



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월29일

(11) 등록번호 10-1813595

(24) 등록일자 2017년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 47/48** (2006.01) **A61K 38/27** (2006.01)  
**C07K 14/61** (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-7021413  
(22) 출원일자(국제) 2012년01월24일  
심사청구일자 2016년01월11일  
(85) 번역문제출일자 2012년08월16일  
(65) 공개번호 10-2013-0028053  
(43) 공개일자 2013년03월18일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/050923  
(87) 국제공개번호 WO 2011/089255  
국제공개일자 2011년07월28일  
(30) 우선권주장  
10151405.7 2010년01월22일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
61/297,305 2010년01월22일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20070203058 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**노보 노르디스크 헬스 케어 악티엔게젤샤프트**  
스위스 체하-8050 취리히 트루가우어슈트라쎄  
36/38  
(72) 발명자  
**베렌스 카르스텐**  
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보  
노르디스크 에이/에스  
**요한슨 닐스 랜지랜드**  
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보  
노르디스크 에이/에스  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
**특허법인와이에스장**

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **장기적 생체 내 효능을 갖는 성장 호르몬**

**(57) 요약**

본 발명은 지연성 프로파일을 갖는 성장 호르몬 화합물에 관한 것이다. 효과는 성장 호르몬 변종에 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기에 연결함으로써 제공된다. 이들 화합물의 제조 및 사용 방법은 더 기술된다. 이들 성장 호르몬 화합물은 치료에 구체적으로 유용하게 고려되도록 개조된 프로파일에 기초한다.

(72) 발명자

**안데르센 헨릭 슌**

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보  
노르디스크 에이/에스

**닐스코브-로우리첸 레이프**

덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보  
노르디스크 에이/에스

**부차르츠 젠스**

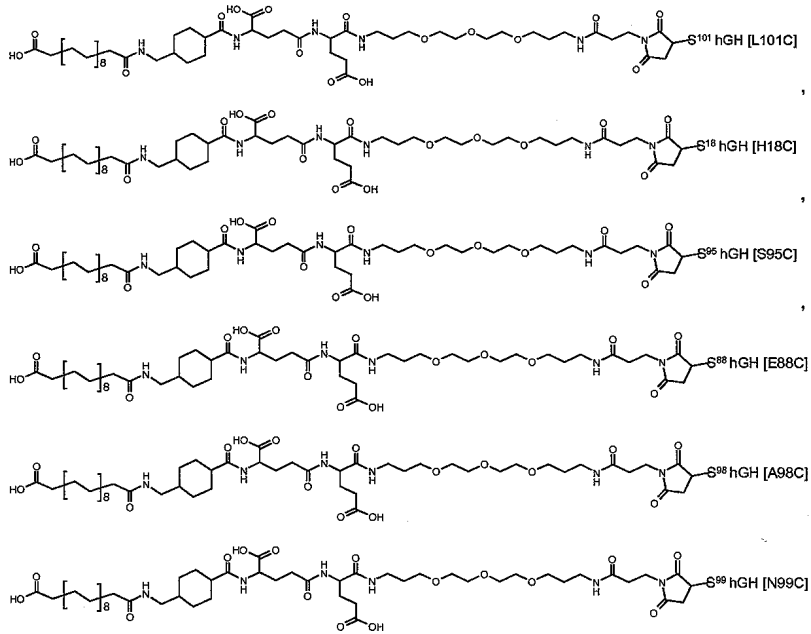
덴마크 디케이-2880 박스바에르트 노보 알레 노보  
노르디스크 에이/에스

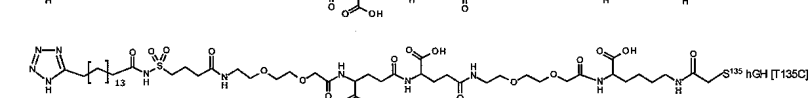
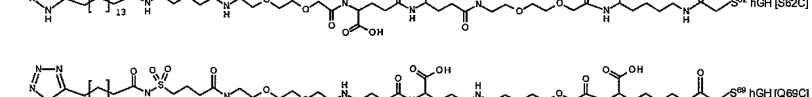
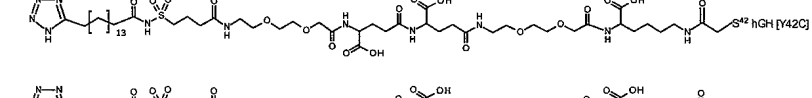
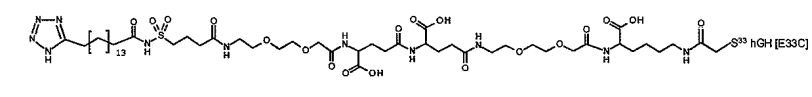
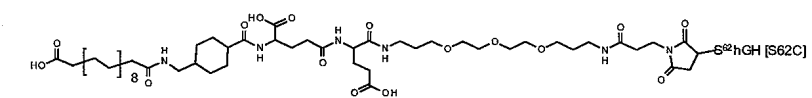
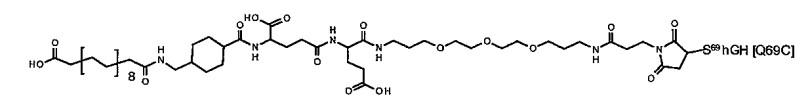
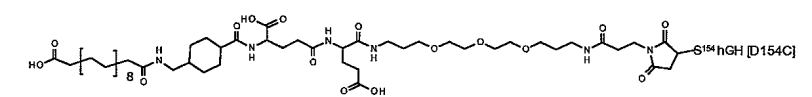
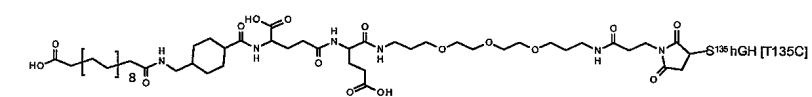
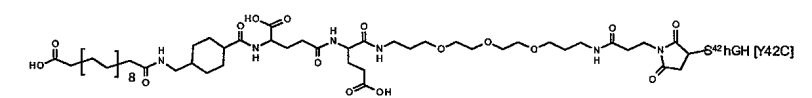
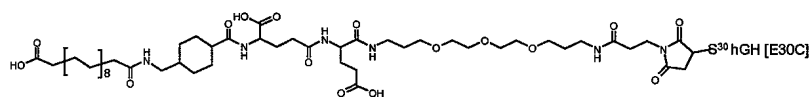
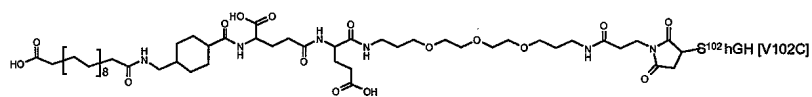
## 명세서

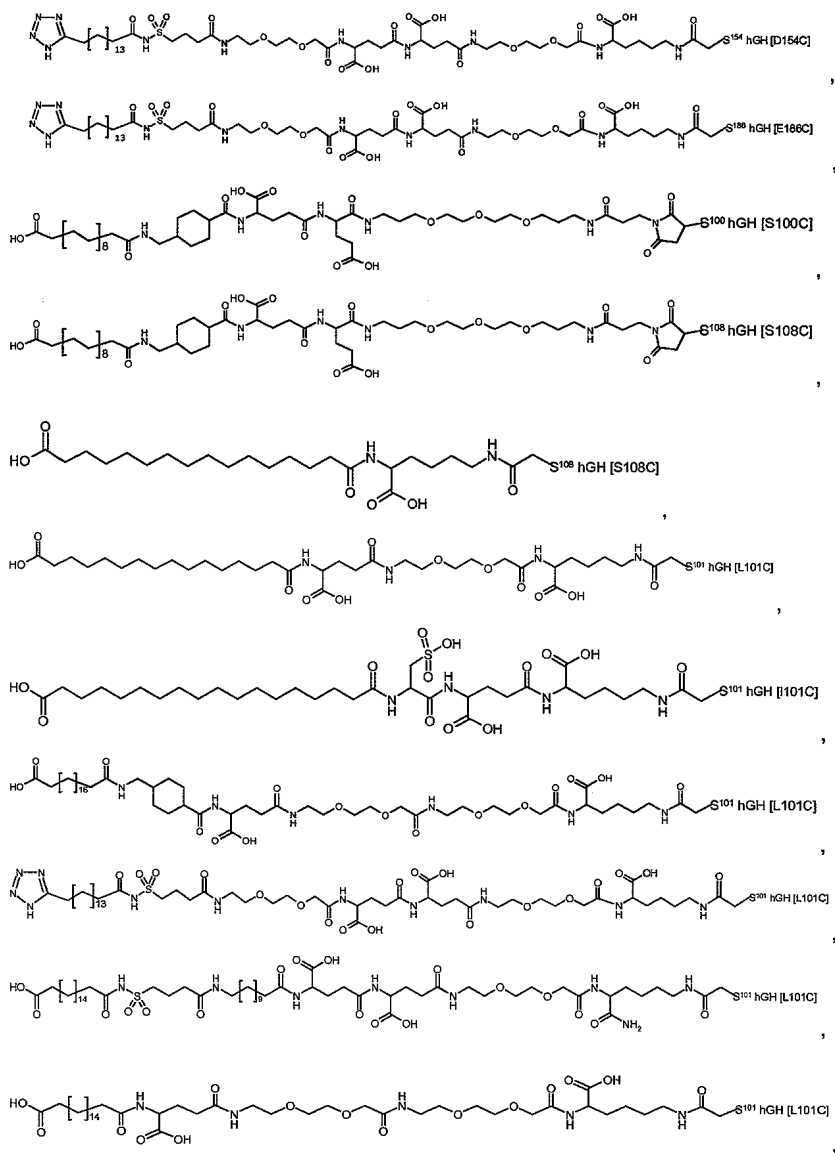
### 청구범위

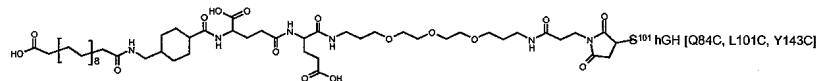
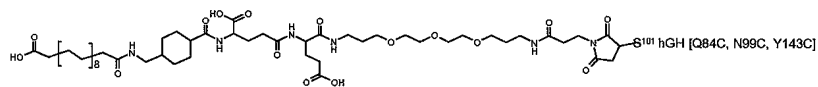
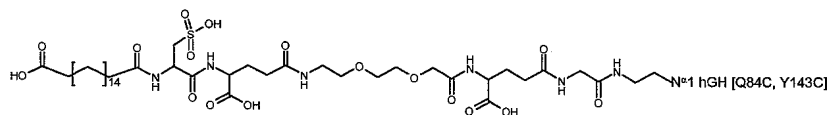
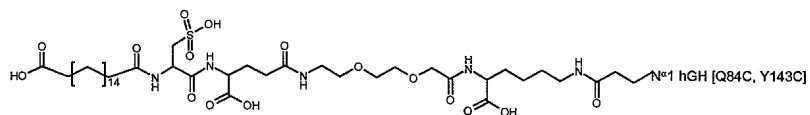
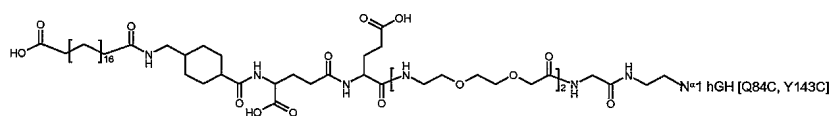
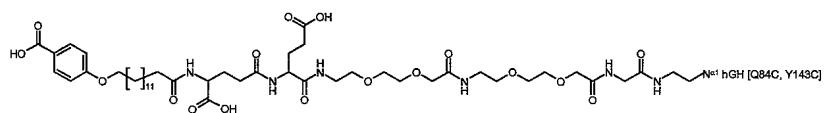
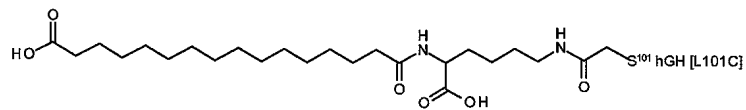
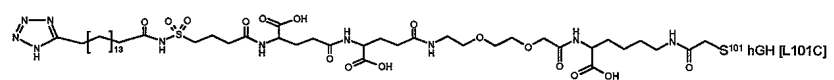
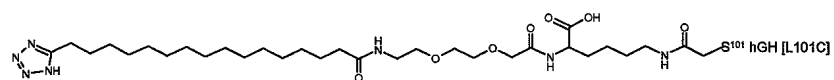
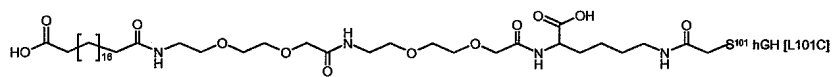
#### 청구항 1

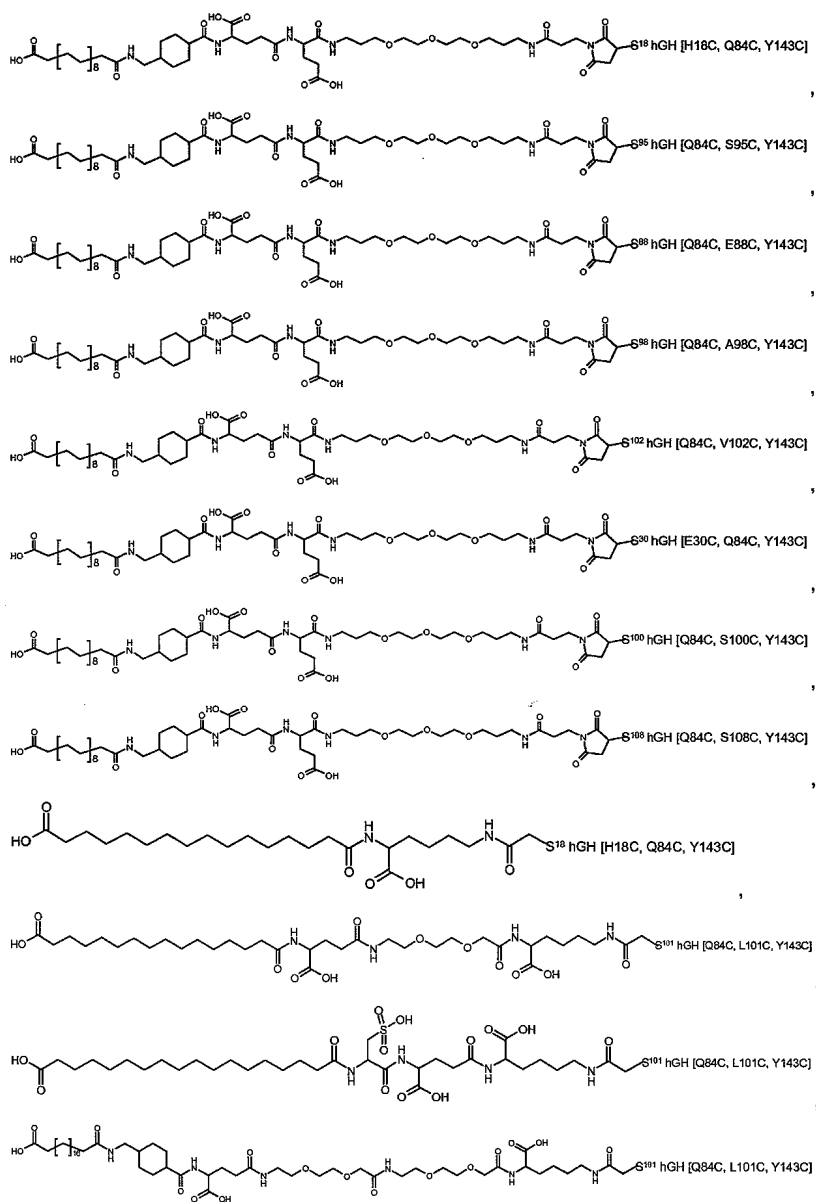
하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 성장 호르몬 접합체 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염:

