



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116635027 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 22

(21) 申请号 202180079063.9

(22) 申请日 2021.11.24

(30) 优先权数据

63/118,568 2020.11.25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/060763 2021.11.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/115563 EN 2022.06.02

(71) 申请人 普罗林科斯有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 E·L·施奈德 B·R·赫恩

D·V·圣

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

专利代理师 陈扬扬 杨昀

(51) Int.Cl.

A61K 31/4178 (2006.01)

权利要求书4页 说明书19页

序列表3页 附图10页

(54) 发明名称

C-利钠肽的延长释放水凝胶偶联物

(57) 摘要

本文提供了c-利钠肽的延长释放水凝胶偶联物、其制备方法和其使用方法。

1. 一种具有式(I)的C-利钠肽的水凝胶偶联物

M- (L-E)<sub>a</sub> (I)

其中M为水凝胶基质;

L是接头;

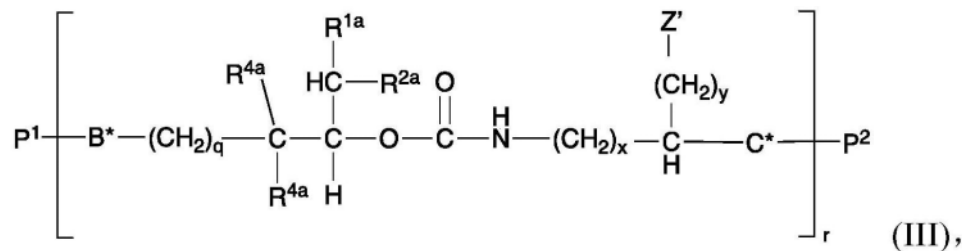
E是C-利钠肽; 和

a是表示在给定体积的基质中产生合适浓度的E的L-E部分的数量整数。

2. 如权利要求1所述的水凝胶偶联物, 其中E选自: SEQ ID No: 1-6。

3. 如权利要求1所述的水凝胶偶联物, 其中E是(Gln<sup>6,14</sup>)CNP38 (SEQ IDNo: 4)。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的水凝胶偶联物, 其中M是式(III)的可生物降解水凝胶



其中

q=0-6;

R<sup>1a</sup>和R<sup>2a</sup>独立地为H、烷基、CN、NO<sub>2</sub>、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、-COR<sup>3a</sup>、-SOR<sup>3a</sup>或-SO<sub>2</sub>R<sup>3a</sup>, 其中

R<sup>3a</sup>是H、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、-OR<sup>5a</sup>或-NR<sup>5a</sup>, 其中

各个R<sup>5a</sup>独立地为H或任选取代的烷基, 或两个R<sup>5a</sup>基团与它们附接的氮一起形成杂环;

其中R<sup>1a</sup>和R<sup>2a</sup>能够与它们附接的碳一起形成3-8元环, 并且其中R<sup>1a</sup>和R<sup>2a</sup>中的一个且仅一个能够是H或烷基;

各个R<sup>4a</sup>独立地为H或C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基, 或两个R<sup>4a</sup>与它们附接的碳一起形成3-6元环;

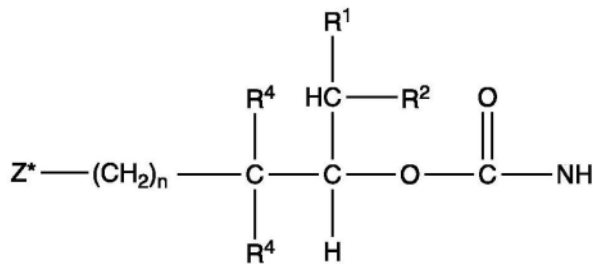
Z' 是介导偶联至接头-L-E的官能团;

x和y各自独立地为0-6;

B\*和C\*各自独立地为连接基团; 和

P<sup>1</sup>和P<sup>2</sup>独立地是平均分子量为1-40kDa的r-臂聚合物, 其中r是2到8之间的整数。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的水凝胶偶联物, 其中L包含具有下式的残基



其中:

n=0-6;

$R^1$ 和 $R^2$ 独立地为H、烷基、CN、 $NO_2$ 、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、 $-COR^3$ 、 $-SOR^3$ 或 $-SO_2R^3$ ,其中

$R^3$ 是H、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、 $-OR^5$ 或 $-NR^5_2$ ,其中

各个 $R^5$ 独立地为H或任选取代的烷基,或两个 $R^5$ 基团与它们附接的氮一起形成杂环;

其中 $R^1$ 和 $R^2$ 能够与它们附接的碳一起形成3-8元环,并且其中 $R^1$ 和 $R^2$ 中的一个且仅一个能够是H或烷基;

各个 $R^4$ 独立地为H或 $C_1$ - $C_3$ 烷基,或两个 $R^4$ 与它们附接的碳一起形成3-6元环;

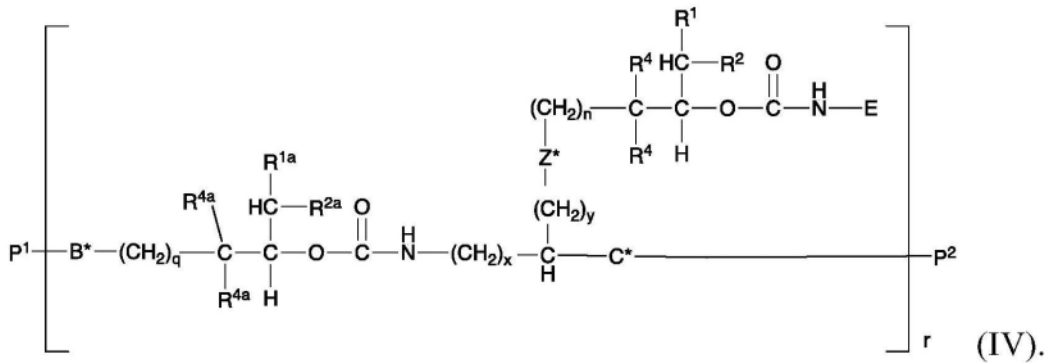
$Z^*$ 是连接基团;和

NH是CNP肽的氨基基团的残基。

6. 如权利要求5所述的水凝胶偶联物,其中 $R^1$ 是CN或 $SO_2R^3$ 。

7. 如权利要求5或6所述的水凝胶偶联物,其中各个 $R^4$ 独立地为 $C_1$ - $C_3$ 烷基,或两个 $R^4$ 与它们附接的碳一起形成3-6元环。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的水凝胶偶联物,其中所述水凝胶偶联物是式(IV)



其中

$n=0-6$ ;

$R^1$ 和 $R^2$ 独立地为H、烷基、CN、 $NO_2$ 、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、 $-COR^3$ 、 $-SOR^3$ 或 $-SO_2R^3$ ,其中

$R^3$ 是H、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、 $-OR^5$ 或 $-NR^5_2$ ,其中

各个 $R^5$ 独立地为H或任选取代的烷基,或两个 $R^5$ 基团与它们附接的氮一起形成杂环;

其中 $R^1$ 和 $R^2$ 能够与它们附接的碳一起形成3-8元环,并且其中 $R^1$ 和 $R^2$ 中的一个且仅一个能够是H或烷基;

各个 $R^4$ 独立地为H或 $C_1$ - $C_3$ 烷基,或两个 $R^4$ 与它们附接的碳一起形成3-6元环;

$Z^*$ 、 $B^*$ 和 $C^*$ 各自独立地为连接基团;

E是CNP肽;

$q=0-6$ ;

$R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 独立地为H、烷基、CN、 $NO_2$ 、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、 $-COR^{3a}$ 、 $-SOR^{3a}$ 或 $-SO_2R^{3a}$ ,其中

$R^{3a}$ 是H、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、 $-OR^{5a}$ 或 $-NR^{5a}_2$ ,其中



$R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 独立地为H、烷基、CN、 $NO_2$ 、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、 $-COR^{3a}$ 、 $-SOR^{3a}$ 或 $-SO_2R^{3a}$ ,其中

$R^{3a}$ 是H、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、 $-OR^{5a}$ 或 $-NR^{5a}_2$ ,其中

各个 $R^{5a}$ 独立地为H或任选取代的烷基,或两个 $R^{5a}$ 基团与它们附接的氮一起形成杂环;

其中 $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 能够与它们附接的碳一起形成3-8元环,并且其中 $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的一个且仅一个能够是H或烷基;

各个 $R^{4a}$ 是H或 $C_1-C_3$ 烷基,或两个 $R^{4a}$ 与它们附接的碳一起形成3-6元环;

$Z'$ 是用于介导偶联至同源官能团Z的官能团;

x和y各自独立地是0-6;

$B^*$ 和 $C^*$ 各自独立地是连接基团;和

$P^1$ 和 $P^2$ 独立地是平均分子量为1-40kDa的r-臂聚合物,其中r是2到8之间的整数,

在其中同源官能团Z和 $Z'$ 反应形成连接基团 $Z^*$ 的条件下,并且任选地分离所得偶联物。

14. 一种药物组合物,其包含权利要求1-12中任一项所述的水凝胶偶联物和药学上可接受的缓冲剂,其中所述药物组合物具有3至7的pH。

15. 如权利要求14所述的药物组合物在处理需要这种处理的患者中需要用CNP肽处理的疾病或病症中的用途。

## C-利钠肽的延长释放水凝胶偶联物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年11月25日提交的美国临时申请第63/118,568号的优先权和权益,其公开通过引用全文纳入本文。

[0003] 关于提交序列表的声明

[0004] 电子格式的序列列表随本申请一同提交。序列列表以标题为670572002640SeqList.txt的文件提供,其创建于2021年11月19日,大小为3,047字节。序列列表的电子格式的信息通过引用其全文方式纳入本文。

### 技术领域

[0005] 本文提供了c-利钠肽的延长释放水凝胶偶联物、其制备方法和其使用方法。

### 背景技术

[0006] C型利钠肽(CNP)是利钠肽家族的成员,包括心房利钠肽(ANP)和脑利钠肽(BNP),其响应于高血压和高血容量(hypervolaemic)状态而释放,并促进钠尿和利尿导致钠和水的流失,从而降低血容量和血压。虽然CNP于1990年首次分离,并且是被发现的三种主要利钠肽中的最后一种,但它是该家族中表达最广泛的肽,尤其在脑、软骨细胞和内皮细胞中被发现。通常作为局部旁分泌/自分泌调节剂,外源性CNP是离体动脉和静脉的有效扩张剂,并且已被证明可以降低人体体内的血压。在许多非心血管效应中,CNP在调节骨骼生长方面起主要作用,也可能在神经元发育和保护中发挥作用。小鼠中CNP产生的遗传破坏通过骨长度的减少导致侏儒症;股骨、胫骨和椎骨比野生型小鼠短50-80%。因此,CNP和类似物在治疗侏儒症和软骨发育不全(achondroplasia)方面引起了人们的关注。

[0007] 利钠肽特征在于核心的17个氨基酸二硫键连接的环,其对受体结合至关重要。这种环状结构在家族成员和物种之间是保守的。CNP基因的初始产物(Nppc)是一个126个氨基酸的prepro-CNP;信号肽的裂解产生pro-CNP肽,其被弗林前蛋白转化酶进一步加工,产生53个氨基酸的CNP-53。CNP-53由尚未鉴定的蛋白酶进一步加工,以提供主要的活性物质,即22-氨基酸CNP(CNP-22)。CNP活性受两个主要降解途径的严格调节,导致血浆半衰期极短(约3分钟)。CNP对清除受体NPR-C具有高亲和力,NPR-C将肽内化到溶酶体中进行降解。它也被血浆中和内皮细胞表面上的中性内肽酶(NEP)蛋白水解。

[0008] 已经表征了三种特异性利钠肽受体,NPR-A、NPR-B和NPR-C。CNP对NPR-A的低亲和力表明它对于介导对CNP的生理反应可能并不重要。CNP似乎是NPR-B的唯一内源性配体,也可以结合并激活NPR-C。CNP在生理浓度(皮摩尔)下结合NPR-B,其亲和力比ANP和BNP高50-500倍。NPR-B的基因敲除导致软骨内骨化障碍,并导致椎骨和四肢骨骼纵向缩短。该模型进一步表明NPR-B在女性生殖道发育中的作用。NPR-B主要存在于静脉中,但也存在于动脉中。NPR-C以高亲和力结合所有三种利钠肽。NPR-C的基因敲除也导致骨骼异常和基础骨更新增加,这可能是由于CNP的清除从NPR-C转移到NPR-B。

[0009] 软骨发育不全是一种以侏儒症为特征的遗传性病症,其是由导致过度活跃的成纤

维细胞生长因子受体3 (FGFR3) 的突变引起的。它是最普遍的侏儒症形式, 27, 500人中影响约1人。主要表型是身高矮小, 平均约4英尺, 头部增大, 前额突出。相关联的并发症包括睡眠呼吸暂停、复发性耳部感染、肥胖、脑积水和椎管狭窄。生长激素疗法对软骨发育不全患者无效。FGFR3通常通过抑制软骨细胞的发育来下调软骨和骨骼的生长, 软骨细胞是产生和维持骨骼生长所必需的软骨基质的细胞; 因此, 过度活跃的FGFR3会导致骨骼生长减少和软骨发育不全。成纤维细胞生长因子与FGFR3的结合导致通过MAPK/ERK途径的信号转导级联。这种级联可以被NPR-B的激活中断, 其干扰MAPK/ERK途径中的RAF-1蛋白。因此, CNP或CNP类似物可用于治疗软骨发育不全。

[0010] 已经公开了几种CNP类似物(美国专利号8, 198, 242、8, 377, 884和9, 266, 939)。一种由于肽链长度增加而增加NEP抗性的CNP类似物, 伏索利肽(vosoritide) (BMN-111) 具有一定程度的延长半衰期(20分钟), 并且在3期临床中显示出作为软骨发育不全每日一次治疗的前景, 目前正在FDA审批中。还研究了CNP的多种类似物以及PEG化偶联物(Wendt, J Pharmacol Exp Ther 353:132-149, 2015年4月)。已经公开了CNP的控释偶联物(PCT公开号W02016/110577、W02017/118703、W02017/118693、W02017/118698、W02017/118700、W02017/118704和W02017/118707)。BMN-111的已知副作用是心率加快和动脉血压下降, 这些副作用随着剂量的增加而变得更加突出。BMN-111的短半衰期需要相对高的剂量, 以便在给定每日给药方案的情况下提供足够时间的治疗性肽水平。半衰期的显著增加将允许在给药之间维持肽的治疗水平而不需要这种过量给药。

[0011] 已经公开了通过可释放偶联延长CNP半衰期的CNP前药(Breinholt等, 2019J.Pharmacol Exp Ther 370:459-71; PCT公开号W02016/110577、W02017/118698和W02019/0022237)。还公开了使用控释CNP类似物的组合疗法(PCT公开号W02018/060314)。所公开的偶联物通过水解机制释放CNP, 这是不利的, 因为在储存过程中难以避免从偶联物中过早释放, 导致在水分存在下降解和保质期缩短; 这需要开发干燥的制剂(PCT公开号W02020/165081)。然而, 这种制剂在使用前需要重建, 并且可能不适用于不溶性偶联物, 例如微粒水凝胶。因此, 仍然需要更方便形式的长效形式的CNP, 用于治疗多种病症和疾病。

## 附图说明

[0012] 图1说明了式(II)的两个接头-CNP。在这两个实施方式中, Z=叠氮化物,  $n=1$ ,  $R^2=H$ , 各个 $R^4=$ 甲基, E是 $[(Gln^{6,14})CNP38]$ , 通过N-末端甘氨酸的 $\alpha$ -胺附接至接头。在第一个接头-肽中,  $R^1=$ 异丙基-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>, 接头释放肽, 其在pH 7.4, 37°C下偶联至水凝胶微球后的半衰期为260小时。在第二个接头-肽中,  $R^1=(N,N-二甲基氨基)-SO_2^-$ , 接头释放肽, 其在pH 7.4, 37°C下偶联至水凝胶微球后的半衰期为1200小时。

[0013] 图2显示了一种用于生产式(IV)的偶联物的方法, 其中M是包含可降解交联的水凝胶, 包括以下步骤: 在连接官能团Z与连接官能团Z' 反应的条件下, 使包含反应性连接基团Z' 的式(III)的水凝胶与包含同源反应基团Z的式(II)的接头-肽接触, 使得接头-肽通过残余官能团Z\*偶联至水凝胶。

