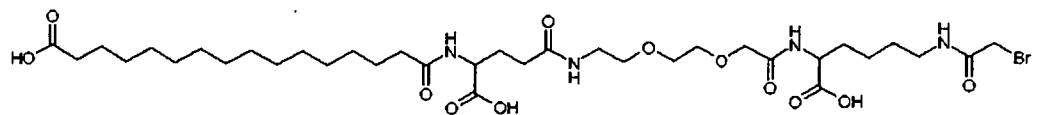
以與上述實施例 1 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 536.52 (M+1)。

實施例 3

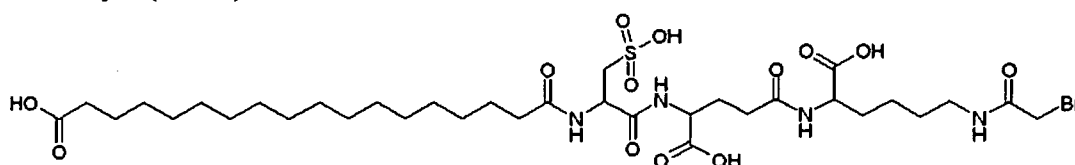
以與上述實施例 1 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 810.80 (M+1)。

實施例 4

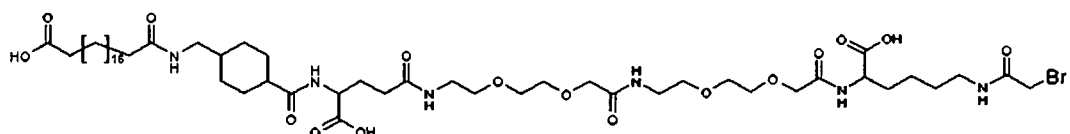
以與上述實施例 1 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 844.84 (M+1)

實施例 5

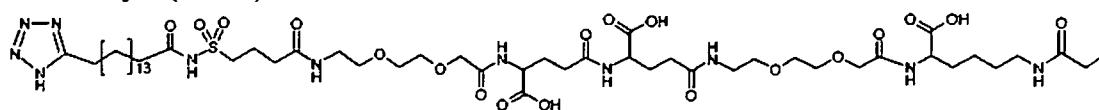
以與上述實施例 1 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1151.27 (M+1)。

實施例 6

以與上述實施例 1 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。

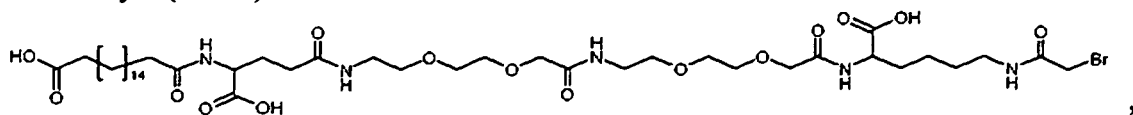


TOF-MS: 質量 1272.30 (M+1)。

實施例 7

以與上述實施例 1 中所述類似之方式，使用

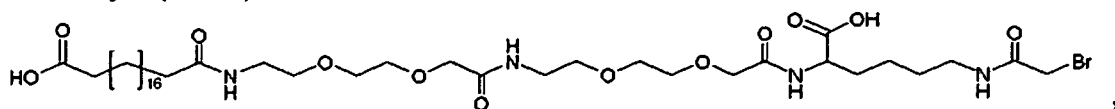
Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 984.01 (M+1)

實施例 8

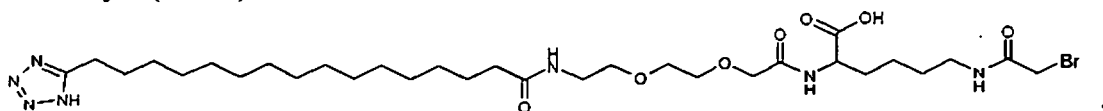
以與上述實施例 1 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 882.95 (M+1)。

實施例 9

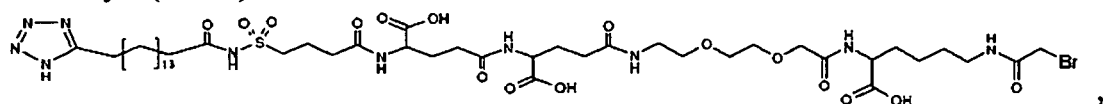
以與上述實施例 1 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 782.74 (M+1)。

實施例 10

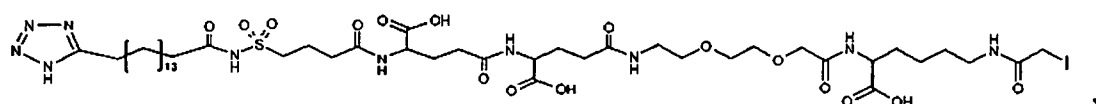
以與上述實施例 1 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1127.14 (M+1)。

實施例 11

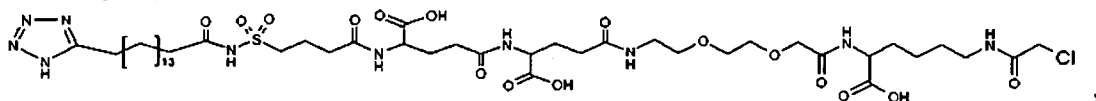
以與上述實施例 1 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH、碘乙酸及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1174.14 (M+1)。

實施例 12

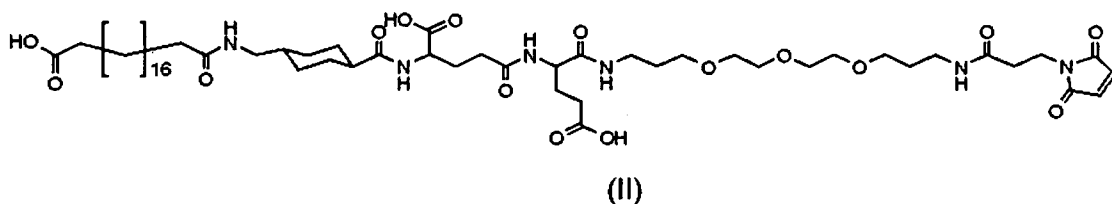
以與上述實施例 1 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH、氯乙酸及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1061.89 (M+1)。

實施例 13

(19-羧基十九鹽基)-Thx- γ Glu-Glu-N-{3-[2-(2-{3-[3-順丁烯二鹽亞胺基-丙鹽胺基]丙氧基}乙氧基)乙氧基]丙基}鹽胺 (II)



使 2-氯三苯甲基樹脂 (2.0 g, 2.6 mmol) 在 DCM 中膨脹 0.5 小時。添加 4,7,10-三氧雜-1,13-二胺於 DCM 中之溶液 (30 mL)。在室溫下攪拌樹脂 1 小時。用 DCM 洗滌樹脂一次，接著添加 DIPEA:MeOH:DCM (15 mL:15 mL:20 mL) 溶液。振盪樹脂 0.5 小時，接著用 DCM 洗滌兩次。接著如下藉由標準肽化學使 Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Glu-OtBu 及 FmocThexOH 依序偶合：混合各 Fmoc-AA-OH/DIC/HOBt 於 NMP 中之 0.5 M 溶液 (11.7 mL) 且在 2 分鐘後，添加至樹脂中。在室溫下振盪樹脂 45 分鐘，且接著用 5×NMP 及

5×DCM 洗滌。添加 $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIPEA}/\text{NMP}$ (1:1:5) 溶液且在室溫下攪拌樹脂 10 分鐘。洗滌 (5×NMP 及 5×DCM) 樹脂。接著用含 30% 哌啶之 NMP 處理樹脂 2×10 分鐘，且最終用 5×NMP 及 5×DCM 洗滌。接著將肽添加至含有 0.125 M HOAt (3 當量)、0.125 M DIC (3 當量) 及 0.125 M 二甲基吡啶 (3 當量) 之 0.25 M 二十烷二酸 (6 當量) 溶液中。在室溫下振盪樹脂 2 小時，繼而用 5×NMP 及 8×DCM 洗滌。使用 10% TFA-DCM 使產物自樹脂裂解 20 分鐘。濾出樹脂且再用 10% TFA-DCM 處理一次，歷時 20 分鐘。收集合併之濾液，且蒸發至乾燥。

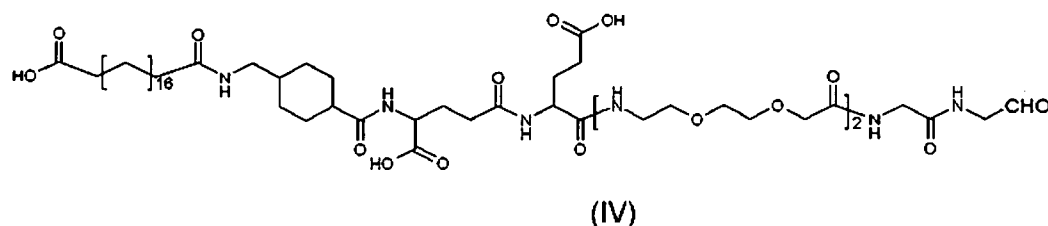
將上述乾燥產物溶解於 DMF (6 mL) 中，且添加經 TSTU 活化之 3-順丁烯二醯亞胺基丙酸 (藉由使 TSTU 與 3-順丁烯二醯亞胺基丙酸在 DMF (2 mL) 中反應 45 分鐘預先製備) 及 DIPEA (200 μL)。在室溫下攪拌混合物 1 小時。將反應混合物蒸發至乾燥且將殘餘物溶解於 95% TFA-MilliQ 水中，且在室溫下攪拌 20 分鐘。將混合物蒸發至乾燥。向殘餘物中添加最少量水以使固體沈澱。濾出沈澱物且使其自 MeCN 中再結晶。收集晶體且用 Et_2O 充分洗滌，得到呈白色固體狀之化合物 (II)。

TOF-MS: 質量 1094.39 ($\text{M}+1$)。

實施例 14

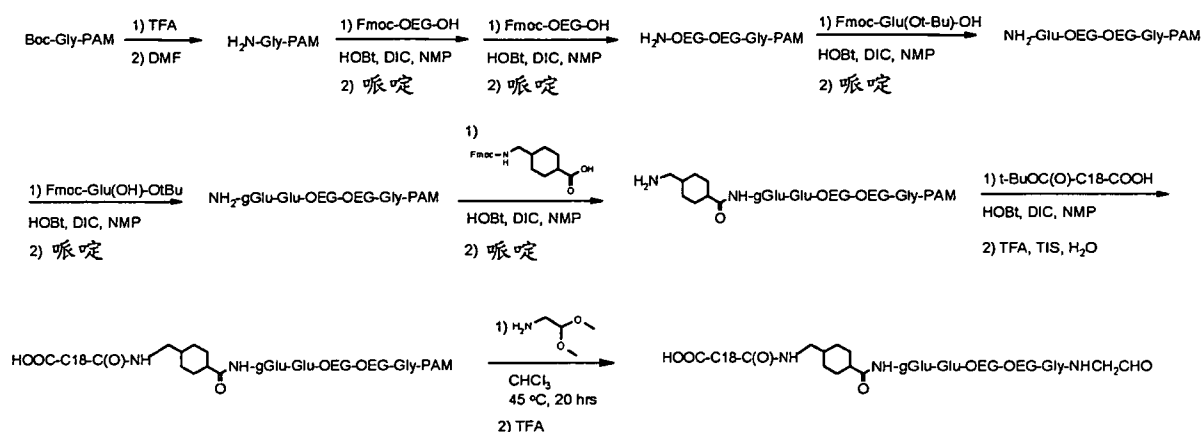
以與上述實施例 1 中所述及下文流程 2 中所述類似之方式，使用 Boc-Gly-PAM 樹脂作為起始物質以及單第三丁基-二十烷酸、4-Boc-胺基苯甲酸、Fmoc-Thx-OH、

Fmoc-OEG-OH、Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH、Fmoc-Glu(OH)-*t*-Bu 保護之胺基酸來製備以下化合物。適度脫除保護基後，使用 2,2-二甲氧基乙胺使肽產物自樹脂裂解，繼而使用 TFA 去乙醯化，得到白蛋白結合劑 (IV)。



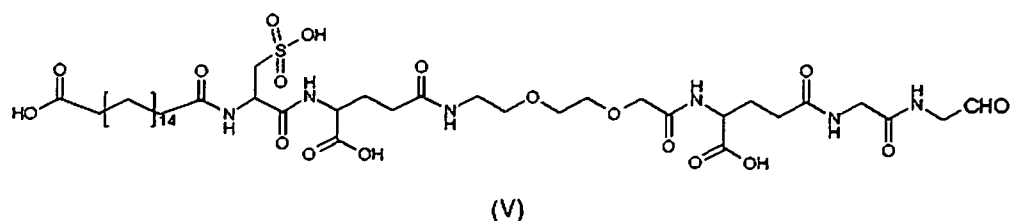
TOF-MS: 質量 1128.38。

流程 2：



實施例 15

以與上述實施例 14 中所述類似之方式，使用 Boc-Gly-PAM 樹脂作為起始物質以及單第三丁基-二十烷酸、4-Boc-胺基苯甲酸、Fmoc-*Thx*-OH、Fmoc-OEG-OH、Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH、Fmoc-Glu(OH)-*t*-Bu 保護之胺基酸來製備以下化合物。適度脫除保護基後，使用 2,2-二甲氧基乙胺使肽產物自樹脂裂解，繼而使用 TFA 去乙醯化，得到白蛋白結合劑 (V)。



TOF-MS: R_t =15.2 分鐘，質量=967.11。

實施例 16

以與上述實施例 14 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-王樹脂作為起始物質以及單第三丁基-十八烷二酸、Boc-Ser(*t*-Bu)-OH、Fmoc-OEG-OH、Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH 及氧化 Fmoc-Cys-OH 保護之胺基酸來製備化合物 (VI)。使用含 2.5% TIS、2.5% H₂O 之 THF 歷時 3 小時使肽產物自樹脂裂解且藉由製備型 HPLC 純化：

管柱：2 cm C18

溶離劑 A：0.1% TFA i Milli-Q 水

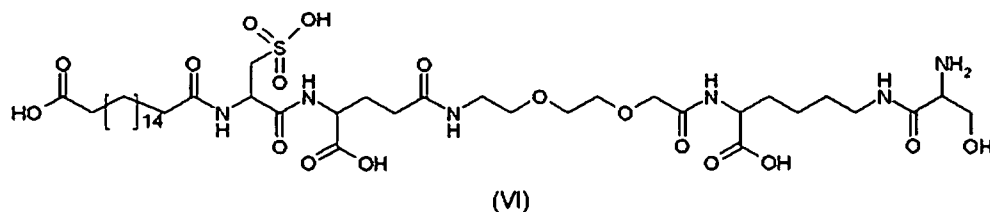
溶離劑 B：0.1% TFA i MeCN

起始 %B：40%

最終 %B：75%

梯度：5 分鐘，用 10% MeCN 維持 5-10 分鐘，經 51 分鐘至起始 %B，5 分鐘，最終為 %B+10% MeCN 維持約 1 小時藉由 LC-MS-TOF 分析溶離份。