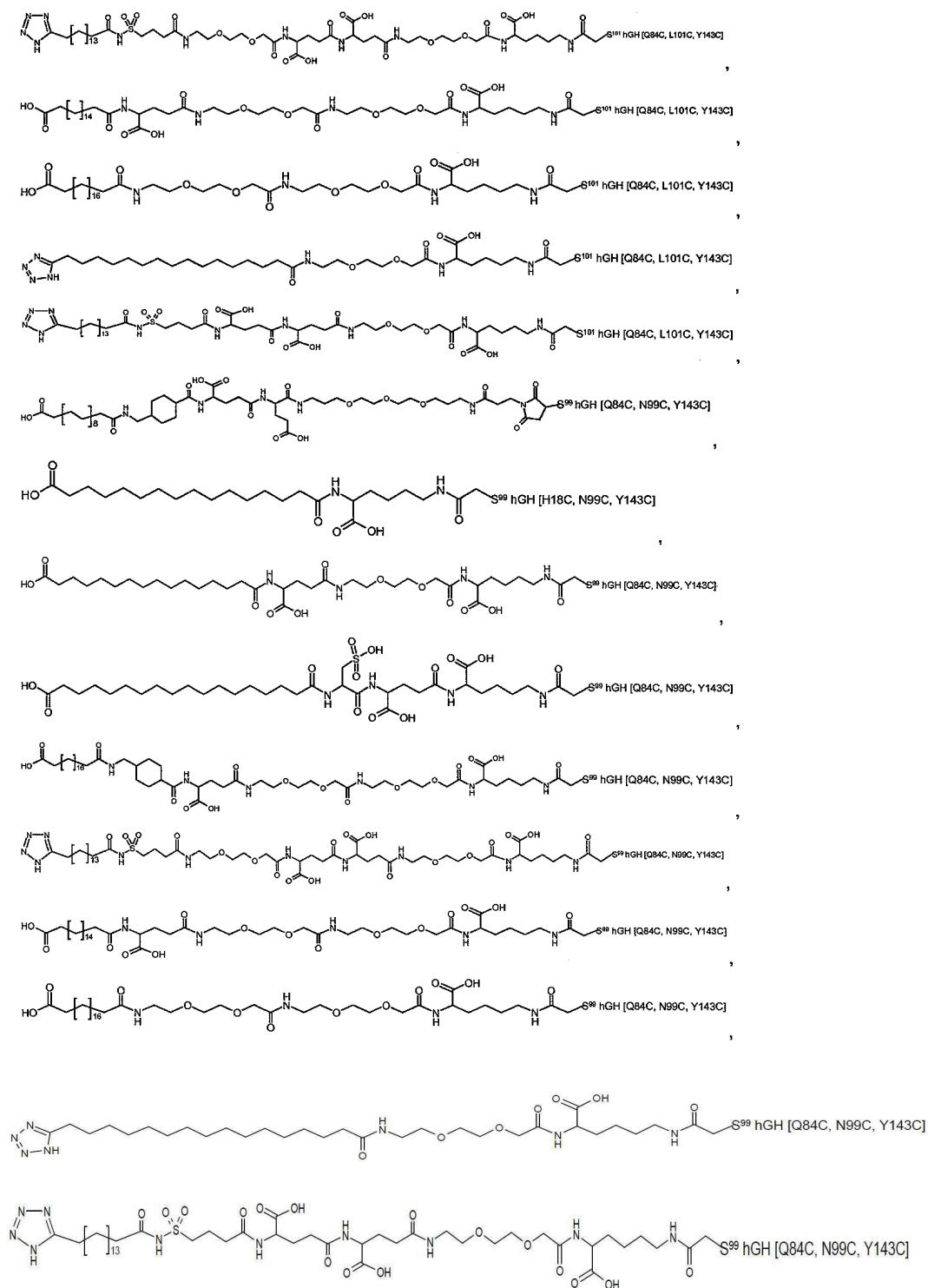








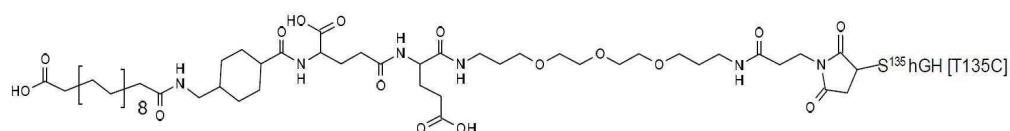
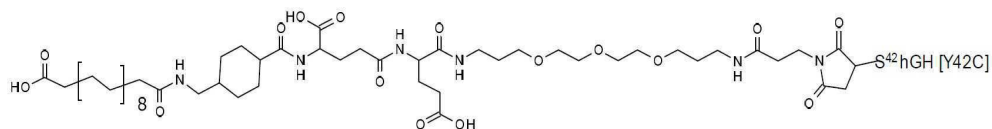
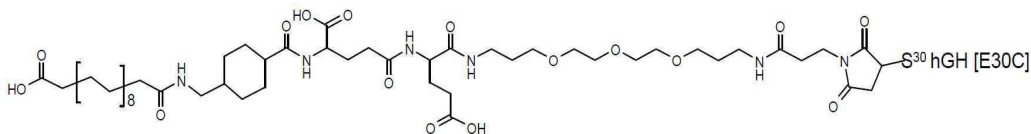
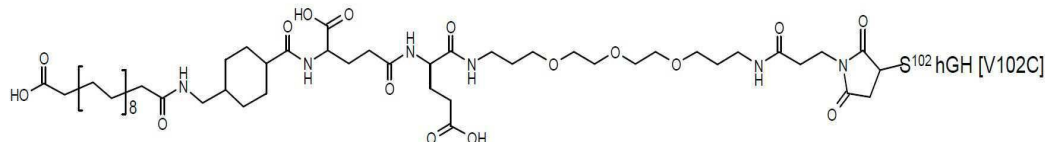
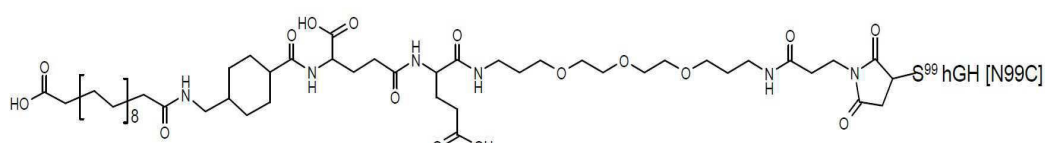
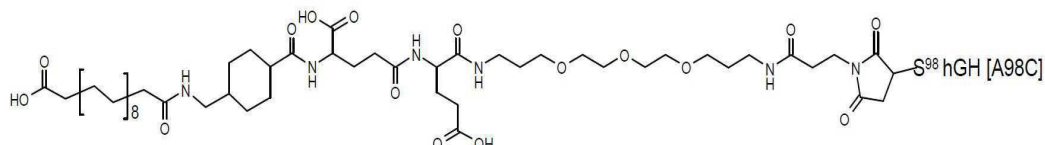
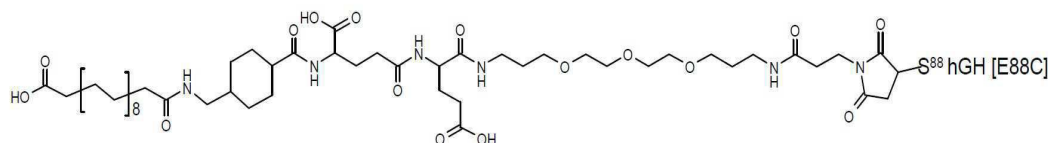
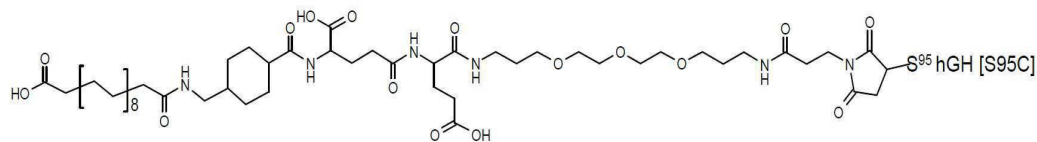
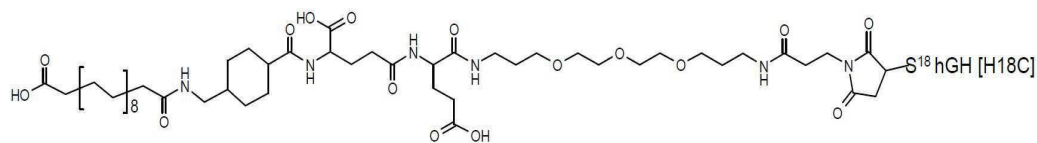
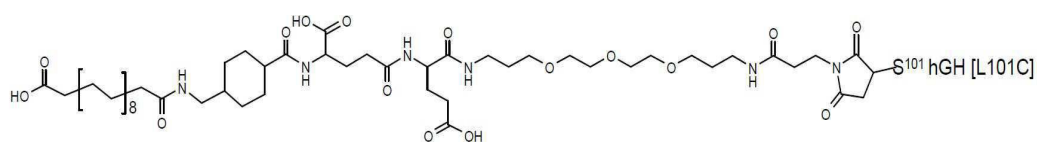


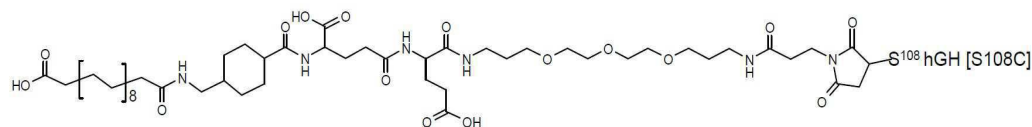
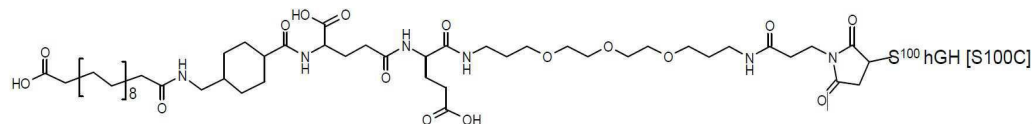
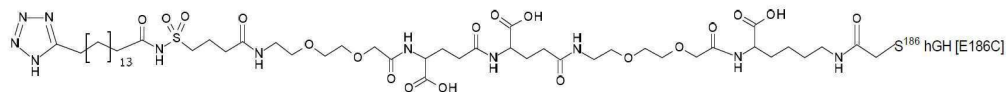
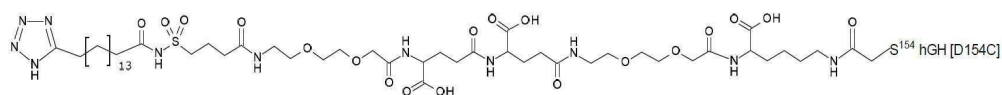
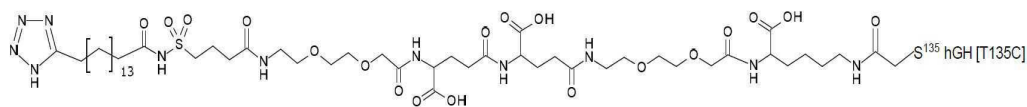
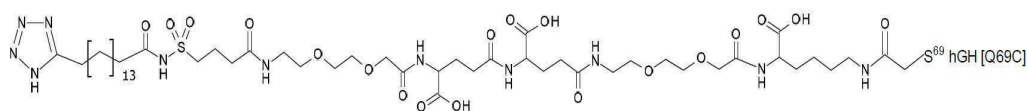
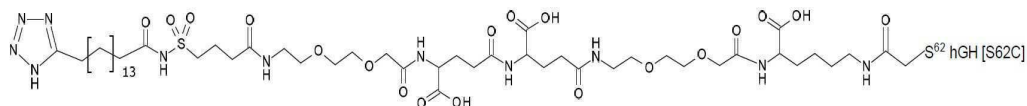
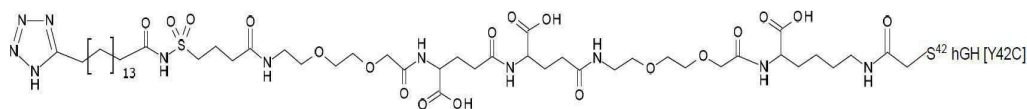
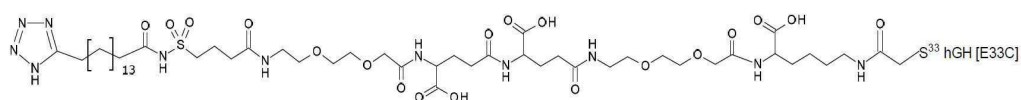
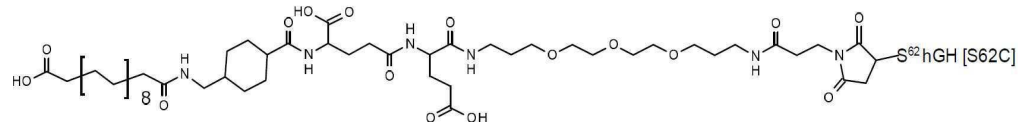
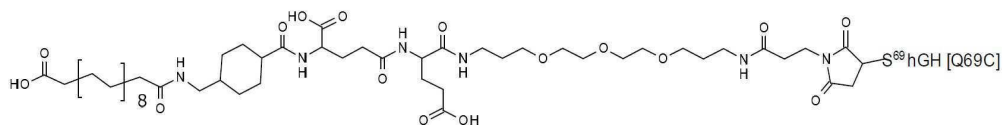
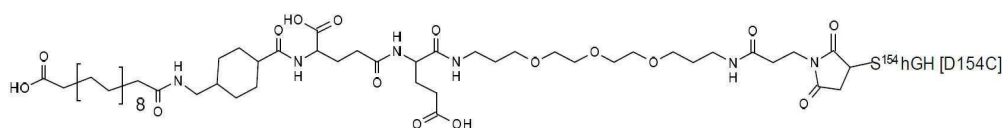


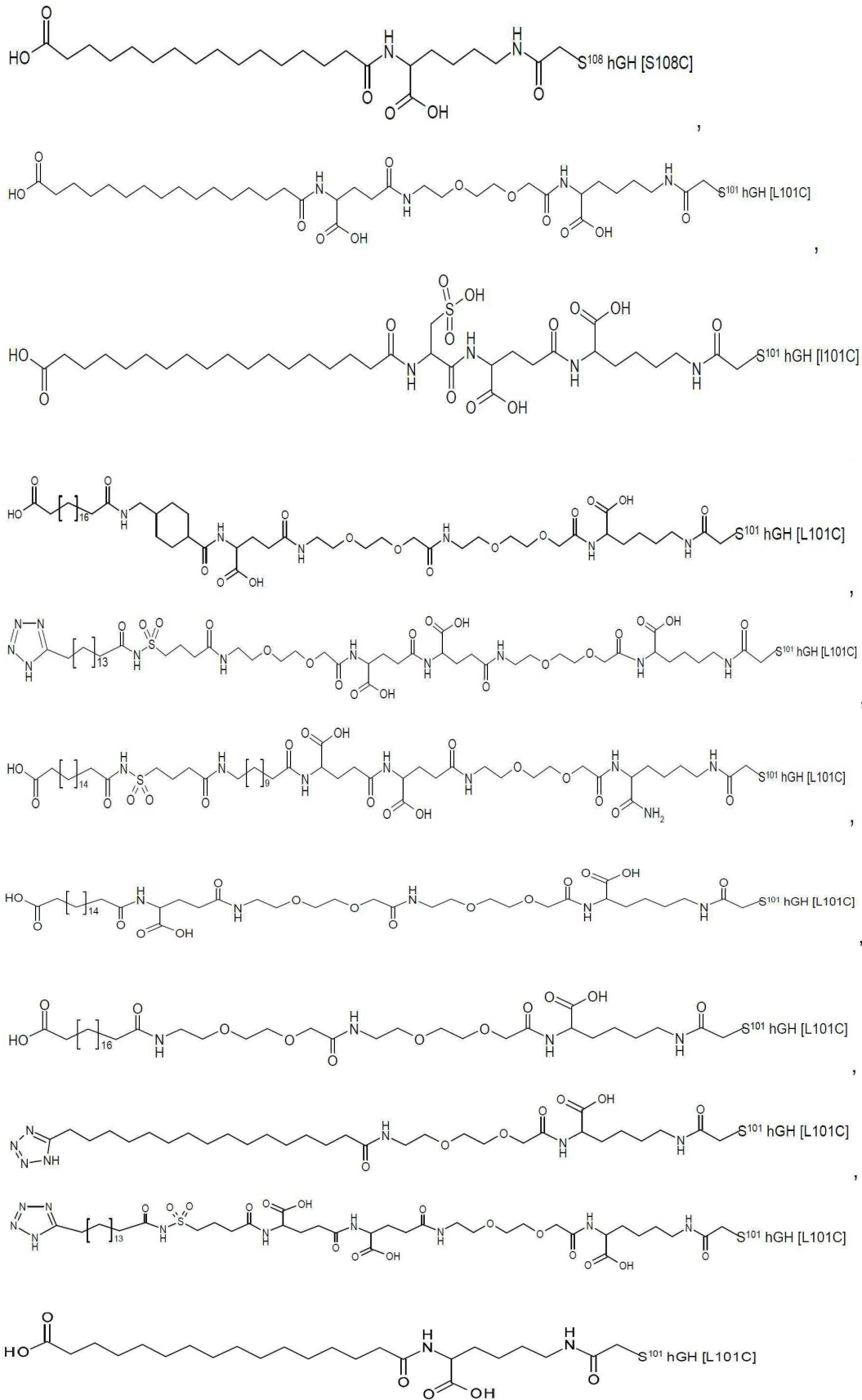
## 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 접합체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 성장 호르몬 접합체 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염:





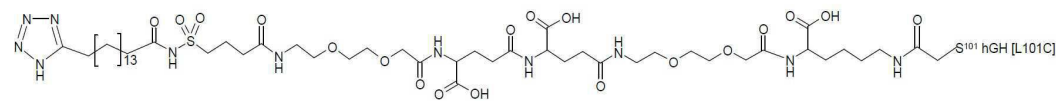
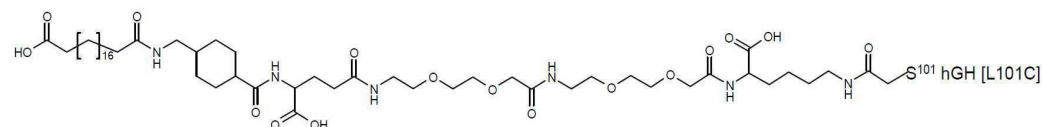
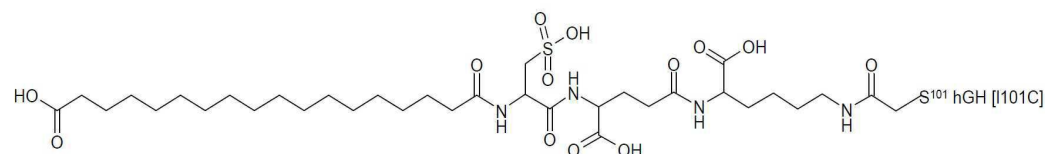
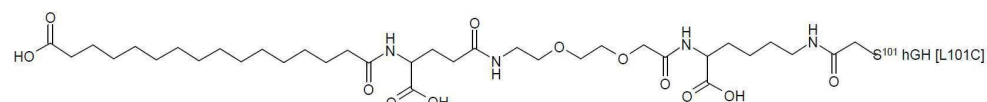
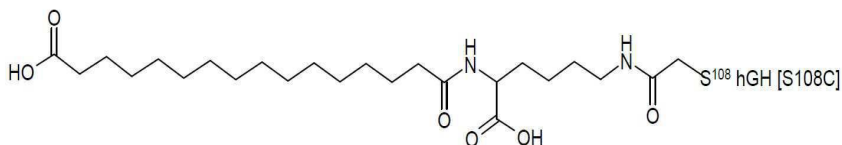
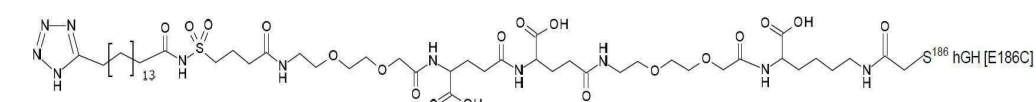
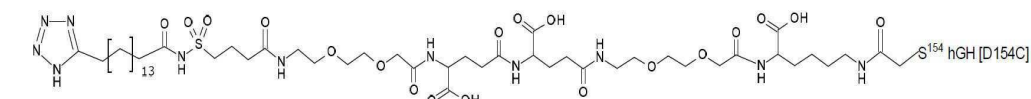
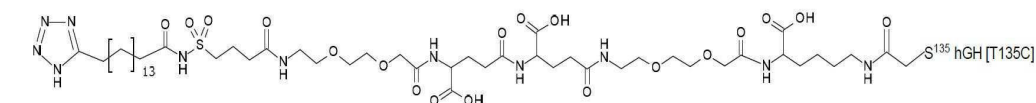
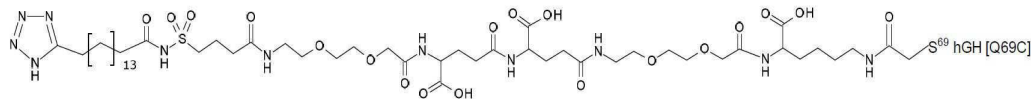
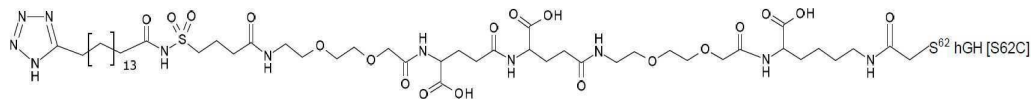
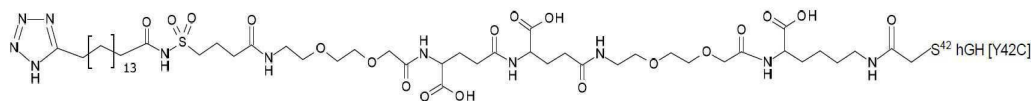
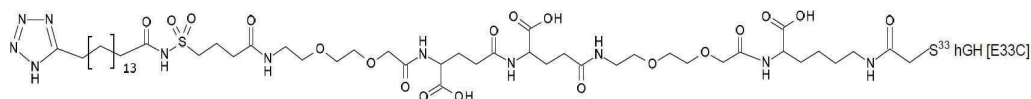