[0014] 图3说明了式(I)的偶联物中的交联结构, 其中M是不溶性水凝胶, 如实施例3中所示。在各种情况下, 聚合物间交联包含具有 $B^*=$ 三唑、 $C^*=$ 甲酰胺,  $q=1$ ,  $R^{1a}=(N,N-二甲基氨基)磺酰基$ ,  $R^{2a}=H$ ,  $R^{4a}=$ 甲基的接头。在第一种情况下, 式(II)的接头-CNP其中Z=叠氮

基,  $n=1$ ,  $R^1$  = 异丙基-SO<sub>2</sub>-,  $R^2$  = H, 各个  $R^4$  = 甲基, E 是通过 N-末端甘氨酸的  $\alpha$ -胺附接至接头的 (Gln<sup>6,14</sup>) CNP38, 其已经通过氨基甲酰基-双环壬基 (carbamoyl-bicyclononyl) 偶联至具有  $x=0$ ,  $y=4$  和  $z=0$  的式 (III) 的水凝胶。在第二种情况下, 式 (II) 的接头-CNP 其中  $Z$  = 叠氮基,  $n=1$ ,  $R^1$  = (N,N-二甲基氨基) SO<sub>2</sub>-,  $R^2$  = H, 各个  $R^4$  = 甲基, E 是通过 N-末端甘氨酸的  $\alpha$ -胺附接至接头的 (Gln<sup>6,14</sup>) CNP38, 其已经通过氨基甲酰基-双环壬基偶联至具有  $x=0$ ,  $y=4$  和  $z=0$  的式 (III) 的水凝胶。

[0015] 图4说明了一种制备式 (II) 的接头-CNP的方法, 其中使用标准方法在固体支持物上制备受保护的CNP肽, 通过与琥珀酰亚胺碳酸酯反应附接接头, 然后肽被去封闭, 从树脂上裂解, 形成二硫化物。

[0016] 图5说明了理想化的结构, 显示了交联基质M中P<sup>1</sup> (实心圆) 和P<sup>2</sup> (空心圆) 和接头-药物L-E (黑色圆) 的配置。两个聚合物由于它们通过同源基团Z和Z' 的连接而在基质中交替, 防止自连接, 每个交联包含接头-药物。在实践中, 一些交联可能会丢失, 例如由于在聚合物的商业制备中丢失臂或由于在单个P<sup>1</sup>和P<sup>2</sup>单元之间形成多重交联。

[0017] 图6显示了实施例1的稳定性研究的结果。伏索利肽和 (Gln<sup>6</sup>, Gln<sup>14</sup>) CNP38 保持在pH 7.4, 37°C, 并通过阴离子交换HPLC监测。(Gln<sup>6</sup>, Gln<sup>14</sup>) CNP38表现出相比伏索利肽增强的稳定性。

[0018] 图7A-7B显示了用实施例3的偶联物治疗的小鼠的药代动力学实验结果 (也见图3)。分图A显示皮下注射实施例3的偶联物后小鼠血浆中 (Gln<sup>6,14</sup>) CNP38的浓度, 其中  $R^1$  = 异丙基磺酰基。分图B显示皮下注射实施例3的偶联物后小鼠血浆中 (Gln<sup>6,14</sup>) CNP38的浓度, 其中  $R^1$  = (N,N-二甲基氨基) 磺酰基。

[0019] 图8显示了用实施例3的偶联物处理的幼年食蟹猴的药代动力学实验结果, 其中  $R^1$  = 异丙基磺酰基。图8描绘了向幼年食蟹猴单次皮下给予1.3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  的实施例3的偶联物后 [Gln<sup>6,14</sup>] CNP-38 的血浆浓度, 其中  $R^1$  = 异丙基磺酰基。数据是3只动物的平均值。该偶联物提供连续暴露  $\geq 100\text{pM}$  的 [Gln<sup>6,14</sup>] CNP-38 持续约1个月。

[0020] 图9显示了用实施例3的偶联物处理的幼年食蟹猴的药代动力学实验结果, 其中  $R^1$  = (N,N-二甲基氨基) 磺酰基。在单次皮下给予幼年食蟹猴1.2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  的实施例3的偶联物后, [Gln<sup>6,14</sup>] CNP-38 的血浆浓度, 其中  $R^1$  = (N,N-二甲基氨基) 磺酰基。数据是3只动物的平均值。该偶联物提供连续暴露  $\geq 100\text{pM}$  的 [Gln<sup>6,14</sup>] CNP-38 持续超过3个月。

[0021] 图10显示了用 [Gln<sup>6,14</sup>] CNP-38 和实施例3的偶联物处理的小鼠的总长度 (尾长+鼻-肛门 (naso-anal) 长度, TL) 的测量结果, 其中  $R^1$  = 异丙基磺酰基 (4A) 或 ( $R^1$  = (N,N-二甲基氨基) 磺酰基 (4B), 在每个给药间隔内每只小鼠的量恒定。从左至右: 黑色 (实心), 载体对照; 棕色 (空心), QD [Gln<sup>6,14</sup>] CNP-38; 蓝色 (水平条纹), QWk 4A 20nmol/小鼠; 红色 (上升对角线), QWk 4A 50nmol/小鼠; 绿色 (下降对角线), 单剂4B 85nmol/小鼠。绘制初始总长度的百分比 (TL) 相对于时间的图; 值显示为平均值  $\pm$  SD。

[0022] 图11显示了用 [Gln<sup>6,14</sup>] CNP-38 和实施例3的偶联物处理的小鼠的总长度 (尾长+鼻-肛门 (naso-anal) 长度, TL) 的测量结果, 其中  $R^1$  = 异丙基磺酰基 (4A) 或 ( $R^1$  = (N,N-二甲基氨基) 磺酰基 (4B), 使用重量调整剂量 ( $\mu\text{mol}/\text{kg}$ )。从左到右, 黑色 (实心), 载体对照; 棕色 (空心), QD [Gln<sup>6,14</sup>] CNP-38; 蓝色 (水平的), QWk 4A 1.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ; 红色 (上升对角线), QWk 4A 2.2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ; 绿色 (下降对角线), Q2Wk 2.2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ; 紫色 (方格), 单剂4B 6.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ;

橙色(垂直的),单剂4B 40 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 。绘制初始总长度的百分比(TL)相对于时间的图;值显示为平均值 $\pm$ SD。

[0023] 图12显示了用[Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38或偶联物4A(实施例3,其中R<sup>1</sup>=异丙基磺酰基)处理五周的代表性小鼠的照片。A) 载体对照;B) QD

[0024] [Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38肽,70nmol;C) 每两周一次(Q2Wk) 偶联物4A,2.2 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ;D) 每周一次(QWk) 偶联物4A,2.2 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ;和E) 每周一次(QWk) 偶联物4A,1.5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 。麻醉小鼠最初被放置为在头部伸展、鼻子与水平引导线对齐、尾巴拉直的情况下进行测量;顶部引导线和尾部末端之间的距离最能代表总长度(TL)。

[0025] 图13A和13B描绘了实施例3的偶联物的肽释放和水凝胶降解,在pH9.4,37 $^{\circ}\text{C}$ ,其中R<sup>1</sup>=异丙基磺酰基(图13A)并且其中R<sup>1</sup>=(N,N-二甲基氨基)磺酰基(图13B)。在图13A中,对于R<sup>1</sup>=异丙基磺酰基,总溶解肽(实线)和溶解PEG(虚线)给出(Gln<sup>6,14</sup>)CNP38释放 $t_{1/2}$ =6.1小时,对应于生理条件下(pH 7.4,37 $^{\circ}\text{C}$ )的610小时。在图13B中,对于R<sup>1</sup>=(N,N-二甲基氨基)磺酰基,总溶解肽(实线)和溶解PEG(虚线)给出(Gln<sup>6,14</sup>)CNP38释放 $t_{1/2}$ =15.8小时,对应于生理条件下(pH 7.4,37 $^{\circ}\text{C}$ )1580小时。数据是n=6的平均值,误差线作为标准偏差给出。

### 具体实施方式

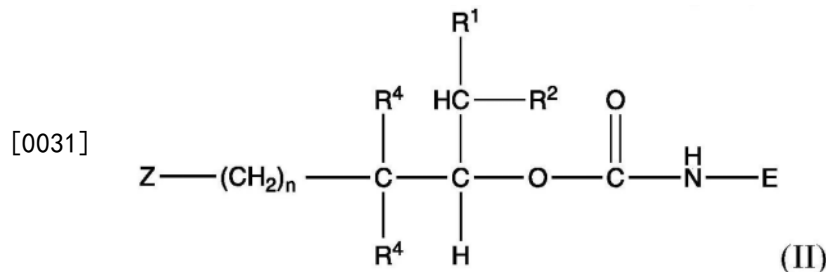
[0026] 本公开涉及提供C-利钠肽(CNP)的延长、低水平释放的偶联物,支持每周一次、每月一次或甚至更不频繁地给予这些肽并且预期用于治疗软骨发育不全等疾病和病症。

[0027] 一方面,本公开提供了包含不溶性水凝胶基质和多重共价附接的接头-肽的延长释放偶联物,其中接头在pH和温度的生理条件下通过 $\beta$ -消除机制裂解以释放游离CNP肽。本发明的偶联物可示意性地说明为式(I)

[0028]  $\text{M}-(\text{L}-\text{E})_a$  (I)

[0029] 其中M是不溶性水凝胶基质,其通过可裂解接头L连接到多重CNP肽E,L是通过pH依赖性 $\beta$ -消除机制裂解的接头,例如美国专利8,680,315中公开的接头,并且a是整数,其表示在给定体积的基质中产生合适浓度的E的L-E部分的数量。合适的浓度是每mL基质0.01-50mg肽,优选每mL 1-25mg肽。接头L释放游离的CNP肽,其半衰期适合所需的给药周期,通常在体外测量为150至2500小时,优选在体外pH 7.4,37 $^{\circ}\text{C}$ 下为250至1500小时。

[0030] 第二方面中,本发明提供具有式(II)的接头-CNP(L-E)



[0032] 其中:

[0033]  $n=0-6$ ;

[0034] R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为H、烷基、CN、NO<sub>2</sub>、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、-COR<sup>3</sup>、-SOR<sup>3</sup>或-SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>,其中

[0035]  $R^3$ 是H、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、 $-OR^5$ 或 $-NR^5_2$ ,其中

[0036] 各个 $R^5$ 独立地为H或任选取代的烷基,或两个 $R^5$ 基团与它们附接的氮一起形成杂环;

[0037] 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 能够与它们所附接的碳一起形成3-8元环,并且其中 $R^1$ 和 $R^2$ 中的一个且仅一个能够是H或烷基;

[0038] 各个 $R^4$ 独立地为H或 $C_1-C_3$ 烷基,或两个 $R^4$ 与它们附接的碳一起形成3-6元环;

[0039] Z是用于介导通过同源官能团Z' 偶联至运载体M的官能团;和

[0040] NH是CNP肽E的氨基基团的残基。

[0041] 应理解,术语“烷基”包括1-20、1-12、1-8、1-6或1-4个碳原子的直链、支链或环状饱和和烃基。在一些实施方式中,烷基是直链或支链。直链或支链烷基的例子包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基等。在一些实施方式中,烷基是环状的。环烷基的例子包括但不限于环丙基,环丁基,环戊基,环戊二烯基,环己基等。

[0042] 应理解,术语“烷氧基”包括与氧键合的烷基,包括甲氧基、乙氧基、异丙氧基、环丙氧基、环丁氧基等。

[0043] 应理解,术语“烯基”包括具有碳-碳双键和2-20、2-12、2-8、2-6或2-4个碳原子的非芳香不饱和烃。

[0044] 应理解,术语“炔基”包括具有碳-碳三键和2-20、2-12、2-8、2-6或2-4个碳原子的非芳香不饱和烃。

[0045] 应理解,术语“芳基”包括6-18个碳,优选6-10个碳的芳香烃基,包括诸如苯基、萘基和蒽基的基团。术语“杂芳基”包括包含3-15个碳(优选3-7个碳)的芳环,其中包含至少一个N、O或S原子,包括吡咯基、吡啶基、嘧啶基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、喹啉基、吲哚基、茚基等基团。

[0046] 在一些情况下,烯基、炔基、芳基或杂芳基部分可通过烷基键与分子的其余部分偶联。在这些情况下,取代基被称为烯基烷基、炔基烷基、芳基烷基或杂芳基烷基,表明烯基部分位于烯基、炔基、芳基或杂芳基部分与偶联于烯基、炔基、芳基或杂芳基的分子之间。

[0047] 应理解,术语“卤素”或“卤代”包括溴代、氟代、氯代和碘代。

[0048] 应理解,术语“杂环”或“杂环基”指包含至少一个N、O或S原子的3-15元芳环或非芳环。示例包括但不限于哌啶基、哌嗪基、四氢吡喃基、吡咯烷和四氢呋喃基,以及为上述术语“杂芳基”提供的示例性基团。在一些实施方式中,杂环或杂环基为非芳香的。在一些实施方式中,杂环或杂环基为芳族的。

[0049] 应理解,除非另有规定,否则“任选取代”表示一个基团可能未被取代或被一个或多个(例如,1、2、3、4或5)相同或不同的取代基取代。取代基的示例包括但不限于烷基、烯基、炔基、卤素、 $-CN$ ,  $-OR^{aa}$ ,  $-SR^{aa}$ ,  $-NR^{aa}R^{bb}$ ,  $-NO_2$ ,  $-C=NH(OR^{aa})$ ,  $-C(O)R^{aa}$ ,  $-OC(O)R^{aa}$ ,  $-C(O)OR^{aa}$ ,  $-C(O)NR^{aa}R^{bb}$ ,  $-OC(O)NR^{aa}R^{bb}$ ,  $-NR^{aa}C(O)R^{bb}$ ,  $-NR^{aa}C(O)OR^{bb}$ ,  $-S(O)R^{aa}$ ,  $-S(O)_2R^{aa}$ ,  $-NR^{aa}S(O)R^{bb}$ ,  $-C(O)NR^{aa}S(O)R^{bb}$ ,  $-NR^{aa}S(O)_2R^{bb}$ ,  $-C(O)NR^{aa}S(O)_2R^{bb}$ ,  $-S(O)NR^{aa}R^{bb}$ ,  $-S(O)_2NR^{aa}R^{bb}$ ,  $-P(O)(OR^{aa})(OR^{bb})$ , 杂环基、杂芳基或芳基,其中,烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、杂芳基和芳基各自独立地任选地被 $R^{cc}$ 取代,其中

[0050]  $R^{aa}$ 和 $R^{bb}$ 各自独立地为H、烷基、烯基、炔基、杂环基、杂芳基或芳基,或

[0051]  $R^{aa}$ 和 $R^{bb}$ 与它们连接的氮原子一起形成杂环基,其任选地被烷基、烯基、炔基、卤素、羟基、烷氧基或CN取代,其中:

[0052] 每个 $R^{cc}$ 独立地为烷基、烯基、炔基、卤素、杂环基、杂芳基、芳基、-CN或-NO<sub>2</sub>。

[0053] 对于用于本文,除非另有明确指示,否则术语“一”、“一个”等指一个或多个。

[0054] 药物释放速率可通过适当选择基团 $R^1$ 和 $R^2$ 来调节。合适的 $R^1$ 和 $R^2$ 的描述可以在美国专利号8,680,315中找到。在一些实施方式中,基团 $R^1$ 和 $R^2$ 各自可以独立地被供电子和/或吸电子取代基取代,其改变插入的 $R^1R^2CH$ 质子的酸度,从而可以实现对药物消除速率的巨大灵活性和控制。吸电子基团定义为哈密特 $\sigma$  (Hammett sigma) 值大于0的基团(例如,参见Hansch等人1991, Chemical Reviews 91:165-195)。术语“供电子基团”是指导致 $R^1R^2CH$ 酸度降低的取代基;供电子基团通常与负的哈密特 $\sigma$  (Hammett $\sigma$ ) 或塔夫特 $\sigma^*$  (Taft $\sigma^*$ ) 常数相关联,并且在物理有机化学领域是众所周知的。(哈密特常数是芳基/杂芳基取代基,塔夫特常数是芳族部分上的取代基。)合适的供电子取代基的例子包括但不限于低级烷基、低级烷氧基、低级烷硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基和甲硅烷基。类似地,“吸电子基团”是指导致 $R^1R^2CH$ 基团酸度增加的取代基;吸电子基团通常与正的哈密特 $\sigma$  (Hammett $\sigma$ ) 或塔夫特 $\sigma^*$  (Taft $\sigma^*$ ) 常数相关联,并且在物理有机化学领域是众所周知的。可用于调节 $R^1$ 和 $R^2$ 的合适的供电子和吸电子取代基的描述可在美国专利号9,649,385中找到。