收集所需溶離份，彙集且凍乾，得到化合物 (VI)。



TOF-MS: R_t =6.3 分鐘，質量=955.1。

(VI) 之氧化：

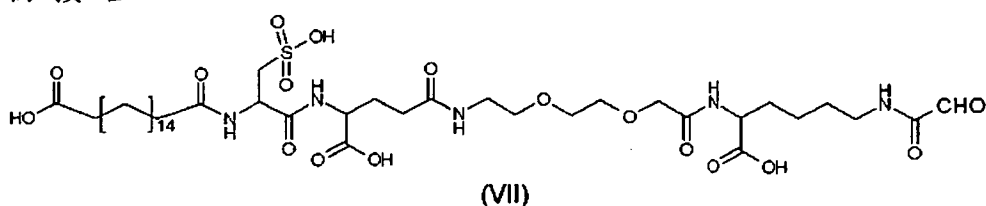
MTP 溶液：

將 3-甲基-硫代-1-丙醇 (290 mg) 溶解於 4 mL 25 mM HEPES (pH=7.00) 中。

高碘酸鹽溶液：

將 96 mg NaIO_4 溶解於 2 mL Milli-Q 水中。

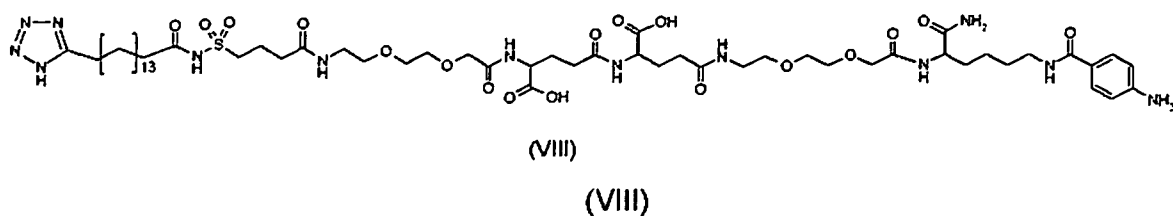
向化合物 (VI) 於 Milli-Q 水 (1 mL) 中之溶液中添加 MTP 溶液 (3.6 mL) + 高碘酸鹽溶液 (560 μL)，且用 1 滴 1 N NaOH 將 pH 值調節至 9.5。用錫箔覆蓋反應燒瓶且在室溫下攪拌 1 小時。再添加一份高碘酸鹽溶液 (560 μL) 且將反應混合物在環境溫度下靜置 4.5 小時。使所得混合物穿過兩個 NAP 管柱以除去 NaIO_4 。用 25 mM HEPES (5×2.5 mL) (pH=7.0) 預洗滌管柱。將樣品 (2.5 mL) 施加於各管柱上且用 3.5 mL 25 mM HEPES (pH=7.00) 溶離。彙集 2×3.5 mL，總共 10.5 mL 含有酮基-醛 (VII)，其直接用於與 GH 類似物接合。



TOF-MS: 質量 = 924.08。

實施例 17

4-(1H-四唑-16-基-十六醯基胺磺醯基)丁醯基-OEG- γGlu - γGlu -OEG- N^ϵ (4-胺基苯甲醯基)Lys- NH_2 (VIII)：



根據流程 3 在固體支撐物上合成化合物 (VIII)。稱取經 Fmoc 保護之 Rink-醯胺-樹脂 (2.2 g, 0.6 mMol/g) 放入燒瓶中。用 NMP (3×30 mL) 使樹脂膨脹 2 小時。將樹脂與含 25% 哌啶之 NMP (30 mL) 一起振盪 10 分鐘。排乾樹脂且用含 25% 哌啶之 NMP (30 mL) 處理 1 小時，繼而排乾且用 NMP (6×30 mL) 洗滌。稱取 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 HOBt 放入燒瓶中，溶解於含溴酚藍 (bromo phenol blue) 之 NMP (30 mL, 0.5 mM) 中。將此溶液添加至上述排乾之樹脂中，繼而添加 DIC。在環境溫度下振盪反應物 21 小時。排乾樹脂且用 NMP (6×30 mL) 洗滌，繼而用 DCM (3×30 mL) 洗滌。用六氟異丙醇 (20 mL) 處理樹脂 10 分鐘。振盪 10 分鐘。排乾樹脂且用 DCM (3×30 mL) 洗滌。再用六氟異丙醇 (20 mL) 處理樹脂 10 分鐘且振盪 10 分鐘。排乾樹脂且用 DCM (3×30 mL) 洗滌，繼而排乾且用 NMP (3×30 mL) 洗滌。稱取 4-(Boc-胺基)苯甲酸及 HOBt 放入燒瓶中，溶解於含溴酚藍之 NMP (30 mL, 0.5 mM) 中。將此溶液添加至上述排乾之樹脂中，繼而添加 DIC。在環境溫度下振盪反應物。排乾樹脂且用 NMP (6×30 mL) 洗滌。將樹脂與含 25% 哌啶之 NMP (10 mL) 一起振盪 10 分鐘。排乾樹脂且用含 25% 哌啶之 NMP (10 mL) 處理 1 小時，繼而排乾且用 NMP (6×15 mL) 洗滌。稱取 Fmoc-OEG-OH 及 HOBt 放入

燒瓶中，溶解於含溴酚藍之 NMP (15 mL, 0.5 mM) 中。將此溶液添加至排乾之樹脂中，繼而添加 DIC。在環境溫度下振盪反應物 23 小時。排乾樹脂且用 NMP (6×15 mL) 洗滌。將樹脂與含 25% 哌啶之 NMP (10 mL) 一起振盪 10 分鐘。排乾樹脂且用含 25% 哌啶之 NMP (10 mL) 處理 1 小時，繼而排乾且用 NMP (6×15 mL) 洗滌。稱取 Fmoc-Glu-O-*t*-Bu 及 HOBt 放入燒瓶中，溶解於含溴酚藍之 NMP (15 mL, 0.5 mM) 中。將此溶液添加至排乾之樹脂中，繼而添加 DIC。在環境溫度下振盪反應物 18 小時。排乾樹脂且用 NMP (6×15 mL) 洗滌。將樹脂與含 25% 哌啶之 NMP (10 mL) 一起振盪 10 分鐘。排乾樹脂且用含 25% 哌啶之 NMP (10 mL) 處理 1 小時，繼而排乾且用 NMP (6×15 mL) 洗滌。稱取 Fmoc-Glu-O-*t*-Bu 及 HOBt 放入燒瓶中，溶解於 15 mL 含 0.5 mM 溴酚藍之 NMP 中。將此溶液添加至排乾之樹脂中，繼而添加 DIC。在環境溫度下振盪反應物 18 小時。排乾樹脂且用 NMP (6×15 mL) 洗滌。將樹脂與含 25% 哌啶之 NMP (10 mL) 一起振盪 10 分鐘。排乾樹脂且用含 25% 哌啶之 NMP (10 mL) 處理 1 小時，繼而排乾且用 NMP (6×15 mL) 洗滌。稱取 Fmoc-OEG-OH 及 HOBt 放入燒瓶中，溶解於含溴酚藍之 NMP (15 mL, 0.5 mM) 中。將此溶液添加至排乾之樹脂中，繼而添加 DIC。在環境溫度下振盪反應物。排乾樹脂且用 NMP (6×15 mL) 洗滌。將樹脂與含 25% 哌啶之 NMP (10 mL) 一起振盪 10 分鐘。排乾樹脂且用含 25% 哌啶之 NMP (10 mL) 處理 1 小時，繼而排乾且用 NMP (6×15

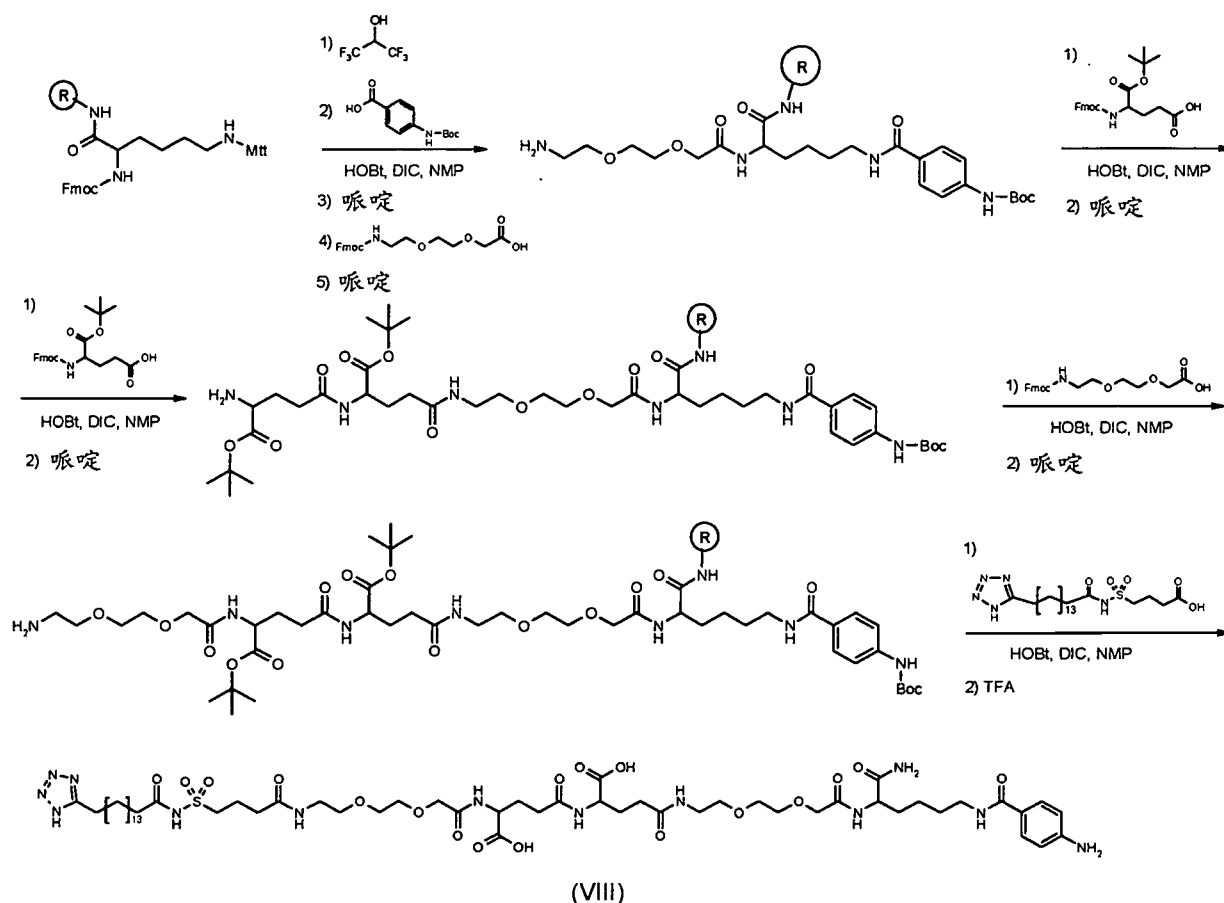
mL) 洗滌。

稱取 4-(16-1H-四唑-5-基-十六鹽基胺磺鹽基)丁酸及 HOBt 放入燒瓶中，溶解於含溴酚藍之 NMP (15 mL, 0.5 mM) 中。將此溶液添加至排乾之樹脂中，繼而添加 DIC。在環境溫度下振盪反應物 21 小時。排乾樹脂且用 NMP (6×15 mL) 洗滌，繼而排乾且用 DCM (6×15 mL) 洗滌。用 95% TFA 水溶液 (10 mL) + DCM (0.25 mL) 及 TIS (0.25 mL) 之混合物裂解樹脂。在環境溫度下振盪樹脂 2 小時且過濾至冰冷 Et₂O (75 mL) 中。藉由離心分離所得沈澱物，繼而用 Et₂O (3×) 洗滌，且在真空中乾燥 48 小時，得到 300 mg 粗化合物 (VIII)。

以製備型 HPLC (GILSON) (30%→80% MeCN) 純化粗化合物 (VIII)。將彙集之溶離份蒸發至乾燥且將殘餘物溶解於 H₂O/MeCN (1:1) 中且冷凍乾燥隔夜，得到 170 mg 化合物 (VIII)。

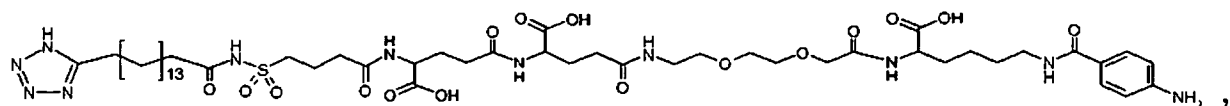
TOF-MS: R_t=4.7 分鐘，質量 1268.71。

流程 3



實施例 18

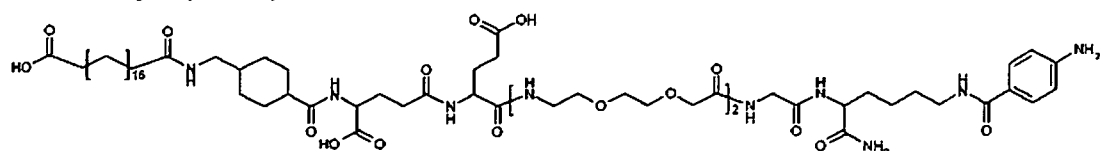
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1124.33。

實施例 19

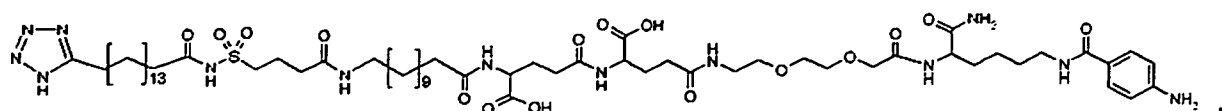
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1333.64。

實施例 20

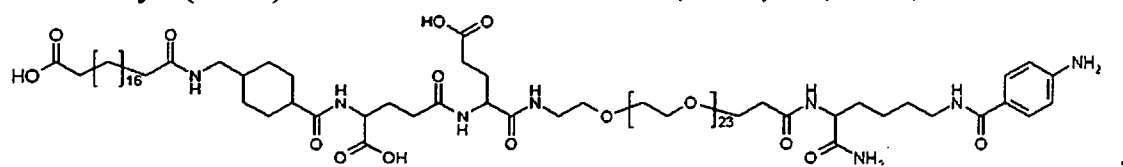
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1320.67。

實施例 21

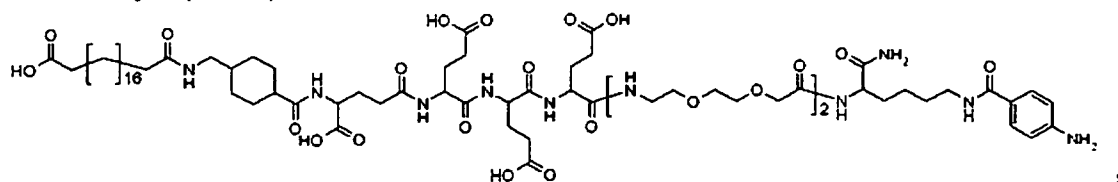
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 2114.64。

實施例 22

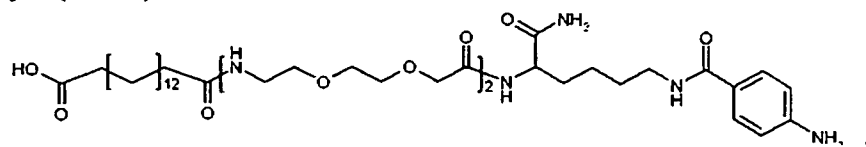
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1534.82。

實施例 23

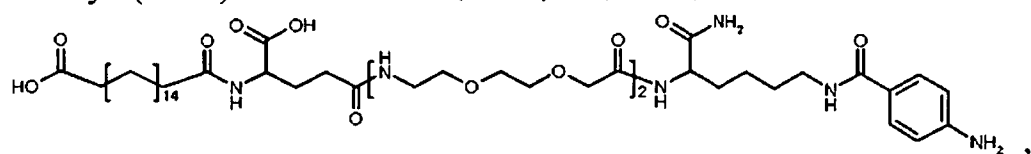
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 823.05。

實施例 24

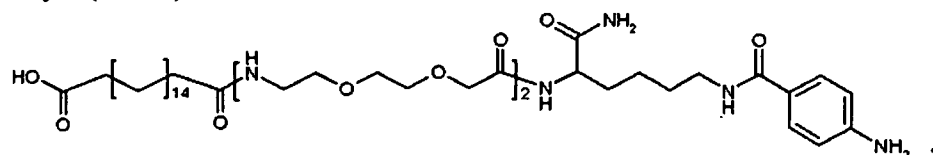
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 980.22。