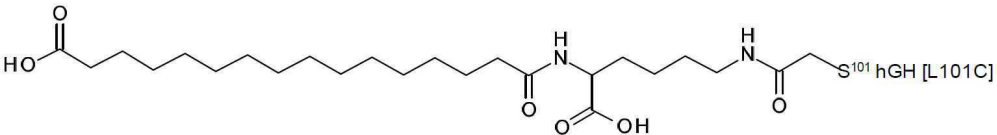
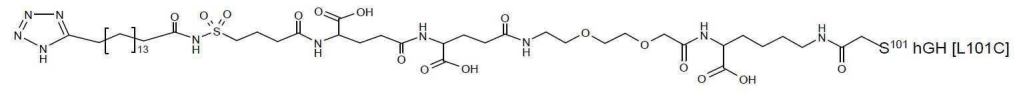
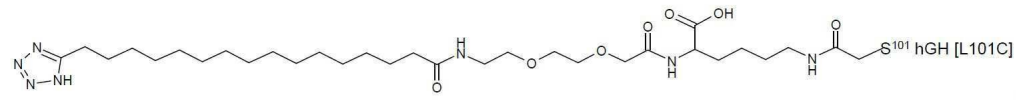
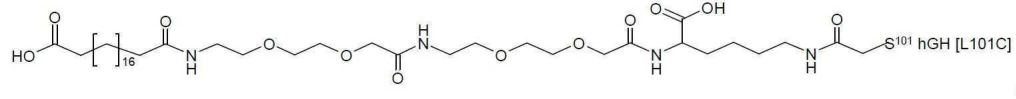
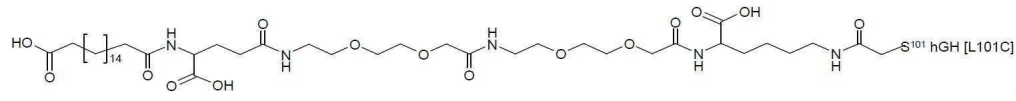
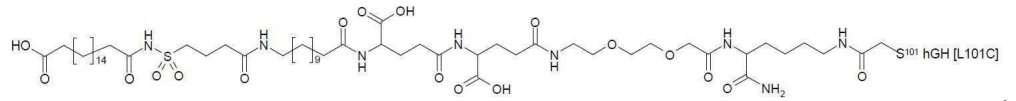


및

### 청구항 3

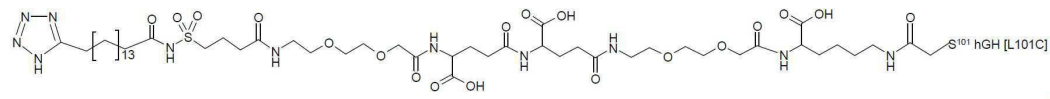
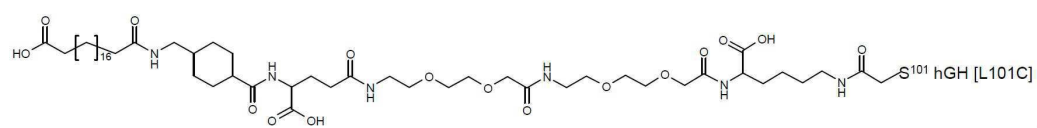
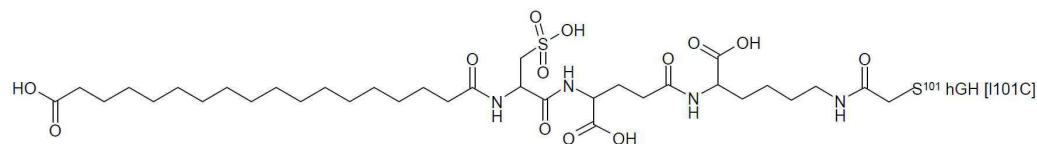
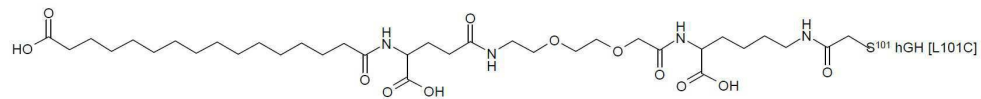
제 1 항에 있어서, 상기 접합체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 성장 호르몬 접합체 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염:

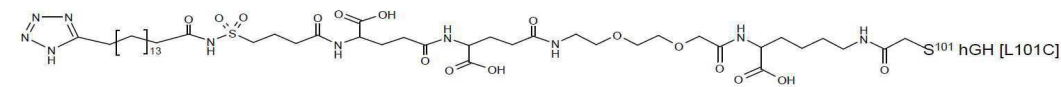
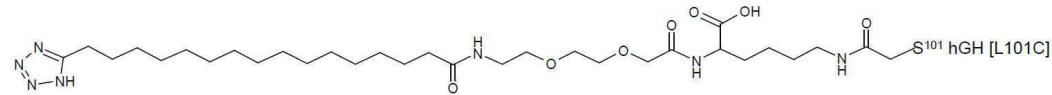
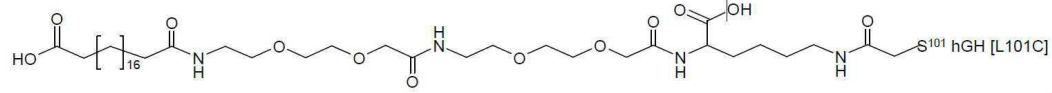
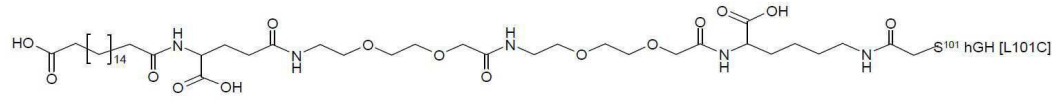
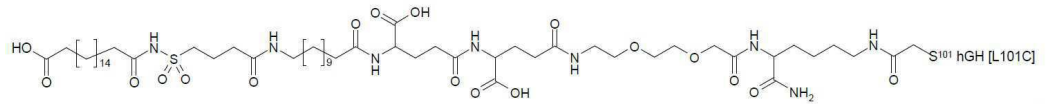




#### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 접합체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 성장 호르몬 접합체 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염:

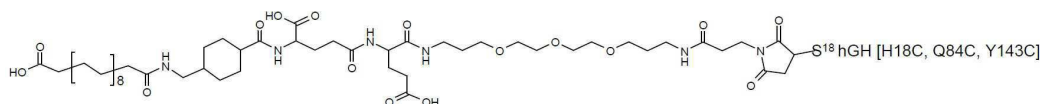
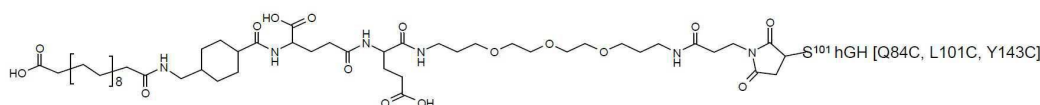
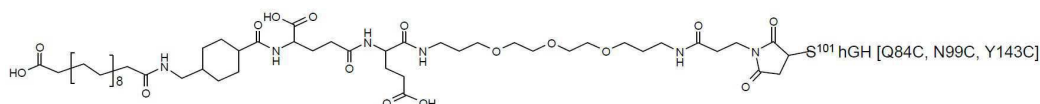
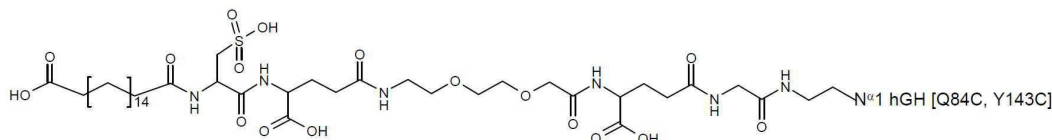
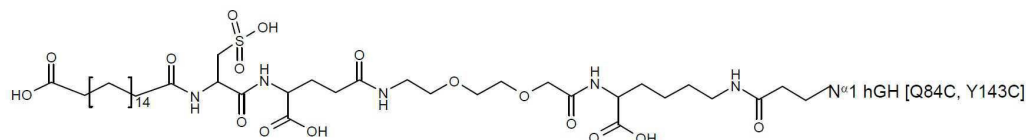
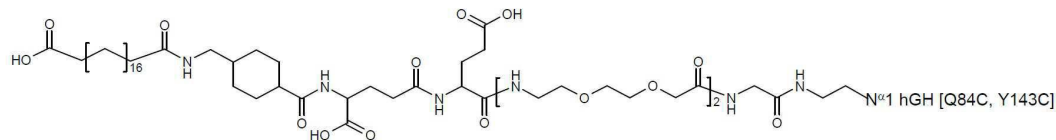
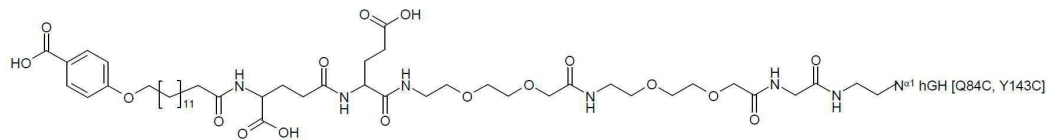


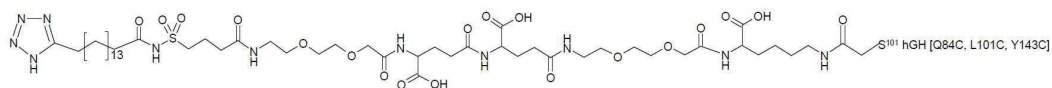
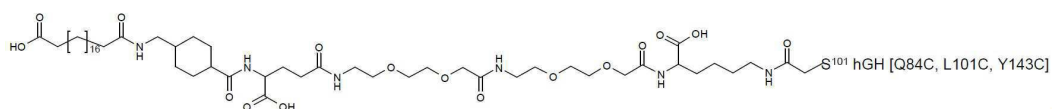
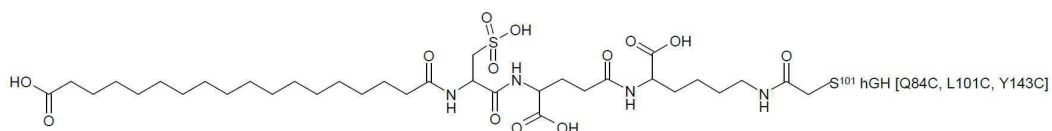
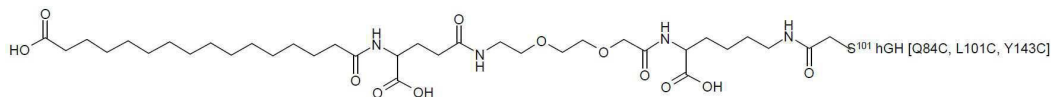
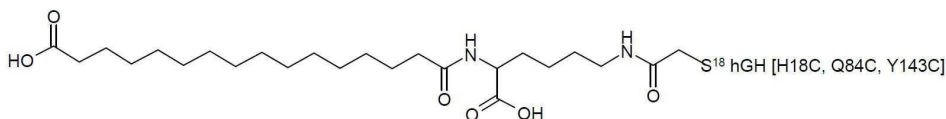
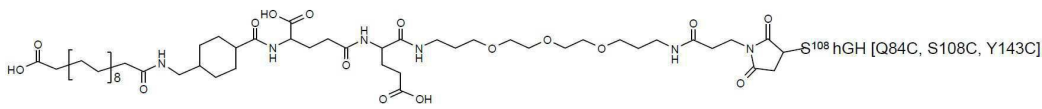
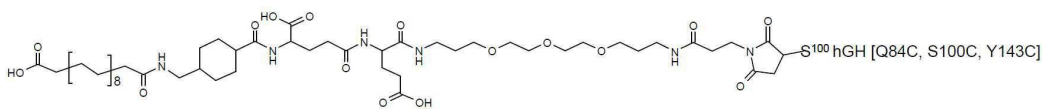
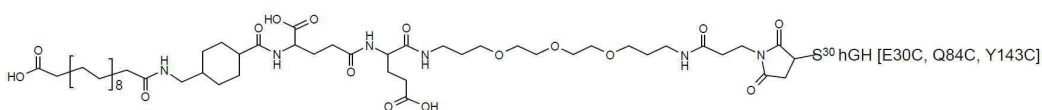
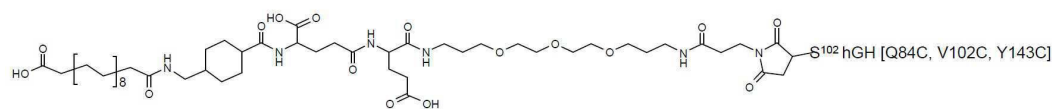
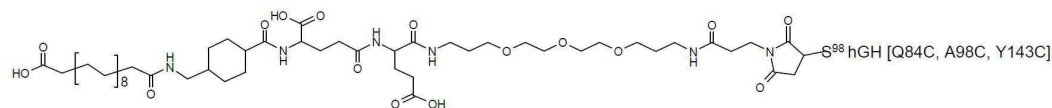
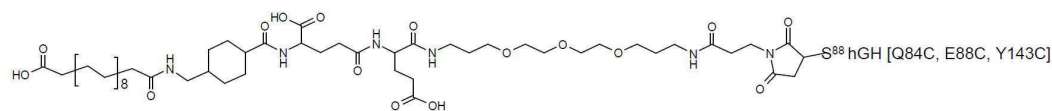
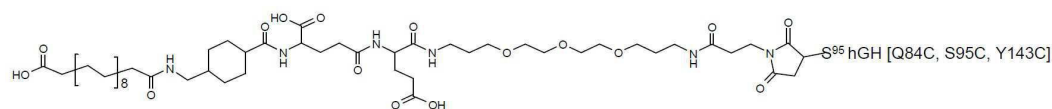


및

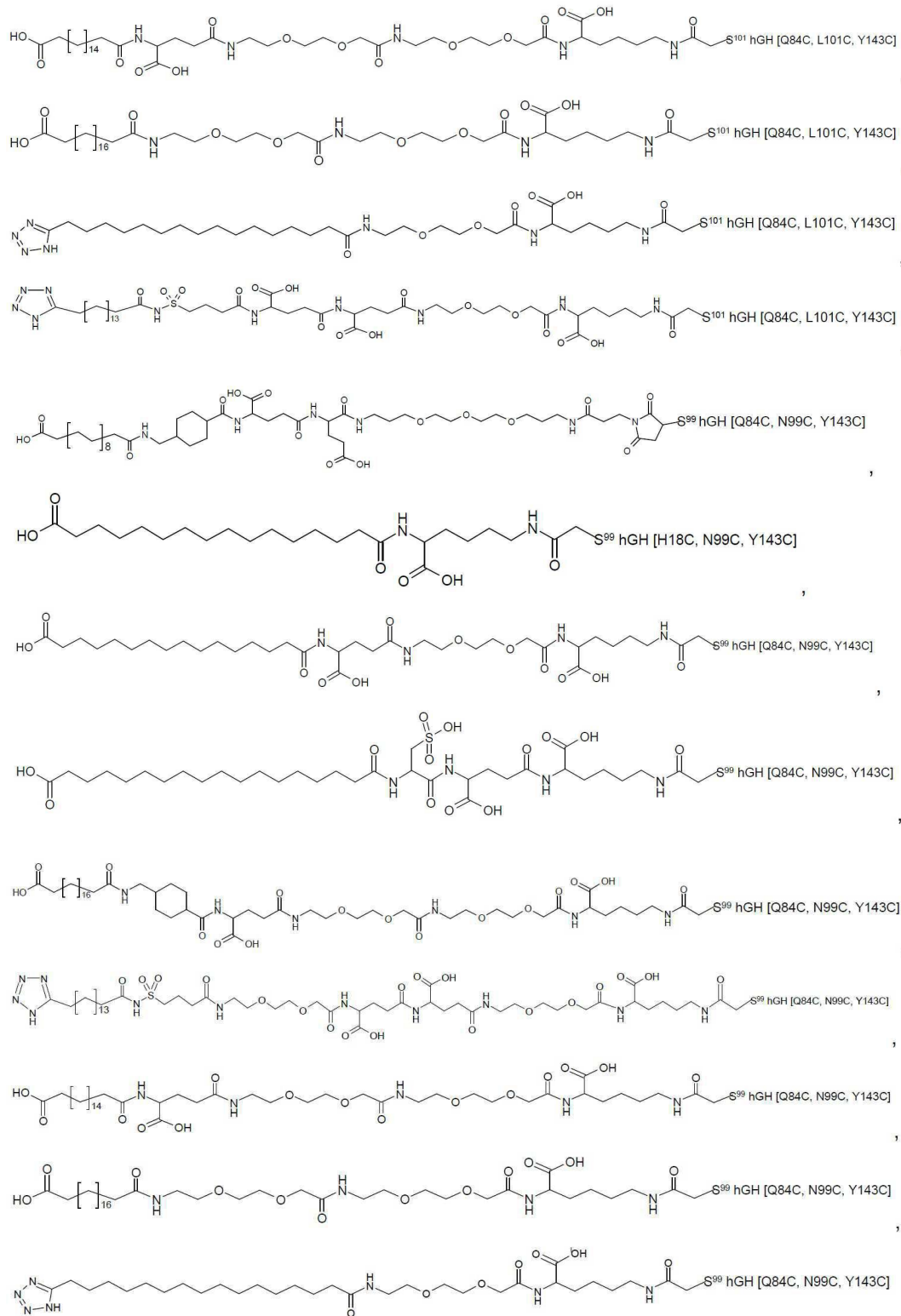
## 청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 접합체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 성장 호르몬 접합체 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염:

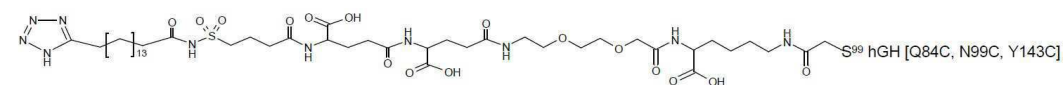








및



## 청구항 6

삭제

## 청구항 7



삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 발명은 친수성 스페이서를 통해 알부민 결합 잔기에 연결된 성장 호르몬 화합물 및 이들 화합물의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다. 이들 성장 호르몬 접합체는 지연된 작용 프로파일과 조합하여 단백질 분해성 분해에 증가된 저항성을 가지며 치료에 유용하다.