[0055] 在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个为-CN。在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个为-NO<sub>2</sub>。在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个是任选取代的含有6-10个碳的芳基。例如,在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个是苯基、萘基或蒽基,它们中的每一个任选取地被取代。在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个是任选取代的杂芳基,其包含3-7个碳并且包含至少一个N、O或S原子。例如,在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个是吡咯基、吡啶基、嘧啶基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、喹啉基、吲哚基或茚基,其中每一个都可任选取代。在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个是任选取代的含有2-20个碳原子的烯基。在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个是任选取代的含有2-20个碳原子的炔基。在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个为-COR<sup>3</sup>、-SOR<sup>3</sup>或-SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>,其中R<sup>3</sup>为H、含有1-20个碳原子的任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、-OR<sup>5</sup>或-NR<sup>5</sup><sub>2</sub>,其中每个R<sup>5</sup>独立地为H或含1-20个碳原子的任选取代的烷基,或两个R<sup>5</sup>基团与它们所附接的氮一起形成杂环。

[0056] 在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个为-CN、-SOR<sup>3</sup>或-SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>。在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个为-CN或-SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>。在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个为-CN或-SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>,其中R<sup>3</sup>为任选取代的烷基、任选取代的芳基或-NR<sup>5</sup><sub>2</sub>。在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 中的至少一个为-CN、-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-SO<sub>2</sub>苯基、-SO<sub>2</sub>(氯苯基)、-SO<sub>2</sub>(4-甲基苯基)、-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O、-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S、-SO<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)或-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 之一是-CN或-SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>,其中R<sup>3</sup>为任选取代的烷基、任选取代的芳基或-NR<sup>5</sup><sub>2</sub>;其他是H。在一些实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 之一是-CN、-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、-SO<sub>2</sub>苯基、-SO<sub>2</sub>(氯苯基)、-SO<sub>2</sub>(4-甲基苯基)、-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O、-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S、-SO<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)或-SO<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;其他是H。

[0057] 在一些实施方式中, $R^4$ 各自独立地为C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基。在一些实施方式中,两个 $R^4$ 都是甲

基。

[0058] 在一些实施方式中,  $n$  是 1 至 6 的整数。在一些实施方式中,  $n$  是 1 至 3 的整数。在一些实施方式中,  $n$  是从 0 至 3 的整数。在一些实施方式中,  $n$  为 1。在一些实施方式中,  $n$  为 2。在一些实施方式中,  $n$  为 3。在一些实施方式中,  $n$  为 4。在一些实施方式中,  $n$  为 5。在一些实施方式中,  $n$  为 6。

[0059] 在一些实施方式中,  $R^1$  是如上定义的 CN 或  $SO_2R^3$ ,  $R^2$  是 H, 各个  $R^4$  是  $C_1-C_3$  烷基, 并且  $n = 1-3$ 。

[0060] 连接基团 Z 可以是在 CNP 肽存在下能够选择性反应的任何基团。典型的基团包括但不限于叠氮化物, 在这种情况下, M 上的同源基团 Z' 是炔烃或环炔烃, 残留的连接基团是三唑; 氨基醚, 在这种情况下, M 上的同源基团 Z' 是羰基, 残留的连接基团是脞; 反式环辛烯或环丙烷, 在这种情况下, M 上的同源基团 Z' 是 1, 2, 5, 6-四嗪, 残留的官能团是哒嗪; 或硫醇, 在这种情况下, M 上的同源基团 Z' 是马来酰亚胺或卤代羰基, 残留的连接基团是硫醚。在优选的实施方式中, Z 是叠氮化物且 Z' 是环辛炔。本领域已知的典型环辛炔包括但不限于 5-羟基环辛炔 (5HCO)、1-氟环辛-2炔-1-羧酸酯 (MFCO)、双环 [6.1.0] 壬-4-炔 (BCN) (参见 Dommerholt 等, Top Curr Chem(Z) (2016) 374:16)。

[0061] 术语“CNP”包括特征在于能够结合 NPR-B 并从而调节软骨细胞的生长、增殖和分化的所有肽。这包括但不限于 PCT 公开 2009/067639、2010/135541 和 2016/110577; 和 Morozumi 等 (2019) PLoS ONE 14(2): e0212680 中所列序列。优选地, 术语“CNP”是指 SEQ ID No: 1-6 的肽及其稳定的类似物。特别优选的是 CNP 类似物, 其中特定的氨基酸残基已被替换以改进肽的稳定性。这种稳定的类似物包括其中天冬酰胺残基已被不易脱酰胺的残基 (例如谷氨酰胺或丙氨酸) 替代的肽, 以及其中氧化敏感残基已被替代 (例如甲硫氨酸被正亮氨酸替代) 的肽。CNP 的示例性实施方式在下面的 SEQ ID No: 1-6 中提供。

[0062] SEQ ID No: 1 ([CNP22])

[0063] GLSKGCFGLKLDRIQSMSGLGC C<sup>6</sup>-C<sup>22</sup>二硫化物

[0064] SEQ ID No: 2 ([伏索利肽])

[0065] PGQEHPNARKYKGANCKGLSKGCFGLKLDRIQSMSGLGC C<sup>23</sup>-C<sup>39</sup>二硫化物

[0066] SEQ ID No: 3 ([CNP38])

[0067] LQEHPNARKYKGANCKGLSKGCFGLKLDRIQSMSGLGC C<sup>22</sup>-C<sup>38</sup>二硫化物

[0068] SEQ ID No: 4 ([Gln<sup>6,14</sup>)CNP38])

[0069] LQHPQARKYKGAQKKGLSKGCFGLKLDRIQSMSGLGC C<sup>22</sup>-C<sup>38</sup>二硫化物

[0070] SEQ ID No: 5 ([Gln<sup>6,14</sup>, N1e<sup>33</sup>)CNP38])

[0071] LQHPQARKYKGAQKKGLSKGCFGLKLDRIQSXSGGLGC C<sup>22</sup>-C<sup>38</sup>二硫化物

[0072] SEQ ID No: 6 ([ASB20123])

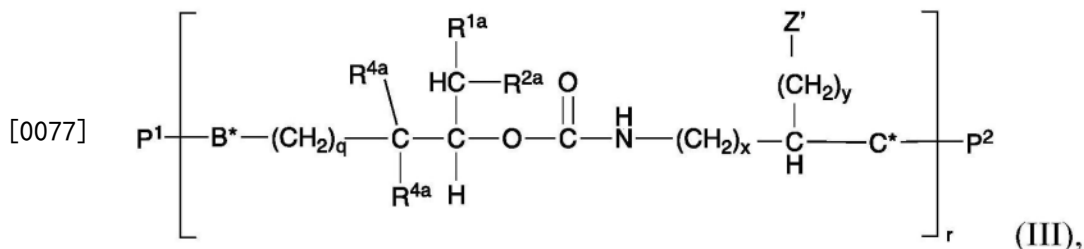
[0073] GLSKGCFGLKLDRIQSMSGLGCVQRKDSKPPAKLQPR C<sup>6</sup>-C<sup>22</sup>二硫化物

[0074] 在一些实施方式中, 稳定的 CNP 是 (Gln<sup>6,14</sup>) -CNP38 (SEQ ID No: 4) 或 (Gln<sup>6,14</sup>, N1e<sup>33</sup>) CNP38 (SEQ ID No: 5)。

[0075] 在本说明书中应理解, 一种部分的每一描述、变化、实施方式或方面可与其他部分的每一描述、变化、实施方式或方面相结合, 如同描述的每一个和每一个组合被具体且单独地列出一样。例如, 本文提供的关于式 (II) 的  $n$  的每个描述、变化、实施方式或方面可以与

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$ 、 $Z$ 和 $E$ 的每个描述、变化、实施方式或方面相结合,这与如果每个和每个组合被具体地和单独地列出的情况相同。还应理解,任何通式(如式(I)、(II)、(III)、(IV)或(V))的所有描述、变化、实施方式或方面(如适用)同样适用于本文详述的其他通式,并且被同样描述,如同针对所有通式单独列出了每一个描述、变化、实施方式或方面。

[0076] 在一些实施方式中, $M$ 是水不溶性水凝胶运载体。在优选的实施方式中, $M$ 是式(III)的可降解水凝胶,



[0078] 其中 $q=0-6$ ;

[0079]  $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 独立地为H、烷基、CN、 $NO_2$ 、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、 $-COR^{3a}$ 、 $-SOR^{3a}$ 或 $-SO_2R^{3a}$ ,其中

[0080]  $R^{3a}$ 是H、任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂芳烷基、 $-OR^{5a}$ 或 $-NR^{5a}_2$ ,其中

[0081] 各个 $R^{5a}$ 独立地为H或任选取代的烷基,或两个 $R^{5a}$ 基团与它们附接的氮一起形成杂环;

[0082] 其中 $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 能够与它们所附接的碳一起形成3-8元环,并且其中 $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的一个且仅一个能够是H或烷基;

[0083] 各个 $R^{4a}$ 独立地为H或 $C_1-C_3$ 烷基,或两个 $R^{4a}$ 与它们附接的碳一起形成3-6元环;

[0084]  $Z'$ 是用于介导偶联至如本文公开的式(II)的接头-CNP的同源官能团 $Z$ 的官能团;

[0085]  $x$ 和 $y$ 各自独立地是0-6;

[0086]  $B^*$ 和 $C^*$ 各自独立地是连接基团;和

[0087]  $P^1$ 和 $P^2$ 独立地是平均分子量为1-40kDa的 $r$ -臂聚合物,其中 $r$ 是2到8之间的整数。在优选的实施方式中, $P^1$ 和 $P^2$ 是 $r$ -臂聚(乙二醇)。

[0088] 式(III)的水凝胶的降解速率可通过适当选择基团 $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 来调节,如本文对 $R^1$ 和 $R^2$ 所讨论的。

[0089] 在一些实施方式中, $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的至少一个为-CN。在一些实施方式中, $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的至少一个为 $-NO_2$ 。在一些实施方式中, $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的至少一个是任选取代的含有6-10个碳的芳基。例如,在一些实施方式中, $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的至少一个是苯基、萘基或蒽基,它们各自任选地被取代。在一些实施方式中, $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的至少一个是任选取代的杂芳基,其包含3-7个碳并且包含至少一个N、O或S原子。例如,在一些实施方式中, $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的至少一个是吡咯基、吡啶基、嘧啶基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、喹啉基、吲哚基或茚基,其中每一个都可任选取代。在一些实施方式中, $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的至少一个是任选取代的含有2-20个碳原子的烯基。在一些实施方式中, $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的至少一个是任选取代的含有2-20个碳原子的炔基。在一些实施方式中, $R^{1a}$ 和 $R^{2a}$ 中的至少一个为 $-COR^{3a}$ 、 $-SOR^{3a}$ 或 $-SO_2R^{3a}$ ,其中 $R^{3a}$ 为H、含有1-20个碳原子的任选取代的烷基、任选取代的芳基、任选取代的芳烷基、任选取代的杂

芳基、任选取代的杂芳烷基、 $-\text{OR}^{5a}$ 或 $-\text{NR}^{5a}_2$ ,其中每个 $\text{R}^{5a}$ 独立地为H或含1-20个碳原子的任选取代的烷基,或两个 $\text{R}^{5a}$ 基团与它们所附接的氮一起形成杂环。

[0090] 在一些实施方式中, $\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{2a}$ 中的至少一个为 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SOR}^{3a}$ 或 $-\text{SO}_2\text{R}^{3a}$ 。在一些实施方式中, $\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{2a}$ 中的至少一个为 $-\text{CN}$ 或 $-\text{SO}_2\text{R}^{3a}$ 。在一些实施方式中, $\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{2a}$ 中的至少一个为 $-\text{CN}$ 或 $-\text{SO}_2\text{R}^{3a}$ ,其中 $\text{R}^{3a}$ 为任选取代的烷基、任选取代的芳基或 $-\text{NR}^{5a}_2$ 。在一些实施方式中, $\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{2a}$ 中的至少一个为 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{SO}_2$ 苯基、 $-\text{SO}_2$ (氯苯基)、 $-\text{SO}_2$ (4-甲基苯基)、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{S}$ 、 $-\text{SO}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 或 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$ 。在一些实施方式中, $\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{2a}$ 之一是 $-\text{CN}$ 或 $-\text{SO}_2\text{R}^{3a}$ ,其中 $\text{R}^{3a}$ 为任选取代的烷基、任选取代的芳基或 $-\text{NR}^{5a}_2$ ;其他是H。在一些实施方式中, $\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{2a}$ 之一是 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{SO}_2$ 苯基、 $-\text{SO}_2$ (氯苯基)、 $-\text{SO}_2$ (4-甲基苯基)、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{S}$ 、 $-\text{SO}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 或 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$ ;其他是H。

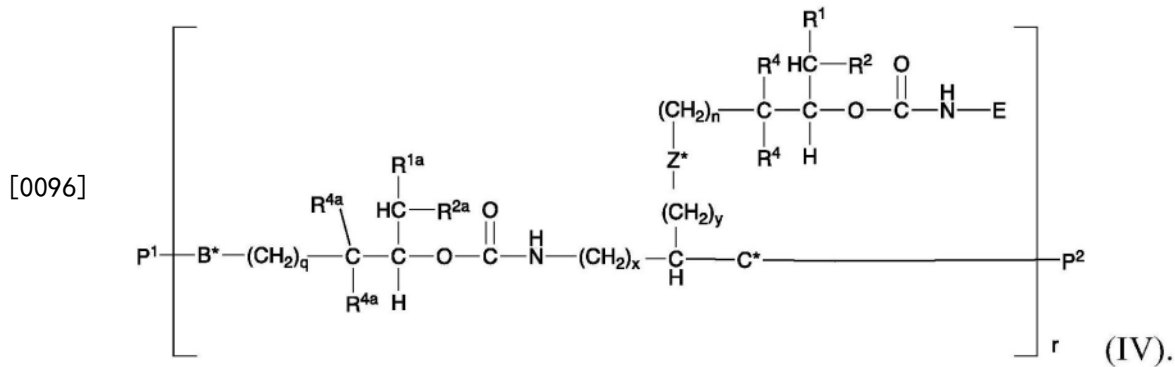
[0091] 在一些实施方式中, $\text{R}^{4a}$ 各自独立地为 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基。在一些实施方式中,两个 $\text{R}^{4a}$ 都是甲基。

[0092] 在一些实施方式中,q是1至6的整数。在一些实施方式中,q是2至3的整数。在一些实施方式中,q是1至3的整数。在一些实施方式中,q是0至3的整数。在一些实施方式中,q为1。在一些实施方式中,q为2。在一些实施方式中,q为3。在一些实施方式中,q为4。在一些实施方式中,q为5。在一些实施方式中,q为6。

[0093] 在一些实施方式中,x是1至6的整数。在一些实施方式中,x是2至3的整数。在一些实施方式中,x是1至3的整数。在一些实施方式中,x是0至3的整数。在一些实施方式中,x是1。在一些实施方式中,x是2。在一些实施方式中,x是3。在一些实施方式中,x是4。在一些实施方式中,x是5。在一些实施方式中,x是6。

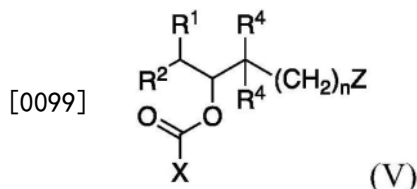
[0094] 在一些实施方式中,y是1至6的整数。在一些实施方式中,y是2至3的整数。在一些实施方式中,y是1至3的整数。在一些实施方式中,y是0至4的整数。在一些实施方式中,y为1。在一些实施方式中,y为2。在一些实施方式中,y为3。在一些实施方式中,y为4。在一些实施方式中,y为5。在一些实施方式中,y为6。