實施例 25

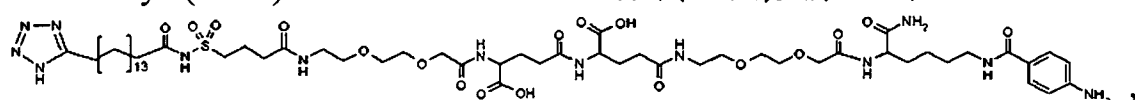
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 851.10。

實施例 26

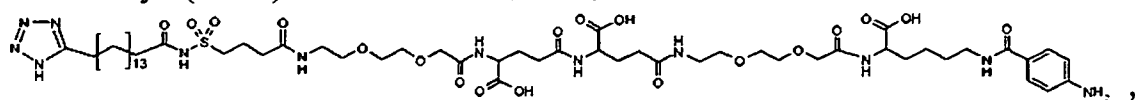
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1258.51。

實施例 27

以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及王樹脂製備以下化合物。

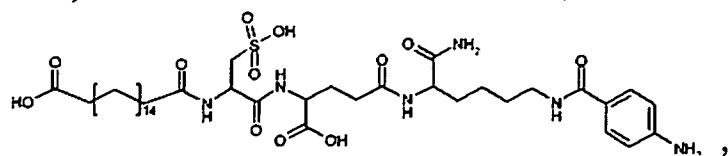


TOF-MS: 質量 1269.49。

實施例 28

以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用

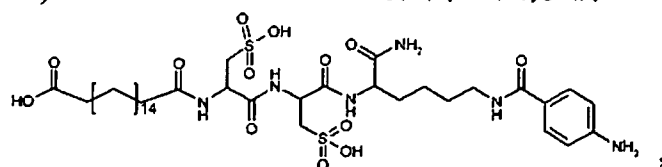
FMOC-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 841.04。

實施例 29

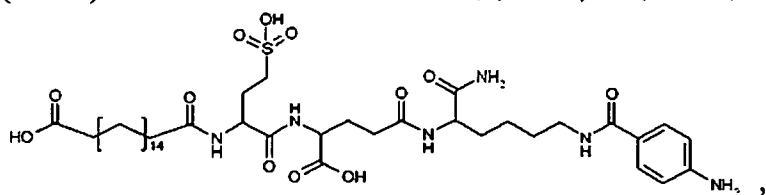
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 863.07。

實施例 30

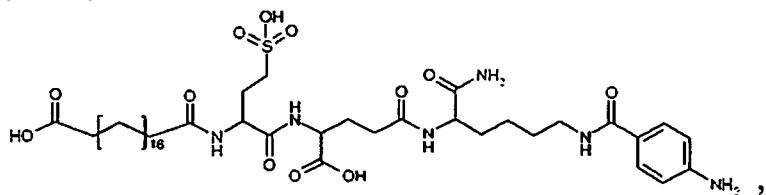
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 855.07。

實施例 31

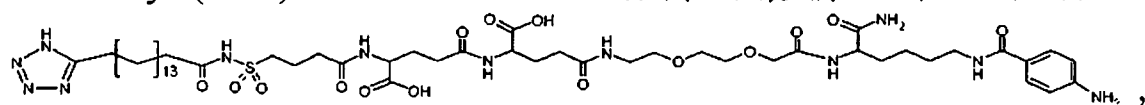
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 883.12。

實施例 32

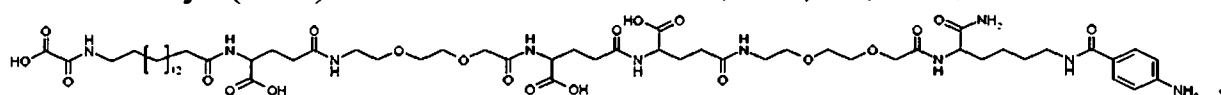
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1123.35。

實施例 33

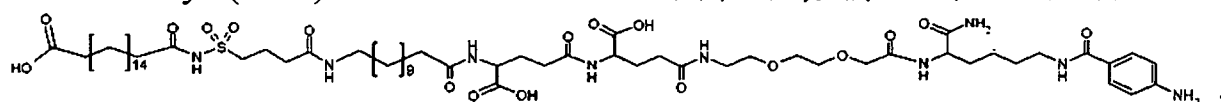
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: Rt=4.7 分鐘，質量 1267.45。

實施例 34

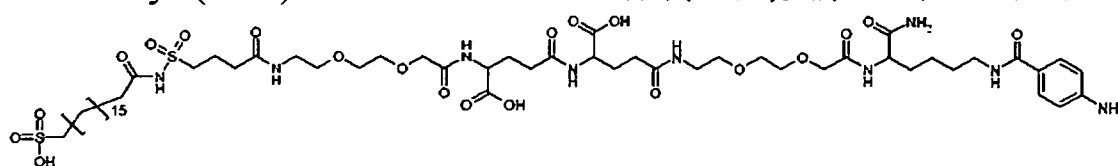
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1310.67。

實施例 35

以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。

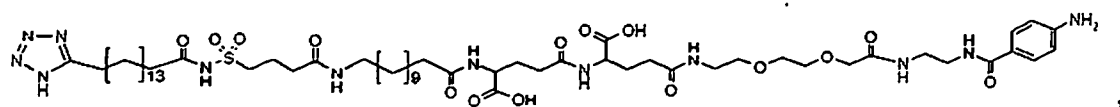


TOF-MS: 質量 1308.58。

實施例 36

以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用

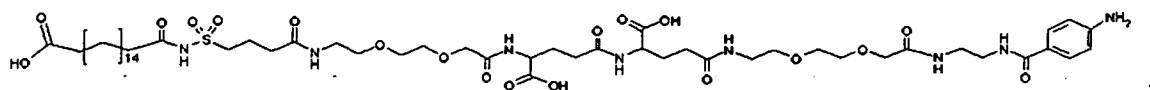
FMOC-Glu(ODmab)-OH 及 2-氯三苯甲基氯樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1235.56。

實施例 37

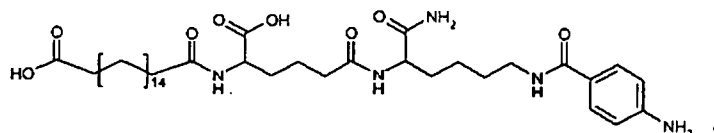
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 FMOC-Glu(ODmab)-OH 及 2-氯三苯甲基氯樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1173.40。

實施例 38

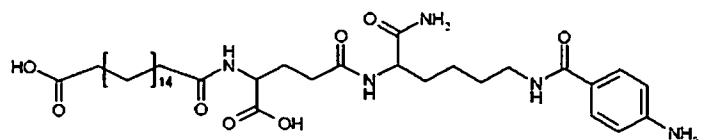
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 703.93。

實施例 39

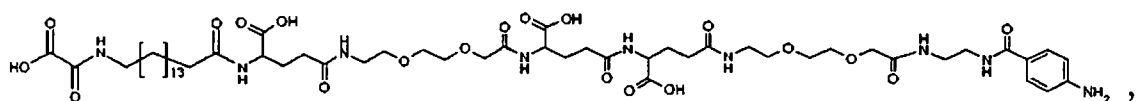
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 及 Rink 醯胺樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 689.90。

實施例 40

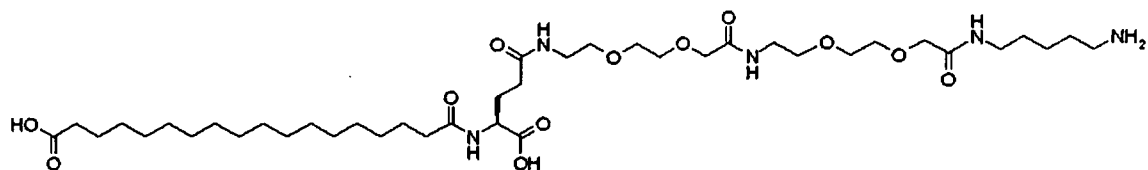
以與上述實施例 17 中所述類似之方式，使用 Fmoc-Glu(ODmab)-OH 及 2-氯三苯甲基氯樹脂製備以下化合物。



TOF-MS: 質量 1182.34。

實施例 41

17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(5-氨基戊基胺甲酯基)甲氧基]乙氧基}乙基胺甲酯基)-甲氧基]乙氧基}乙基胺甲酯基)-1-羧基-丙基胺甲酯基]-十七烷酸：



將 N-第三丁氧基羧基屍胺 (24.3 mg; 0.12 mmol) 添加至 17-((S)-1-羧基-3-{2-[2-((2-[2-(2,5-二側氧基-吡咯啶-1-基氧基羧基甲氧基)-乙氧基]乙基胺甲酯基}甲氧基)乙氧基]乙基胺甲酯基}丙基胺甲酯基)-十七烷酸 (100 mg; 0.12 mmol) 及 DIPEA (46.68 mg; 0.36 mmol) 於 THF (2.0 ml) 中之溶液中。在室溫下攪拌反應混合物隔夜，且接著在真空中濃縮。將殘餘物溶解於水 (5 ml) 與 THF (2 ml) 之混合物中，且藉由製備型 HPLC (RP18 管柱) 純化。彙集含有經 Boc 保護之偶合產物之溶離份且進行乾燥。將殘餘物溶解於 50% TFA-DCM (4 ml) 中且在室溫下攪拌 1 小時，接著在真空中濃縮，得到 54 mg (55%) 呈三氟乙酸鹽形式之標題物質。TOF-MS: 質量 815.5。

製備 GH 白蛋白結合劑化合物：

實施例 42

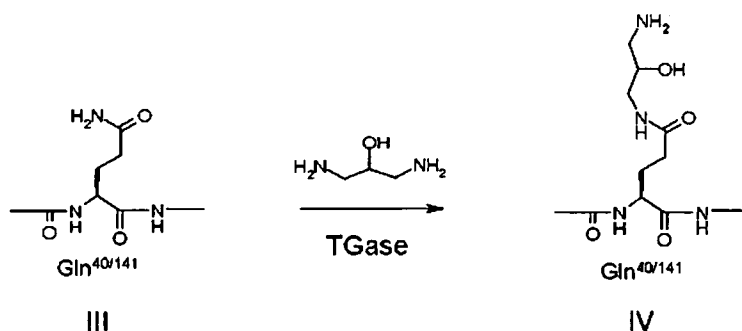
使用轉麩醯胺酸酶將柄狀物連接至 GH 先前已描述於 WO2005/070468 中，且根據本發明可用於連接白蛋白結合劑。所用 TGase 為根據 US5156956 來自茂原輪枝鏈黴菌之微生物轉麩醯胺酸酶。一般方法描述於上述章節化學反應 I 中。

1. 轉胺基及氧化之 GH 化合物 (I) 與白蛋白結合劑 (II) 之偶合

製備以下溶液：

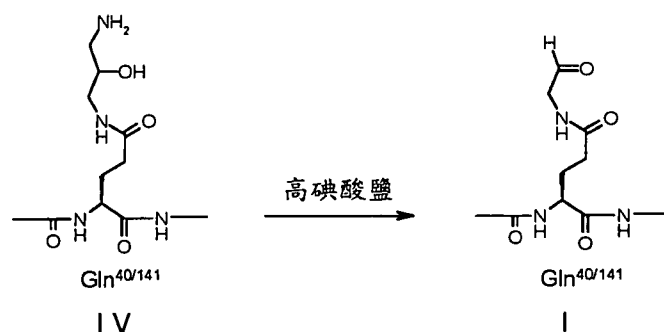
緩衝液 A：將三乙醇胺 (119 mg, 0.8 mmol) 溶解於水 (40 mL) 中，且 pH 值調節至 8.5。

(A) hGH (III) 與 1,3-二胺基-2-丙醇之轉胺基反應



在下一步驟中，向轉胺基之 GH (III) 中添加高碘酸鹽。典型地在低溫（諸如 4°C 至 10°C）下視情況在黑暗中經 30 分鐘進行氧化。高碘酸鹽可將 GH 中之甲硫胺酸殘基氧化成其相應甲硫胺酸亞砷殘基。為使此氧化風險降至最低，可在高碘酸鹽氧化期間添加小分子有機硫醚。適合有機硫醚為 3-甲基硫代丙-1-醇，但熟習此項技術者將能夠提出其他有機硫醚。

轉胺基之 GH 化合物 (IV) 的氧化：



可進行緩衝液更換以獲得有效氰基硼氫化鈉還原所需之酸性溶液。典型地使用過量 A-W-B1-NH₂ 胺，且可隨時間添加較小份氰基硼氫化鈉。

製備以下溶液：

緩衝液 A：將三乙醇胺（119 mg，0.8 mmol）溶解於水（40 mL）中，且 pH 值調節至 8.5。

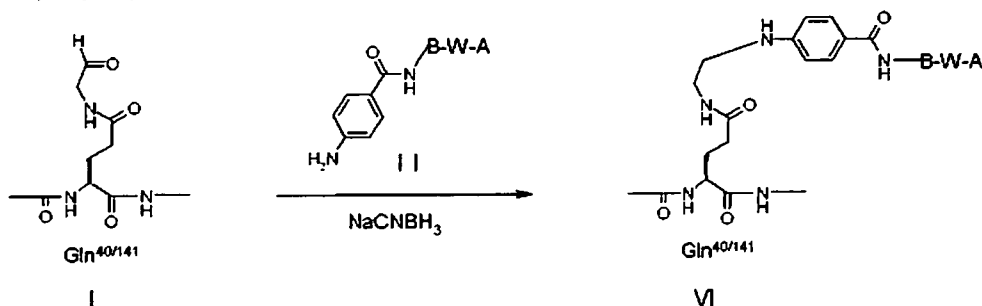
緩衝液 B：將 3-甲基硫代丙醇（725 mg，7.1 mmol）溶解於緩衝液 A（10 mL）中。

緩衝液 C：將 HEPES（5.96 g）溶解於水（1.0 L）中且 pH 值調節至 7.0。

高碘酸鹽：NaIO₄（48.1 mg，0.225 mmol）溶解於水（1.0 mL）中。

向（IV）（10 mg，0.5 μmol）之溶液中添加緩衝液 B（0.2 mL），繼而添加高碘酸鹽溶液（0.03 mL）。冷培育 20 分鐘後，用緩衝液 C 透析混合物 4 次。將殘餘物濃縮至 1 mL。

（C）（I）與白蛋白結合劑（II）之還原胺化反應



可使用如實施例 17 至 40 中所述之白蛋白結合劑(II)。

將來自 (B) 之最終溶液 (1 mL, 10 mg, 0.45 μmol (I)) 與白蛋白結合劑 (II) 溶液 (2 mL, 10 mg, 0.3 μmol) 在 25 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) 中混合且在室溫下緩慢旋轉所得混合物 1 小時。1 小時後，逐份添加 NaCNBH_3 (NaCNBH_3 (20 mg) 於水 (0.5 mL) 中之 100 μL 溶液)。混合物在黑暗中保持於室溫下 18 至 24 小時。

可如下進行後一反應：

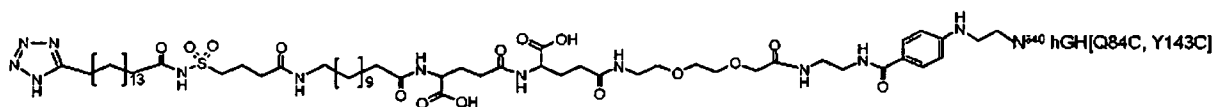
將氧化之轉胺基 GH 溶液添加至白蛋白結合劑連接子於 AcOH (1.5 mL) 與 50 mM MES (0.5 mL) 之混合物中的溶液 (pH 6.00) 中。在室溫下溫和振盪所得反應混合物 30 分鐘，此時添加 NaCNBH_3 溶液 (15 μL , 22 mg NaCNBH_3 溶解於 500 μL Milli-Q 水+AcOH (15 μL) 中)。用錫箔覆蓋樣品且在室溫下攪拌隔夜。