### 배경 기술

- [0002] 성장 호르몬은 포유동물 내의 뇌하수체전엽에 의해 분비되는 폴리펩티드 호르몬이다. 종에 따라서, 성장 호르몬은 분자량 약 22 kDa에 해당하는 약 190개의 아미노산 잔기로 구성된 단백질이다. 성장 호르몬은 세포 표면 수용체인 성장 호르몬 수용체(GHR)와 결합하고, 그것을 통해 신호를 보낸다. 성장 호르몬은 성장을 촉진하고, 정상적인 체 성분, 동화작용 및 지방대사를 유지하는데 핵심적인 역할을 한다. 또한, 그것은 감소된 글루코스 흡수, 증가된 지방분해, 증가된 아미노산 흡수 및 단백질 합성과 같은 중간 대사에 직접적인 효과를 갖는다. 호르몬은 또한 지방 조직, 간, 장, 신장, 골격, 연결하는 조직 및 근육을 포함하는 다른 조직에 영향을 미친다. 재조합체 사람 성장 호르몬(hGH)은 예를 들어, Genotropin™(Pharmacia Upjohn), Nutropin™ 및 Protropin™ (Genentech), Humatrope™(Eli Lilly), Serostim™(Serono), Norditropin(Novo Nordisk), Omnitrope(Sandoz), Nutropin Depot(Genentech 및 Alkermes)로서 제조되고 상업적으로 이용가능하다. 게다가, N-말단부에서 부가 메티오닌 잔기를 갖는 유사체는 예를 들어, Somatorm™(Pharmacia Upjohn/Pfizer)로서 구매된다.
- [0003] 성장 호르몬은 성장 호르몬 계열 단백질의 다른 멤버인 프로락틴(PRL) 및 태반성 락토젠(PL)과 공통된 형태를 공유한다. 성장 호르몬은 2개의 보존된 이황화 연결을 갖는 "위-위-아래-아래" 형태를 나타내는 4개의 나선 번들(bundle) 단백질(도 1)로서 분류된다. 구체적으로, 야생형 사람 성장 호르몬(hGH)은 191개의 아미노산 잔기로 구성되고, 위치 53, 165, 182 및 189에서 4개의 시스테인 잔기를 가지며, 각각 C53을 C165와 및 C182를 C189와 연결하는 2개의 분자 내 이황화 결합을 형성함으로써 단백질의 3차원 구조를 안정화시킨다(도 1). hGH의 구조는 유리 형태로(Chantale L. *et al Protein and Peptide Letters* **3**, 333-340, (1995)) 및 그것의 결합 단백질(사람 GHR(hGHR)의 추가 세포 도메인)과의 복합체로(Devos, A. M. *et al Science* **255**, 306-312, (1992)) X-선 결정학에 의해 실험에 의해 측정되었다. 이들 구조는 단백질 데이터뱅크(PDB)에 기탁되었고, 공개적으로 이용가능

하다(각각 PDB 접근 코드: 1HGU 및 1HWG). 따라서, 공개된 hGH 구조로부터 hGHR과 hGH 결합에 중요한 잔기들이 확인될 수 있다. 게다가, hGH의 동적 성질은 핵자기공명(NMR) 분광법에 의해 연구되었다(Kasimova M.R. *et al. J. Mol. Biol.* **318**, 679-695, (2002)). 이들을 결합하여, X-선 및 NMR 데이터는 덜 구조화되고 동적인 영역으로부터 잘 구조화되고 잘 한정된 hGH 영역들을 구별할 수 있다. hGH의 덜 구조화되고 동적인 영역은 단백질 분해 절단에 특히 민감할 것으로 예상되고, 이들 영역의 적당한 안정화는 개선된 단백질 분해 안정성을 가져올 것이다.

- [0004] hGH는 바람직한 화학적 또는 생물학적 성질을 갖는 hGH 유사체를 제조하는 시도에서 광범위한 돌연변이 유발의 대상이었다. 구체적으로, 몇 가지 목적을 위한 시스테인 돌연변이가 기술되었다.
- [0005] US 2003/0162949는 GH 초유전자 계열 멤버의 시스테인 변종을 개시한다. 이들 단백질의 부위 특이적, 생물학적 활성 접합체를 만드는 일반적인 방법이 제공된다. 방법은 시스테인 잔기를 단백질의 비필수 영역에 부가하거나 또는 부위-지향 돌연변이 유발을 사용하여 단백질 내 비필수 아미노산을 시스테인 잔기로 치환하는 단계, 그 다음 시스테인-반응성 중합체 또는 다른 타입의 시스테인-반응성 부분을 부가된 시스테인 잔기를 통해 단백질에 공유 결합하는 단계를 포함한다.
- [0006] WO 02/055532는 공유 부착된 적어도 하나의 비폴리펩티드 부분을 갖는 유전적으로 조작된 hGH 돌연변이체, 특히 도입된 시스테인 잔기가 폐길화(PEGylation)를 위해 사용된 hGH 돌연변이체를 기술한다.
- [0007] US 5,951,972는 생리학적으로 활성인 유도체화된 자연 및 재조합체, 포유류 및 사람 단백질 및 폴리펩티드를 기술하고, 이것은 단백질 내 적어도 하나의 자연 발생 또는 포함시킨 시스테인 잔기가 다양한 치환체로 유도체화되어있다.
- [0008] hGH의 단백질 분해성 절단이 상세하게 연구되었다. 128 내지 154개의 잔기로 구성된 긴 루프는 트롬빈, 플라스민, 콜라겐분해효소, 서브틸리신 및 키모트립신 유사 세린 프로테아제와 같은 몇 가지 프로테아제를 위한 추정 절단 부위를 갖는다. 따라서, hGH의 이 부분은 단백질 분해성 절단에 특히 민감한 것으로 나타났다(Lewis, U.J. *Ann. Rev. Physiol.* **46**, 33-42, (1984)). hGH를 분해한다고 보고된 효소는 트롬빈, 플라스민, 서브틸리신, 키모트립신 유사 세린 프로테아제 및 칼리크레인을 포함한다.
- [0009] 래트 조직에서의 hGH의 분해가 연구되었다(Garcia-Barros *et al. J. Endocrinol. Invest.* **23**, 748-754, (2000)).
- [0010] 래트의 갑상선에서, 별키한 친유성 아미노산 잔기에서 절단을 돕는, 키모트립신 유사 프로테아제는 초기에 Y143과 S144 사이의 펩티드 결합을 절단하여 2개의쇄 분자를 가져오고, 이후 Y42와 S43 사이를 절단하여, N-말단 펩티드 F1-Y42를 분리하는 것으로 발견되었다. 2개의쇄 분자에서의 분할된 루프는 키모트립신 유사 프로테아제에 의해서, 및 추가로 카르복시펩티다제의 작용에 의한 F146과 D147 사이의 절단에 의해 더 처리된다.
- [0011] 단백질 분해성 분해에 대해 안정화된 hGH 유사체를 제조하는 몇 가지 방법이 보고되었다.
- [0012] Alam *et al.*, *J. Biotech.* **65**, 183-190, (1998)은 트롬빈 및 플라스민에 저항성인 hGH 돌연변이체를 특이적 접변이에 의해 디자인하였다. 트롬빈은 hGH를 R134와 T135 사이에서 특이적으로 절단하고, 그리고 이중 돌연변이체 R134D, T135P는 트롬빈에 의한 절단에 저항성인 hGH 변종을 산출하였고, 그리고 삼중 돌연변이체 R134D, T135P, K140A는 플라스민에 저항성을 가져왔다. 게다가, 후자의 hGH 돌연변이체는 7일 이상 사람 혈장에 의한 단백질분해에 저항성이었다.
- [0013] EP 534568은 R134를 알라닌, 류신, 트레오닌, 페닐알라닌, 프롤린 또는 히스티딘으로 돌연변이함으로써 단백질 분해성 분해에 대해 안정화된 hGH 돌연변이체를 기술한다.
- [0014] WO 2004/022593/Nautilus는 증가된 단백질 분해 안정성을 갖는 GH 변종을 포함하는 변형된 시토카인을 제조하는 일반적인 높은 처리량 지향 전개 방법을 기술한다.
- [0015] WO 2006/048777/Nautilus는 개선된 단백질 분해 안정성을 갖는 변형된 hGH 유사체를 구체적으로 기술한다. 유사체는 위치 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 및 187-191에서 1 내지 5개의 돌연변이를 함유한다. 시스테인 잔기의 도입은 바람직하지 않은 이황화 연결된 다이머의 형성을 잠재적으로 가져오고, WO 2006/048777에서 시스테인에 의한 아미노산 잔기의 치환은 범위로부터 특이적으로 제외되고, WO 2006/048777(p. 65)에서 "시스테인 잔기에 의한 아미노산의 치환은 분명하게 회피되는데, 이는 이런 변화가 분자간 이황화 결합의 형성을 잠재적으로 가져오기 때문이다"라고 언급

되어있다.

- [0016] 단백질 분해성 분해에 저항성인 hGH 화합물을 개발하는 분명한 필요가 존재한다. 이러한 안정화된 화합물은 단백질 분해성 절단에 대한 증가된 안정성을 나타내는 반면, hGH의 바람직한 생물학적 성질을 보유했다. 이러한 GH 분자는 증가된 안정성, 더 느린 제거율, 및/또는 연장된 생체 내 반감기를 가질 것이다.
- [0017] 더욱이, 기들을 펩티드에 접합시킴으로써 펩티드의 성질 및 특성을 변형시키는 것이 잘 알려져 있는데 이것은 펩티드의 성질을 알맞게 변화시킨다. 이러한 접합은 일반적으로 접합기에서 또 다른 관능기와 반응할 펩티드에 서의 어떤 관능기를 필요로 한다. 전형적으로, 리신에서 N-말단 아미노기 또는  $\epsilon$ -아미노기와 같은 아미노기는 적합한 아실화제와 조합하여 사용되었다. 또 다르게는, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 또는 그것의 유도체를 단백질에 부착할 수도 있다. 검토를 위해, *Exp. Opin. Ther. Patent*, **14**, 859-894, (2004) 참고. 성장 호르몬과의 PEG 부착은 성장 호르몬의 혈장 반감기에 긍정적인 효과를 갖는 것으로 나타났다(WO 03/044056 참고).
- [0018] 펩티드의 C-말단을 변형하는 카르복시펩티다제의 사용은 일찌기 기술되었다. WO 92/05271은 C-말단 카르복시기를 아미드화하기 위해 카르복시펩티다제 및 친핵성 화합물의 사용을 개시하고, WO 98/38285는 이 목적에 적합한 구체적인 카르복시펩티다제 Y의 변종을 개시한다.
- [0019] EP 243 929는 단백질 또는 폴리펩티드의 C-말단으로 폴리펩티드, 리포터 기 또는 세포독성 물질을 포함시키기 위해 카르복시펩티다제의 사용을 개시한다.
- [0020] WO 2005/035553은 펩티드의 C-말단에서 관능기를 효소학적으로 포함시킴에 의한 펩티드의 선택적인 접합 방법을 기술한다.
- [0021] 활성화된 할로젠 유도체 및 말레이미드는 펩티드에서 설프히드릴기에 접합체를 포함시킬 때 가장 통상적인 사용된 관능기의 어떤 것을 나타낸다(G. T. Hermanson in *Bioconjugate Techniques* 2. Ed. 2008, Elsevier).
- [0022] 트랜스클루타미나제는 펩티드의 성질을 변경하기 위해 앞서 사용되었다. 식품산업에서와 구체적인 유제품 산업에서, 많은 기술이, 예를 들어 트랜스클루타미나제를 사용하여 펩티드를 교차-결합하기 위해 이용가능하다. 다른 문헌들은 생리학적 활성 펩티드의 성질을 바꾸기 위해 트랜스클루타미나제의 사용을 개시한다. EP 950665, EP 785276 및 Sato, *Adv. Drug Delivery Rev.* **54**, 487-504, (2002)는 트랜스클루타미나제의 존재 하에 적어도 하나의 Gln 및 아민-관능화 PEG 또는 유사한 리간드를 포함하는 펩티드들 사이의 직접적인 반응을 개시하고, Wada, *Biotech. Lett.* **23**, 1367-1372, (2001)은 트랜스클루타미나제에 의해  $\beta$ -락토글로불린의 지방산과의 직접적인 접합을 개시한다. WO 2005/070468로서 공개된 국제 특허 출원은 접합기가 부착될 수 있는 핸들을 포함시키기 위해 트랜스클루타미나제의 사용을 개시한다.
- [0023] 성장 호르몬은 신체 성장의 조절뿐만 아니라 단백질, 탄수화물 및 지질 대사의 조절에 수반된 주요 호르몬이다. 성장 호르몬의 주요한 효과는 성장을 촉진시키는 것이다. 사람 성장 호르몬은, FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLQSWLEPVQFLRSVFANSLV YGASDSNVYDLLKDEEGIQTLGRLEDGSPRTGQIFKQYTSKFDNTSHNDALLKNYGLLYCFRKMDKVPETFLRIVQCRSVEGSCGF(SEQ ID NO: 1)의 서열을 갖는 191개의 아미노산 잔기 단백질이다.
- [0024] 사람 성장 호르몬 및 그것의 밀접하게 관련된 변종의 투여는 여러 가지의 성장 호르몬 결핍 관련 질환을 치료하는데 사용된다. 폴리펩티드인, 성장 호르몬은 비경구적으로, 즉 바늘을 사용하여 투여된다. 더욱이, 성장 호르몬은 상대적 짧은 반감기를 특징으로 하고, 따라서 빈번한 투여가 요구되어 대응하는 환자의 고통 및 불편을 준다. 따라서, 예를 들어 연장된 반감기와 같은 개선된 약리학적 성질을 갖는 성장 호르몬 화합물의 제공에 대한 필요가 여전히 존재한다.
- [0025] 본 발명은 새로운 성장 호르몬 화합물 접합체를 개선된 약동학 및 약리학적 성질, 그뿐만 아니라 그것들의 제조 방법과 함께 제공한다.

## 발명의 내용

### 과제의 해결 수단

- [0026] 피하 투여된 약학적 화합물의 생체이용률은 흡수율과 관련될 수 있다. 피하 모세혈관의 밀착 연결을 통과하는 화합물의 능력은 그것들의 물리적 및 화학적 성질, 그뿐만 아니라 화합물의 분자 크기 또는 유체역학적 부피와 부분적으로 관련된다. 40 kDa PEG를 갖는 폐결핵 hGH(PEG-hGH)와 같은 단백질 접합체는 150 - 250 kDa의 겔보 기 분자량을 갖는다. 공유 결합 알부민을 갖는 hGH 분자는 87 kDa의 분자량을 갖는 반면, 비공유 결합 알부민을

갖는 hGH 분자는, 그때의 알부민 부분으로부터 해리되고, 따라서 22 kDa의 분자량을 가질 것이다.