[0095] 式(III)的水凝胶,其中 $\text{P}^1$ 和 $\text{P}^2$ 是r-臂聚(乙二醇),如以下所述制备,例如Henise等(2015)Bioconj.Chem.26:270-8;Henise等,Int.J.Polymer Sci.Vol.2019,文章ID 9483127;和Henise等(2020)Engineering Reports2020;2:e12213。这些水凝胶提供了药物释放和随后水凝胶溶解的调节速率。 $\text{B}^*$ 和 $\text{C}^*$ 的典型连接基团包括但不限于三唑、甲酰胺、氨基甲酸酯、肟和硫醚。当水凝胶聚合是通过叠氮化物/环辛炔环加成进行时, $\text{B}^*$ 和/或 $\text{C}^*$ 的连接基团是如上所述的三唑。在一些实施方式中, $\text{B}^*$ 是三唑, $\text{C}^*$ 是甲酰胺。 $\text{P}^1$ 和 $\text{P}^2$ 是合成或天然聚合物,例如聚(乙二醇)、葡聚糖、透明质酸等。在这些水凝胶中,聚合物链被交联以形成不溶性三维基质(图6),其中每个交联具有式(II)的接头 $-\text{CNP}$ 的附接点。交联通过非水解性 $\beta$ -消除以主要由 $\text{R}^{1a}$ 和 $\text{R}^{2a}$ 基团控制的速率缓慢断裂,得到最终的可溶性聚合物片段。这些水凝胶允许接头-药物通过连接基团 $\text{Z}^*$ 附接,其由式(II)和(III)上的同源基团 $\text{Z}$ 和 $\text{Z}'$ 反应形成,如图2所示,从而产生式(I)的偶联物,其中M是不溶性水凝胶,其在每个交联处包含偶联的接头-肽并具有更具体的式(IV),其中 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{E}$ 、 $\text{n}$ 、 $\text{Z}^*$ 、 $\text{y}$ 、 $\text{P}^1$ 、 $\text{P}^2$ 、 $\text{B}^*$ 、 $\text{q}$ 、 $\text{r}$ 、 $\text{C}^*$ 、 $\text{x}$ 、 $\text{R}^{1a}$ 、 $\text{R}^{2a}$ 和 $\text{R}^{4a}$ 如本文所公开。



[0097] 此类式(IV)的偶联物中的交联的示例性结构在图3中给出。图2进一步说明了制备式(IV)的偶联物的方法,其包括使包含连接基团Z'的式(III)的水凝胶接触包含同源连接基团Z的式(II)的接头-肽,在使得Z和Z'反应的条件下形成将接头-肽连接至水凝胶的残基基团Z\*。当Z和Z'是叠氮化物/环辛炔时,这样的条件是在0至100℃,优选0至50℃,更优选25至50℃的温度下。取决于接头-肽的溶解度,其中悬浮或溶解接头-肽和水凝胶的溶剂可以是水性的、有机的或混合的。典型的溶剂是水性缓冲液,pH值介于2和7之间,优选介于2和5之间,任选地与水可混溶的共溶剂混合,例如甲醇、乙醇、2-丙醇、叔丁醇、乙腈、二甲基甲酰胺、乙腈或四氢呋喃。当M是不溶性基质时,式(I)的偶联物任选地通过洗涤来分离以除去未反应的接头-肽和反应副产物。(II)和(III)的反应过程类似于Henise等(2020) Engineering Reports 2020;2:e12213报道的那些。

[0098] 式(II)的接头-CNP可以通过CNP肽或其保护形式与式(V)的接头试剂反应来制备,其中X是离去基团,例如氯、0-琥珀酰亚胺基、0-硝基苯基等,以及其余基团如本文针对式(II)所公开。



[0100] 接头可附接至CNP肽的N-末端α-胺基或赖氨酸ε-胺基,使用例如美国专利号8,680,315中描述的化学方法。当接头附接到N-末端α-胺基时,其优选在如图3所示的固体支持物上的肽合成过程中完成。在固体支持物上合成受保护的肽序列后,如下文实施例中所详述的,接头通过反应附接活性碳酸酯,例如琥珀酰亚胺碳酸酯,将所得中间体去封闭,从树脂上裂解,形成二硫化物以提供式(II)的接头-CNP。

[0101] 在第三方面,本发明涉及用于配制和给予式(I)的偶联物的方案。在一个实施方式中,偶联物被制备成适合使用窄规格针进行皮下注射的水凝胶微球。这些微球可以配制成为适合注射的任何溶液,并且可以包含维持偶联物稳定性所需的任何赋形剂,例如缓冲剂、抗菌剂、抗氧化剂、用于调节密度和渗透压的试剂以及促进悬浮和防止微球结块的试剂。特别地,考虑到这些偶联物中接头裂解的β-消除机制的pH敏感性,通过使用低pH的缓冲剂,优选pH 2-7,更优选pH 3-7,最优选pH 4-5的缓冲剂,可以促进稳定性。合适的缓冲剂是本领域已知的用于药物应用的那些,并且包括乙酸盐/酯、柠檬酸盐/酯、苹果酸盐/酯、马来酸盐/酯、磷酸盐/酯和在这些pH范围内有效的其他物质。

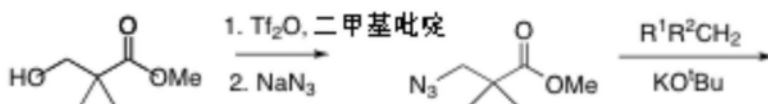
[0102] 给药可以通过任何途径,包括皮下、肌肉内或关节内。预期本发明的偶联物将可用于治疗对CNP有反应的人和动物的疾病和病症,例如软骨发育不全,给药频率为每周、每月或更长。

[0103] 本文所有引用的文献在此通过引用其全文纳入本文。提供以下实施例,以说明而非限制本发明的范围。

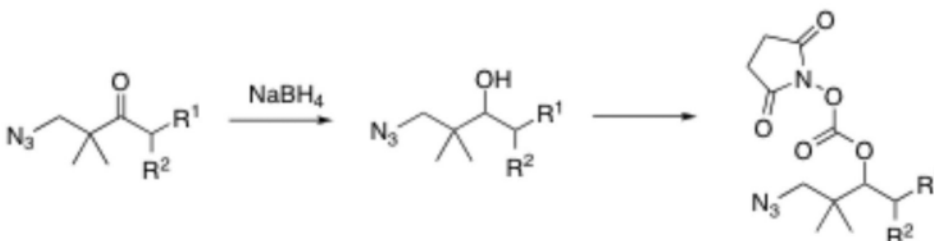
[0104] 以下实施例将用于说明而不是限制本公开的范围。本文中引用的所有参考文献均以引用方式并入,包括针对其公开的特定方面引用的参考文献,特别是针对这些方面以及一般情况引用的参考文献。

[0105] 制备A

[0106] 式(V)的接头的制备



[0107]



[0108] 4-叠氮-1-((N,N-二甲基氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯

[0109] 将正丁基锂在己烷(70mL, 100mmol)中的1.43M溶液添加到在惰性气氛下保持在-50℃的200mL无水THF中的N,N-二甲基甲磺酰胺(12.33g, 100mmol)的搅拌溶液中。使混合物在1小时内温至-20℃,然后在添加3-叠氮-2,2-二甲基丙酸甲酯(根据Kim, Synthetic Communications制备; 7.70g, 50mmol)之前重新冷却至-50℃。让混合物在2小时内温至+10℃,然后用20毫升6N HCl猝灭。用甲基叔丁基醚(MTBE, 200mL)稀释混合物,用100mL水洗涤2次,用100mL盐水洗涤1次,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩,得到14.05g粗制的酮产物。在SiO<sub>2</sub>(220g)上使用0、20、30、40和50%EtOAc/己烷的步进梯度进行色谱,得到纯化的4-叠氮-1-((N,N-二甲基氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁酮(10.65g, 86%)结晶固体。

[0110] 将上述酮溶于200mL甲醇中,在冰上冷却,并用硼氢化钠(0.96g, 25mmol)处理15min,然后用4mL 6N HCl淬灭并浓缩。用甲基叔丁基醚(MTBE, 200mL)稀释得到的浆液,用100mL水洗涤1次,用100mL盐水洗涤1次,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩,得到10.0g 4-叠氮-1-((N,N-二甲基氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁醇结晶。

[0111] 经10分钟,将吡啶(10.6mL, 132mmol)添加到在冰上冷却的250mL二氯甲烷中的N-羟基琥珀酰亚胺(6.90g, 60mmol)和三光气(5.93g, 20mmol)的搅拌混合物中。将混合物在冰上搅拌15分钟,然后经30分钟加热至环境温度。添加4-叠氮-1-((N,N-二甲氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁醇(10.0g, 40mmol)在20mL二氯甲烷中的溶液,并在环境温度下将混合物再搅拌1h。在冰上冷却后,用100毫升水处理混合物并分离相。有机相用水洗涤2次,用5%KHSO<sub>4</sub>洗涤1次,用盐水洗涤1次,用MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并浓缩。粗产物由100mL 30%EtOAc/己烷结晶,得到4-叠氮-1-((N,N-二甲氨基)磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯的

白色结晶固体(11.1g,71%)。

[0112] 4-叠氮-1-(异丙基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯

[0113] 在-78℃下,将1.38M正丁基锂的己烷溶液(14.5mL,20mmol)添加到二异丙胺(2.96mL,21mmol)的80mLTHF溶液中,并允许混合物短暂升温至环境温度,然后再冷却至-78℃。在5分钟内滴加异丙基甲基砒(2.69g,22mmol),然后加3-叠氮-2,2,-二甲丙酸甲酯(1.57g,10mmol)。使混合物在1小时内缓慢升温至环境温度,然后通过添加3.47mL 6N HCl(20.5mmol)猝灭。用乙酸乙酯稀释混合物,用100mL水洗涤2次,用100mL盐水洗涤1次,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩,得到2.9g黄色液体状粗制的酮产物。在SiO<sub>2</sub>(25g)上使用0-70% EtOAc/己烷的梯度进行色谱,得到纯化的4-叠氮-1-(异丙基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁酮(1.73g,70%)结晶固体。

[0114] 将上述酮溶于14mL甲醇中,在冰上冷却,并用硼氢化钠(0.13g,3.5mmol)处理15分钟,然后用1.2mL 6N HCl猝灭并浓缩。用甲基叔丁基醚(MTBE,200mL)稀释得到的浆液,用100mL水洗涤1次,用100mL盐水洗涤1次,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩,得到1.51g无色油状的4-叠氮-1-(异丙基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁醇。

[0115] 在1分钟内将吡啶(0.93mL,11.6mmol)加入到醇(1.44g,5.78mmol)和三光气(2.92g,9.83mmol)在45mL THF中的搅拌混合物中。30分钟后,过滤并浓缩悬浮液。将残余物重新溶解在25mL THF中,用N-羟基琥珀酰亚胺(1.97g,17.1mmol)和吡啶(1.38mL,17.1mmol)处理,搅拌30分钟,然后用乙酸乙酯稀释,用5% KHSO<sub>4</sub>、水和盐水洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤并蒸发。在SiO<sub>2</sub>(25g)上使用0-80% EtOAc/己烷的梯度进行色谱,得到纯化的4-叠氮-1-(异丙基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(1.46g)白色结晶固体。根据这些程序制备的接头包括但不限于:

[0116] 4-叠氮-1-(甲基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V),其中R<sup>1</sup>=MeSO<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,各个R<sup>4</sup>=Me,Z=叠氮,X=O-琥珀酰亚胺基,且n=1。

[0117] 4-叠氮-1-(异丙基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V),其中R<sup>1</sup>=<sup>i</sup>PrSO<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,各个R<sup>4</sup>=Me,Z=叠氮,X=O-琥珀酰亚胺基,且n=1。

[0118] 4-叠氮-1-(苯磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V),其中R<sup>1</sup>=PhSO<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,各个R<sup>4</sup>=Me,Z=叠氮,X=O-琥珀酰亚胺基,且n=1。

[0119] 4-叠氮-1-(4-甲基苯磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V),其中R<sup>1</sup>=(4-甲基苯基)SO<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,各个R<sup>4</sup>=Me,Z=叠氮,X=O-琥珀酰亚胺基,且n=1。

[0120] 4-叠氮-1-(氯苯基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V),其中R<sup>1</sup>=(4-氯苯基)SO<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,各个R<sup>4</sup>=Me,Z=叠氮,X=O-琥珀酰亚胺基,且n=1。

[0121] 4-叠氮-1-氰基-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V),其中R<sup>1</sup>=CN,R<sup>2</sup>=H,各个R<sup>4</sup>=Me,Z=叠氮,X=O-琥珀酰亚胺基,且n=1。

[0122] 4-叠氮-1-(N,N-二甲基氨基磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V),其中R<sup>1</sup>=(Me<sub>2</sub>N)SO<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,各个R<sup>4</sup>=Me,Z=叠氮,X=O-琥珀酰亚胺基,且n=1。

[0123] 4-叠氮-1-(吗啉磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V),其中R<sup>1</sup>=(O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NSO<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,各个R<sup>4</sup>=Me,Z=叠氮,X=O-琥珀酰亚胺基,且n=1。

[0124] 4-叠氮-1-(硫代吗啉磺酰基)-3,3-二甲基-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V),其中R<sup>1</sup>=(S(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NSO<sub>2</sub>,R<sup>2</sup>=H,各个R<sup>4</sup>=Me,Z=叠氮,X=O-琥珀酰亚胺基,且n=1。

[0125] 从4-氯-2,2-二甲基丁酸乙酯开始,制备了以下接头:

[0126] 5-叠氮-1-(氯苯基磺酰基)-4,4-二甲基-2-戊基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V)),其中 $R^1=(4\text{-氯苯基})\text{SO}_2$ , $R^2=\text{H}$ ,各个 $R^4=\text{Me}$ , $Z=\text{叠氮}$ , $X=\text{O-琥珀酰亚胺基}$ ,且 $n=2$ 。

[0127] 5-叠氮-1-氰基-4,4-二甲基-2-戊基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V)),其中 $R^1=\text{CN}$ , $R^2=\text{H}$ ,各个 $R^4=\text{Me}$ , $Z=\text{叠氮}$ , $X=\text{O-琥珀酰亚胺基}$ ,且 $n=2$ 。

[0128] 5-叠氮-1-(苯磺酰基)-4,4-二甲基-2-戊基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V)),其中 $R^1=\text{苯基SO}_2$ , $R^2=\text{H}$ ,各个 $R^4=\text{Me}$ , $Z=\text{叠氮}$ , $X=\text{O-琥珀酰亚胺基}$ ,且 $n=2$ 。

[0129] 5-叠氮-1-(甲基磺酰基)-4,4-二甲基-2-戊基琥珀酰亚胺碳酸酯(式(V)),其中 $R^1=\text{MeSO}_2$ , $R^2=\text{H}$ ,各个 $R^4=\text{Me}$ , $Z=\text{叠氮}$ , $X=\text{O-琥珀酰亚胺基}$ ,且 $n=2$ 。

[0130] 制备B

[0131] 式(III)的水凝胶

[0132] 如Henise等(2020)Engineering Reports 2(8):e12213中所述,将式(III)的水凝胶制备为无菌可注射微球。制备的水凝胶包括其中:

[0133] (a)  $P^1$ 和 $P^2$ 各为10-kDa 4-臂聚(乙二醇); $B^*=\text{三唑}$ ;  $C^*=\text{甲酰胺}$ ;  $q=1$ ;  $R^{1a}=(\text{N,N-二甲基氨基})\text{磺酰基}$ ;  $R^{2a}=\text{H}$ ; 各个 $R^{4a}=\text{甲基}$ ;  $x=4$ ;  $y=0$ ; 且 $Z'=\text{NH-CO-O-}(\text{双环}[6.1.0]\text{壬-4-炔-9-基甲基})$ 。

[0134] (b)  $P^1$ 和 $P^2$ 各为10-kDa 4-臂聚(乙二醇); $B^*=\text{三唑}$ ;  $C^*=\text{甲酰胺}$ ;  $q=1$ ;  $R^{1a}=(\text{N,N-二甲基氨基})\text{磺酰基}$ ;  $R^{2a}=\text{H}$ ; 各个 $R^{4a}=\text{甲基}$ ;  $x=0$ ;  $y=4$ ; 且 $Z'=\text{NH-CO-O-}(\text{双环}[6.1.0]\text{壬-4-炔-9-基甲基})$ 。