可如下藉由陰離子交換層析分離接合物：藉由使用 Amicon Ultra15 裝置 (Ultracel 10K 管) 以 4000 轉/分鐘離心 3 次每次 8 分鐘將緩衝液更換為純水 (3 $\times$) 來移除乙酸。接著使用 Amicon 過濾器裝置將混合物緩衝液更換為 20 mM TEA (pH 8.50)，且用 20 mM TEA 稀釋至 50 mL 之最終體積，之後將其裝載於 HiLoad Q 瓊脂糖 26/10 管柱上。最初用 20 mM TEA (pH 8.50，緩衝液 A) 洗滌管柱，且接著用 20 mM TEA、500 mM NaCl (pH 8.50，緩衝液 B)，使用 20 CV 內 0%至 100% (B) 梯度以 2 毫升/分鐘之流速溶離。使用 Amicon Ultra15 裝置 (Ultracel 10K 管) 以 4000 轉/分鐘

離心 3 次每次 8 分鐘將彙集之溶離份緩衝液更換為含 10 mM 碳酸氫銨緩衝液之純水 5 次。

使用來自實施例 18 之白蛋白結合劑將得到以下化合物。

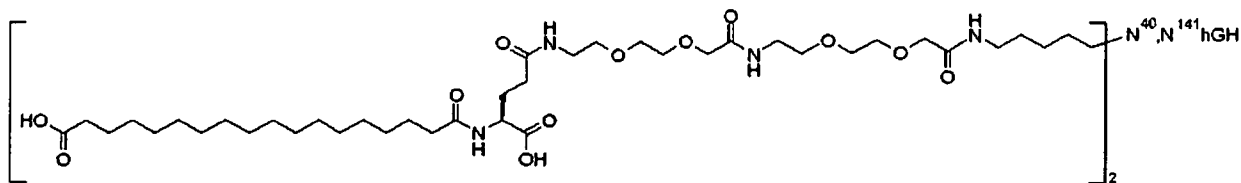
42.1



TOF-MS: 質量 23301.63。

使用來自實施例 41 之白蛋白結合劑製備以下化合物。

42.2

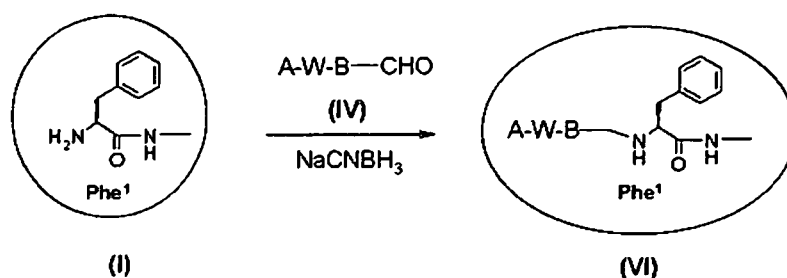


TOF-MS: 質量 23727.6245。

向 hGH (1 mg, 45 nmol) 及 17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(5-胺基戊基胺甲酯基)甲氧基]乙氧基}乙基胺甲酯基)甲氧基]乙氧基}乙基胺甲酯基)-1-羧基-丙基胺甲酯基]十七烷酸 (2.10 mg; 2250 nmol) 於 20 mM 三乙醇胺 (1000 μ L; pH 8.5) 中之溶液中添加 TGase (0.12 nmol; 茂原輪枝鏈黴菌)。在 25°C 下培育反應混合物 146 小時，此後獲得上式之雙重衍生化之 hGH 類似物。

實施例 43

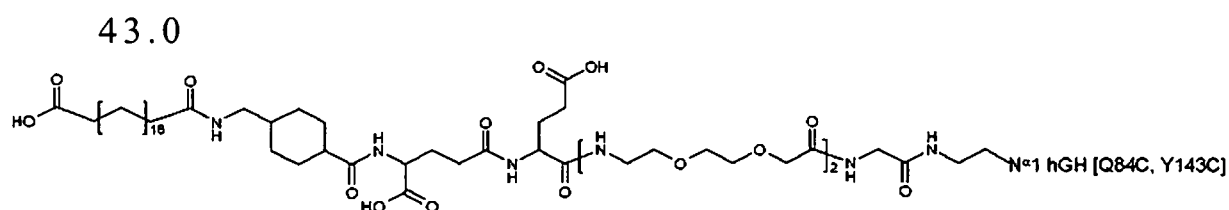
1. GH 化合物 (I) N-端與白蛋白結合劑 (IV) 之偶合
(A) (I) 與白蛋白結合劑醛 (IV) 之還原性烷基化反應



如上所示之衍生化方法利用白蛋白結合連接子 A-W-B，其中 B 具有末端醛官能基。經由還原性烷基化進行 hGH 與 A-W-B-CHO 之接合 (hGH→VI)。還原性烷基化在本文中例示且在此項技術中為公認的，且產生在 N-端位置經修飾之 hGH 化合物。

如實施例 14 中所述獲得白蛋白結合劑 (IV)。

合成：2-(C₂₀ 二酸-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-甘胺醯胺)-乙基-N^{α1}-hGH[Q84C、Y143C]



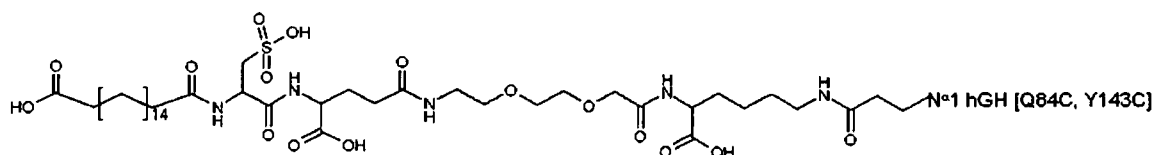
將 hGH[Q84C、Y143C] (23 mg) 溶解於 Hepes 緩衝液 (2.3 mL, 0.25 mM, pH 7.0) 中。用 TFA (50 μL) 處理 C₂₀ 二酸-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly-二甲基縮醛 (2 mg, 參見上述實施例 14) 6 分鐘，且在真空中蒸發至乾燥。用 EtOH (200 μL) 汽提殘餘物且在真空中蒸發至乾燥。將殘餘物溶解於 DMF (100 μL) 中且添加至 hGH 溶液中。形成沈澱物且藉由添加 DMF (1 mL) 再溶解。1 小時後，逐份添加 NaCNBH₃ (20 mg, 於 0.5 mL MeCN 中 (230 μl)) 溶液且靜置 20 小時。藉由添加 AcOH (2 mL) 淬滅反應且用

水稀釋至 20 mL 之總體積，且以製備型 HPLC 用 C18 管柱及 40%-80% 含 0.1% TFA 之 MeCN 對 0.1% TFA 水溶液的梯度純化。收集最後溶離之峰，用水自 70% MeCN 稀釋至 10% 且凍乾，得到 4.51 mg 2-(C₂₀ 二酸-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-甘胺鹽胺)-乙基-N^α1-hGH[Q84C、Y143C]。

TOF-MS: Rt=15.25 分鐘，質量=23150。

以與上文所述類似之方式，使用來自實施例 16 之白蛋白結合劑製備以下化合物。

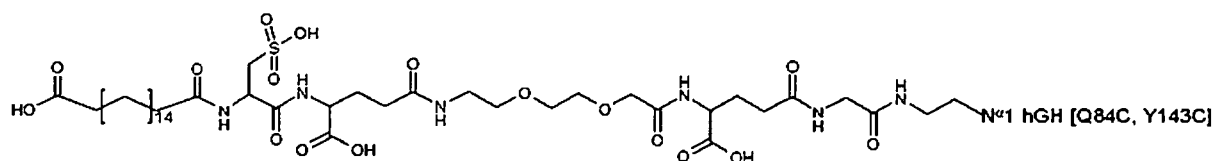
43.1



TOF-MS: Rt=15.2 分鐘，質量=23033。

以與上文所述類似之方式，使用來自實施例 15 之白蛋白結合劑製備以下化合物。

43.2



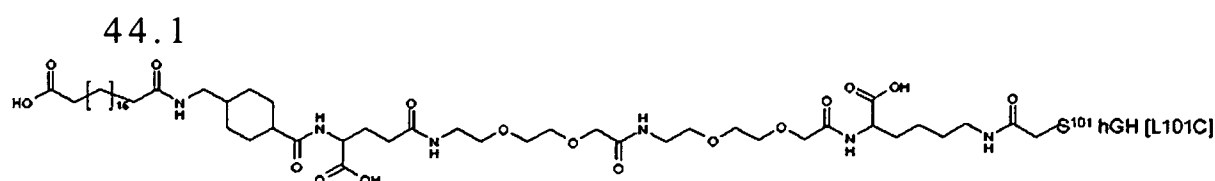
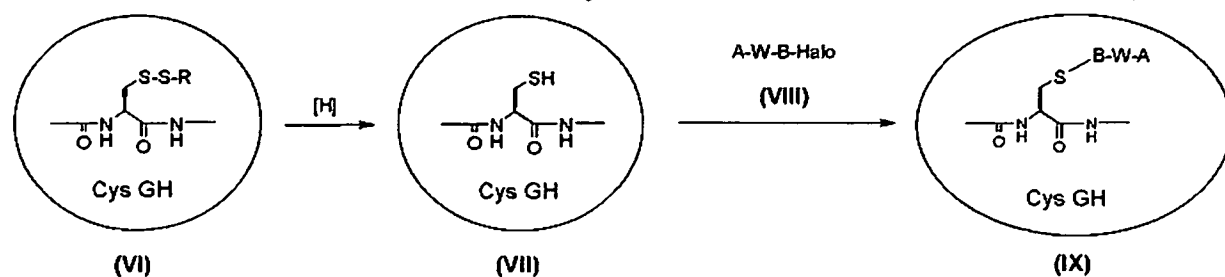
TOF-MS: Rt=15 分鐘，質量=22989.1。

實施例 44

1. 具有內部自由單一 cys 之 GH 化合物 (VII) 與白蛋白結合劑 (VIII) 之偶合

1) 經由用適合選擇性還原劑還原二硫醚 (VI) 來釋放自由 Cys GH (VII)；

2) 用鹵素活化之白蛋白結合劑 (VIII) 對自由 Cys GH (VII) 進行烷基化，得到 Cys 接合型 GH 化合物 (IX)



2-(C₂₀ 二酸-Trx-γGlu-OEG-OEG-δLys)-羰基亞甲基-S¹⁰¹-hGH[L101C]

製備 hGH[L101C] (VII)：

如上文獲得之 hGH[L101C] 具有其自由半胱胺酸經麩胱甘肽及胱胺阻斷之部分。使用麩胱還原蛋白 II (glutaredoxin II, Grx2) 在含有 GSH 及 GSSG 之平衡緩衝液中酶催化地進行去阻斷。藉由在葡聚糖凝膠 G25 管柱上進行緩衝液交換將去阻斷之 hGH[L101C] 與低分子量 GSH/GSSG 分離。

白蛋白結合劑 (VIII) 與 hGH[L101C] (VII) 之接合：

將來自實施例 5 之白蛋白結合劑 (78 mg, 5 當量) 溶解於 170 mL 含 5% 羥丙基-β-環糊精之 HEPES/EDTA 緩衝液中且添加 MTP (2.1 mL, 1%) 及 0.5 M NaCl (6.34 g)。向此混合物中添加濃縮之 hGH[L101C] (1 當量, 46 mL) 且混合物在室溫下靜置隔夜。隔夜後溶液變得渾濁。由於 HPLC 指示有未反應之起始物質，所以再添加溶解於最少量 NMP 中之 5 當量來自實施例 5 之白蛋白結合劑。在室溫下再攪