- [0027] 분리된 상태에서의 시간 소모는 적어도 부분적으로 알부민 결합 부분의 친화력에 의존한다고 생각된다. 따라서 비공유 결합 알부민을 갖는 hGH 분자의 흡수율은 PEG-hGH보다 빠를 수 있다. 증가된 흡수율은, 알부민에 대해 더 낮은 친화력을 갖는 알부민 결합 부분을 사용할 때 얻어질 수 있다.
- [0028] 게다가, 알부민 결합 부분의 hGH로의 부착을 제공하는 링커 및/또는 스페이서의 물리적 및 화학적 성질은 화합물의 관능성에 영향을 미칠 것이다.
- [0029] 본 발명자들은 놀랍게도, 단일 Cys 돌연변이 및/또는 추가의 이황화 다리를 갖는 성장 호르몬 화합물(GH)이 전형적으로  $mLogP < 0$  - 또는  $cLogP < 0.5$ 를 갖는 화학 부분과 함께 GH와 알부민 결합 잔기를 분리하는 친수성 스페이서를 통해 알부민 결합 잔기에 선택적으로 연결되어, 높은 시험관 내 효능, 또는 생체 내 반감기 증가, 또는 아마도 활성의 지연성 생체 내 프로파일과 조합하여 단백질 분해성 분해에 증가된 저항과 같은 개선된 성질을 갖는 GH 접합체를 제공한다는 것을 발견하였다. 알부민 결합 잔기를 단일 Cys 돌연변이에 친수성 스페이서를 통해 연결함으로써 생물학적 활성은 보유될 수 있고, 하나 이상의 상기 언급된 개선이 얻어질 수 있다. 이러한 개선은, 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기가 hGH의 N-말단, 위치 40 또는 위치 141과 같은 추가의 이황화 다리를 갖는 성장 호르몬에 연결될 때 또한 얻어진다. 성장 호르몬 화합물은 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 다리 둘 다를 포함할 수도 있고, 이 양태에서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 단일 Cys 돌연변이와 연결된다.
- [0030] 넓은 양태에서 본 발명은 성장 호르몬 화합물(GH)을 포함하는 성장 호르몬 접합체 또는 그것의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이고, 이 성장 호르몬 화합물(GH)은
- [0031] a) 단일 Cys 돌연변이,
- [0032] b) 추가의 이황화 다리, 또는
- [0033] c) 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 다리를 갖고,
- [0034] 여기서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 상기 GH에 연결된다.
- [0035] 본 발명의 한 구체예에서 안정한 hGH 화합물은 추가의 이황화 결합(들)을 갖는다. 이황화 결합은 시스테인쌍들 사이에 형성되고, 시스테인쌍의 하나 또는 둘 다는 야생형 hGH 서열에서 점변이에 의해 도입된다.
- [0036] 본 발명의 다른 구체예에서 안정한 hGH 화합물은 추가의 시스테인을 갖는다. 시스테인은 야생형 hGH 서열에서 점변이에 의해 도입된다.
- [0037] 본 발명의 추가 구체예에서 안정한 hGH 화합물은 추가의 이황화 결합(들) 및 하나 이상의 추가의 시스테인을 갖는다. 추가 시스테인쌍과 추가의 시스테인 사이에 형성된 추가의 이황화 결합(들)은 야생형 hGH 서열에서 점변이에 의해 도입된다.
- [0038] 더욱이, 본 발명은, 사람 성장 호르몬(hGH)에서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기를 도입하는 것이 선택적으로 수행될 수 있고, 이때 큰 비율의 활성이 보유되었다는 관찰에 근거한다. 바람직하게는, 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 도입된 시스테인(들)에 대응하는 위치(들)에서 및/또는 위치 글루타민 40에서 및/또는 위치 글루타민 141 및/또는 SEQ ID NO:1의 서열을 갖는 hGH의 N-말단에서 도입된다. 트랜스글루타미나제(TGase)의 사용 및 구체적으로 *Streptovorticillium mobaraenae* 또는 *Streptomyces lydicus*로부터의 TGase는, 위치 40 또는 위치 141에서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기의 선택적인 도입을 허용하고, 남은 11개의 글루타민 잔기는, 글루타민이 트랜스글루타미나제의 기질이라는 사실에도 불구하고 변하지 않고 남아있다.
- [0039] 따라서, 본 발명의 한 구체예에서 성장 호르몬 화합물(GH)은 친수성 스페이서를 통해 한 알부민 결합 잔기에 연결된다. 전형적으로, 알부민 결합 잔기는 N-말단, 또는 hGH의 위치 18, 30, 40, 42, 62, 69, 88, 95, 98, 99, 100, 101, 102, 108, 135, 141 또는 154에 친수성 스페이서를 통해 부착된다. 추가 구체예에서 2개의 알부민 결합 잔기는 hGH의 위치 40 또는 위치 141 혹은 N-말단과 같은 상기 위치의 어떤 하나 및 단일 Cys 돌연변이에 친수성 스페이서를 통해 부착된다.
- [0040] 본 발명의 성장 호르몬 화합물 접합체는 폐경화 hGH와 비교해 더 빠른 피하 흡수를 갖고, 따라서, 지방위축증을 덜 또는 없도록 제공한다. 게다가, 알부민 결합 잔기 및 친수성 스페이서는 PEG에 대해 생분해성이다.
- [0041] 본 발명의 추가 목적은 GH의 성질을 본 발명의 방법에 따른 상기 단백질의 접합에 의해 개선하는 방법을 제공하는



다.

[0042] 추가 양태에서 본 발명은 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함하는 단일 Cys 돌연변이, 추가의 이황화 결합 또는 성장 호르몬 화합물을 포함하는 분리된 성장 호르몬 화합물(GH)에 관한 것이다. 본 발명의 추가 목적에서 이들 화합물은 용해성이 있다.

[0043] 정의

[0044] 본 상황에서, 본원에 사용한 용어 "성장 호르몬 화합물"은 사람, 소, 또는 돼지의 성장 호르몬과 같은 포유류 기원의 성장 호르몬 및 재조합체 사람, 소, 또는 돼지의 성장 호르몬과 같은 재조합체 성장 호르몬 및 변종, 그 뿐만 아니라 이러한 성장 호르몬의 돌연변이를 의미한다. 본원에 사용한 "GH" 및 "성장 호르몬 화합물"은 호환성이다. GH가 hGH 및 재조합체 hGH와 같은 포유류 기원의 성장 호르몬 변종인 경우, 상기 변종은 성장 호르몬, 예를 들어 hGH, 다른 자연 또는 비자연 아미노산을 갖는 서열에서 하나 이상의 아미노산 잔기를 치환함으로써 및/또는 하나 이상의 자연 또는 비자연 아미노산을 성장 호르몬, 예를 들어 hGH, 서열에 첨가함으로써 및/또는 성장 호르몬, 예를 들어 hGH, 서열로부터 하나 이상의 아미노산 잔기를 제거함으로써 제공된 화합물이라고 이해되고, 여기서 이들 단계의 어떤 것은 이후 선택적으로 하나 이상의 아미노산 잔기를 더 유도체화할 수 있다. 전형적으로, GH는 hGH와 적어도 80% 동일성 및 전형적으로, 본원의 어세이(I)(실시예 46)에서 측정된 hGH의 적어도 10%의 성장 호르몬 활성을 갖는다.

[0045] 본 상황에서, 본원에 사용한 용어 "알부민 결합 잔기"는 사람 혈청 알부민에 비공유 결합하는 잔기를 의미한다. 성장 호르몬 화합물(GH)에 부착된 알부민 결합 잔기는 전형적으로 약 10  $\mu$ M 미만 또는 약 1  $\mu$ M 훨씬 미만인 사람 혈청 알부민과 결합하는 친화력을 갖는다. 알부민 결합 잔기의 범위는 선형 및 분기된 친유성 부분 함유 12-40개의 탄소 원자인, 시클로펜타노펜탄트렌 골격을 갖는 화합물 및/또는 10-45개 아미노산 잔기 등을 갖는 펩티드 사이에 알려져 있다. 알부민 결합 성질을 *J. Biol. Chem.* **277**(38), 35035-35042, (2002)에 기술된 바와 같이, 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정할 수 있다.

[0046] 본원에 사용한 용어 "친수성 스페이서"는 성장 호르몬 화합물 및 적어도 5개의 비수소 원자(이들의 30-50%가 N 또는 O 중 하나임)를 포함하는 화학적 부분을 갖는 알부민 결합 잔기를 분리하는 스페이서를 의미한다.

[0047] 본 상황에서, 용어 "아미노기 전이반응" 및 관련된 용어는 반응을 나타낸다고 의도되고, 글루타민의 측쇄에서 아미드 질소는 다른 화합물로부터의 질소, 구체적으로 다른 질소 함유 친핵성으로부터의 질소와 교환된다.

[0048] 트랜스클루타미나제(E.C.2.3.2.13)는 또한 단백질-글루타민- $\gamma$ -글루카밀전달효소로서 알려져있고 하기 일반적인 반응을 촉매작용 한다.



[0049]

[0050] Q-C(O)-NH<sub>2</sub>(아민 수용체)는 글루타민 잔기 함유 펩티드 또는 단백질을 나타낼 수 있고, Q'-NH<sub>2</sub>(아민 주개)는 아민-함유 친핵성을 나타낸다. 선택적으로, Q-C(O)-NH<sub>2</sub> 및 Q'-NH<sub>2</sub>는 각각 아민 수용체 및 리신-함유 펩티드 또는 단백질을 나타낼 수 있다. 그러나, 본 발명에서, Q-C(O)-NH<sub>2</sub>는 글루타민 잔기 함유 성장 호르몬을 나타내고, Q'-NH<sub>2</sub>는 상기 나타낸 아민-함유 친핵성을 나타낸다.

[0051] 유용한 트랜스클루타미나제의 예는, 예를 들어 *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum* 및 *Streptomyces griseocarneau*(모두 US 5,156,956에 개시되며, 본원에 참고로 포함됨), 및 *Streptomyces lavendulae*(US 5,252,469에 개시되며, 본원에 참고로 포함됨) 및 *Streptomyces ladakanum*(JP 2003/199569, 본원에 참고로 포함됨)으로부터의 그것들과 같은 미생물 트랜스클루타미나제를 포함한다. 전자 속 *Streptoverticillium*의 멤버는 속 *Streptomyces*에 이제 포함된다고 언급되어야 한다(Kaempfer, *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1831-1892, (1991)). 다른 유용한 미생물 트랜스클루타미나제는 *Bacillus subtilis*(US 5,731,183에 개시되며, 본원에 참고로 포함됨) 및 다양한 점균류로부터 분리되었다. 유용한 미생물 트랜스클루타미나제의 다른 예는 WO 96/06931(예를 들어, *Bacillus lylidicus*로부터의 트랜스클루타미나제) 및 WO 96/22366에 개시된 것들로, 둘 다 본원에 참고로 포함된다. 유용한 비미생물 트랜스클루타미나제는 기니아 피그의 간 트랜스클루타미나제와 편평어 *Pagrus major*(EP-0555649에 개시되며, 본원에 참고로 포함됨), 및 굴 *Crassostrea gigas*(US 5,736,356에 개시되며, 본원에 참고로 포함됨) 같은 다양한 해양 공급원으로부터의 트랜스클루타미나

제를 포함한다.

[0052] 본 상황에서, 용어 "이용가능하지 않음"은 어떤 것이 도달할 수 없는 의미에서 부재 또는 실질적인 부재를 나타낸다고 의도된다. 관능기가 접합된 단백질에서 이용가능하지 않다고 언급될 때, 있는 경우, 상기 관능기는 단백질로부터 또는 반응에 참여로부터 방지된 일부 식에서의 부재를 나타낸다고 의도된다. 예제를 거쳐, 상기 관능기는 단백질의 구조에 깊게 매몰될 수 있는데, 이것을 반응에 참여로부터 차폐하기 위함이다. 이것은 관능기가 반응 조건에 따라 이용가능한지 아닌지를 인식한다. 예를 들어, 변성제의 존재 하에서 또는 상승시킨 온도에서, 단백질은 노출되도록 펼쳐질 수 있고, 다른 말로 이용가능한 관능기가 아닌 것으로 예상될 수 있다. "이용가능하지 않음"은 "관심의 구체적인 반응을 위해 선택된 반응 조건에서 이용가능하지 않음"을 의미한다고 이해된다.

[0053] 용어 "알칸" 또는 "알킬"은 포화, 선형, 분기 및/또는 루프 탄화수소를 나타낸다고 의도된다. 다른 수의 탄소 원자로 명시되지 않는다면, 용어는 1 내지 20개(둘 다 포함됨), 1 내지 10개(둘 다 포함됨), 예를 들어 1 내지 5개(둘 다 포함됨)와 같은 1 내지 30개(둘 다 포함됨)의 탄소 원자를 갖는 탄화수소를 나타낸다고 의도된다. 용어 알킬 및 알킬렌은 각각 대응하는 라디칼 및 이가-라디칼을 의미한다.

[0054] 용어 "C<sub>1-6</sub> 알킬"은 1 내지 6개의 탄소 원자가 포함된 곧은 채된 또는 분기된 포화 탄화수소를 의미한다. 이들의 예는 메틸, 2-프로필, 1-부틸, 2-부틸, 2-메틸-2-프로필, 2-메틸-1-부틸 및 n-헥실을 포함하나 제한되지 않는다.

[0055] 용어 "C<sub>3-10</sub> 시클로알킬"은 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸, 시클로노닐, 및 시클로데칸일을 전형적으로 의미한다.

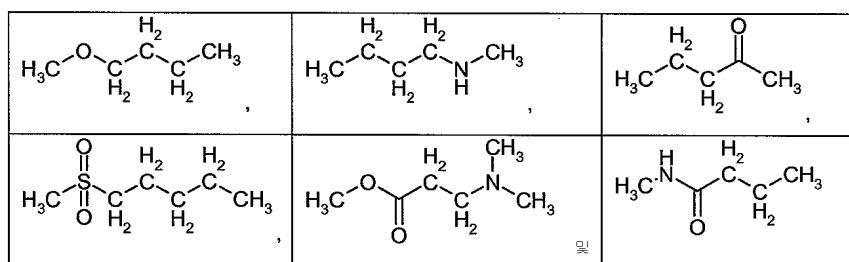
[0056] 용어 "알켄"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 선형, 분기된 및/또는 고리 탄화수소를 나타낸다고 의도된다. 다른 수의 탄소 원자로 명시되지 않으면, 용어는 2 내지 20개(둘 다 포함됨), 2 내지 10개(둘 다 포함됨), 예를 들어 2 내지 5개(둘 다 포함됨)와 같은 2 내지 30개(둘 다 포함됨)의 탄소 원자를 갖는 탄화수소를 나타낸다고 의도된다. 용어 알켄일 및 알켄일렌은 각각 대응하는 라디칼 및 이가-라디칼을 의미한다.

[0057] 용어 "알킨"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 선형, 분기된 및/또는 고리 탄화수소를 나타낸다고 의도되고, 그것은 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 선택적으로 포함할 수 있다. 다른 수의 탄소 원자로 명시되지 않으면, 용어는 2 내지 20개(둘 다 포함됨), 2 내지 10개(둘 다 포함됨), 예를 들어 2 내지 5개(둘 다 포함됨)와 같은 2 내지 30개(둘 다 포함됨)의 탄소 원자를 갖는 탄화수소를 나타낸다고 의도된다. 용어 알킨일 및 알킨일렌은 각각 대응하는 라디칼 및 이가-라디칼을 의미한다.

[0058] 용어 "동종고리 방향족 화합물"은 벤젠 및 나프탈렌과 같은 방향족 탄화수소를 나타낸다고 의도된다.

[0059] 용어 "헤테로고리 화합물"은 1, 2, 3 또는 4개는 N, O 및/또는 S로부터 선택된 헤테로원자인 5, 6 또는 7개의 고리 원자를 포함하는 고리 화합물을 나타낸다고 의도된다. 예는 헤테로고리 방향족 화합물, 예를 들어 티오펜, 푸란, 피란, 피롤, 이미다졸, 피라졸, 이소티아졸, 이소옥사졸, 피리딘, 피라진, 피리미딘, 피리다진, 그뿐만 아니라 그것들의 부분적으로 또는 전체적으로 수소화된 등가물, 예를 들어 피페리딘, 피라졸리딘, 피롤리딘, 피롤린, 이미다졸리딘, 이미다졸린, 피페라진 및 모르폴린을 포함한다.

[0060] 용어 "헤테로 알칸", "헤테로 알켄", 및 "헤테로 알킨"은 상기 한정된 하나 이상의 헤테로원자 또는 기가 상기 부분의 구조로 삽입된 알칸, 알켄 및 알킨을 나타낸다고 의도된다. 헤테로기 및 원자의 예는 -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -C(O)- -C(S)- 및 -N(R\*)-을 포함하고, 여기서 R\*는 수소 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬 을 나타낸다. 헤테로알칸의 예는 하기를 포함한다.



[0061]

[0062] 용어 "라디칼" 또는 "이가-라디칼"은 각각 하나 또는 2개의 수소 원자가 제거된 화합물을 나타낸다고 의도된다.

구체적으로 언급된 경우, 라디칼은 또한, 예를 들어 화합물로부터의 히드록실인 더 큰 군 원자들의 형식 제거에 의해 형성된 부분을 나타낼 수 있다.