[0135] (c)  $P^1$ 和 $P^2$ 各为20-kDa 4-臂聚(乙二醇); $B^*=\text{三唑}$ ;  $C^*=\text{甲酰胺}$ ;  $q=1$ ;  $R^{1a}=(\text{N,N-二甲基氨基})\text{磺酰基}$ ;  $R^{2a}=\text{H}$ ; 各个 $R^{4a}=\text{甲基}$ ;  $x=4$ ;  $y=0$ ; 且 $Z'=\text{NH-CO-O-}(\text{双环}[6.1.0]\text{壬-4-炔-9-基甲基})$ 。

[0136] (d)  $P^1$ 和 $P^2$ 各为20-kDa 4-臂聚(乙二醇); $B^*=\text{三唑}$ ;  $C^*=\text{甲酰胺}$ ;  $q=1$ ;  $R^{1a}=(\text{N,N-二甲基氨基})\text{磺酰基}$ ;  $R^{2a}=\text{H}$ ; 各个 $R^{4a}=\text{甲基}$ ;  $x=0$ ;  $y=4$ ; 且 $Z'=\text{NH-CO-O-}(\text{双环}[6.1.0]\text{壬-4-炔-9-基甲基})$ 。

[0137] (e)  $P^1$ 和 $P^2$ 各为20-kDa 4-臂聚(乙二醇); $B^*=\text{三唑}$ ;  $q=4$ ;  $R^{1a}=\text{CN}$ ;  $R^{2a}=\text{H}$ ; 各个 $R^{4a}=\text{H}$ ;  $x=0$ ;  $y=4$ ; 且 $Z'=\text{NH-CO-O-}(\text{4-环辛炔基})$ 。 $P^1$ 和 $P^2$ 各为20-kDa 4-臂聚(乙二醇); $B^*=\text{三唑}$ ;  $C^*=\text{甲酰胺}$ ;  $q=1$ ;  $R^{1a}=(\text{N,N-二甲基氨基})\text{磺酰基}$ ;  $R^{2a}=\text{H}$ ; 各个 $R^{4a}=\text{甲基}$ ;  $x=4$ ;  $y=0$ ; 且 $Z'=\text{NH-CO-O-}(\text{4-环辛炔基})$ 。

[0138] (f)  $P^1$ 和 $P^2$ 各为20-kDa 4-臂聚(乙二醇); $B^*=\text{三唑}$ ;  $C^*=\text{甲酰胺}$ ;  $q=4$ ;  $R^{1a}=\text{CN}$ ;  $R^{2a}=\text{H}$ ; 各个 $R^{4a}=\text{H}$ ;  $x=0$ ;  $y=4$ ; 且 $Z'=\text{NH-CO-O-}(\text{4-环辛炔基})$ 。

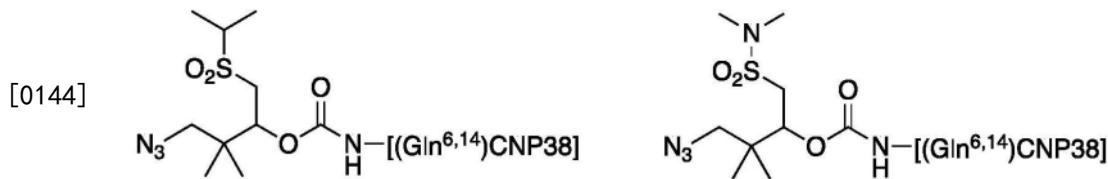
[0139] 实施例1

[0140] (Gln<sup>6,14</sup>)CNP38和伏索利肽的稳定性研究

[0141] 在1.5mL玻璃小瓶中,100 $\mu\text{M}$ [Gln<sup>6,14</sup>]-CNP38或100 $\mu\text{M}$ 伏索利肽用含有0.13M NaCl, pH 7.4的10mM磷酸钠处理。反应保持在37 $^\circ\text{C}$ ,并在分析前周期性地取出等分试样并储存在-20 $^\circ\text{C}$ 。在Dionex BioLC,ProPac SCX-10,250x 4mm上分析样品;0-100%的缓冲液B,经10分钟;1mL/分钟;柱温40 $^\circ\text{C}$ 。在220nm处监测峰。缓冲液A:10mM MES, pH 6.2@22 $^\circ\text{C}$ ;缓冲液B:10mM MES,1M NaCl, pH 6.2@22 $^\circ\text{C}$ 。在1周内观察到伏索利肽的显著分解,而在稳定性实验的整个4周的持续时间内[Gln<sup>6,14</sup>]-CNP38明显更稳定(图6)。

[0142] 实施例2

[0143] 式(II)的接头-CNP的制备



[0145] 通过固相肽合成制备式(II)的接头-CNP。抑制C-末端半胱氨酸消旋化的CNP的制备方法公开于Fujiwara等,Chem.Pharm.Bull.(1996)44(7):1326-31。在树脂上制备(Gln<sup>6,14</sup>)CNP的肽序列后,使用4-叠氮-3,3-二甲基-1-(异丙基磺酰基)-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯或4-叠氮-3,3-二甲基-1-((N,N-二甲基氨基)磺酰基)-2-丁基琥珀酰亚胺碳酸酯附接接头作为最终残基。在二硫化物形成、去封闭和从树脂上裂解后,通过反相HPLC分离接头-CNP。

[0146] 实施例3

[0147] 式(IV)的载有CNP的水凝胶微球的制备

[0148] 如Henise等(2020)Engineering Reports 2020;2:e12213所述,制备式(III)的活化可降解水凝胶微球,其中P<sup>1</sup>和P<sup>2</sup>=10-kDa 4-臂聚(乙二醇),B\*=三唑,C\*=甲酰胺,q=1,R<sup>1a</sup>= (N,N-二甲氨基)SO<sub>2</sub>,R<sup>2a</sup>=H,各个R<sup>4a</sup>=甲基,x=4,y=0,r=4,且Z'=(双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基)CH<sub>2</sub>-O-CO-NH(“BCN-O-CO-NH”)。将活化微球的浆液(2.7mL浆液,15.0μmol BCN)在反应溶剂(100mM柠檬酸盐在1:1的iPrOH:H<sub>2</sub>O中,pH 3.0)中与式(II)的接头-CNP组合,其中R<sup>1</sup>= (N,N-二甲氨基)SO<sub>2</sub>(实施例2),其为BCN的1.2当量(4.8μmol,在2.4mL反应溶剂中),并在37°C下搅拌孵育16小时。用12mL反应溶剂洗涤载药微球4次(直到最终洗涤的OD<sub>280</sub>低于检测值),然后用12mL等渗乙酸盐缓冲液(10mM乙酸钠,143mMNaCl,0.05%聚山梨醇酯20(w/v)pH 5.0)洗涤4次。通过在9体积(约270μL,1μL:1mg浆液)的125mM pH 9.4的硼酸盐中在37°C下24小时溶解约30μL填充浆液(约30mg)来确定CNP浓度和负载分数,一式两份。通过276nm处的吸光度(ε=5800M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)确定肽含量。使用先前描述的PEG测定确定每种浆液中的PEG含量。基于PEG测定,微球浆液的负载百分比被确定为肽浓度与理论PEG反应性端基的比率。类似地制备偶联物,其中R<sup>1</sup>=异丙基-SO<sub>2</sub>(实施例2),使用式(III)的活化可降解水凝胶微球,其中P<sup>1</sup>和P<sup>2</sup>=10-kDa 4-臂聚(乙二醇),B\*=三唑,C\*=甲酰胺,q=1,R<sup>1a</sup>= (N,N-二甲氨基)SO<sub>2</sub>,R<sup>2a</sup>=H,各个R<sup>4a</sup>=甲基,x=0,y=4,r=4,且Z'=(双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基)CH<sub>2</sub>-O-CO-NH(“BCN-O-CO-NH”)。

[0149] 实施例4

[0150] 肽释放动力学

[0151] 将载药微球样品(约30mg)置于1.5mL螺旋盖微量离心管中,通过添加9体积(约0.27mL)的pH 9.4的100mM硼酸钠缓冲液起始肽释放。将反应在37°C的水浴中孵育。在t=0和不同的时间点,在10,000x g下沉淀微球浆液,去除5μL反应上清液,并将样品储存在-20°C。反应上清液中(Gln<sup>6,14</sup>)CNP38的浓度通过Nanodrop UV-Vis在280nm处的吸光度测定。使用Prism 8.0软件绘制上清液时间点的A<sub>280</sub>,并将其拟合为单指数,以确定每种肽的释放速率。对于R<sup>1</sup>=异丙基-SO<sub>2</sub>,观察到的释放半衰期为6.1小时,对应的pH 7.4,37°C下的释放半衰期为610小时。对于R<sup>1</sup>= (N,N-二甲氨基)-SO<sub>2</sub>,观察到的释放半衰期为21小时,对应的pH

7.4, 37°C下的释放半衰期为2100小时。

[0152] 实施例5

[0153] 小鼠药代动力学研究

[0154] CD-1小鼠(雄性,7周龄,体重约30g)通过皮下注射悬浮在pH 5.0缓冲液中的实施例3的水凝胶微球浆液给药,所述缓冲液含有10mM乙酸钠、143mM NaCl、10mM甲硫氨酸、0.05%聚山梨醇酯20(w/v)和1.2%透明质酸钠60kDa(w/v)。其中 $R^1 = (N,N\text{-二甲基氨基})\text{-SO}_2$ 的水凝胶微球偶联物以每只小鼠0.7 $\mu\text{mol}$ 的剂量给予。在以下时间点通过添加HALT蛋白酶抑制剂收集血清样品:0、8、24、48、96、168、240、336、408、04、576、672、840、1008、1176、344、1512、1680、1848和2016小时。使用2组,每组4只小鼠收集完整的时间过程,并在每组的交替时间点收集血清样品。其中 $R^1 = \text{异丙基}\text{-SO}_2$ 的水凝胶微球偶联物以每只小鼠0.22 $\mu\text{mol}$ 的剂量给予。在以下时间点通过添加HALT蛋白酶抑制剂收集血清样品:0、8、24、48、72、120、168、240、336、432、504、600和672小时。使用3组,每组4只小鼠收集完整的时间过程,并在每三个时间点从交替组中收集血清样品。使用(Gln<sup>6,14</sup>)CNP38作为通过吸光度定量的标准( $\epsilon_{280} = 1681.8\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),通过ELISA分析血清样品。结果如图7所示。数据符合两相模型。对于 $R^1 = \text{异丙基}\text{-SO}_2$ ,观察到的半衰期分别为39和212小时。对于 $R^1 = (N,N\text{-二甲基氨基})\text{-SO}_2$ ,观察到的半衰期分别为58和607小时。

[0155] 实施例6

[0156] 食蟹猴药代动力学

[0157] 如实施例3中所述制备负载有[Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38的微球,其对于 $R^1 = \text{异丙基磺酰基}$ 和 $R^1 = (N,N\text{-二甲基氨基})\text{-磺酰基}$ 分别包含3.1和3.6 $\mu\text{mol}$ 肽/mL填充浆液。在等渗乙酸盐(10mM乙酸钠、143mM NaCl)pH 5.0、0.05%Tween 20缓冲液(含1.2%透明质酸钠)中配制微球。注射器(0.3mL U-100胰岛素注射器,带有固定的29g x1/2"针头,BD#34702)在无菌条件下填充1mL配制的微球。

[0158] 在实验开始时年龄大于18个月、体重在1.8至2.6kg之间的正常幼年食蟹猴(每组3只,雌性1只和雄性2只),根据当前体重以1.3 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ( $R^1 = \text{异丙基磺酰基}$ )或1.2 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ( $R^1 = (N,N\text{-二甲基氨基})\text{-磺酰基}$ )皮下给予实施例3的偶联物。任何不需要的物质都从预填充的注射器中排出,并给予残留的体积。在给药前、给药后8、24、48、96、168、240、336、408、504、576、672、744和840小时,从给予4A和4B的猴的外周静脉收集血样(大约1mL)。对于给予4B的猴子,还在给药后1008、1176、1344、1680和2160小时收集血液。通过在含有K<sub>2</sub>EDTA和蛋白酶抑制剂(Halt蛋白酶抑制剂,赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific))的试管中收集将血样处理为血浆,并分成两个相等的体积以在-80C下储存。从第一次给药后的第1天开始,每周至少一次在注射部位、头部、颈部、四肢、躯干、尾巴、体窍和生殖器检查动物的一般毒性迹象,包括粪便和尿液质量。在处理过程中,观察每只动物的皮肤、毛皮、眼睛、粘膜、分泌物和排泄物的出现、流泪、立毛、瞳孔大小和异常呼吸模式的变化。还检查了动物的笼子是否有异常粪便、尿液、呕吐物或其他排泄物或分泌物。

[0159] [Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38在食蟹猴血浆中的浓度使用来自菲尼克斯医药公司(Phoenix Pharmaceuticals, Inc)(目录号FEK-012-03)的CNP-22荧光EIA试剂盒测量,在分子装置公司(Molecular Devices)Spectramax i3平板阅读器上读取。将血浆样品在空白食蟹猴血浆中稀释,以获得使用[Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38代替CNP-22生成的标准曲线范围内的浓度(2pM至

2nM)。两个不同的操作员在不同的日子使用两个不同的样品等分试样重复分析。

[0160] 图8和图9显示了用实施例3 ( $R^1 =$  异丙基磺酰基) 处理幼年食蟹猴的血浆浓度(图8), 或用实施例3 ( $R^1 =$  (N,N-二甲基氨基)-磺酰基) 处理幼年食蟹猴的血浆浓度(图9)。实施例3的偶联物, 其中 $R^1 =$  异丙基磺酰基, 其提供连续暴露 $\geq 100$ pM的[Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38持续约1个月。实施例3的偶联物, 其中 $R^1 =$  (N,N-二甲基氨基)-磺酰基, 提供连续暴露 $\geq 100$ pM的[Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38持续超过3个月。

[0161] 实施例7

[0162] 幼年小鼠中的药效学

[0163] 三周龄的野生型雄性小鼠(FVB/nJ; 查尔斯河实验室公司(Charles River Laboratory, Inc)) 在35天内以重量调整后的(nmol/kg)或恒定的(nmol/动物, 独立于初始体重)剂量皮下注射实施例3的偶联物。对于使用恒定剂量/动物的实验, 以20或50nmol/小鼠给予其中 $R^1 =$  异丙基磺酰基的实施例3的偶联物(偶联物4A); 以85或600nmol/小鼠给予其中 $R^1 =$  (N,N-二甲基氨基)磺酰基的实施例3的偶联物(偶联物4B)。对于使用重量调整剂量/动物的实验, 偶联物4A以1.5或2.2 $\mu$ mol/kg给予; 偶联物4B以6.1 $\mu$ mol/kg给予。剂量是根据给药前的体重计算的, 并在一天中的大约同一时间进行。比较动物以70nmol/kg给予[Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38或伏索利肽, 其配制在pH 4.0的含有10% (w/v) 蔗糖和1% (v/v) 苄醇(Wendt; Breinholt)的30mM乙酸中, 并向对照动物给予制剂缓冲液(等渗乙酸盐(10mM乙酸钠, 143mM NaCl), pH 5.0, 含有1.2%透明质酸钠的0.05% Tween 20缓冲液。每日重量调整剂量基于给药前的体重计算, 每天大约在同一时间进行。

[0164] 通过尾静脉收集血液, 添加蛋白酶抑制剂(Halt蛋白酶抑制剂混合物, 赛默飞世尔科技), 并用K<sub>2</sub>EDTA处理以提供约15-20 $\mu$ L血浆, 用于游离[Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38的分析。对于用偶联物4A处理的小鼠, 在0、24、168、192、336、360、504、528、672和840小时采血。对于用偶联物4B处理的小鼠, 在0、24、168、336、504、672和840小时采血。

[0165] 在研究起始时收集体重、尾长和鼻-肛门长度, 并在活体治疗期间每周测量一次。小鼠用异氟烷麻醉后仰卧置于桌上, 尾巴拉直, 用金属尺轻轻压在小鼠身上, 使脊柱任何弯曲处伸直, 使小鼠充分伸长。测量并记录鼻-肛门(从鼻尖到肛门的距离)和尾长(从肛门到尾尖的距离)。所有测量均使用同一尺子, 所有测量均以厘米为单位进行和记录。总长度(TL)是从测量的尾长和鼻-肛门长度相加得出的。