拌所得混合物 16 小時。

純化：

所用緩衝液：

緩衝液 A：

20 mM 三乙醇胺 (TEA) +10% 乙二醇

5.96 g 三乙醇胺

200 ml 乙二醇

添加 MQ 水至 2 l

用 1 N HCl 將 pH 值調節至 8.5

緩衝液 B：

20 mM 三乙醇胺 (TEA) +1.0 M NaCl+10% 乙二醇

5.96 g 三乙醇胺

116.88 g NaCl

200 ml 乙二醇

添加 MQ 水至 2 l

用 1 N HCl 將 pH 值調節至 8.5

在葡聚糖凝膠管柱上經 3 次操作將反應緩衝液更換為
含乙二醇之 TEA-緩衝液 A：

管柱：50/30 葡聚糖凝膠 G25 fine

緩衝液 A：

流速：10 毫升/分鐘

溫度：室溫（在 12°C 下收集溶離份）

溶離份：每份溶離份 30 mL

收集所需溶離份，彙集且接著用 Q 瓊脂糖管柱純化：

管柱：26/10 Q 瓊脂糖 HP

緩衝液 A：

緩衝液 B：

梯度 1：0%-10%緩衝液 B，1 CV；

梯度 2：10%至 40%緩衝液 B，20 CV；

梯度 3：40%-100%緩衝液 B，1 CV；

流速：8 毫升/分鐘

溫度：室溫（在室溫下收集溶離份）

溶離份：每份溶離份 5 mL

收集所需溶離份，彙集且在葡聚糖凝膠 G25 管柱上緩衝液交換成 10 mM 碳酸氫銨（pH 8.0）：

管柱：50/30 葡聚糖凝膠 G25 fine

緩衝液 A：10 mM 碳酸氫銨（pH 8.0）

流速：10 毫升/分鐘

溫度：室溫（在 12°C 下收集溶離份）

溶離份：每份溶離份 30 mL

彙集五份溶離份且冷凍乾燥。

藉由 MS 分析彙集物且觀測到大量二聚體（MS 44491.7）。

將冷凍乾燥之小瓶溶解於緩衝液 A 中且再在新 Q 瓊脂糖管柱上純化：

管柱：26/10 Q 瓊脂糖 HP

緩衝液 A：

緩衝液 B：

梯度 1：0%-10%緩衝液 B，1 CV

梯度 2：10%至 40%緩衝液 B，20 CV

梯度 3：40%-100%緩衝液 B，1 CV

流速：8 毫升/分鐘

溫度：室溫（在室溫下收集溶離份）

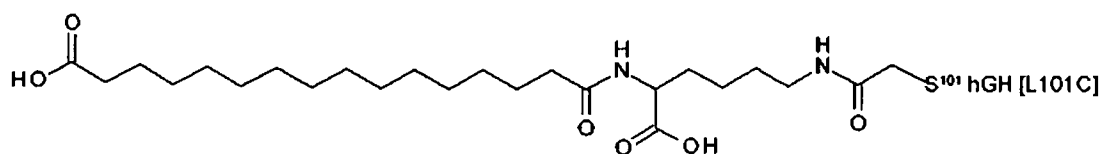
溶離份：每份溶離份 5 mL

彙集溶離份且藉由超濾脫鹽/緩衝液交換成 10 mM 碳酸氫銨。將彙集物濃縮至 25 mL 且藉由 RP-HPLC 及 MS-TOF 定量：

TOF-MS: $R_t=16.15$ 分鐘，質量=23315.96。

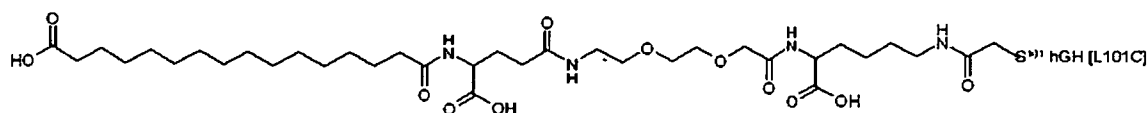
使用相同方法製備以下化合物。

44.2



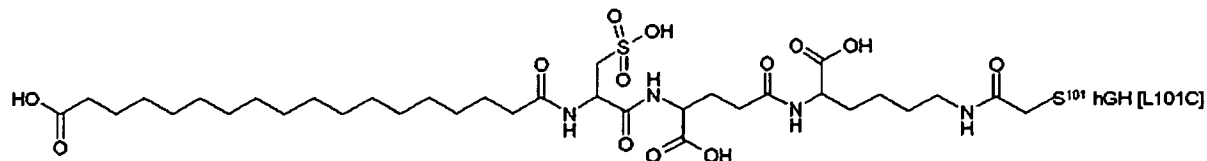
TOF-MS: $R_t=15.24$ 分鐘，質量=22676.8。

44.3



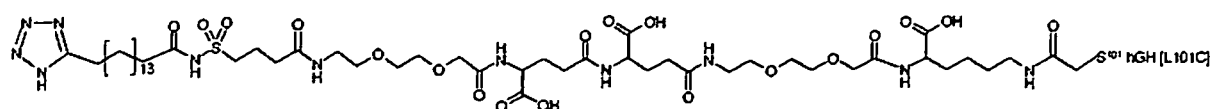
TOF-MS: $R_t=10.5$ 分鐘，質量=22975.1。

44.4



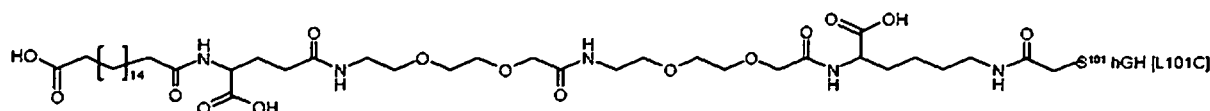
TOF-MS: $R_t=15.5$ 分鐘，質量=23009。

44.5



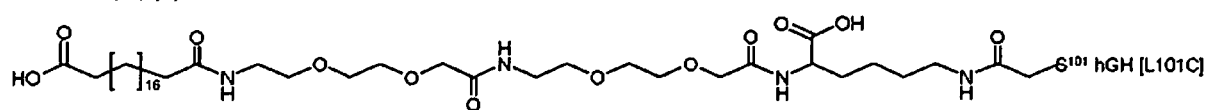
TOF-MS: R_t =14.0 分鐘，質量=23305.5。

44.6



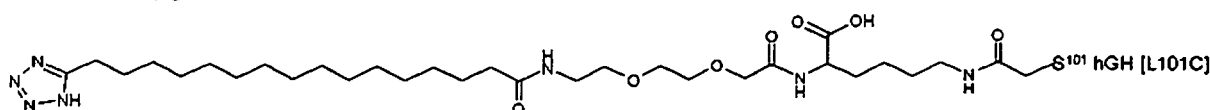
TOF-MS: R_t =15.27 分鐘，質量=23148。

44.7



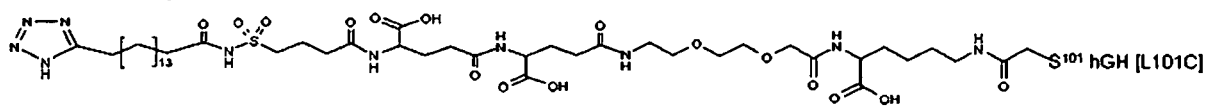
TOF-MS: R_t =16.40 分鐘，質量=23048。

44.8



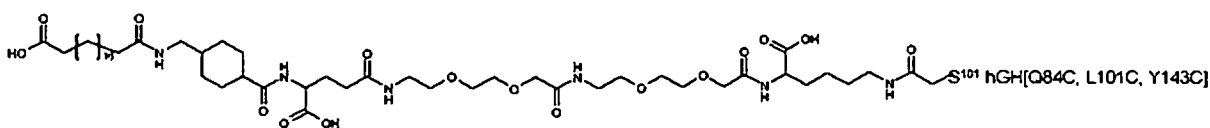
TOF-MS: R_t =15.3 分鐘，質量=22884.4。

44.9



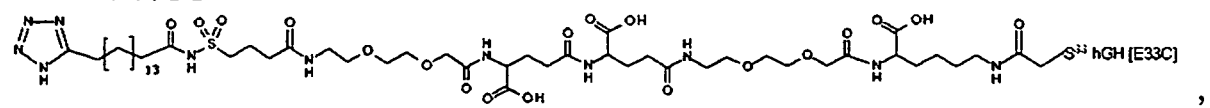
TOF-MS: R_t =14.6 分鐘，質量=23291.4。

44.10



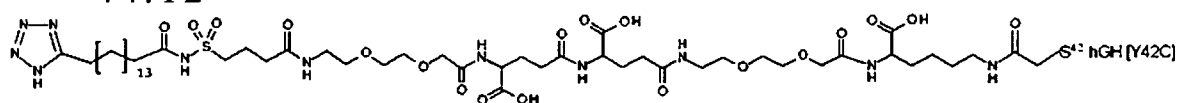
TOF-MS: R_t =15.05 分鐘，質量=23097.76。

44.11



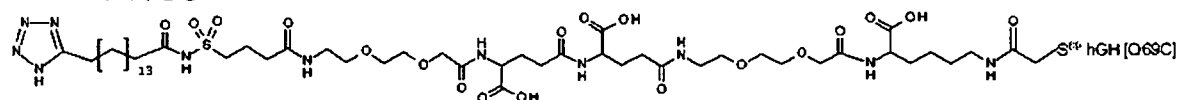
TOF-MS: R_t =14.2 分鐘，質量=23420.83。

44.12



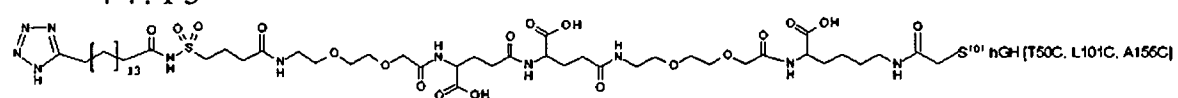
TOF-MS: $R_t=15.7$ 分鐘，質量=23289.6。

44.13



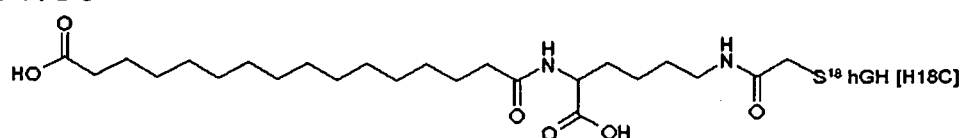
TOF-MS: $R_t=17.0$ 分鐘，質量=23324.55。

44.15



TOF-MS: $R_t=12.85$ 分鐘，質量=23337.5。

44.16

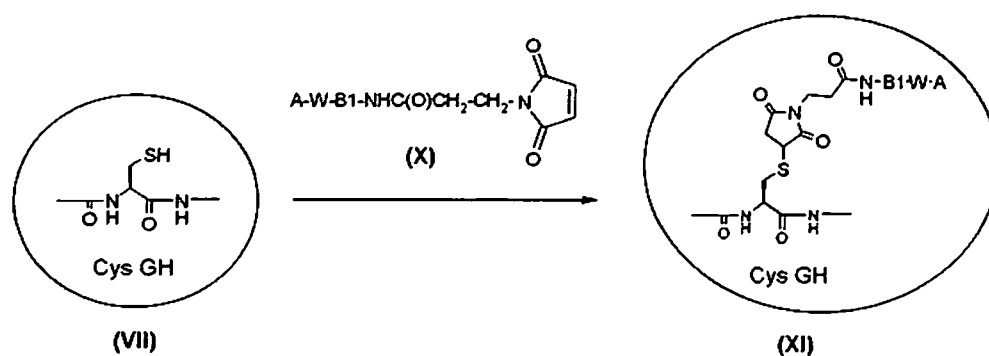


TOF-MS: $R_t=15,24$ 分鐘，質量=22676.8。

實施例 45

1. 具有內部自由單一 cys 之 GH 化合物 (VII) 與白蛋白結合劑 (X) 之偶合

1) 用經順丁烯二醯亞胺取代之白蛋白結合劑 (X) 對自由 Cys GH (VII) 進行烷基化，得到 Cys 接合型 GH 化合物 (XI)



可使如上文在實施例 44 中所獲得之 Cys 脫除保護基之 GH 化合物 (VII) 與經順丁烯二醯亞胺取代之白蛋白結合劑連接子 (X) 反應，得到 GH 接合物 A-W-B1-NHC(O)CH₂CH₂-吡咯啉-2,5-二酮-3-hGH (XI)，其中 B1 係如上述化學反應 IV 中所述定義。

經順丁烯二醯亞胺官能化之白蛋白結合劑 (X) 與 hGH L101C 之接合

步驟 (a) 半胱胺酸殘基之去阻斷

使用麩氧還原蛋白 II (Grx2) 在含有 GSH 及 GSSG 之平衡緩衝液中將 Cys 經麩胱甘肽/半胱胺阻斷之 hGH (VI) 酶催化地去阻斷。在葡聚糖凝膠 G25 管柱上藉由緩衝液交換將 Cys 去阻斷之 hGH (VII) 與低分子 GSH/GSSG 分離。

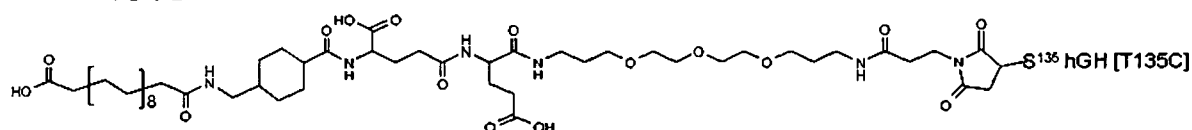
步驟 (b) 偶合至經順丁烯二醯亞胺官能化之白蛋白結合劑 (X)

將經順丁烯二醯亞胺官能化之白蛋白結合劑 (X) 溶解於含有 5% 羥丙基-β-環糊精之緩衝液中。接著將溶液添加至 Cys 去阻斷之 hGH (VII) 中且在室溫下反應隔夜。

接合後，在 Q 瓊脂糖 HiLoad 管柱上於含有 10% 乙二醇之 20 mM 三乙醇胺緩衝液 (pH 8.5) 中使用氯化鈉之梯度純化接合之蛋白質。彙集收集之溶離份且使用 G25 管柱轉