- [0063] 용어 "할로젠"은, 예를 들어 F, Cl, Br 및 I인 주기율표의 7번째 주된 군으로 멤버를 나타낸다고 의도된다.
- [0064] 본 상황에서, 용어 "아릴"은 탄소고리 방향족 고리 라디칼 또는 접합 방향족 고리 시스템 라디칼을 나타낸다고 의도되며, 여기서 적어도 하나의 고리는 방향족이다. 전형적인 아릴기는 페닐, 바이페닐일, 나프틸, 등을 포함한다.
- [0065] 본원에 사용한 용어 "헤테로아릴" 또는 "헤테릴"은, 홀로 또는 조합하여, 예를 들어 5 내지 7개의 멤버 원자를 갖는 방향족 고리 라디칼 또는, 예를 들어 7 내지 18개의 멤버원자를 갖는 접합 방향족 고리 시스템 라디칼을 의미하고, 여기서 적어도 하나의 고리는 질소, 산소, 또는 황 헤테로 원자로부터 선택된 고리 원자로서 하나 이상의 헤테로 원자를 함유하는 방향족이며, 여기서 N-산화물 및 일산화황 및 이산화황은 헤테로방향족 치환을 허용한다. 예는 푸란일, 티엔일, 티오펜일, 피롤일, 이미다졸일, 피라졸일, 트리아졸일, 테트라졸일, 티아졸일, 옥사졸일, 이소옥사졸일, 옥사디아졸일, 티아디아졸일, 이소티아졸일, 피리딘일, 피리다진일, 피라진일, 피리미딘일, 퀴놀린일, 이소퀴놀린일, 벤조푸란일, 벤조티오펜일, 인돌일, 및 인다졸일, 등을 포함한다.
- [0066] 명사로서 용어 "접합체"는 변형된 단백질, 즉 상기 단백질의 성질을 변형하도록 그것과 결합된 부분을 갖는 단백질을 나타낸다고 의도된다. 동사로서, 용어는 상기 단백질의 성질을 변형하도록 부분의 단백질로의 결합 공정을 나타낸다고 의도된다.
- [0067] 용어 "단일 Cys" 또는 "유리 시스템"은 이중 결합에 연결되지 않은 시스템 잔기를 의미한다. 따라서 단백질은, 상기 단일 Cys가 내부 이황화 다리(들)를(을) 가져오는 동안 하나 이상의 단일 Cys 잔기 이외에 하나 이상의 추가 이황화 다리(들)를(을) 포함할 수 있다.
- [0068] 본원에 사용한 용어 "프로드러그(prodrug)"는 생체가수분해 가능한 아미드 및 생체가수분해 가능한 에스테르를 나타내고, 또한 a) 이러한 프로드러그에서의 생체가수분해 가능한 관능성을 본 발명에 따른 화합물에서 망라하는 화합물, 및 b) 본 발명에 따라 주어진 관능기에서 생물학적으로 산화 또는 환원되어 약물을 얻을 수 있는 화합물을 망라한다. 이들 관능기의 예는 1,4-디히드로피리딘, N-알킬카보닐-1,4-디히드로피리딘, 1,4-시클로헥사디엔, *tert*-부틸, 등을 포함한다.
- [0069] 본원에 사용한 용어 "생체가수분해 가능한 에스테르"는 약물의 에스테르(이 경우, 본 발명에 따른 화합물)로 a) 모 물질의 생물학적 활성을 방해하진 않지만, 그 물질에 활성 기간, 활성 시작, 등과 같은 생체 내의 유리한 성질을 부여하거나, 또는 b) 생물학적으로 불활성이지만 생물학적 활성 원리의 대상에 의해 생체 내에서 쉽게 전환된다. 이점은, 예를 들어 증가된 용해도이거나 또는 생체가수분해 가능한 에스테르가 내장으로부터 구강 흡수되고 혈장에서 본 발명에 따른 화합물로 변형된다는 것이다. 이들의 많은 예는 본 분야에 알려져 있고, 예를 거쳐 더 낮은 알킬 에스테르(예를 들어, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), 더 낮은 아실옥시알킬 에스테르, 더 낮은 알콕시아실옥시알킬 에스테르, 알콕시아실옥시 에스테르, 알킬 아실아미노 알킬 에스테르, 및 콜린 에스테르를 포함한다.
- [0070] 본원에 사용한 용어 "생체가수분해 가능한 아미드"는 약물의 아미드(이 경우, 본 발명에 따른 화합물)로, a) 모 물질의 생물학적 활성을 방해하진 않지만, 그 물질에 활성 기간, 활성 시작, 등과 같은 생체 내의 유리한 성질을 부여하거나, 또는 b) 생물학적으로 불활성이지만 생물학적 활성 원리의 대상에 의해 생체 내에서 쉽게 전환된다. 이점은, 예를 들어 증가된 용해도이거나 또는 생체가수분해 가능한 아미드가 내장으로부터 구강 흡수되고 혈장에서 본 발명에 따른 화합물로 변형된다는 것이다. 이들의 많은 예는 본 분야에 알려져 있고, 예를 거쳐, 더 낮은 알킬 아미드, α-아미노산 아미드, 알콕시아실 아미드 및 알킬아미노알킬카보닐 아미드를 포함한다.
- [0071] 본 상황에서, 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 환자에게 해롭지 않은 염을 나타낸다고 의도된다. 이들 염은 약학적으로 허용가능한 산 첨가 염, 약학적으로 허용가능한 금속 염, 암모늄 및 알킬화된 암모늄 염을 포함한다. 산 첨가 염은 무기산, 그뿐만 아니라 유기산 염을 포함한다. 적합한 무기산의 대표예는 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 인산, 황산, 질산 등을 포함한다. 적합한 유기산의 대표예는 포름산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 프로피온산, 벤조산, 신남산, 시트르산, 푸마르산, 글리콜산, 젖산, 말레산, 말산, 말론산, 만델산, 옥살산, 피크르산, 피루브산, 살리실산, 숙신산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 타르타르산, 아스코르브산, 파모산, 비스메틸렌 살리실산, 에탄디술폰, 글루콘산, 시트라콘산, 아스파르트산, 스테아르산, 팔미트산, EDTA, 글리콜산, p-아미노벤조산, 글루탐산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등을 포함한다. 약학적으로 허용가능한 무기산 또는 유기산 첨가 염의 추가 예는 *J. Pharm. Sci.* 66, 2, (1977)의 표에 실린 약학적으로 허용가능한 염을 본원에 참고로 포함된다. 금속 염의 예는 리튬, 나트륨, 칼륨, 마그네슘 염 등을 포함한다.



다. 암모늄 및 알킬화된 암모늄 염의 예는 암모늄, 메틸암모늄, 디메틸암모늄, 트리메틸암모늄, 에틸암모늄, 히드록시에틸암모늄, 디에틸암모늄, 부틸암모늄, 테트라메틸암모늄 염 등을 포함한다.

[0072] 본원에 사용한 화합물의 "치료적으로 효과적인 양"은 주어진 질환 및 그것의 합병증의 임상 징후를 치료, 완화, 또는 부분적으로 저지하기에 충분한 양을 의미한다. 이것을 완수하는 충분한 양을 "치료적으로 효과적인 양"으로서 한정한다. 각 목적을 위한 효과적인 양은 질환 또는 부상의 심각도, 그뿐만 아니라 대상 무게 및 일반적인 상태에 의존할 것이다. 적절한 투여량의 측정은, 값의 매트릭스를 구축하고 매트릭스에서의 다른 지점을 시험함으로써, 임상 실험을 사용하여 달성될 수 있고, 이것은 훈련된 의사 또는 수의사의 모든 종래 기술에 있다고 이해될 것이다.

[0073] 본원에 사용한 용어 "치료" 및 "치료하기"는 질환 또는 장애와 같은 상태를 예방하는 목적을 위해 환자를 관리하고 보살피는 것을 의미한다. 용어는 활성 화합물의 투여와 같은 환자가 겪는 주어진 상태 치료의 전체 스펙트럼을 포함하고, 증상 또는 합병증을 완화하고, 질환, 장애 또는 상태의 진행을 지연시키고, 증상 및 합병증을 완화 또는 경감하고, 및/또는 질환, 장애 또는 상태를 치료 또는 제거하고, 그뿐만 아니라 상태를 예방한다고 의도되며, 여기서 예방은 질환, 상태, 또는 장애를 방지하는 목적을 위해 환자를 관리하고 보살피는 것으로서 이해되고, 활성 화합물의 투여를 포함하여 증상 또는 합병증의 시작을 예방한다. 치료받는 환자는 바람직하게는 포유동물, 구체적으로는 인류이지만, 개, 고양이, 소, 양 및 돼지와 같은 동물도 포함할 수 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 전반적인 양태에서 본 발명은 성장 호르몬 화합물(GH)을 포함한 안정한 성장 호르몬 접합체 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이며, 성장 호르몬 화합물(GH)은

[0075] a) 단일 Cys 돌연변이,

[0076] b) 추가의 이황화 다리, 또는

[0077] c) 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 다리를 갖고,

[0078] 여기서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 상기 GH에 연결된다.

[0079] 단일 Cys 돌연변이가 존재할 때, 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 Cys의 황 잔기에 연결된다. 추가의 이황화 다리가 존재할 때(그러나 단일 Cys 돌연변이는 아님), 본원에 기술한 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 위치 40, 위치 141 또는 hGH의 N-말단과 같은 성장 호르몬 화합물에서의 위치와 연관된다. 2개 이상의 알부민 결합 잔기가 성장 호르몬 화합물에 친수성 스페이서를 통해 연결될 때, 이들 알부민 결합 잔기는 단일 Cys 돌연변이에 연결되고, 이러한 돌연변이가 존재하는 경우 또는 추가의 이황화 다리만 존재하는 경우, 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 본원에 기술한 성장 호르몬 화합물에서의 위치와 연관된다.

[0080] 한 구체예에서 성장 호르몬 화합물은 한개의 단일 Cys 돌연변이를 갖는다.

[0081] 다른 구체예에서 성장 호르몬 화합물은 2개의 단일 Cys 돌연변이를 갖는다.

[0082] 추가 구체예에서 성장 호르몬 화합물은 한개의 추가 이황화 다리를 갖는다.

[0083] 추가 구체예에서 성장 호르몬 화합물은 한개의 단일 Cys 돌연변이 및 한개의 추가 이황화 다리를 갖는다.

[0084] 추가 구체예에서 GH는 사람 성장 호르몬(hGH)(SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 성장 호르몬 화합물을 나타낸다. 추가 구체예에서, GH는 hGH와 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 적어도 95%의 동일성을, SEQ ID NO:1과 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는다. 추가 구체예에서, hGH와의 상기 동일성은, 본원의 어세이I에 측정된 hGH의 성장 호르몬 활성의 적어도 0%, 예를 들어 적어도 20%, 적어도 40%, 적어도 60%, 적어도 80%와 연관된다. 서열 동일성 구체예의 어떤 하나는 hGH와 적어도 80% 동일성을 갖는 GH와 같은 활성 구체예의 어떤 하나와 조합되고, hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 60%와 연관되며(GH는 hGH와 적어도 90% 동일성을 가짐), hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 40%와 연관되고(GH는 hGH와 적어도 95% 동일성을 가짐), 그리고 hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 80%와 연관되는 등이 가능하다. 본원에 기술한 HG는 MethHG로서 발현될 수 있는데, 이것은 서열이 추가 N-말단 메티오닌을 포함한다고 나타낸다.

[0085] 한 구체예에서 GH는 성장 호르몬 변종이며, 단일 Cys 돌연변이가 도입된다. 추가 구체예에서 GH는 단일 Cys 돌연변이 이외의 1 내지 5개의 돌연변이를 함유하는 성장 호르몬 화합물을 나타낸다.

- [0086] 추가 구체예에서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 단일 Cys 돌연변이에 연결된다. 한 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 GH의 N-말단, H1, H2, L2 또는 H3에서의 위치이다. 추가 구체예에서, 단일 Cys 돌연변이는, N-말단에서 T3C, P5C, S7C의 어떤 하나와 같고, 혹은 H1(AA 9-35에 대응함)에서 돌연변이는 D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C의 어떤 하나와 같고, 혹은 L1(AA36-71에 대응함)에서 돌연변이는 K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C의 어떤 하나와 같거나 혹은 바람직하게 Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C의 어떤 하나와 같고, 혹은 H2, L2 또는 H3(AA 72-98, AA 99-106 및 AA 107-127에 대응함)에서 돌연변이는 hGH(SEQ ID NO:1)의 E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다. L3 및 H4(128-154 및 AA155-184)에서 돌연변이는 E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C의 어떤 하나와 같거나 혹은 C-말단에서 돌연변이는 E186C, G187C, G190C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다.
- [0087] 단일 Cys 돌연변이가 hGH 변종에 존재하는 경우, 돌연변이는 대응하는 아미노산 잔기에 위치된다.
- [0088] 특정 구체예 GH에서 단일 Cys 돌연변이는 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 및 G190으로 구성되는 군, 예를 들어 T3, P5, S7, D11, H18, Q29, E30, E33, A34, Y35, E88, Q91, S95, A98, N99, S100, L101, V102, Y103, D107, S108, D112, Q122 및 G126으로 구성되는 군으로부터 선택된 hGH(SEQ ID NO:1)의 위치와 동등한 모 GH와 동등한 위치에서 도입되었고, GH 접합체는 알부민 결합 부분을 상기 단일 시스테인 잔기의 측쇄에서 더 포함하였다.
- [0089] 추가 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 hGH에서 AA 93-106 또는 hGH 변종에서 대응하는 잔기 내에 위치된다. 추가로 명시된 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 AA 99-106 또는 AA 99-103 또는 대응하는 잔기와 같은 L2 내에 위치된다.
- [0090] 단일 Cys 돌연변이가 본 발명의 성장 호르몬 화합물 접합에 존재할 때, 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 E30C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 Y42C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 S55C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 S57C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 S62C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 Q69C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 S95C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 A98C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 N99C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 S100C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 L101C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 V102C이다. 추가로 전형적인 단일 Cys 돌연변이는 S108C이다.
- [0091] rhGH/수용체 복합체(PDB:3HHR)의 결정 구조에 따라 번들은 잔기 9 내지 34의 제 1 나선(A), 잔기 72 내지 92 및 잔기 94 내지 100의 제 2 나선(B), 잔기 106 내지 128의 제 3 나선(C)과, 잔기 155 내지 184의 제 4 나선(D)의 4개의 주요한 나선으로 구성된다(M. R. Kasimova et. al. *J. Mol. Biol.* **318**, 679-695, (2002)). 4개의 주된 나선은 단백질의 코어로서 언급된다. 나선 영역의 부분이 아닌 잔기는 루프 잔기로서 한정되고, 가요성 영역, 루프,  $\beta$ -돌이(turn), 헤어핀(hairpin) 및 코일(coil)의 부분일 수 있다. 나선의 약간 다른 위치 확인은 hGH가 그것의 결합 단백질(PDB:1HWG)을 갖는 복합체에 있을 때 제공되고, 이것은 상기에 언급된 나선의 정의이다.
- [0092] 게다가, 본 발명은 적어도 하나의 도입된 시스테인 잔기를 포함하는 GH 접합체에 관한 것이고, 잔기는 나선에서의 위치 또는 hGH의 루프 영역과 동등한 위치에서 도입되었다. 구체적으로 아미노산 잔기는 나선 또는 루프 영역의 위치에 노출된 표면에 도입될 수 있고, 이것은 표면에서 노출된 그것 측쇄의 25% 이상, 바람직하게는 표면에서(예를 들어, hGH 홀로의 모형 구조에서 또는 그것의 2개 수용체 분자로 복합된 hGH 모형 구조에서) 노출된 그것 측쇄의 50% 이상을 갖는다. 바람직한 구체예에서, 나선 또는 루프에서의 위치는 hGH의 수용체 결합 부위 밖의 위치와 동등하다. 표면 노출된 잔기는 컴퓨터 화학 알고리즘을 사용하여 확인할 수 있다. 예를 들어, 상대적인 표면 접근성은 공개적으로 이용가능한 구조(PDB 가입 코드 1HGU 및 1HWG 구조) 및 디폴트 파라미터 설정으로부터 원자 좌표를 사용하는 Accelrys Inc.로부터의 컴퓨터 프로그램 Quanta 2005로 계산될 수 있다. 알고리즘 뒤에 기술의 근본적인 원리를, B. Lee 및 F.M. Richards, "The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility" *J. Mol. Biol.* **55**, 379-400, (1971)에 발견할 수 있다.
- [0093] 추가 구체예에서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 추가의 이황화 다리를 갖는 GH에 연결된다. 전형적으로, 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 hGH의 위치 40 또는 위치 141인 N-말단에 연결된다.

- [0094] 추가 구체예에서 GH는 추가의 이황화 결합을 루프 부분과 나선 부분 사이에 또는 루프 부분 내에 또는 루프 부분들 사이에 또는 나선 부분들 사이에 포함한다.
- [0095] 추가 구체예에서 GH는 추가의 이황화 결합을 포함하고, 적어도 하나의 시스테인은 아미노산 잔기 128-154(L3)로부터의 이러한 루프 부분에 존재한다.
- [0096] 추가 구체예에서 GH는 추가의 이황화 결합을 포함하고, 추가의 이황화 결합은 나선 부분을 가진 루프 부분과 연결한다.
- [0097] 추가 구체예에서 GH는 추가의 이황화 결합을 포함하고, 추가의 이황화 결합은 나선 B 또는 나선 2(AA 72-98에 대응함)를 가진 루프 부분과 연결한다.
- [0098] 추가 구체예에서 GH는 루프 3(AA 128-154에 대응함)을 갖는 나선 2(AA 72-98에 대응함)에 연결된 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0099] 추가 구체예에서 GH는 추가의 이황화 결합을 SEQ ID NO:1에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서 아미노산쌍들 중 하나 사이에 포함한다.
- [0100] 추가 구체예에서 GH의 추가 이황화 다리는 hGH(SEQ ID NO:1)에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.
- [0101] 추가 구체예에서 추가의 이황화 결합은 SEQ ID NO:1에서의 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 및/또는 R94C/D107C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.
- [0102] 추가 구체예에서 추가의 이황화 결합은 SEQ ID NO:1에서의 D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C 및/또는 R94C/D107C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.
- [0103] 추가 구체예에서 추가의 이황화 결합은 SEQ ID NO:1에서의 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 및/또는 S85C/S144C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.
- [0104] 추가 구체예에서 추가의 이황화 결합은 SEQ ID NO:1에서의 S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C 및/또는 S85C/S144C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다. 전형적으로, 추가의 이황화 다리는 Q84C/Y143C이다.
- [0105] 추가 구체예에서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 다리를 갖는 GH에 연결된다. 전형적으로, 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 단일 Cys 돌연변이에 연결된다. 특정 구체예에서 GH는, 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기가 연결된 곳으로, 추가의 이황화 다리 Q84C/Y143C 및 단일 Cys 돌연변이 L101C를 갖는다.
- [0106] 추가 구체예에서 GH는 hGH(SEQ ID NO:1) 또는 hGH 변종에서 대응하는 잔기에서의 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 및 G190C의 어떤 하나로부터, 예를 들어 T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C의 어떤 하나로부터 선

택된 추가의 이황화 결합 및 단일 Cys 돌연변이를 갖는다.

- [0107] 특정 구체예에서 GH는 추가의 이황화 결합 및 단일 Cys 돌연변이를 갖고, 상기 단일 Cys 돌연변이는 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 및 G190로 구성되는 군, 바람직하게 T3, P5, S7, D11, H18, Q29, E30, E33, A34, Y35, E88, Q91, S95, A98, N99, S100, L101, V102, Y103, D107, S108, D112, Q122 및 G126의 군으로부터 선택된 hGH(SEQ ID NO:1) 위치와 동등한 모 GH와 동등한 위치에서 도입되었다. GH 접합체는 알부민 결합 부분을 상기 단일 시스테인 잔기의 측쇄에서 더 포함한다.
- [0108] 추가 구체예에서 GH는 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 루프 부분과 나선 부분 사이에 또는 루프 부분 내에 또는 루프 부분들 사이에 또는 나선 부분들 사이에 포함한다.
- [0109] 추가 구체예에서 GH는 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함하고, 적어도 하나의 시스테인은 아미노산 잔기 128-154(L3)로부터의 이러한 루프 부분에 존재한다.
- [0110] 추가 구체예에서 GH는 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함하고, 추가의 이황화 결합은 나선 B 또는 나선 2(AA 72-98에 대응함)와 같은 나선 부분을 갖는 아미노산 잔기 128-154로부터 이러한 루프 부분과 연결한다.
- [0111] 추가 구체예에서 GH는 루프 3(AA 128-154에 대응함)을 갖는 나선 2(72-98에 대응함)를 연결한 추가의 이황화 결합 및 단일 Cys 돌연변이를 포함한다.
- [0112] 추가 구체예에서 GH는 SEQ ID NO:1에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0113] 추가 구체예에서 GH는 hGH(SEQ ID NO:1)에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 다리를 포함한다.
- [0114] 추가 구체예에서 GH는 SEQ ID NO:1에서의 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 및/또는 R94C/D107C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0115] 추가 구체예에서 추가의 이황화 결합은 SEQ ID NO:1에서의 D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C 및/또는 R94C/D107C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 있다.
- [0116] 추가 구체예에서 GH는 SEQ ID NO:1에서의 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 및/또는 S85C/S144C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0117] 추가 구체예에서 GH는 SEQ ID NO:1에서의 S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C 및/또는 S85C/S144C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0118] 친수성 스페이서(B)의 용해도는 그것의 logP 값에 의해 기술될 수 있다. LogP는(또한 분배 계수로서 알려짐) 화합물 평형에서 2개의 섞이지 않는 용매 혼합물의 2개의 상에서 화합물 농도비의 로그이다. 전형적으로 용매들 중 하나는 물인 반면, 두번째는 옥탄-1-올, 클로로포름, 시클로헥산 및 프로필렌 글리콜 디펠라고네이트(PGDP)



로부터 선택된다. 이들 다른 용매에서 측정된 LogP 값은 수소 결합 효과로 인해 주로 차이를 나타낸다. 옥탄올은 수소 결합을 공여 및 수용할 수 있는 반면, 시클로헥산은 불활성이다. 클로로포름은 수소 결합을 공여할 수 있는 반면, PGDP는 그것들을 수용만 할 수 있다. LogP 값을 본 분야에 알려진 표준 방법에 의해 측정할 수 있다.