[0166] 在第35天, 小鼠被麻醉并且除了鼻-肛门和尾长测量之外, 还通过数字X-射线测量骨长度(脊柱、右股骨、右胫骨、肱骨和尺骨)。在用异氟烷深度麻醉后, 将小鼠置于俯卧位并通过X-射线测量每只小鼠的: 脊柱长度(侧视图, 从C1椎骨的最颅端到S4椎骨的最尾端的距离, 并手动计算弯曲度), 右股骨(背-腹视图中从最近端股骨头骨化中心到最远端骨化中心的距离), 右胫骨(背-腹视图中从最近端骨化中心到最远端骨化中心的距离), 右肱骨(背-腹视图中从最近端骨化中心到最远端骨化中心的距离)和右尺骨(背-腹视图中从最近端骨化中心到最远端骨化中心的距离), 使用Spectral Imaging Instruments AMI HTX和相关联的Aura软件。

[0167] 重量调整剂量的总尾长测量值分别显示在图10和11中。图12显示了麻醉小鼠的照片, 所述小鼠用以下处理: A) 载体对照; B) QD[Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38肽, 70nmol; C) 每两周一次(Q2Wk)偶联物4A, 2.2 $\mu$ mol/kg; D) 每周一次(QWk)偶联物4A, 2.2 $\mu$ mol/kg; 和E) 每周一次

(QWk) 偶联物4A, 1.5 $\mu$ mol/kg, 五周后。

[0168] 表1显示用实施例3的偶联物处理5周后的骨长度, 其中R<sup>1</sup>=异丙基磺酰基(4A)或R<sup>1</sup>= (N,N-二甲基氨基)磺酰基(4B)。通过X射线测量。[标准偏差](与载剂的百分比变化)。

[0169] 结果表明, 每周一次(QWk)给予含有1.5 $\mu$ mol/kg [Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38的4A, 或每两周一次(Q2Wk)给予含有2.2 $\mu$ mol/kg [Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38的, 相对于载剂对照增加了生长, 其相当于或超过每日一次(QD)的[Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38或伏索利肽。在稳定前, 6.1 $\mu$ mol/kg的单剂偶联物4B也支持增加生长, 相当于每日一次[Gln<sup>6,14</sup>]CNP-38持续至少3周。这些结果表明, 每周、每两周或每月递送长效4A和4B的适当方案可以实现与每日给药伏索利肽或其他CNP变体相似或更大的幼年小鼠的生长增强。

[0170] 表1.

处理	剂量	骨长度(mm)				
		股骨	胫骨	脊柱	肱骨	尺骨
载剂	N/A	12.5 [0.7]	18.4 [0.2]	57.5 [1.2]	12.2 [0.5]	14.8 [0.1]
[0171] [Gln <sup>6,14</sup> ]CNP-38	QD 70 nmol/kg	14.2 [1.0] (13.6%)	20.0 [0.5] (8.7%)	63.3 [1.4] (10.1%)	12.3 [0.8] (0.8%)	15.6 [0.4] (5.4%)
	QWk 50	14.1 [1.0]	21.9 [0.3]	74.1 [2.5]	13.9 [0.9]	16.3 [0.4]

[0172]	nmol/小鼠	(12.8%)	(19.0%)	(28.9%)	(13.9%)	(10.1%)
	Qwk 20 nmol/小鼠	13.5 [0.9] (8.0%)	20.2 [0.9] (9.8%)	64.9 [0.9] (12.9%)	12.7 [0.6] (4.1%)	16.0 [0.4] (8.1%)
	QWk 1.5 $\mu\text{mol/kg}$	16.1 [0.4] (28.8%)	21.1 [0.8] (14.7%)	71.2 [1.4] (26.0%)	13.1 [0.9] (4.8%)	16.7 [0.5] (12.1%)
	QWk 2.2 $\mu\text{mol/kg}$	15.5 [1.3] (24.0%)	20.9 [1.0] (13.6%)	73.8 [2.6] (30.6%)	13.7 [0.8] (9.6%)	16.8 [0.5] (12.8%)
	Q2Wk 2.2 $\mu\text{mol/kg}$	14.5 [0.8] (16.0%)	20.4 [0.6] (10.9%)	66.4 [1.7] (17.5%)	13.4 [0.7] (7.2%)	16.0 [0.6] (7.4%)
[0173]	s.d. 84 nmol/小鼠	12.7 [1.1] (1.6%)	19.3 [0.4] (4.9%)	62.0 [1.8] (7.8%)	12.5 [0.2] (2.5%)	14.8 [0.5] (0.0%)
	s.d. 6.1 $\mu\text{mol/kg}$	14.5 [1.5] (16.0%)	19.2 [0.8] (4.3%)	61.9 [3.2] (9.6%)	12.8 [0.7] (2.4%)	15.6 [0.5] (4.7%)
	s.d. 40 $\mu\text{mol/kg}$	11.7 [0.8] (-6.4%)	20.3 [0.5] (10.3%)	64.0 [3.8] (11.3%)	12.1 [0.9] (-0.8%)	15.9 [0.5] (7.4%)

[0173] 实施例8

[0174] 肽释放和水凝胶降解的动力学

[0175] 分析负载有根据实施例3制备的  $(\text{Gln}^{6,14})\text{CNP38}$  ( $\text{R}^1 = \text{异丙基磺酰基或}(\text{N},\text{N}-\text{二甲氨基})\text{磺酰基}$ ) 的可生物降解水凝胶微球在加速的 pH 9.4, 37°C 条件下释放游离  $(\text{Gln}^{6,14})\text{CNP38}$  和溶解的 PEG, 根据公开的程序 (Henise 等 (2020) Engineering Reports 2020;2: e12213)。

[0176] 溶解的肽通过  $\text{OD}_{280}$  定量, 而溶解的 PEG 使用  $\text{BaCl}_2/\text{I}_2/\text{NaI}$  比色测定法定量, 使用 PEG8000 作为标准。由于水凝胶微球的一些早期降解可能导致仍附接有肽的 PEG 片段溶解, 通过  $\text{OD}_{280}$  测量的总溶解肽可能是从微球释放的游离肽加上溶解的 PEG 化肽的总和。因此, 假设药物-接头的一级裂解速率恒定, 通过校正可溶性肽的量来分析数据。假设溶解的 PEG 代表总体水凝胶, 那么对总  $\text{OD}_{280}$  有贡献的可溶性 PEG-肽的量简单地给出为

$$[\text{PEG-肽}]_{\text{sol}} = \text{PEG}(t) \cdot \exp(-kt)$$

[0178] 其中  $\text{PEG}(t) =$  在时间  $t$  存在的溶解 PEG 的数量,  $k =$  接头-肽裂解的一级速率常数。从  $\text{OD}_{280}$  测量的总肽中减去该量, 以得到在时间  $t$  从水凝胶释放的游离肽的量。 $\text{OD}_{280}$  和 PEG 的实验数据根据由平台值确定的测定中的总数归一化, 然后使用迭代过程拟合归一化数

据,以确定根据残差平方和给出最佳拟合的k值。

[0179] 使用6次重复测量肽释放和水凝胶降解,OD<sub>280</sub>和溶解的PEG的归一化值取平均值。结果示于图13A和13B。

[0180] 对于实施例3的偶联物,其中R<sup>1</sup>=异丙基磺酰基,如图13A所示,k的最佳拟合值给出了在pH 9.4下的t<sub>1/2</sub>=6.1小时,其外推为在pH 7.4,37℃下为610小时。水凝胶微球在该pH值下在约30小时前完全溶解。对于其中R<sup>1</sup>=(N,N-二甲基氨基)磺酰基的偶联物,如图13B所示,k的最佳拟合值给出了在pH 9.4下的t<sub>1/2</sub>=15.8小时,其外推为在pH 7.4,37℃下为1580小时。水凝胶微球在该pH值下在约30小时前完全溶解。



<210> 3

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<223> C22-C38二硫化物

<400> 3

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

<210> 4

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<223> C22-C38二硫化物

<400> 4

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

<210> 5

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<223> C22-C38二硫化物

<220>



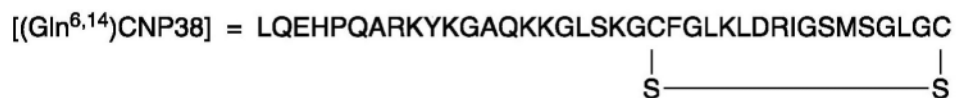
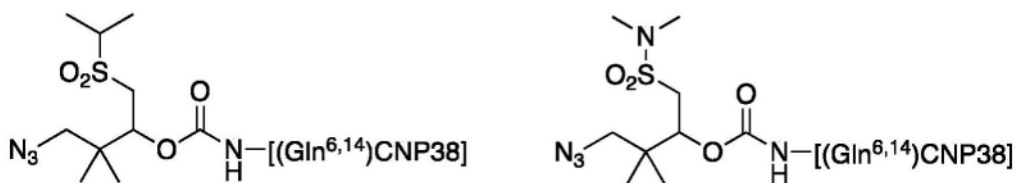