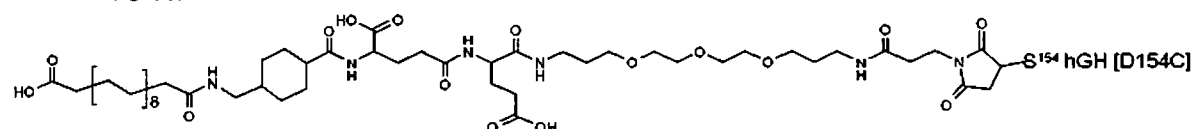
移至 10 mM 碳酸氫銨中且凍乾。

45.1



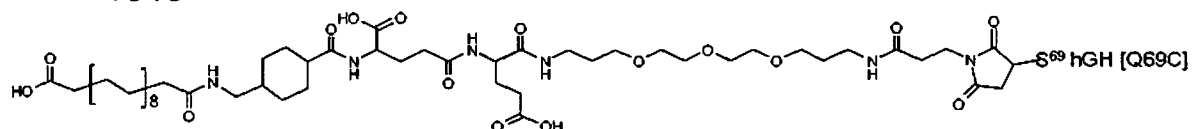
TOF-MS: R_t =16.0 分鐘，質量=23352。

45.2



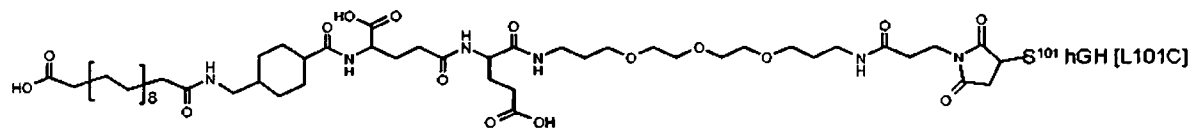
TOF-MS: R_t =15.98 分鐘，質量=23338。

45.3



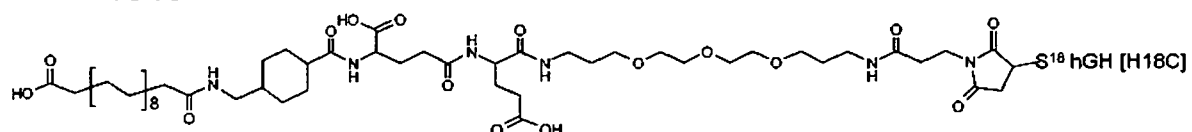
TOF-MS: R_t =16.62 分鐘，質量=23324.6。

45.4



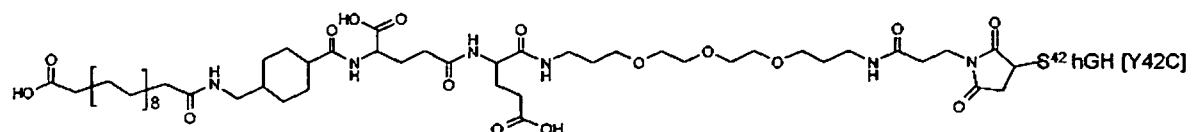
TOF-MS: R_t =16.20 分鐘，質量=23339.7。

45.5



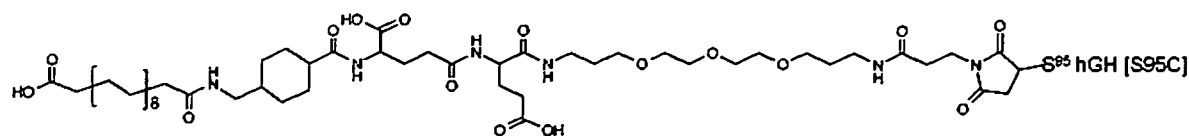
TOF-MS: R_t =15.72 分鐘，質量=23316.35。

45.7



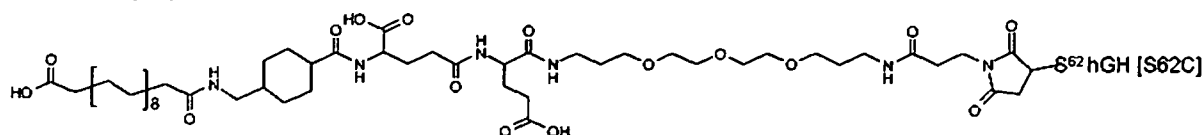
TOF-MS: R_t =17.2 分鐘，質量=23365.9。

45.8



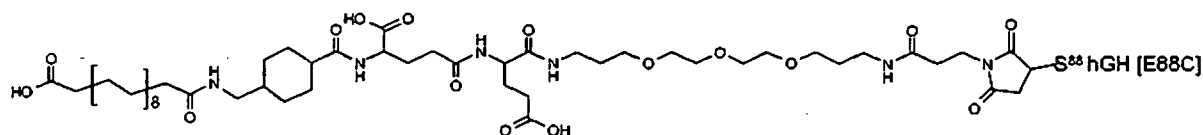
TOF-MS: R_t =17.2 分鐘，質量=23366。

45.9



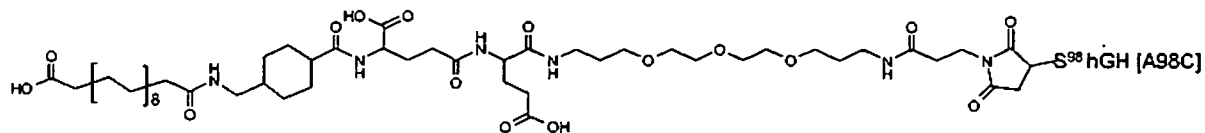
TOF-MS: R_t =16.5 分鐘，質量=23366。

45.10



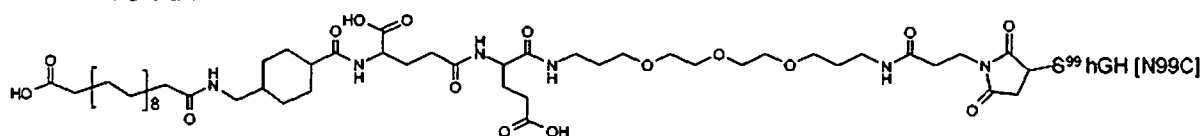
TOF-MS: R_t =16.8 分鐘，質量=23323.8。

45.11



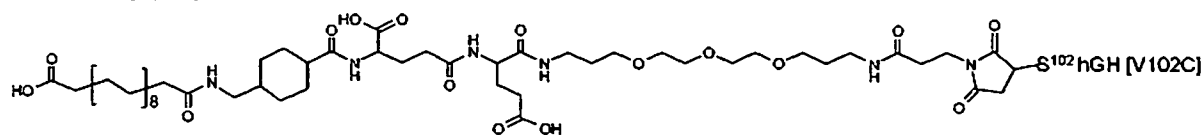
TOF-MS: R_t =17.1 分鐘，質量=23382。

45.12



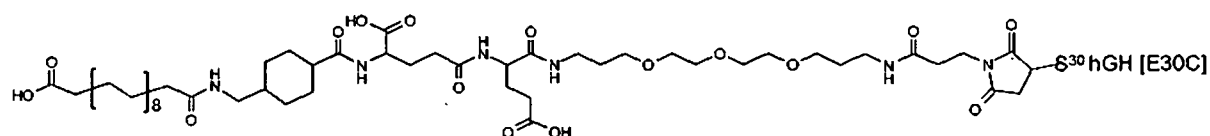
TOF-MS: R_t =17.2 分鐘，質量=23338.8。

45.13



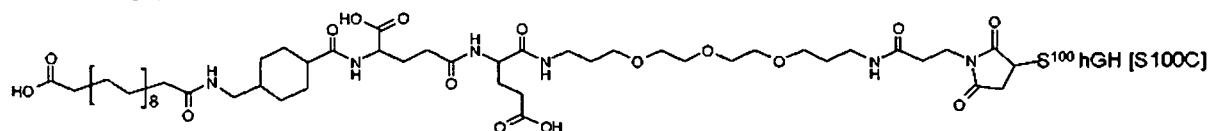
TOF-MS: R_t =17 分鐘，質量=23353.9。

45.14



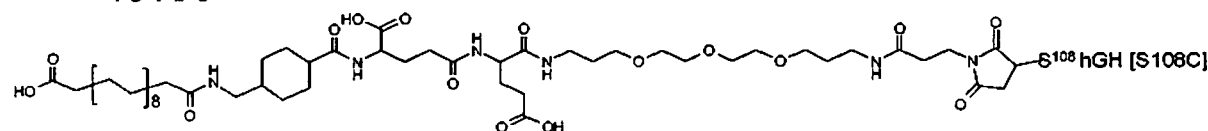
TOF-MS: $R_t=15.65$ 分鐘，質量=23323.7。

45.15



TOF-MS: $R_t=16.5$ 分鐘，質量=23365.8。

45.16



TOF-MS: $R_t=17.2$ 分鐘，質量=23365.9。

實施例 46

檢定 (I) 測定生長激素活性之 BAF-3GHR 檢定

BAF-3 細胞（來源於骨髓之鼠類原 B 淋巴樣細胞系）的生長及存活最初具有 IL-3 依賴性。IL-3 活化 JAK-2 及 STAT，後兩者與在刺激時活化 GH 之介體相同。在轉染人類生長激素受體後，細胞系變成生長激素依賴性細胞系。此純系可用於評估不同生長激素樣品對 BAF-3GHR 之存活的影响。

將 BAF-3GHR 細胞在饑餓培養基（無生長激素之培養基）中於 37°C 、5% CO_2 下培養 24 小時。

洗滌細胞且再懸浮於饑餓培養基中且接種於培養板中。將 $10\ \mu\text{L}$ 不同濃度之生長激素化合物或人類生長激素或對照物添加至細胞中，且在 37°C 、5% CO_2 下培育培養板 68 小時。

將 AlamarBlue®添加至各孔中，且接著再培育細胞 4 小時。AlamarBlue®為氧化還原指示劑，且由細胞代謝固有之反應還原，且因此提供對活細胞數目之間接量度。

最終，在螢光板讀取器中量測細胞之代謝活性。樣品之吸光度表示為未受生長激素化合物或對照物刺激之細胞的百分比，且可自濃度-反應曲線計算出活性（刺激 50%細胞之化合物的量）。

化合物 45.4 在 BAF-3 hGH 受體檢定中之試管內效能展示於下表 1 中。

如一般方法中所述藉由將化合物與胰凝乳酶或彈性蛋白酶一起培育 4 小時來測定化合物 45.5 之蛋白酶穩定性。量測完整 GH 化合物之百分比且結果包括於表 1 中。

表 1. 關於化合物 45.4 之資料

化合物	EC ₅₀ (nM)	比率 (EC ₅₀ cmp/EC ₅₀ hGH)	n	胰凝乳酶 (完整 GH 化合物%)	彈性蛋白酶 (完整 GH 化合物 %)
hGH	0.026±0.012	1	6	40	25
45.4	0.09±0.043	3.5	6	75	65

實施例 47

藥物動力學

利用雄性史泊格多利大鼠在靜脈內 (i.v.) 及皮下 (s.c.) 單次劑量投藥後研究實施例化合物之藥物動力學。

測試化合物在由以下組成之稀釋緩衝液中稀釋至 1 mg/mL 之最終濃度：甘胺酸 20 mg/mL、甘露糖醇 2 mg/mL、NaHCO₃ 2.5 mg/mL (pH 值調節至 8.2)。

利用體重為 250 g 之雄性史泊格多利大鼠研究測試化合物。以每公斤體重 60 nmol 之劑量用 25 G 針藉由在尾靜脈中靜脈內或在頸中皮下單次注射投予測試化合物。

對於各測試化合物，根據表 2 中提供之以下時程進行血液取樣。

表 2. 各測試化合物之血液取樣時程

		取樣時間 (h)												
動物編號	RoA	給藥前	0.08	0.25	0.5	1	2	4	6	8	18	24	48	72
1	s.c.							X	X	X		X	X	X
2								X	X	X		X	X	X
3				X	X	X	X							
4				X	X	X	X							
5			X								X			
6			X								X			
7	i.v.				X	X			X	X		X	X	X
8					X	X			X	X		X	X	X
9		X	X								X			
10		X	X								X			

在各取樣時間，使用 25 G 針自尾靜脈抽出 0.25 ml 血液。將血液取樣至塗有 EDTA 之試管中，且儲存於冰上直至以 1200×G 在 4℃ 下離心 10 分鐘。將血漿轉移至 Micronic 管中且儲存於 -20℃ 下直至進行分析。

藉由夾心 ELISA 使用天竺鼠抗 hGH 多株抗體作為捕捉劑，且使用經生物素標記之 hGH 結合蛋白（人類 GH 受體之可溶性部分）作為偵測劑來測定測試化合物濃度。檢定之偵測極限為 0.2 nM。

使用 WinNonlin Professional(Pharsight 公司, Mountain View, CA, USA) 對各測試化合物之平均濃度-時間曲線進行

非隔室藥物動力學分析。計算終末半衰期 ($t_{1/2}$) 及平均滯留時間 (MRT) 之藥物動力學參數估算值。

表 3.在單次劑量靜脈內及皮下投予後實施例之 GH 化合物在史泊格多利大鼠體內之半衰期 ($t_{1/2}$) 及平均滯留時間 (MRT)。

化合物 (實施例編號)	RoA	$t_{1/2}$ (h)	MRT (h)
43.0	i.v.	7.2	9.8
43.2	i.v.	4.4	7.4
44.1	i.v.	5.6	7.2
44.3	i.v.	1.3	0.9
44.4	i.v.	2.5	2.7
44.5	i.v.	4.1	6.8
44.6	i.v.	3.2	4.0
44.7	i.v.	3.8	6.0
44.9	i.v.	4.2	6.5
45.4	i.v.	8.6	9.8
45.4	s.c.	19.8	31.2
45.12	i.v.	5.8	6.8

實施例 45.4 之生體可用率經估算為 48.3%。在皮下投予後達到最大血漿濃度之時間 (t_{max}) 為 8.0 小時。在靜脈內及皮下投予後， C_{max} 分別為 1670 nM 及 151 nM。在靜脈內投予後在時間零時之外推血漿濃度為 1710 nM。

實施例 48

如上文所述測定一系列化合物之試管內效能及半衰期。化合物之接合物相同，但經由藉由如表 4 中所述之突變引入之替代半胱胺酸連接。

表 4.試管內效能及半衰期 ($t_{1/2}$)

化合物	試管內效能	$T_{1/2}$ (靜脈內大鼠) (小時)	MRT (小時)	連接位點 (變異體)
-----	-------	------------------------	----------	------------

hGH	1.0 (def)	0.23		-
45.1		2.6	3.8	T135C
45.2		2.8	8.7	D154C
45.3		2.1	3.1	Q69C
45.4	2.9	6.3/8.6	7.8/9.8	L101C
45.5		4.1	4.5	L18C
45.7		4.1	5.5	Y42C
45.8		0.72	6.5	S95C
45.9		0.59	2.0	S62C
45.10		1.8	4.1	E88C
45.11	2.6	3.4	4.3	A98C
45.12	3.1	5.8	6.8	N99C
45.13	2.5	1.9	3.0	V102C
45.14	16.5	1.9	2.6	E30C
45.15	4.4	1.5	2.0	S100C

實施例 49

垂體經切除之史泊格多利大鼠中的活體內劑量-反應研究

利用垂體經切除之雄性史泊格多利大鼠研究活體內劑量-反應關係。垂體經切除之大鼠為熟知及公認的生長激素缺乏之動物模型，其中在手術移除垂體腺後不產生生長激素。此亦導致低循環含量之胰島素樣生長因子-1 (IGF-1)，胰島素樣生長因子-1 為人類生長激素缺乏之另一重要臨床特徵。

對體重為 90 至 100 g 之 4 週齡雄性大鼠進行垂體切除術。手術後 3 至 4 週體重為 100 至 110 g 之動物進入研究。在手術後 3 至 4 週期間體重增加 10% 以上的動物不允許進入研究。

使用每隻大鼠 1 至 150 nmol 化合物 45.4 之五種劑量進行劑量反應研究。

在所有給藥組中，垂體經切除之史泊格多利大鼠的血

漿 IGF-1 之基線含量為約 80 至 100 ng/mL。單次給藥後，在第 1 天，IGF-1 含量快速升高至 800 至 1000 ng/mL，幾乎與劑量無關。在隨後幾天中血漿 IGF-1 含量再以劑量依賴性方式下降，其中在最低劑量下觀測到最快下降，且在最高劑量下觀測到最慢下降。在最高劑量下，IGF-1 血漿含量在開始較快速下降之前維持於 800 至 900 ng/mL 歷時 3 天。第 3 天前所有給藥組之 IGF-1 血漿濃度含量相較於媒劑對照組較高。對於給藥組 10 nmol、50 nmol 及 150 nmol，其在整個研究（7 天）期間皆較高。

實施例 50

消失

假定吸收速率與分子通過皮下毛細血管之緊密連接的能力（與分子大小相關之性質）相關。具有 40 kDa PEG 之 PEG-hGH 具有 150 至 250 kDa 之表觀分子量（mw）。具有共價結合之白蛋白之 hGH 分子具有 $mw = 87$ kDa，而具有非共價結合之白蛋白的 hGH 分子將耗費一部分時間與白蛋白解離且因此具有 $mw = 22$ kDa。解離狀態所耗費之時間將取決於白蛋白結合部分之親和力。因此，該等化合物之吸收速率應快於 PEG-hGH 之吸收速率，且吸收速率應隨著使用對白蛋白具有較低親和力之白蛋白結合部分而增加。

在由以下組成之標準緩衝液中稀釋測試溶液：甘胺酸 20 mg/mL、甘露糖醇 2 mg/mL、 NaHCO_3 2.4 mg/mL（pH 值調節至 8.2）。

由 Chemistry & Isotope Lab. Novo Nordisk A/S 用 ^{125}I

進行碘化。最終放射性調配物具有 3 μ Ci/mL 之比放射活性且於 3 mL 筆式注射劑（Penfill）中供應。

使用前溶液儲存於 2°C 至 8°C 下。

利用 5 隻雜交 LYD 雌性豬量測所選化合物之消失速率。對豬進行稱重、禁食且配給專門「豬外套（pig coat）」以攜帶 γ 計數器及發射器且在開始研究前置於單個畜圈中。

所有豬在研究前禁食 18 小時。

用具有固定黑色針頭限制器（needle stopper）之 Novopen3®及 NovoFine® 28G 針分別在頸部左側及右側對動物進行皮下給藥（60 nmol）。注射深度為 5 mm。

藉由攜帶型裝備量測放射性儲積物的消失率約 24 至 48 小時。

對於各個別動物，結果呈示為 AUC（0 至 45 小時），如表 5 中所示。

如上文所述測定一系列化合物之試管內效能、半衰期及其他特徵且展示於表 5 中。

表 5.化合物特徵

化合物	試管內效能	T _½ （靜脈內大鼠） （小時）	消失 AUC（0-45 小時）	IGF-1 增加持續時間 （小時）
hGH	1.0（def）	0.23	519	-
44.9	8.2	4.2	2259	>48
44.8	1.8	2.6	1490	>24
44.1	4.7	5.6	1750	>48
44.3	1.5	1.3	2152	<24
44.6	4.7	3.2	1558	<24
44.7	4.5	3.8	2039	<24
44.5	5.8	4.1	1599	>48
44.4	3.9	2.5	1588	>48

實施例 51

豬之活體內研究

為進一步證實本發明 hGH 白蛋白接合物之功能性，選擇三種化合物用於在豬中進行其他藥物動力學研究。藉由在移除 MAEA 純化標籤後將白蛋白結合劑接合至 hGH 變異體來製備相當於化合物 44.1、44.5 及 44.6 之化合物。

在標準緩衝液（20 mg/ml 甘胺酸、2 mg/ml 甘露糖醇、2.4 mg/ml NaHCO_3 ，pH 值調節至 8.2）中將測試化合物稀釋至 100 nmol/mL 之最終濃度。在研究中使用二十四隻體重為 9 至 12 kg 之 5 月齡雄性格廷根小種豬（Gottingen minipig）。對 8 隻動物給予各測試化合物，其中四隻小種豬接受靜脈內快速注射投藥且四隻動物接受皮下投藥。靜脈內注射經由 24 G Venflon 給予耳朵中。以快速注射形式經最多 5 秒給予劑量，繼而給予 2 ml 0.9% NaCl。在頸部右側距耳朵約 5 至 7 cm 及距頸部中間 7 至 9 cm 處給予皮下注射。各動物接受 10 nmol/kg 測試化合物之單次劑量。在以下時間點自各動物收集血液樣品：給藥前、注射後第 0.08、0.25、0.5、1、2、4、6、8、18、24、48、72、96、120、168、240 及 336 小時。自各血液樣品分離血漿且在分析測試化合物之前儲存於 -20°C 下。藉由非隔室藥物動力學方法分析血漿濃度-時間資料。

表 6. 單次劑量皮下投予 10 nmol/kg 後之藥物動力學參數估算值。

化合物	ABW-Halo	AUC/劑量 (h*kg/l)	T _½ (h)	MRT (h)	MAT (h)	F (%)
51.1	44.1	139 (37.5)	11 (1.2)	30.6 (4.1)	10.0	38.6
51.2	44.4	101 (22.5)	12 (2.7)	25.2 (3.9)	11.6	60.8
51.3	44.5	144 (34.7)	12.6 (3.5)	33.1 (1.7)	12.1	35.6

() 中為平均值±SD

表 6 展示三種測試化合物之關鍵藥物動力學參數。AUC/劑量為測試化合物之劑量校正暴露量 (dose corrected exposure) 之估算值。T_½為在吸收期完成後測試化合物之終末半衰期。MRT 為對應於平均測試化合物分子處於體內之時間的測試化合物之平均滯留時間。MAT 為相應平均吸收時間且為分子處於吸收期之平均時間的估算值。F 為關於靜脈內投予之測試化合物之絕對生體可用率。