[0119] 본 발명의 한 구체예에서, 친수성 스페이서는 옥탄-1-올, 클로로포름, 시클로헥산 및 프로필렌 글리콜 디펠라고네이트(PGDP) 중 하나에서 0.5 미만과 같은 0 미만의 LogP를 갖는다.

[0120] 추가 구체예에서, 친수성 스페이서는 옥탄-1-올, 클로로포름, 시클로헥산 및 프로필렌 글리콜 디펠라고네이트(PGDP) 중 하나에서 -1 미만의 logP를 갖는다.

[0121] 선택적으로, LogP 값은 알부민 바인더 부분 또는 친수성 스페이서 부분을 위해 공개된 알고리즘을 사용하여 mLogP 및/또는 cLogP로서 계산될 수 있다(T. Fujita; J. Iwasa 및 C. Hansch, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 5175-5180, (1964) "A New Substituent Constant,  $\pi$ , Derived from Partition Coefficients", C. A. Lipinski et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **23**, 3-25, (1997) "Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings" 및 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").

[0122] 본 발명의 한 구체예에서 친수성 스페이서(B)는 mLogP < 0을 갖는다.

[0123] 추가 구체예에서 성장 호르몬 화합물(GH)은 하나의 알부민 결합 잔기에 친수성 스페이서(B)를 통해 연결된다.

[0124] 추가 구체예에서 성장 호르몬 화합물(GH)은 성장 호르몬 화합물(GH)에서 유리 시스테인에 연결된 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기(B)에 연결된다.

[0125] 다른 구체예에서 성장 호르몬 화합물(GH)은 2개의 알부민 결합 잔기에 하나 또는 2개의 친수성 스페이서(들)를 (을) 통해 연결된다. 따라서, 한 실시예에서 하나의 알부민 결합 잔기는 하나의 친수성 스페이서(B)를 통해 단일 Cys 돌연변이에 연결되고, 다른 알부민 결합 잔기는 하나의 친수성 스페이서(B')를 통해 위치 40 또는 위치 141에서의 글루타민에 연결되거나, 또는 선택적으로 2개의 알부민 결합 잔기는 하나의 친수성 스페이서(B)를 통해 단일 Cys 돌연변이 또는 위치 40, 위치 141 또는 N-말단의 글루타민에 연결된다. 다른 구체예에서 성장 호르몬 화합물(GH)은 하나 이상의 친수성 스페이서(들)를(을) 통해 3개의 알부민 결합 잔기와 연관된다.

[0126] 한 구체예에서 친수성 스페이서는 적어도 하나의 OEG 모티브인 라디칼 8-아미노-3,6-디옥사오탄산, 즉  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ 을 포함한다. 추가로 명시된 구체예에서 친수성 스페이서는 적어도 2개의 OEG 모티브를 포함한다. 한 구체예에서 이들 OEG 모티브(들)의 방향은  $-\text{C}(\text{O})-$ 가 성장 호르몬 화합물에 가장 가깝도록 하지만, 성장 호르몬 화합물 및 알부민 바인더 링커로 이어지지 않도록 하고,  $-\text{NH}-$ 는 알부민 결합 잔기에 가장 가깝도록 한다. 추가 구체예에서 2개의 OEG 모티브를 포함하는 2개의 모티브는 동일한 방향 또는 다른 방향을 갖는다. 한 구체예에서 2개의 이들 OEG 모티브는 서로 인접하게 위치된 반면, 선택적인 구체예에서 이들 OEG 모티브는 하나 이상의 공유적으로 연결된 원자에 의해 분리된다.

[0127] 한 구체예에서 친수성 스페이서는 적어도 하나의 글루탐산 잔기를 포함한다. 아미노 글루탐산은 2개의 카르복시산기를 포함한다. 그것의  $\gamma$ -카르복시기를, 아마이드 결합을 리신의  $\epsilon$ -아미노기, 또는 있는 경우, OEG 분자의 아미노기, 또는 또다른 Glu 잔기의 아미노기로 형성하는데 사용할 수 있다.  $\alpha$ -카르복시기를, 선택적으로 유사한 아마이드 결합을 리신의  $\epsilon$ -아미노기, 또는 있는 경우, OEG 분자의 아미노기, 또는 또다른 Glu 잔기의 아미노기로 형성하는데 사용할 수 있다. Glu의 아미노기는 아마이드 결합을 알부민 결합 잔기의 카르복시기, 혹은 있는 경우, OEG 모티브의 카르복시기, 혹은 또다른 Glu의  $\gamma$ -카르복시기 또는  $\alpha$ -카르복시기로 교대로 형성한다. 하나의 Glu 아미노기의 제 2 Glu  $\gamma$ -카르복시기로의 연결은 " $\gamma$ -Glu" 모티브로서 언급될 수 있다.

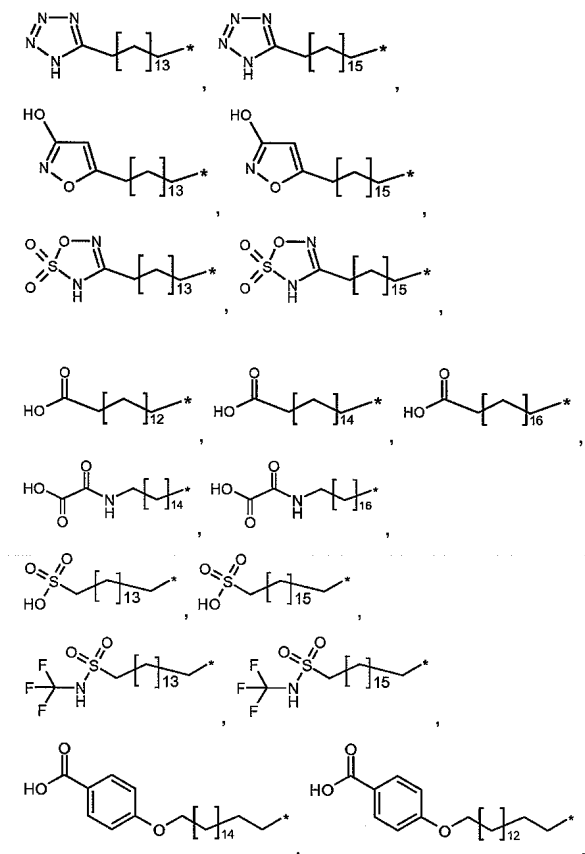
[0128] 한 구체예에서 친수성 스페이서는 적어도 하나의 조합된 OEG-Glu 모티브( $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OH})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-$ ) 또는 적어도 하나의 조합된 Glu-OEG 모티브( $-\text{NH}-\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OH})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ ) 또는 이것의 조합을 포함하고, 이들 Glu-OEG 및 OEG-Glu 모티브는 하나 이상의 공유적으로 연결된 원자에 의해 또는 Glu의  $\gamma$ -Glu를 형성하는 아마이드 결합에 의한 서로 직접적인 결합에 의해 분리될 수 있다.

[0129] 추가 양태에서 본 발명은 하기 식(I)을 갖는 성장 호르몬 접합체 및 그것의 약학적으로 허용가능한 염에 관한

것이다:

- [0130] A-W-B-GH (I)
- [0131] 여기서
- [0132] GH는 단일 Cys 돌연변이를 갖는 성장 호르몬 화합물을 나타내고,
- [0133] B는 Cys 돌연변이의 황 잔기로 연결된 친수성 스페이서를 나타내고,
- [0134] W는 A 및 B를 연결한 화학기이고, 그리고
- [0135] A는 알부민 결합 잔기를 나타낸다.
- [0136] 추가 구체예에서 GH는 사람 성장 호르몬(hGH)(SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 성장 호르몬 화합물을 나타낸다. 추가 구체예에서, GH는 hGH(SEQ ID NO:1)를 갖는 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는다. 추가 구체예에서, hGH로의 상기 동일성은, 본원의 어세이I에 측정된 hGH 성장 호르몬 활성의 적어맴버0%, 예를 들어 적어도 20%, 적어도 40%, 적어도 60%, 적어도 80%에 연결된다. 서열 동일성 구체예의 어떤 하나는 hGH와 적어도 80% 동일성을 갖는 GH와 같은 활성 구체예의 어떤 하나와 조합되고, hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 60%와 연관되며(GH는 hGH와 적어도 90% 동일성을 가짐), hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 40%와 연관되고(GH는 hGH와 적어도 95% 동일성을 가짐), 그리고 hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 80%와 연관되는 등이 가능하다.
- [0137] 추가 구체예에서 집합체의 GH는 GH의 N-말단, H1, H2, L2 또는 H3 영역에서 단일 Cys 돌연변이의 어떤 하나로부터 선택된 단일 Cys 돌연변이를 갖는다. 추가 구체예에서, 단일 Cys 돌연변이는, N-말단에서 T3C, P5C, S7C의 어떤 하나와 같고, 혹은 H1(AA 9-35에 대응함)에서 돌연변이는 D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C의 어떤 하나와 같고, 혹은 L1(AA36-71에 대응함)에서 돌연변이는 K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C의 어떤 하나와 같거나 혹은 바람직하게 Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C의 어떤 하나와 같고, 혹은 H2, L2 또는 H3(AA 72-98, AA 99-106 및 AA 107-127에 대응함)에서 돌연변이는 hGH(SEQ ID NO:1)의 E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다. L3 및 H4(128-154 및 AA155-184)에서 돌연변이는 E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C의 어떤 하나와 같거나 혹은 C-말단에서 돌연변이는 E186C, G187C, G190C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다.
- [0138] 단일 Cys 돌연변이가 hGH 변종에 존재하는 경우, 돌연변이는 대응하는 아미노산 잔기에 위치된다.
- [0139] 추가 구체예는 GH 집합체를 포함하며, GH에서의 단일 Cys 돌연변이는 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 및 G190C의 어떤 하나로부터, 예를 들어 hGH(SEQ ID NO:1)의 T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C의 어떤 하나로부터 선택된다.
- [0140] 추가 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 hGH에서의 AA 93-106 또는 hGH 변종에서의 대응하는 잔기 내에 위치된다. 추가로 명시된 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 AA 99-106 또는 AA 99-103 또는 대응하는 잔기와 같은 L2 내에 위치된다.

[0141] 추가 구체예에서 A는 하기로부터 선택된다.



[0142]

[0143] 여기서 \*는 W를 통한 B로의 부착을 표시한다.

[0144] 추가 구체예에서 W는 하기 식을 갖는다.

[0145]  $-W_7-Y-$ ,

[0146] 여기서

[0147] Y는  $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -시클로알킬- $W_8-$  또는 원자가 결합이고,

[0148] I7은 0-6이고,

[0149]  $W_7$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s3$ 는 0 또는 1이며,

[0150]  $W_8$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s4$ 는 0 또는 1이다.

[0151] 추가 구체예에서 B는, 상기 기술된 하나 이상의 OEG, 및/또는  $\gamma$ -Glu 모티브를 포함하거나 구성한다.

[0152] 추가 구체예에서 B는 하기 식을 갖는다.

[0153]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

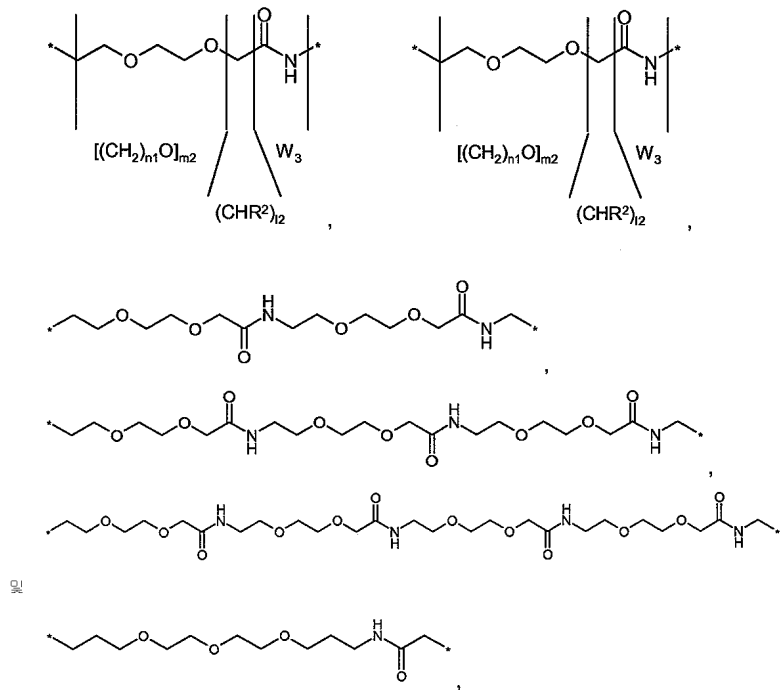
[0154] 여기서

[0155]  $X_1$ 은  $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 이고,

- [0156]  $X_2$ 는  $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 이고,
- [0157]  $X_3$ 는  $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ 이고,
- [0158]  $X_4$ 는  $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ 이고,
- [0159] I1, I2, I3, I4, I5 및 I6는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0160] m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-10으로부터 선택되고,
- [0161] m2 및 m5는 독립적으로 0-25로부터 선택되고,
- [0162] n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0163] F는 아릴, 헤타릴, 피롤리딘-2,5-디온 또는 원자가 결합이며, 여기서 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬로 치환되고,
- [0164] R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 독립적으로 수소, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub>-알킬, 아릴 또는 헤타릴로부터 선택되고; 여기서 알킬, 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -CN 또는 -OH로 치환되고,
- [0165] D1, D2, E1 및 E2는 독립적으로 -O-, -N(R<sup>6</sup>)-, -N(C(O)R<sup>7</sup>)- 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 R<sup>6</sup> 및 R<sup>7</sup>은 독립적으로 수소 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬을 나타내며,
- [0166] W<sub>1</sub> 내지 W<sub>5</sub>는 독립적으로 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s2는 0 또는 1이며,
- [0167] W<sub>6</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-알킬, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-알킬 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s1은 0 또는 1이며, C<sub>1-6</sub>-알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH 또는 -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH로 치환되고; 여기서 (\*)는 X<sub>4</sub>에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0168] 추가 구체예에서 I1, I2, I3, I4, I5 및 I6는 독립적으로 0-6이다.
- [0169] 추가 구체예에서 m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-6이다.
- [0170] 추가 구체예에서 m2 및 m5는 독립적으로 0-10이다.
- [0171] 추가 구체예에서 n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 0-10이다.
- [0172] 추가 구체예에서 D1 및 D2는 독립적으로 -O- 또는 -N(R<sup>6</sup>)- 또는 원자가 결합으로부터 선택된다.
- [0173] 추가 구체예에서 E1 및 E2는 독립적으로 -O- 또는 -N(R<sup>6</sup>)- 또는 원자가 결합으로부터 선택된다.
- [0174] 추가 구체예에서 W<sub>1</sub> 내지 W<sub>8</sub>은 독립적으로 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-알킬, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-알킬 또는 원자가 결합으로 구성되는 군으로부터 선택되며; 여기서 알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH 또는 -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH로 치환되고; 여기서 (\*)는 X<sub>4</sub>에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0175] 추가 구체예에서 R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 독립적으로 수소, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬로부터 선택되며; 여기서 C<sub>1-6</sub>-알킬기는 선택적으로 -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub> 또는 -S(O)<sub>2</sub>OH로 치환된다.



[0176] 추가 구체예에서  $-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$  및  $-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$  (여기서 E1 및 E2는 -O-임)는 하기로부터 선택된다.

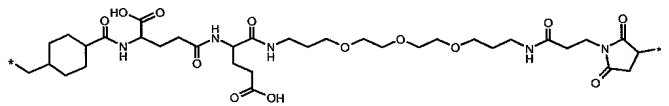


[0177]

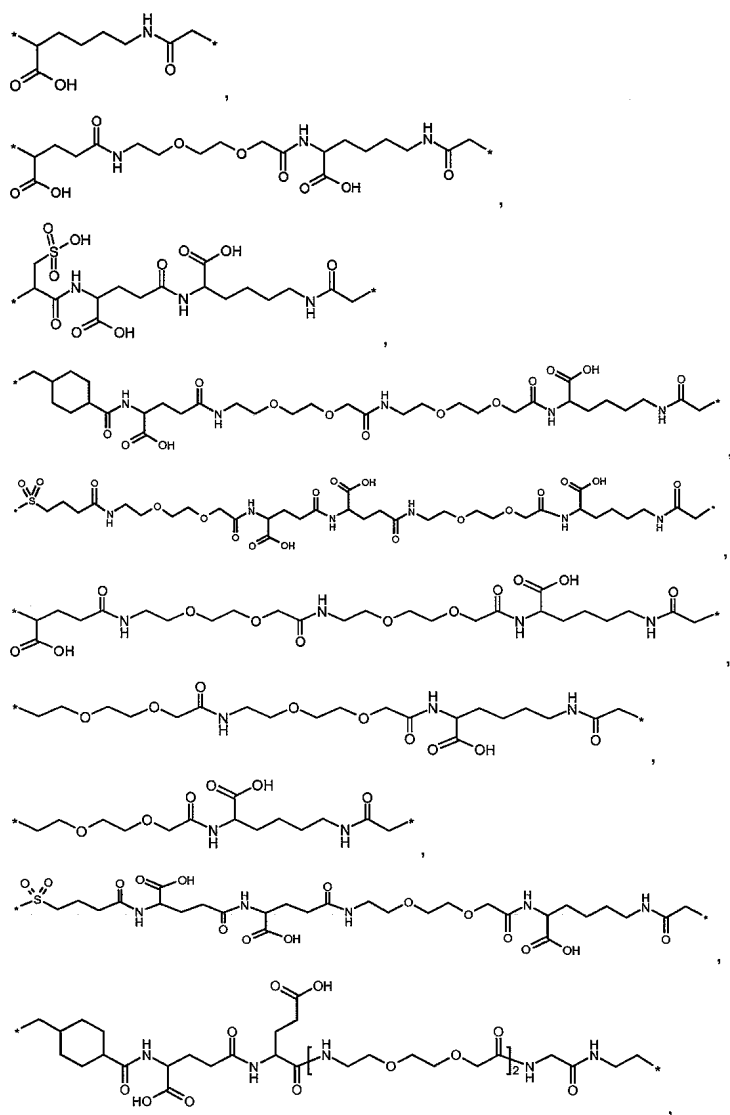
[0178] 여기서 \*는 부착점, 즉, 열린 결합을 표시하도록 의도된다.