图1

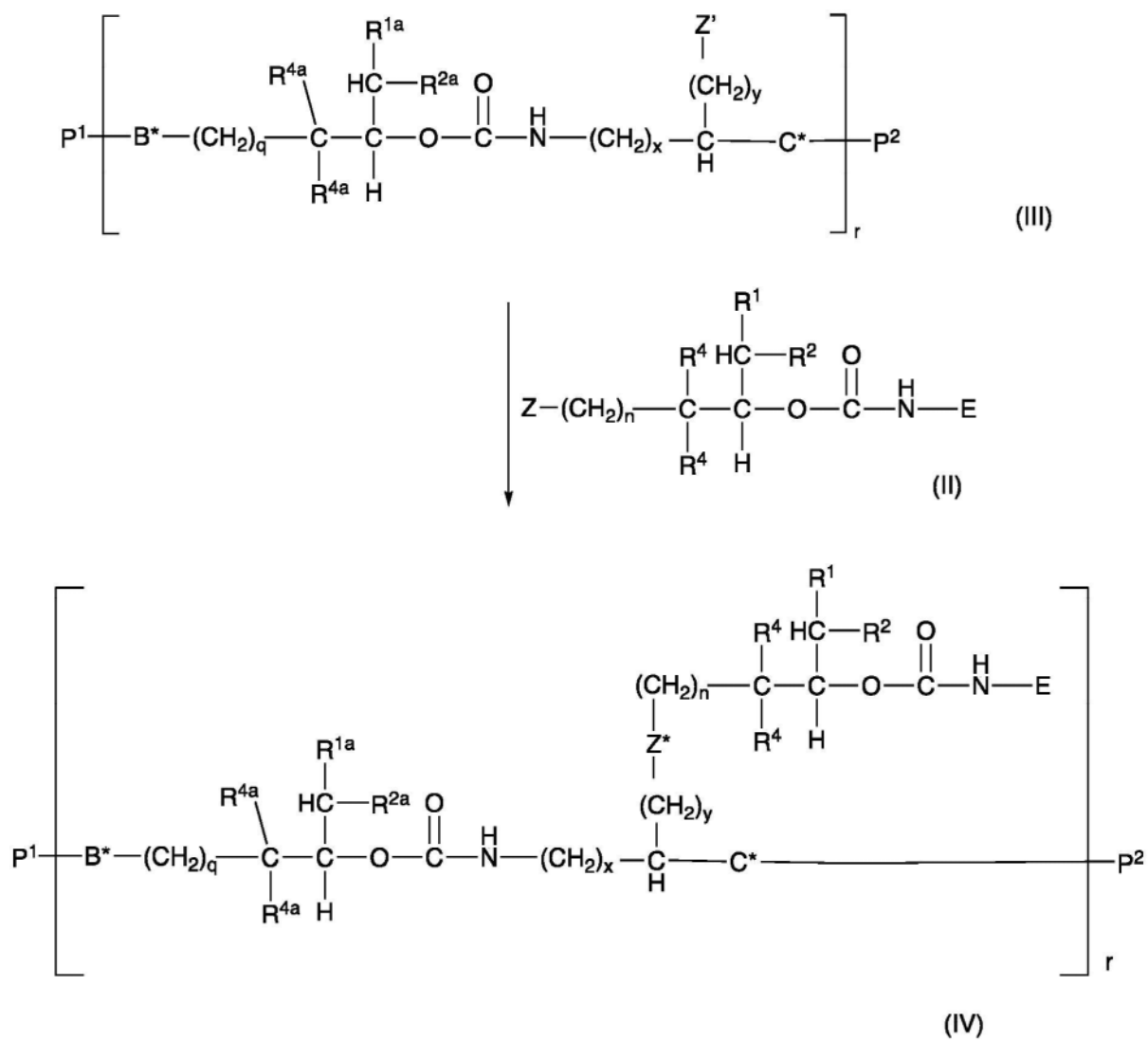


图2

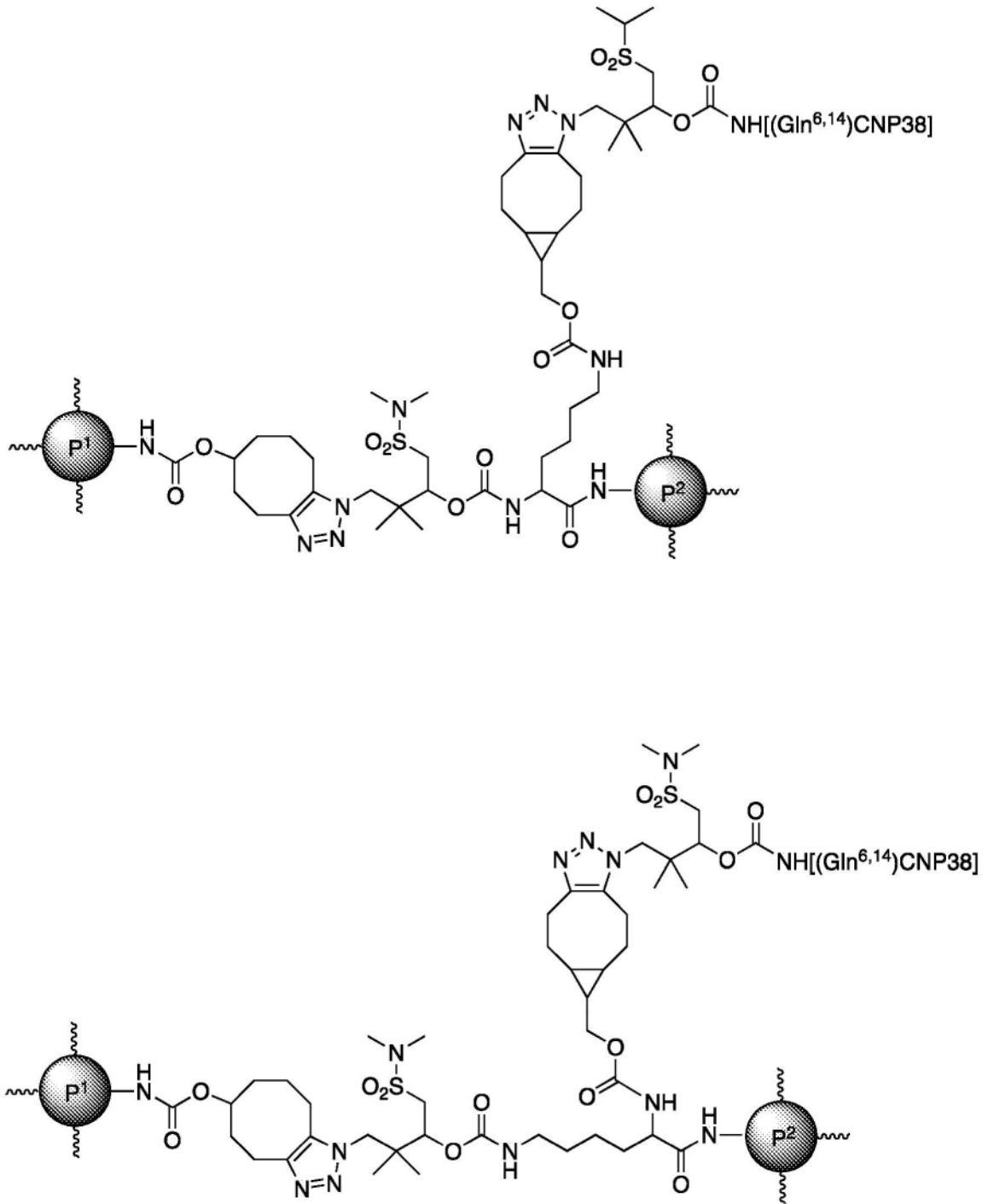


图3

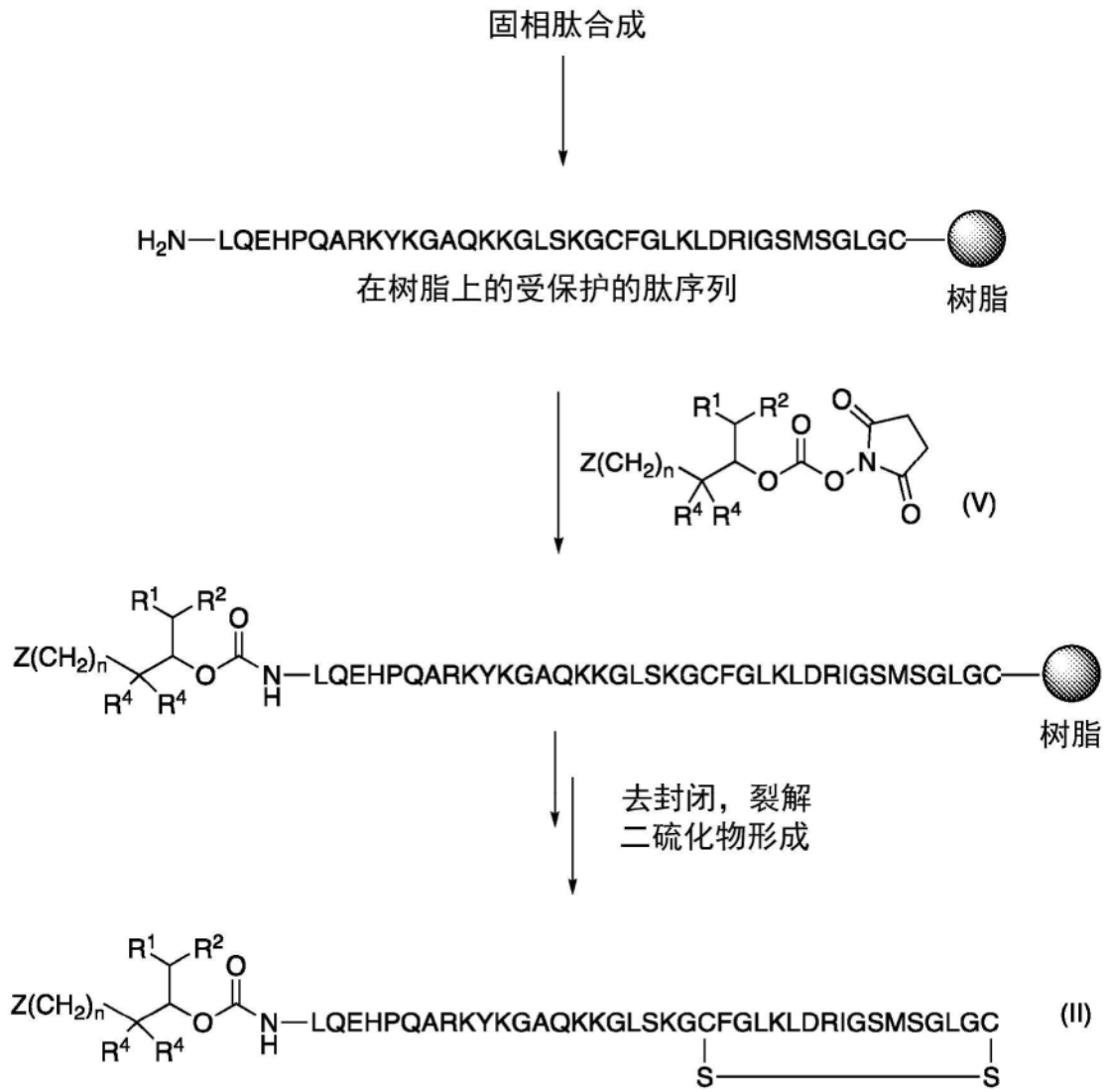


图4

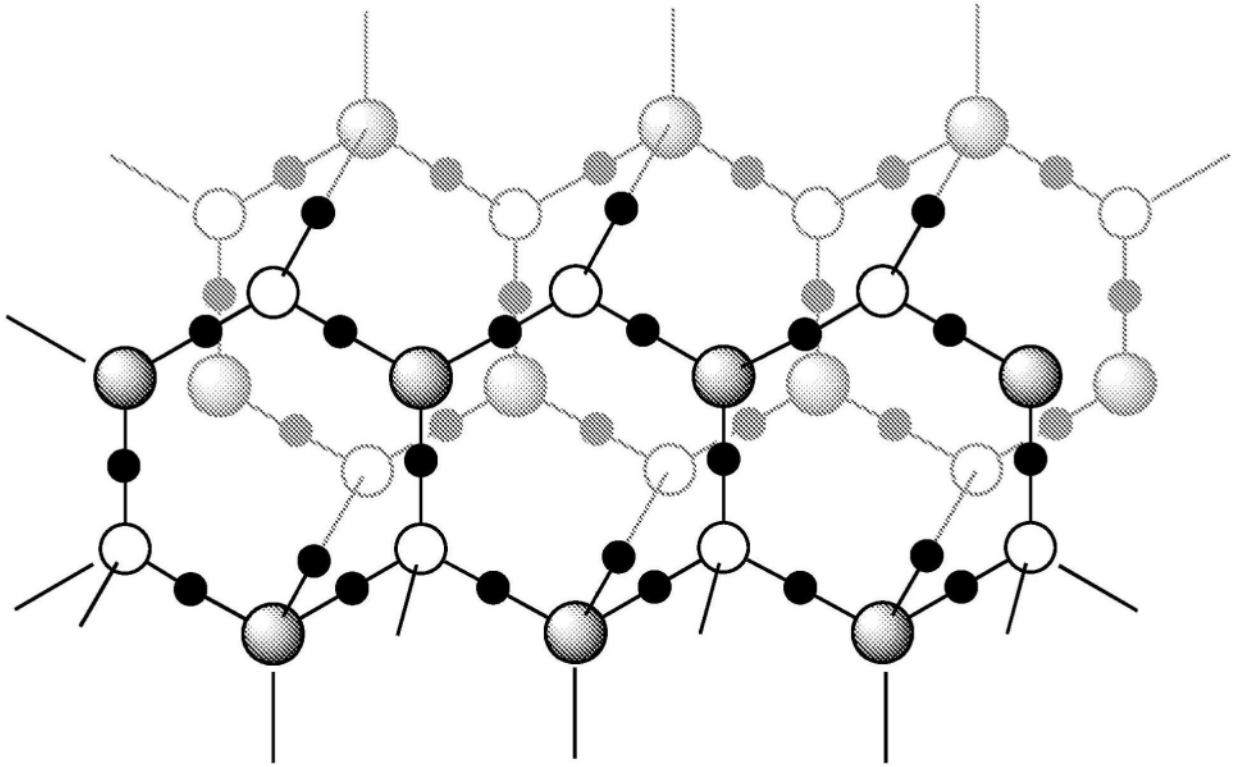


图5

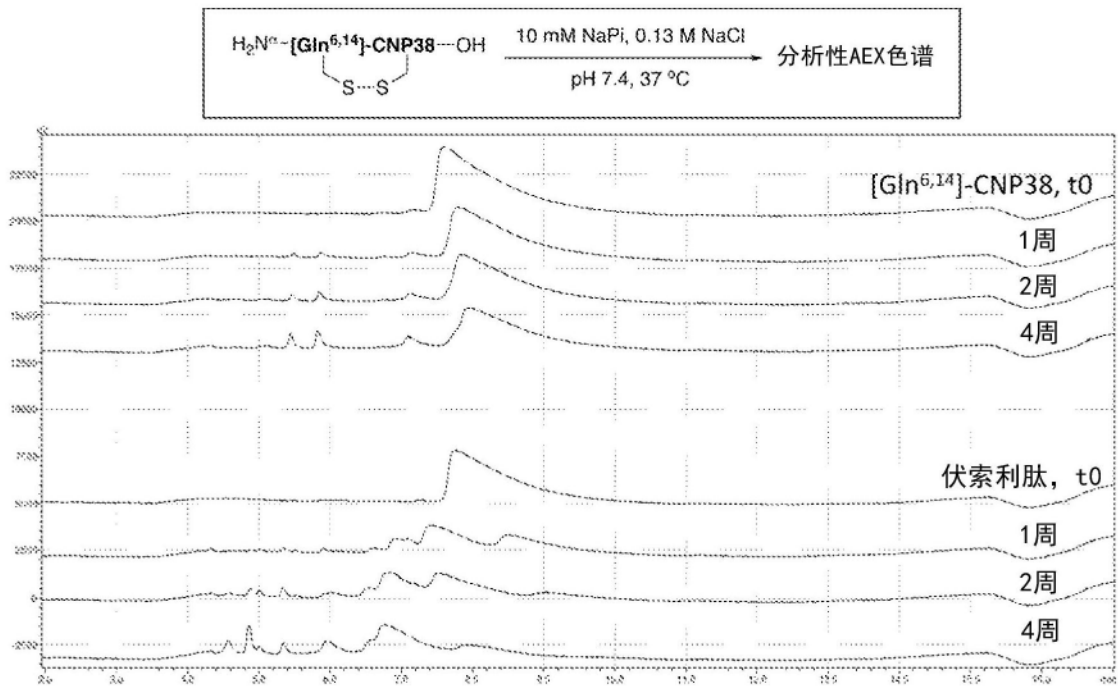


图6

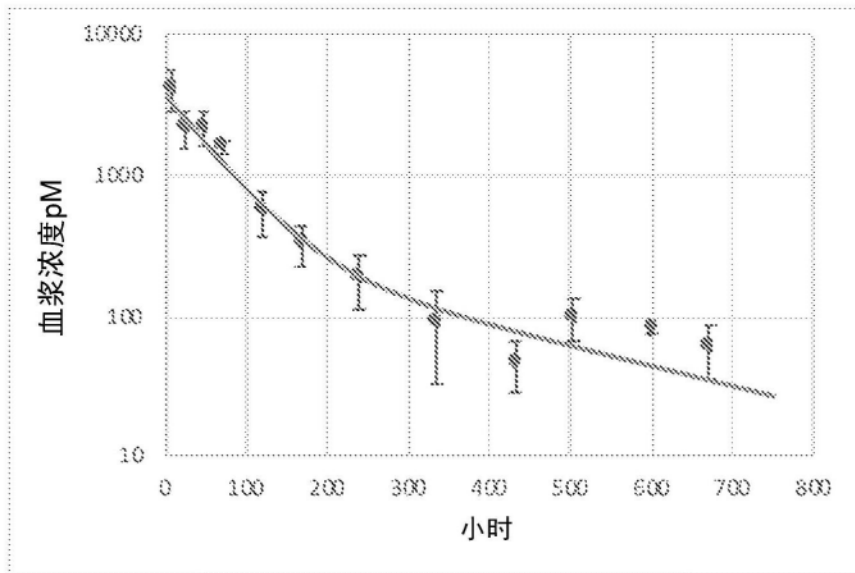


图7A

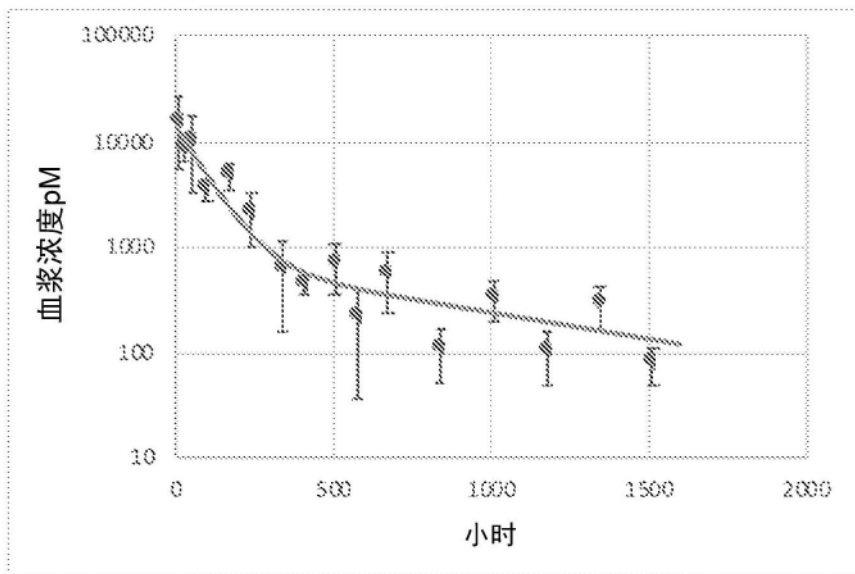


图7B