【圖式簡單說明】

圖 1 表示生長激素之三維結構。

圖 2 表示野生型人類生長激素 (hGH) 之氨基酸序列。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> Novo Nordisk A/S

<120> 生長激素化合物

<130> 8069.200-TW

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 191

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr
第 1 頁

145 150 155 160

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

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

104年4月28日修(正)正本

104年4月28日修正替換頁

公告本

七、申請專利範圍：

1.一種生長激素接合物，其包含具有單一 Cys 突變之生長激素化合物 (GH)，其中白蛋白結合殘基經由親水性間隔基連接至該 GH 之單一 Cys 之硫殘基，或其醫藥學上可接受之鹽。

2.如申請專利範圍第 1 項之接合物，其中該生長激素接合物具有式 (I)：



其中

GH 表示該生長激素化合物，

B 表示連接至該 Cys 突變之硫殘基的親水性間隔基，

W 為連接 A 與 B 之化學基團，及

A 表示白蛋白結合殘基。

3.如申請專利範圍第 2 項之接合物，其中該親水性間隔基連接至該生長激素化合物中存在之單一 Cys 突變，該單一 Cys 突變係選自 hGH (SEQ ID NO: 1) 之以下任一者：

T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C 及 G190C。

4.如申請專利範圍第 3 項之接合物，其中該親水性間隔

基連接至該生長激素化合物中存在之單一 Cys 突變，該單一 Cys 突變係選自 hGH (SEQ ID NO: 1) 之以下任一者：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 及 G126C。

5.如申請專利範圍第 4 項之接合物，其中該單一 Cys 突變為 L101C 且其中該親水性間隔基連接至 L101C 之硫。

6.如申請專利範圍第 3 項之接合物，其中該白蛋白結合殘基透過親水性間隔基連接至具有單一 Cys 突變與額外的二硫橋鍵的 GH 化合物。

7.如申請專利範圍第 6 項之接合物，其中該 GH 化合物在對應於 hGH (SEQ ID NO: 1) 中以下位置之至少一個胺基酸對之間具有額外二硫橋鍵：R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C。

8.如申請專利範圍第 6 項之接合物，其中該額外的二硫

橋鍵之半胱胺酸之至少一者係存在於環區段。

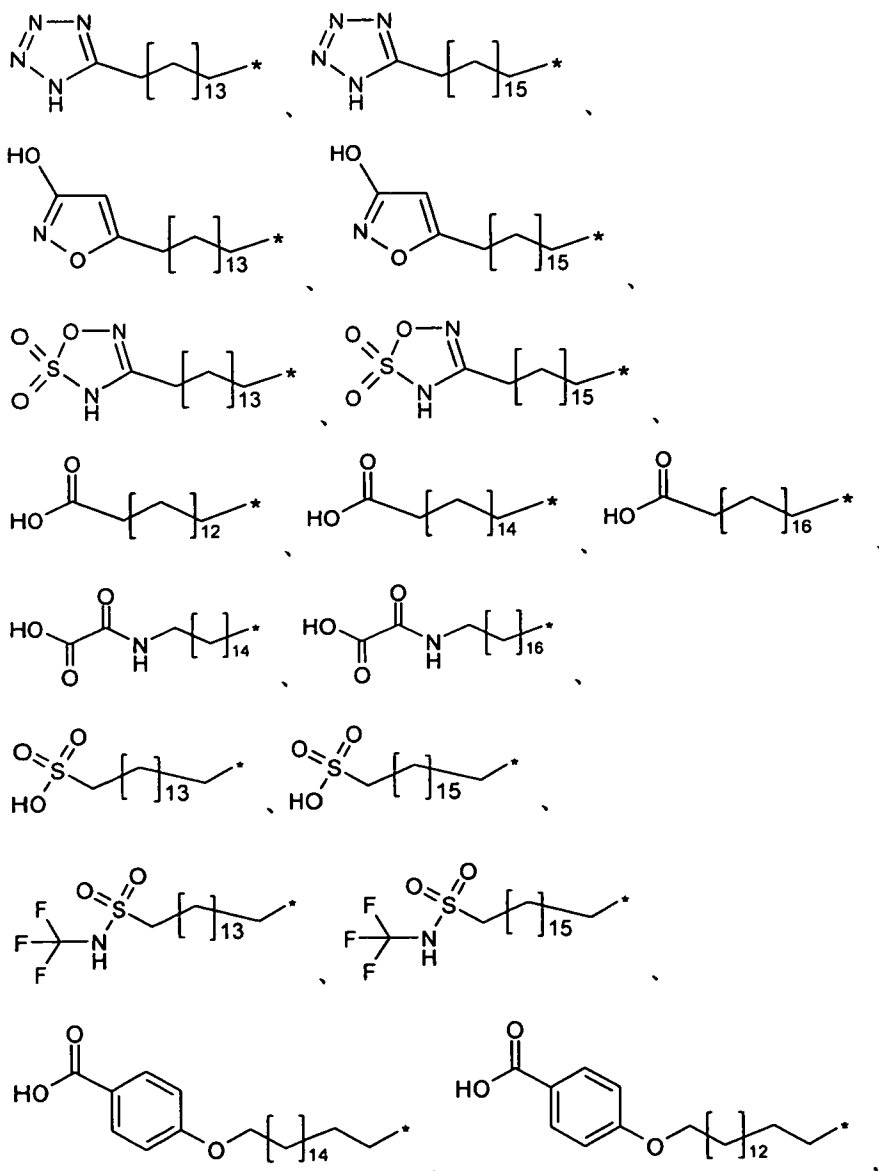
9.如申請專利範圍第 8 項之接合物，其中該環區段為胺基酸殘基 128-154 (L3)。

10.如申請專利範圍第 9 項之接合物，其中該額外二硫鍵連接 L3 與螺旋 2。

11.如申請專利範圍第 1-10 項中任一項之接合物，其中該 GH 與 hGH (SEQ ID 1) 具有至少 95 %一致性。

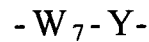
12.如申請專利範圍第 3 項或第 6 項之接合物，其中 A

係選自



其中*表示經由 W 連接至 B。

13.如申請專利範圍第 12 項之接合物，其中 W 具有下式：



其中

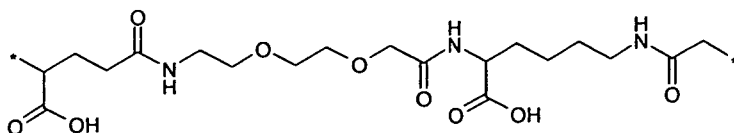
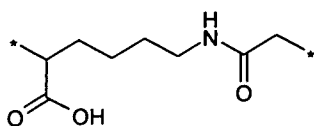
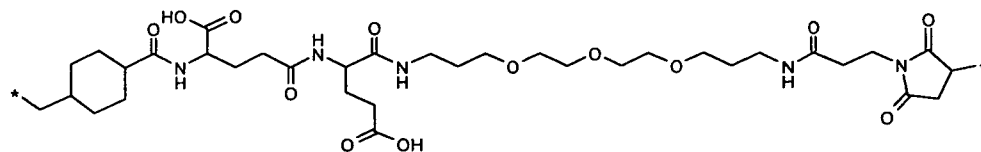
Y 為 $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ 環烷基- W_8 -或價鍵，

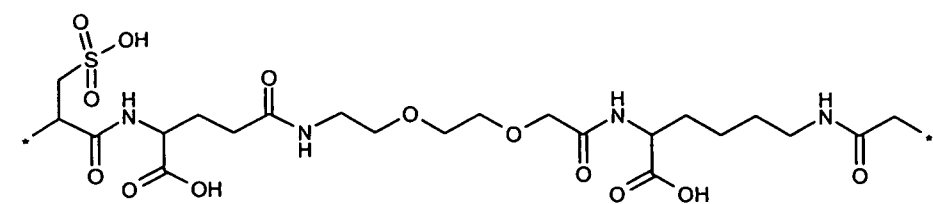
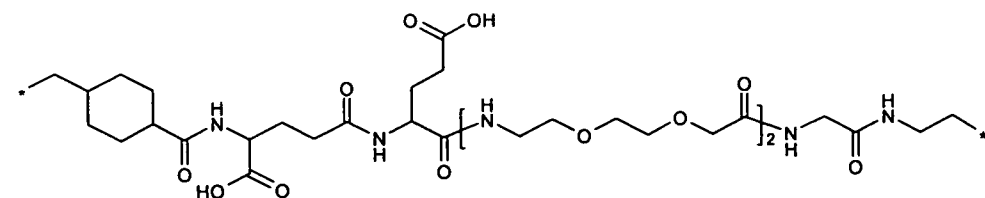
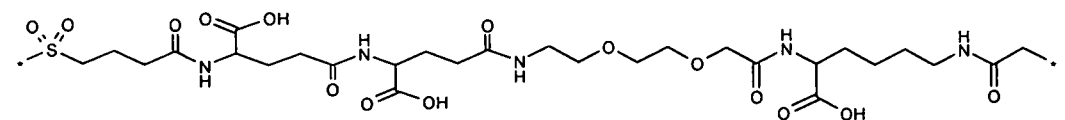
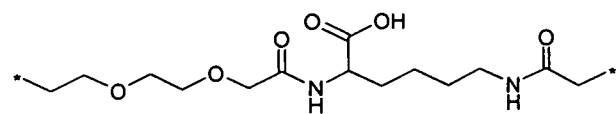
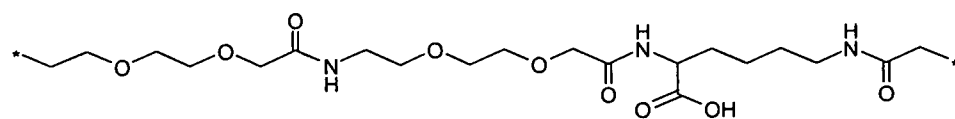
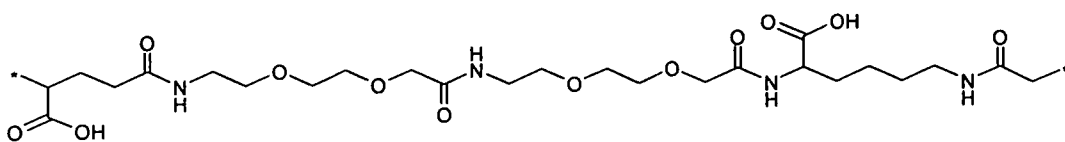
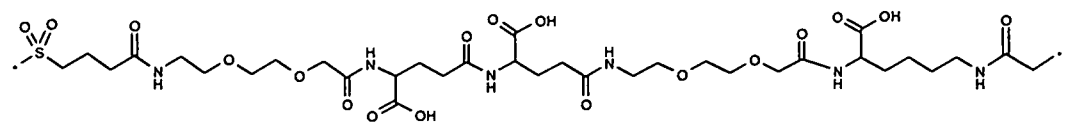
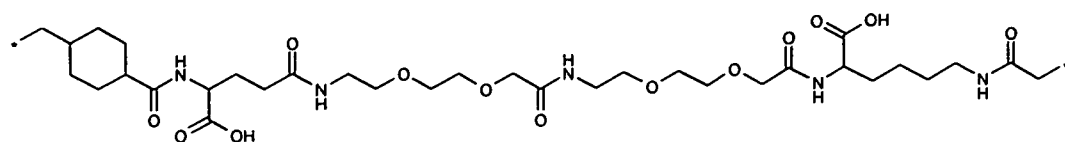
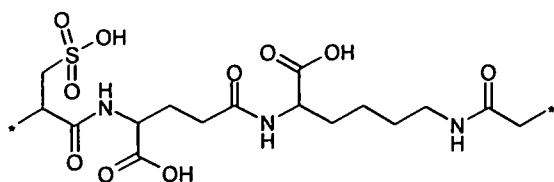
17 為 0 至 6，

W_7 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s3}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s3$ 為 0 或 1，

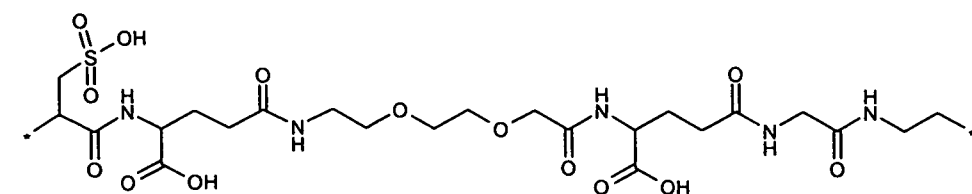
W_8 係選自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s4}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或價鍵；其中 $s4$ 為 0 或 1。

14.如申請專利範圍第 13 項之接合物，其中 B 係選自

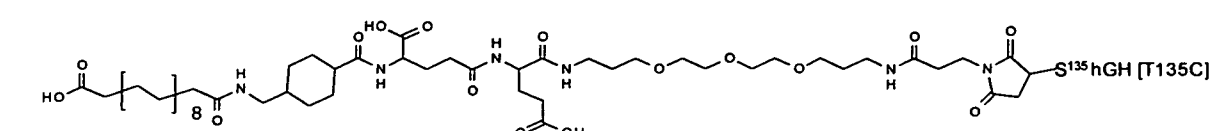
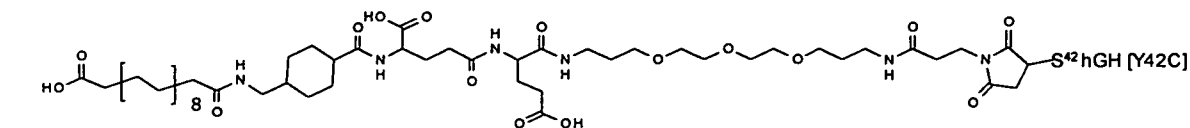
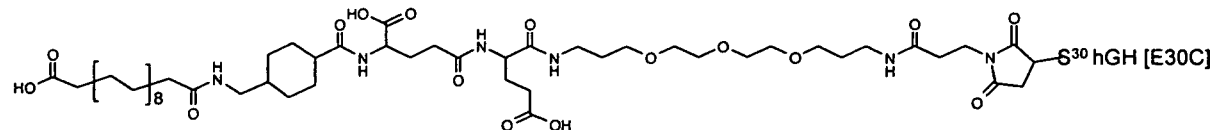
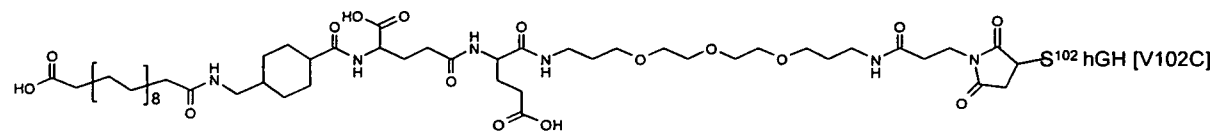
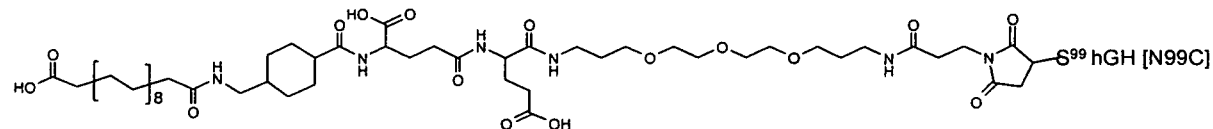
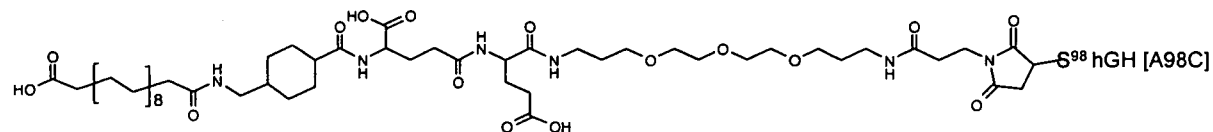
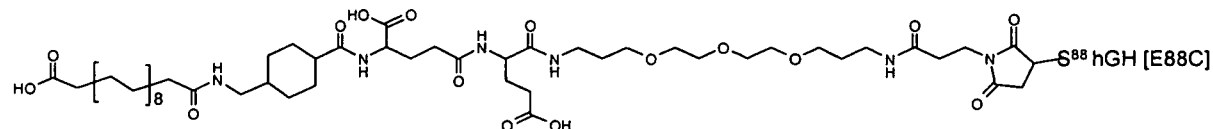
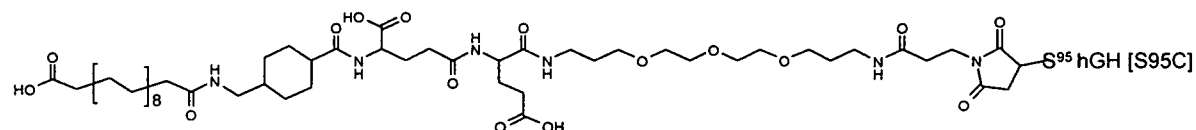
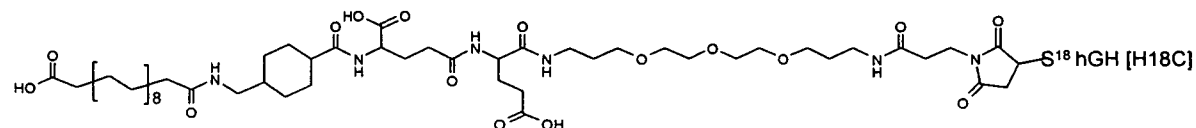
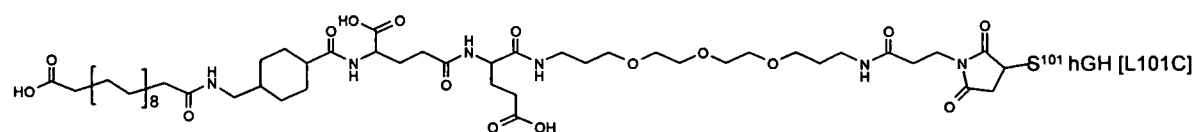


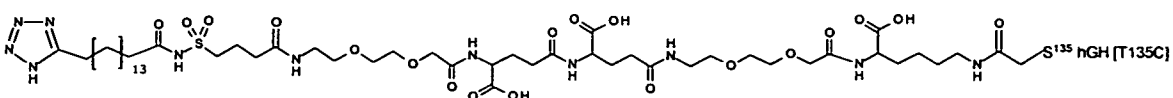
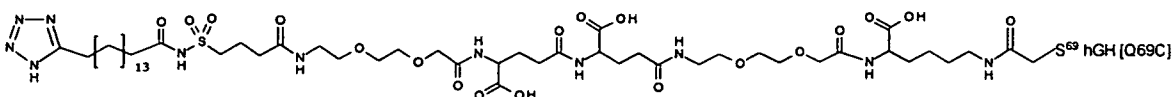
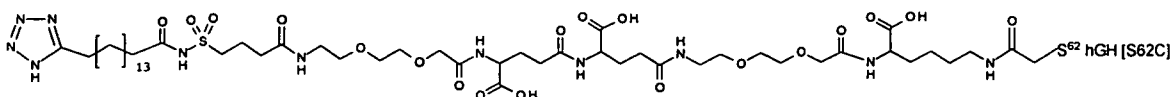
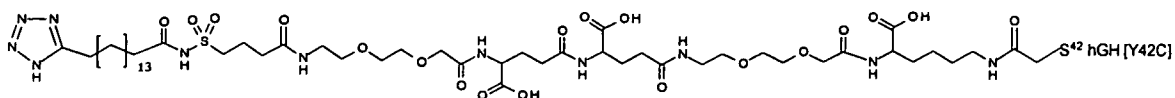
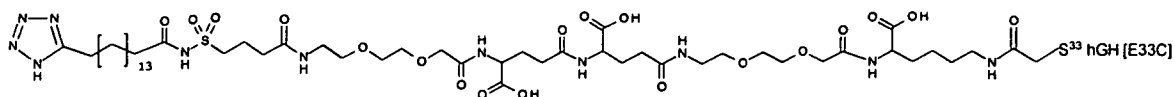
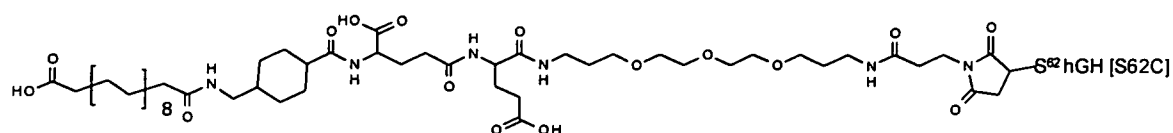
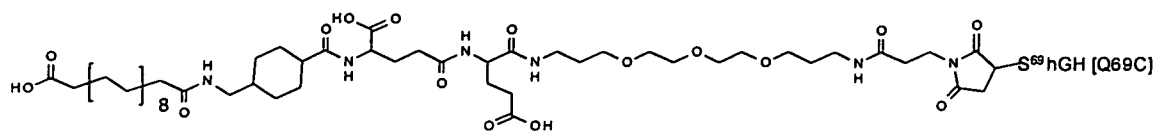
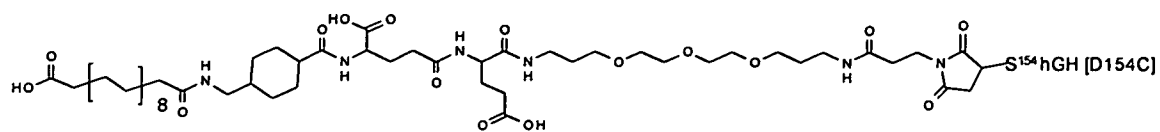


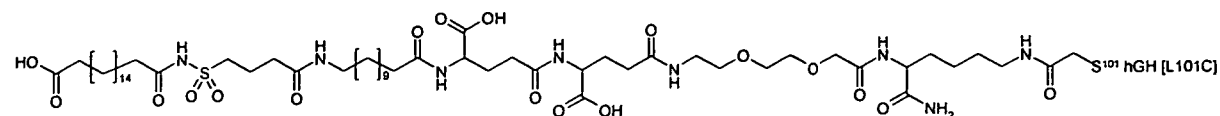
與

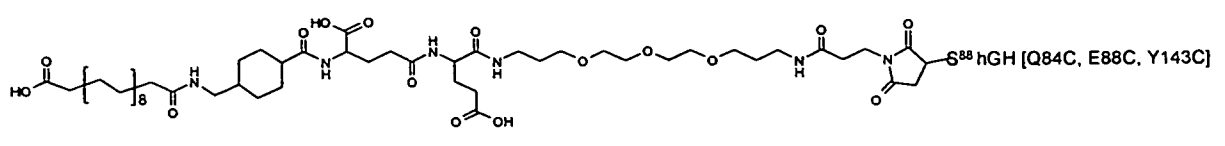
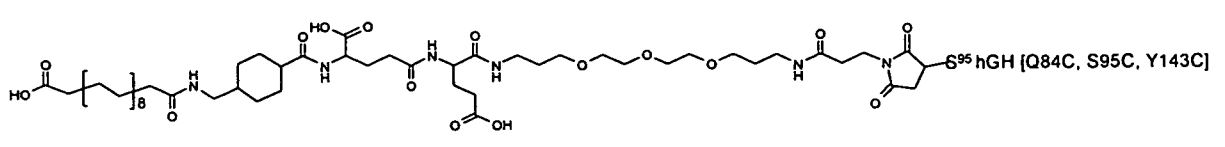
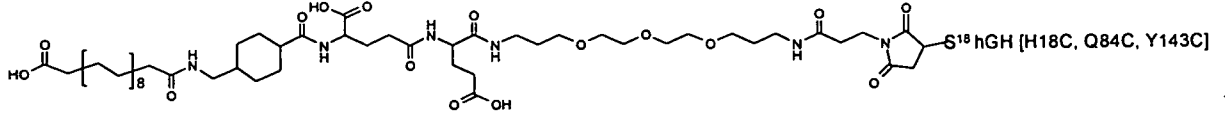
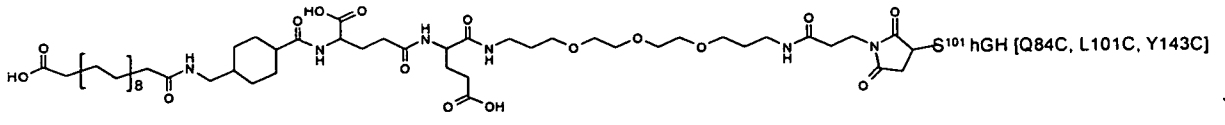
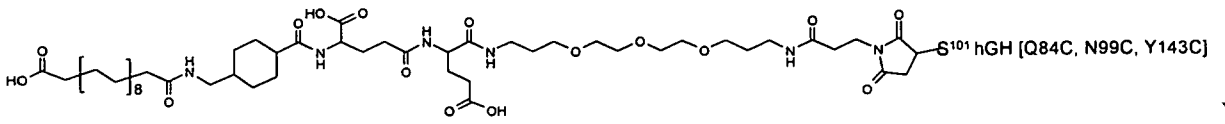
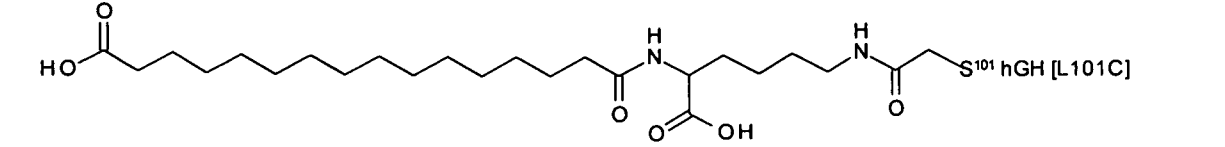
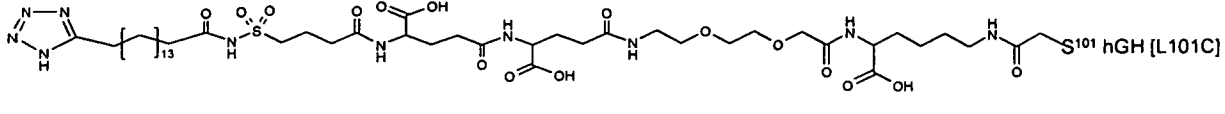
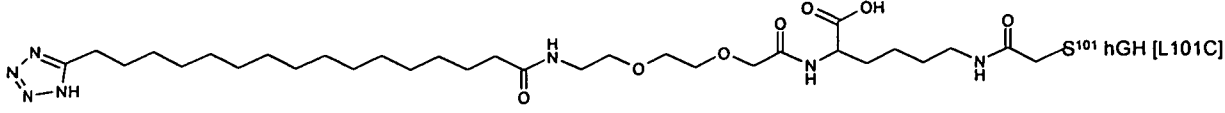
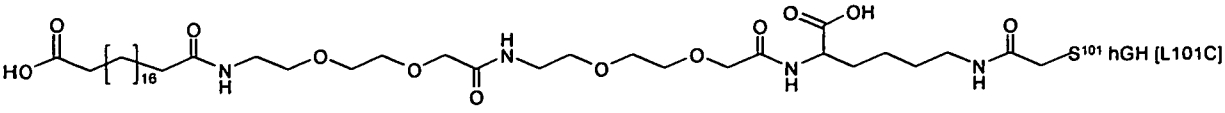
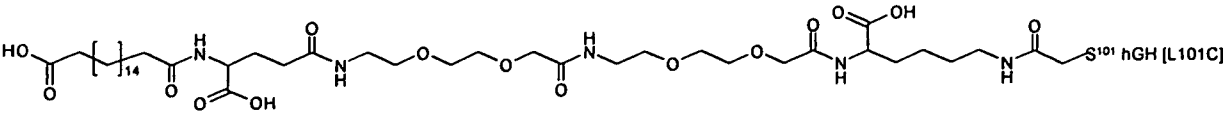


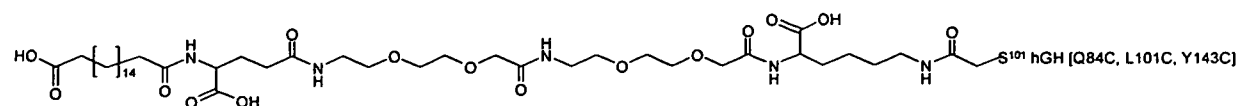
15.如申請專利範圍第 1 項之接合物，其中該化合物係
選自

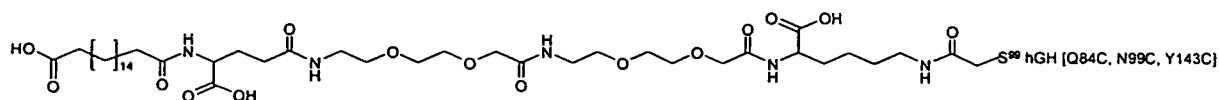


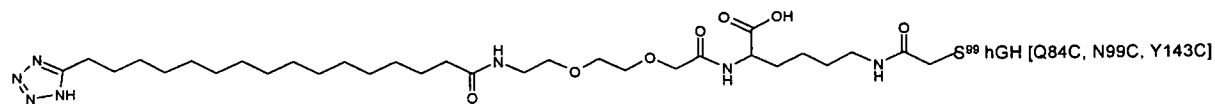
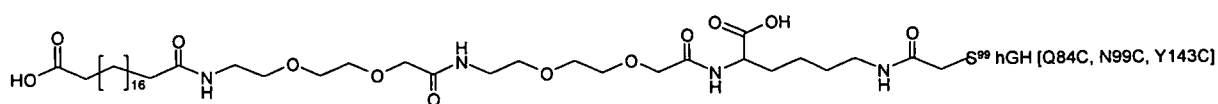




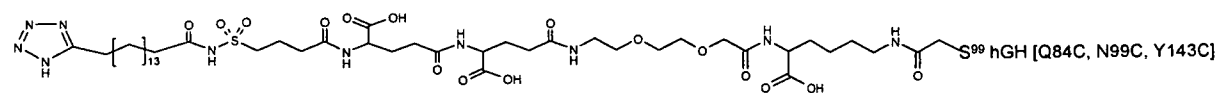








及



八、圖式：

(如次頁)

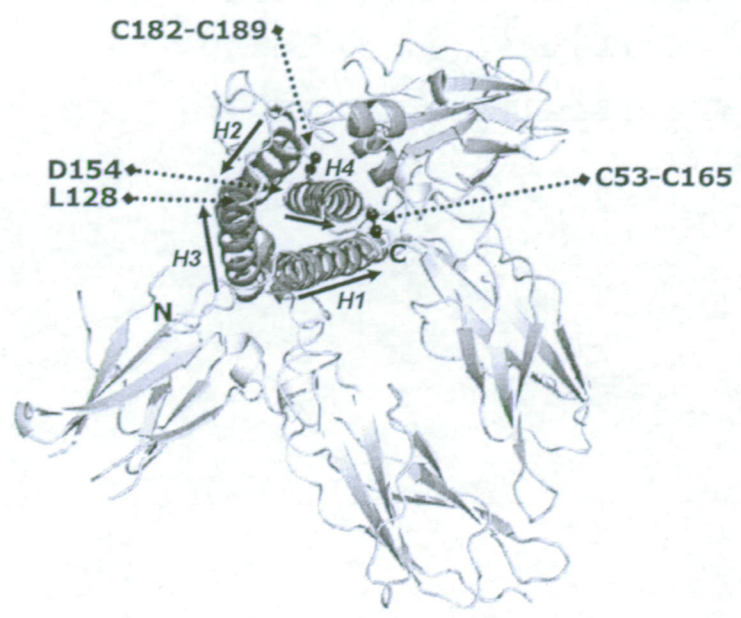


圖1