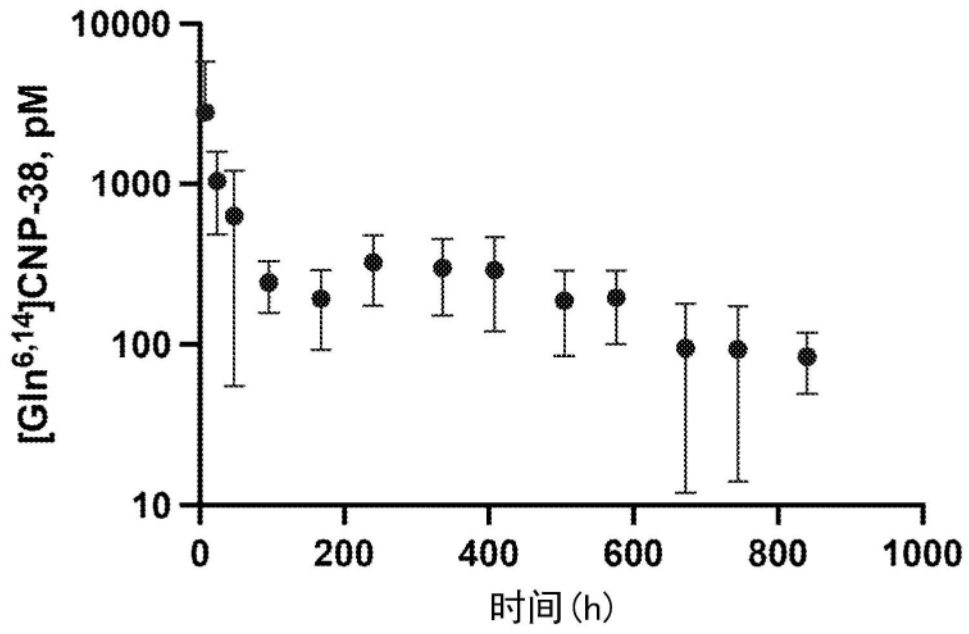


图8

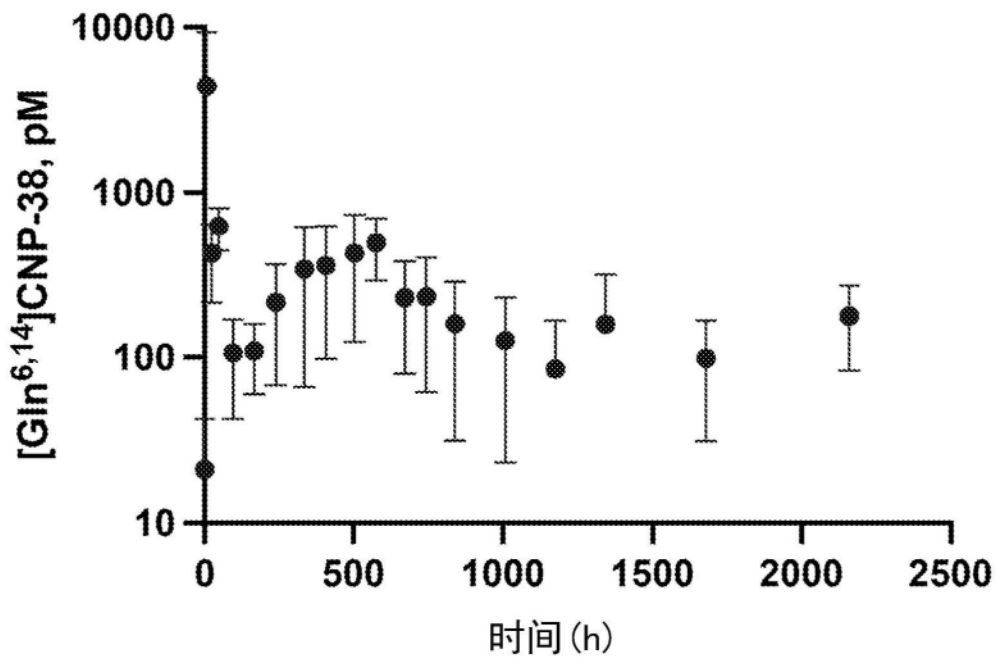


图9

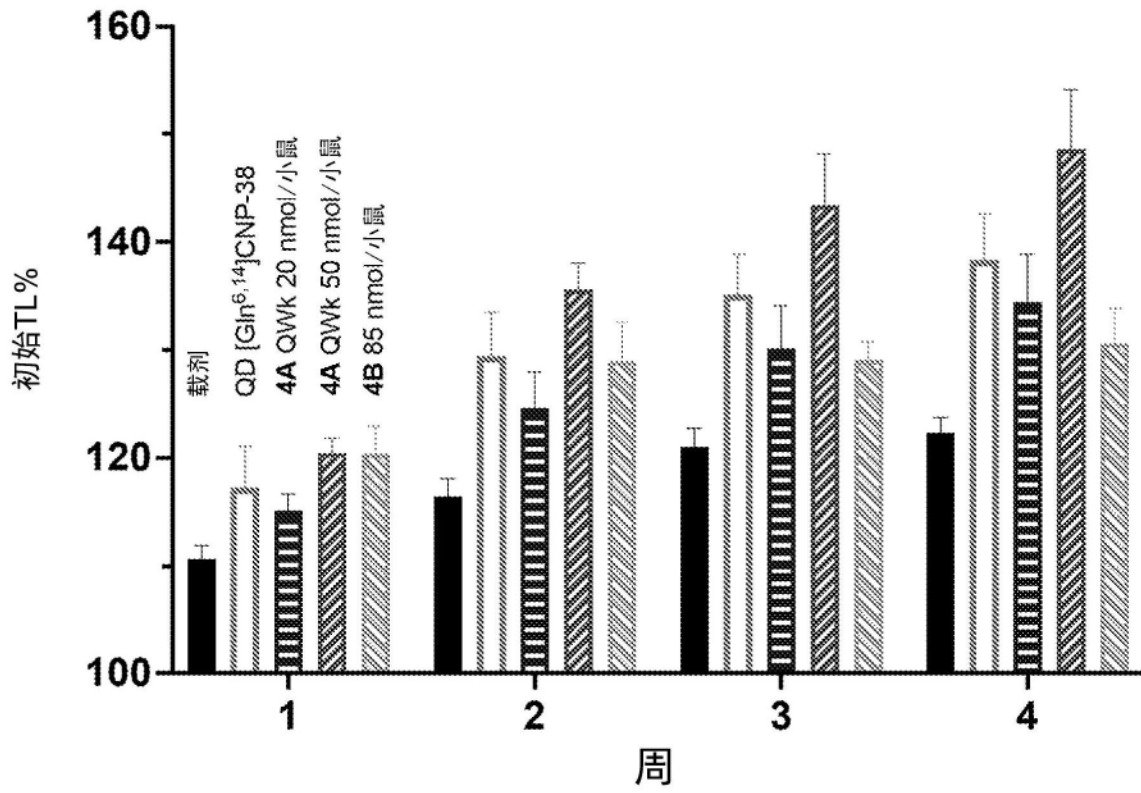


图10

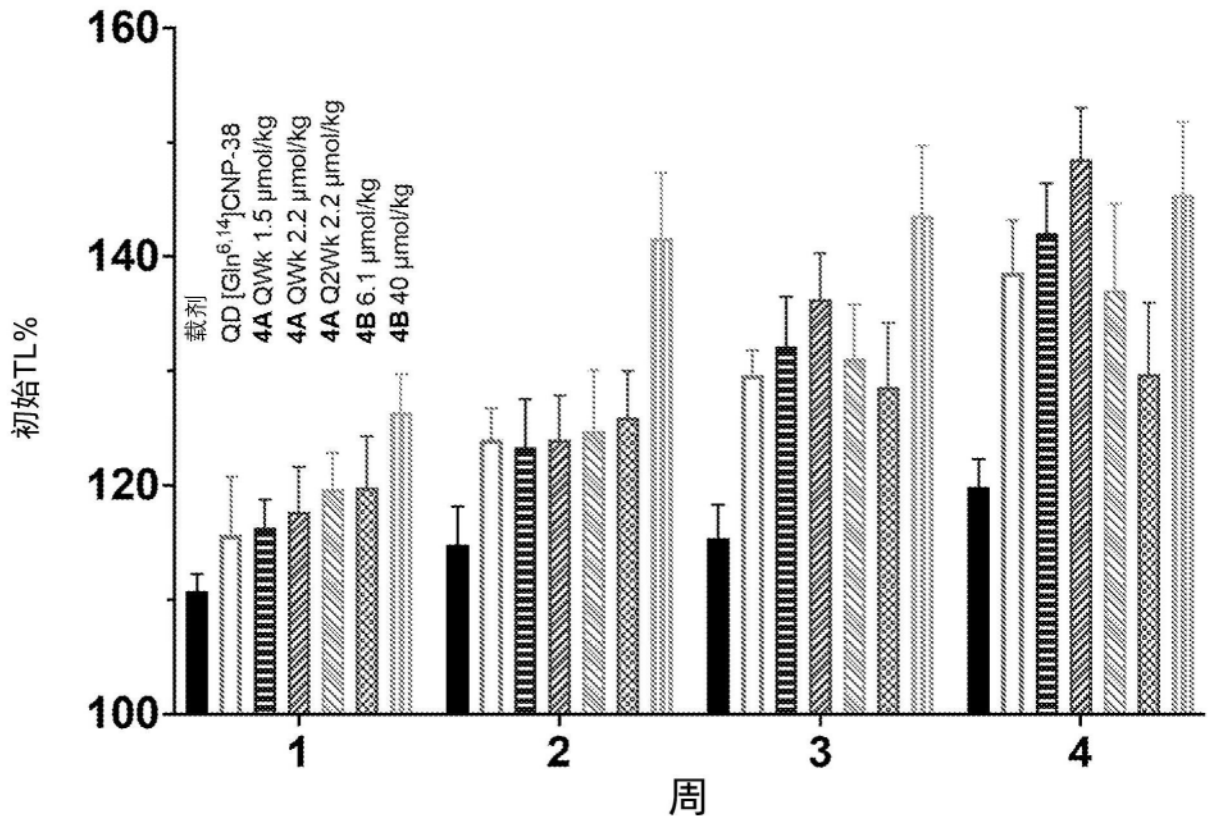


图11

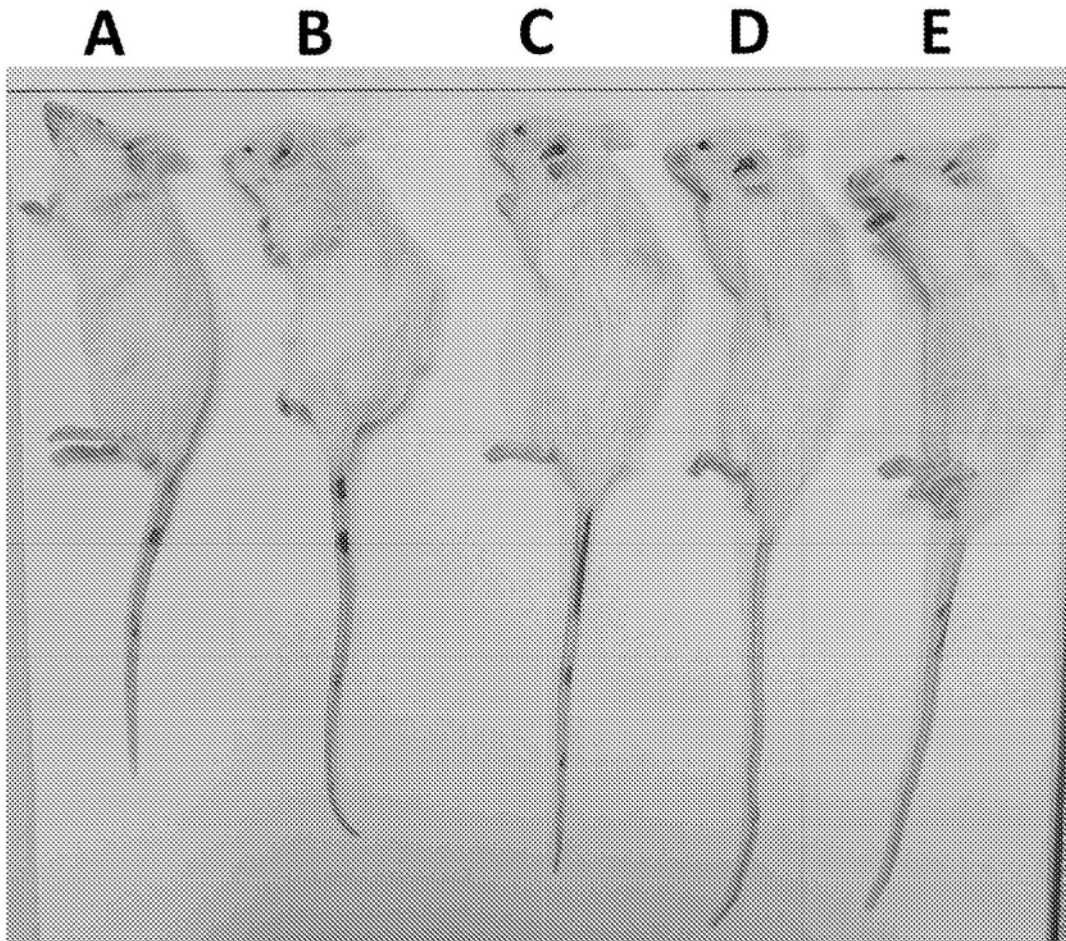


图12

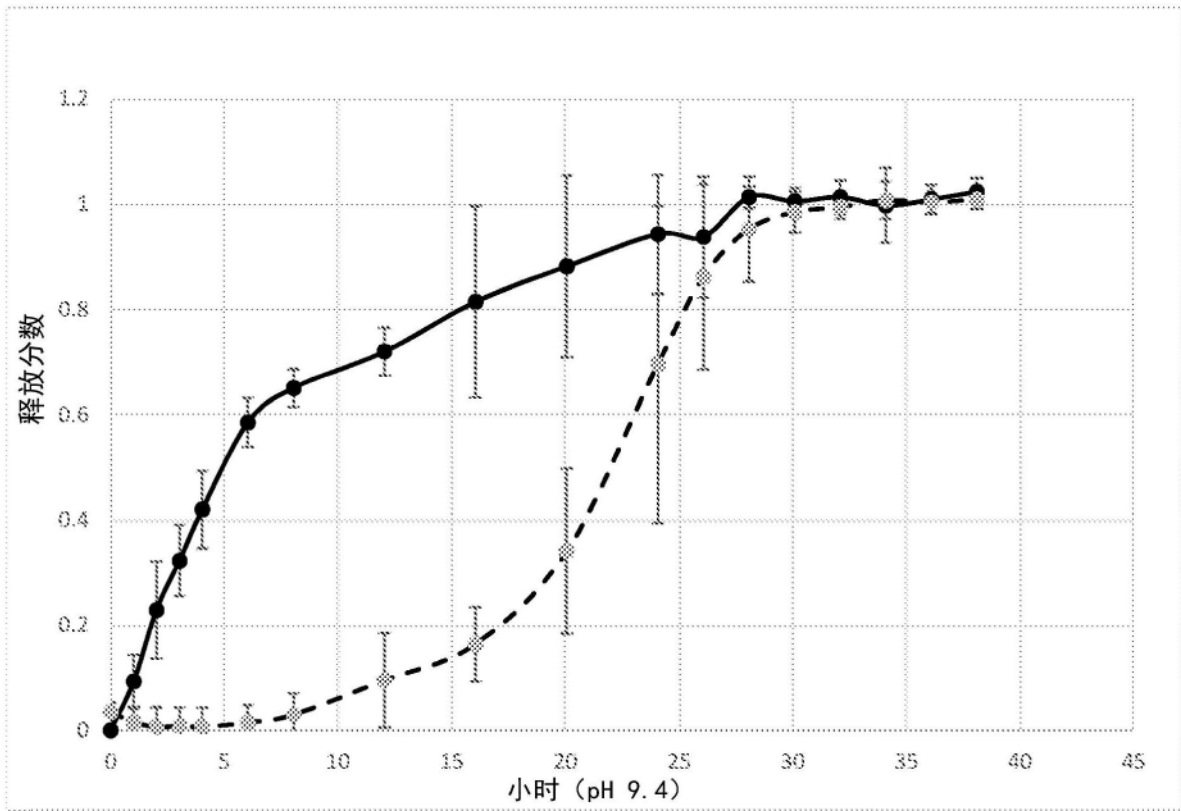


图13A

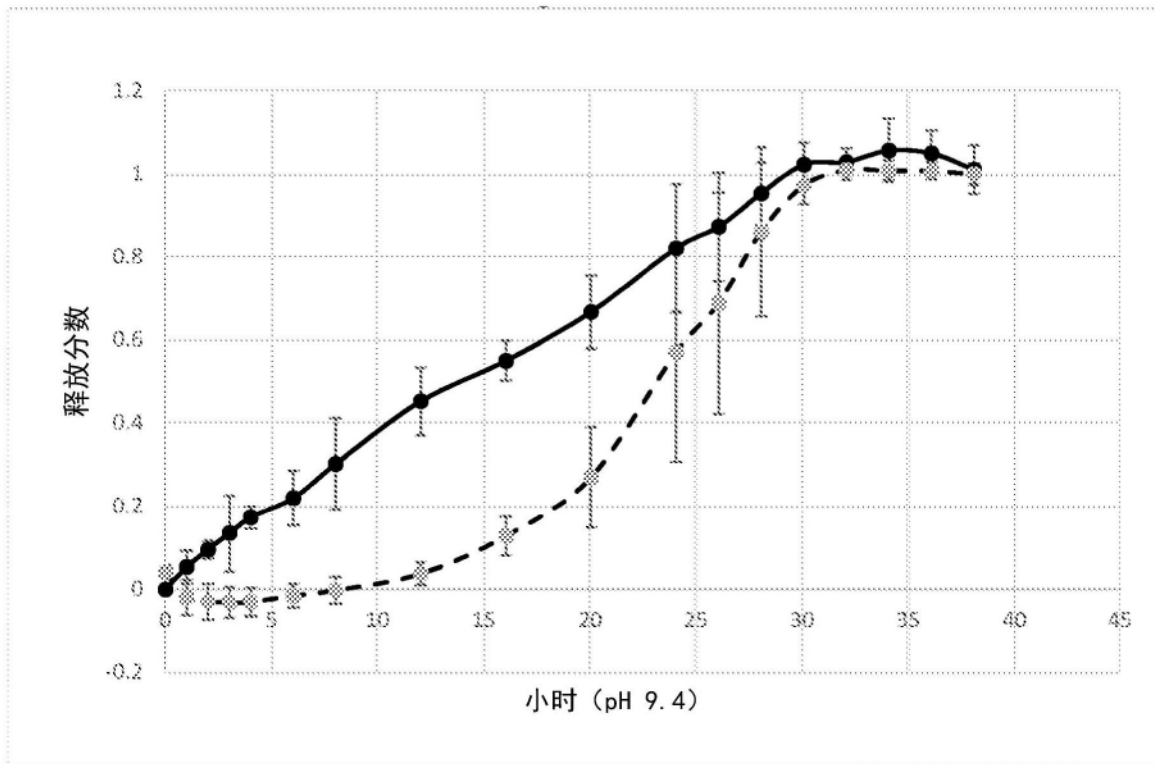


图13B