[0179] 추가 구체예에서  $X_4$ 는 원자가 결합이고,  $W_6$ 는 피롤리딘-2,5-디온,  $-NHC(O)CH*CH_2COOH$  또는  $-NHC(O)CH_2CH*COOH$  중 하나로부터 선택되며, 여기서 (\*)는 GH에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.

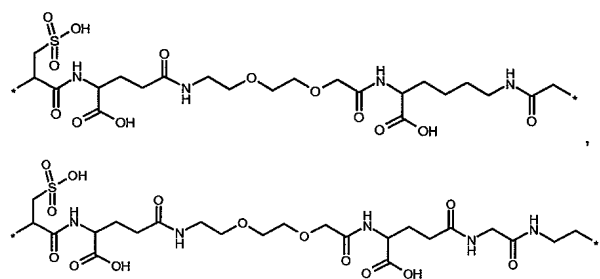
[0180] 추가 구체예에서 B는 하기로부터 선택된다.



[0181]

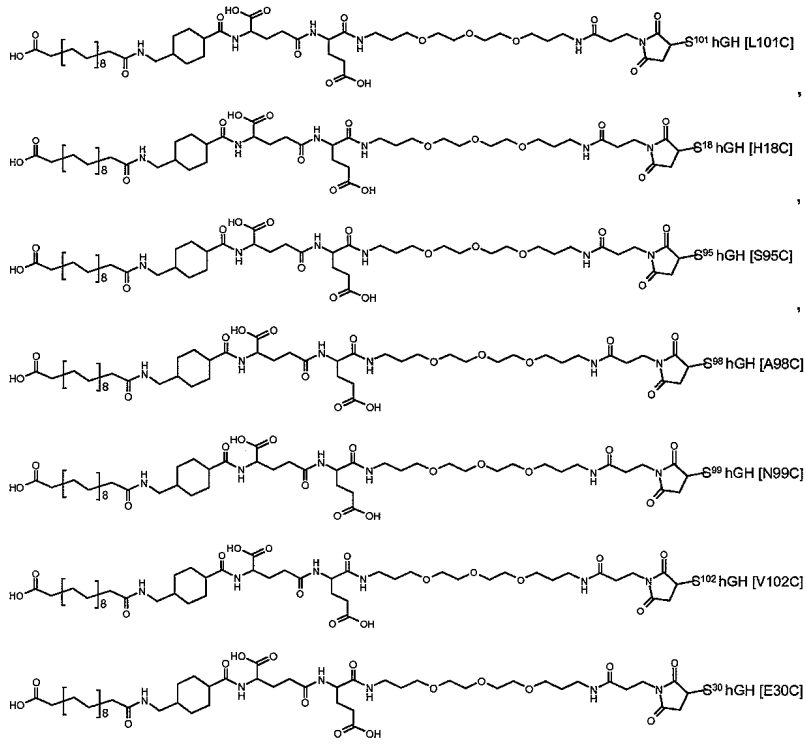


[0182]

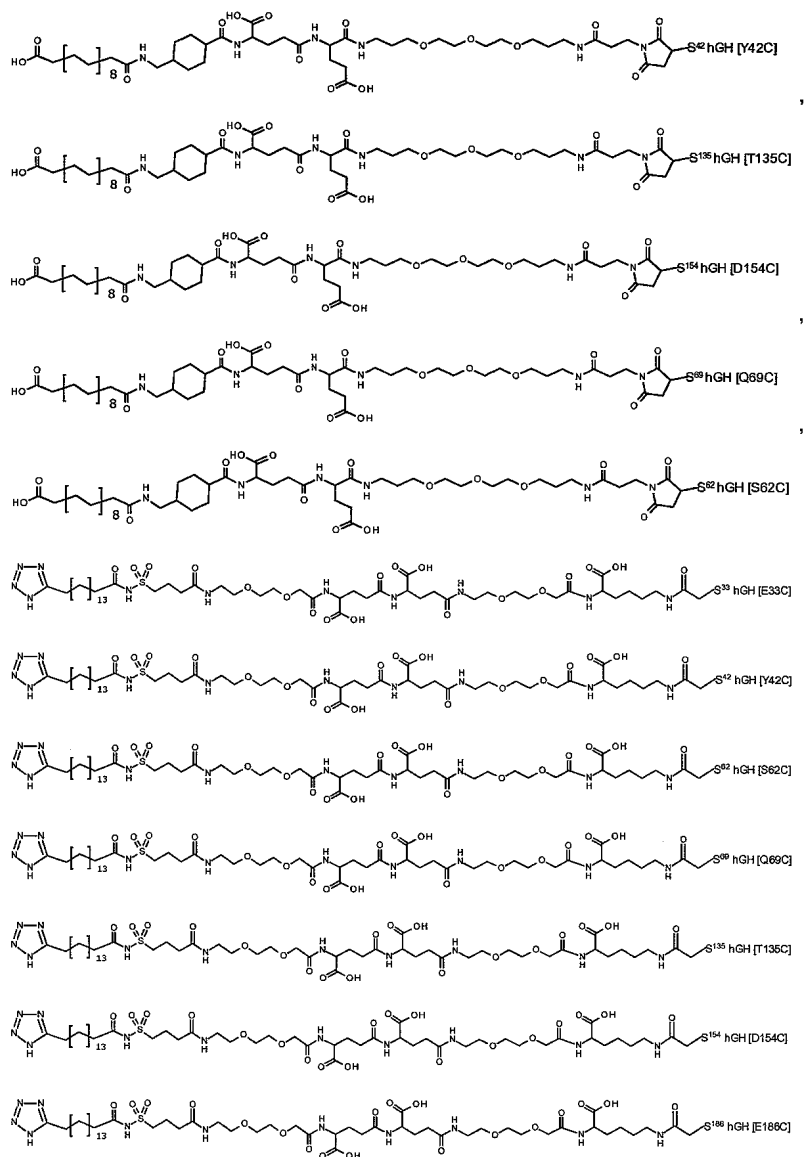


[0183]

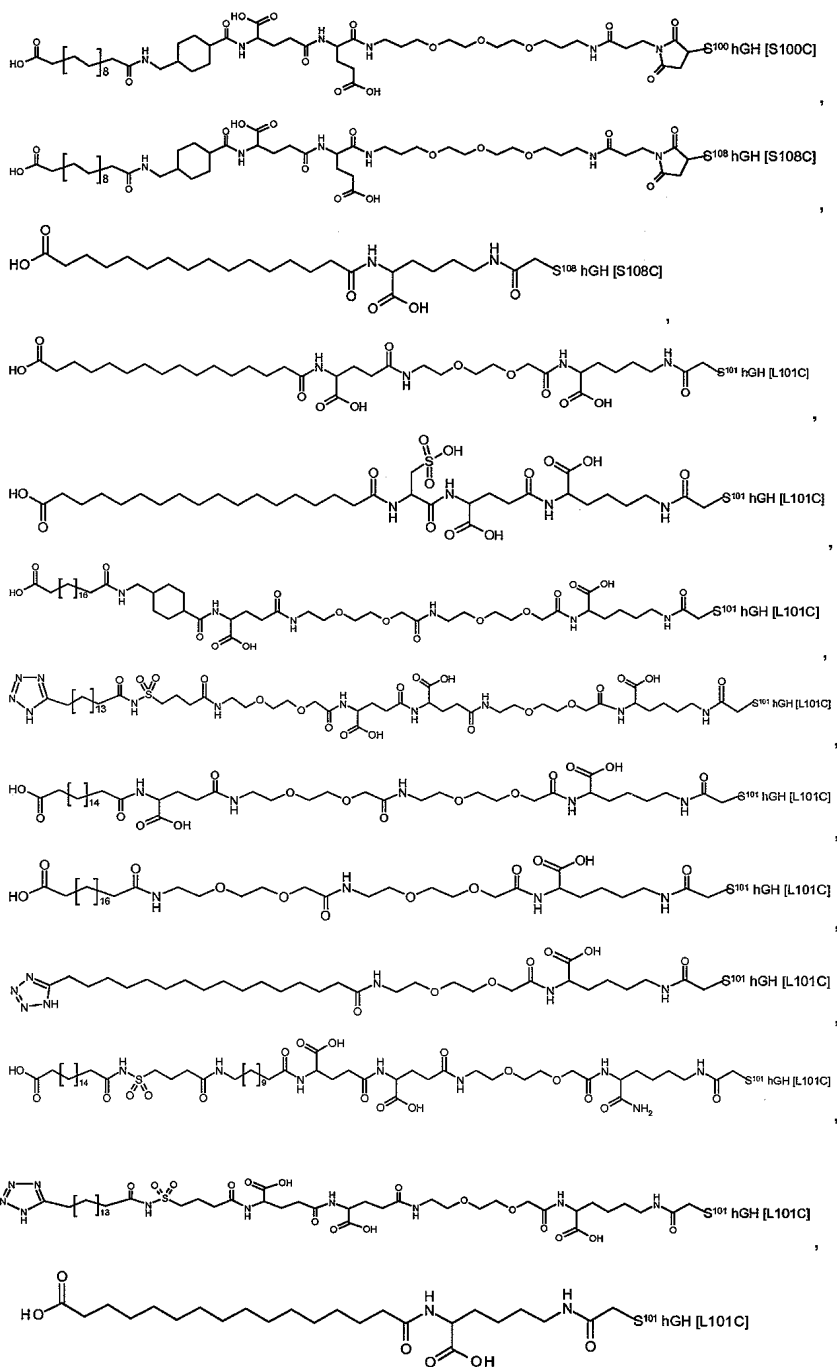
[0184] 추가 구체예에서 GH 접합체는 하기로부터 선택된다.



[0185]



[0186]



[0187]

[0188]

[0189] 추가 양태에서 본 발명은 하기 식(I)을 갖는 성장 호르몬 접합체 및 그것의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:

[0190] A-W-B-GH (I)

[0191] 여기서

[0192] GH는 추가의 이황화 다리를 갖는 성장 호르몬 화합물을 나타내고.

[0193] B는 최수성 스페이서를 나타내고.

[0194] W는 A 및 B를 연결한 화합기이고, 그리고

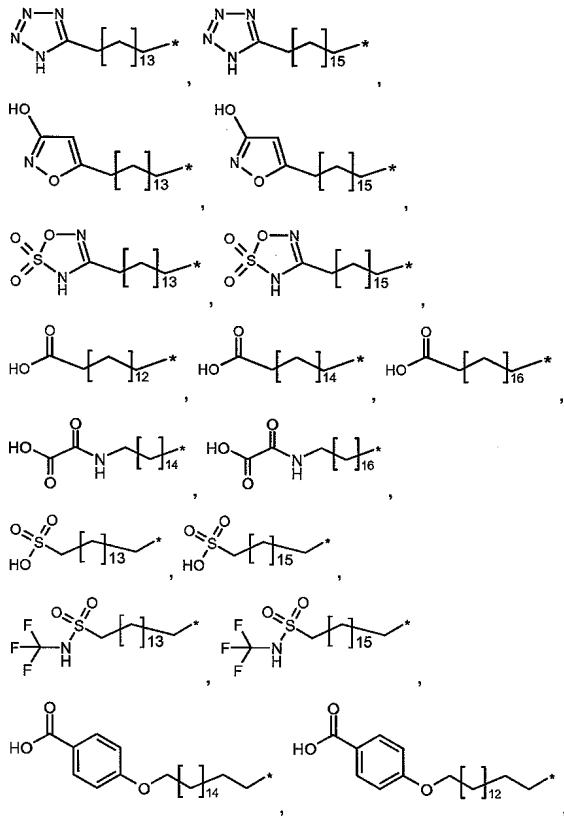
[0195] A는 알부민 결합 잔기를 나타낸다.

[0196] 추가 구체예에서 GH는 사람 성장 호르몬(hGH)(SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 성장 호르몬 화합물을 나타낸다. 추가 구체예에서, GH는 hGH(SEQ ID NO:1)와 적어도 80%,

예를 들어 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 동일성을 갖는다. 추가 구체예에서, hGH에의 상기 동일성은, 본원의 어세이I에 측정된 hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 0%, 예를 들어 적어도 20%, 적어도 40%, 적어도 60%, 적어도 80%에 연결된다. 서열 동일성 구체예의 어떤 하나는 hGH와 적어도 80% 동일성을 갖는 GH와 같은 활성 구체예의 어떤 하나와 조합되고, hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 60%와 연관되며(GH는 hGH와 적어도 90% 동일성을 가짐), hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 40%와 연관되고(GH는 hGH와 적어도 95% 동일성을 가짐), 그리고 hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 80%와 연관되는 등이 가능하다.

- [0197] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 추가의 이황화 결합을 루프 부분과 나선 부분 사이에 또는 루프 부분 내에 또는 루프 부분들 사이에 또는 나선 부분들 사이에 포함한다.
- [0198] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 추가의 이황화 결합을 포함하고, 적어도 하나의 시스테인은 아미노산 잔기 128-154로부터의 이러한 루프 부분에 존재한다.
- [0199] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 추가의 이황화 결합을 포함하고, 추가의 이황화 결합은 나선 B 또는 나선 2(AA 72-98에 대응함)와 같은 나선 부분을 가진 아미노산 잔기 128-154(H3)로부터 이러한 루프 부분과 연결한다.
- [0200] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 루프 3(AA 128-154에 대응함)을 갖는 나선 2(AA 72-98에 대응함)를 연결한 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0201] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 SEQ ID NO:1에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0202] 추가 구체예에서 추가의 이황화 다리는 hGH(SEQ ID NO:1)에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.
- [0203] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 SEQ ID NO:1에서의 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 및/또는 R94C/D107C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0204] 추가 구체예에서 추가의 이황화 결합은 SEQ ID NO:1에서의 D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C 및/또는 R94C/D107C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 있다.
- [0205] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 SEQ ID NO:1에서의 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 및/또는 S85C/S144C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0206] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 SEQ ID NO:1에서의 S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C 및/또는 S85C/S144C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 추가의 이황화 결합을 포함한다.

[0207] 추가 구체예에서 A는 하기로부터 선택된다.



[0208]

[0209] 여기서 \*는 B 내지 W로의 부착을 표시한다.

[0210] 추가 구체예에서 W는 하기 식을 갖는다.

[0211]  $-W_7-Y-$ ,

[0212] 여기서

[0213] Y는  $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -시클로알킬- $W_8-$  또는 원자가 결합이고,

[0214] I7은 0-6이고,

[0215]  $W_7$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s3$ 는 0 또는 1이고,

[0216]  $W_8$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s4$ 는 0 또는 1이다.

[0217] 추가 구체예에서 B는, 상기 기술된 하나 이상의 OEG, 및/또는  $\gamma$ -Glu 모티브(들)를(을) 포함하거나 구성한다.

[0218] 추가 구체예에서 B는 하기 식을 갖는다.

[0219]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0220] 여기서

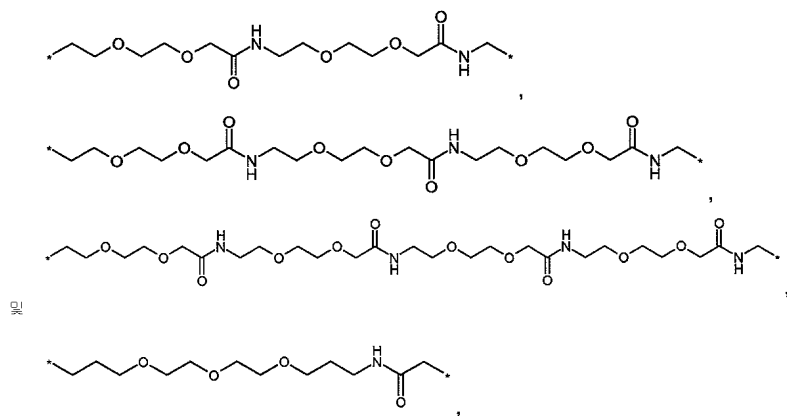
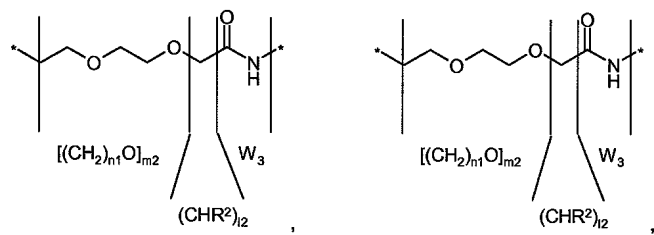
[0221]  $X_1$ 은  $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 이고,

[0222]  $X_2$ 는  $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 이고,

- [0223]  $X_3$ 는  $-(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ 이고,
- [0224]  $X_4$ 는  $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ 이고,
- [0225] I1, I2, I3, I4, I5 및 I6는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0226] m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-10으로부터 선택되고,
- [0227] m2 및 m5는 독립적으로 0-25로부터 선택되고,
- [0228] n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0229] F는 아릴, 헤타릴, 피롤리딘-2,5-디온 또는 원자가 결합이며, 여기서 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬로 치환되고,
- [0230]  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 수소, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub>-알킬, 아릴 또는 헤타릴로부터 선택되며; 여기서 알킬, 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -CN 또는 -OH로 치환되고,
- [0231] D1, D2, E1 및 E2는 독립적으로 -O-, -N(R<sup>6</sup>)-, -N(C(O)R<sup>7</sup>)- 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 R<sup>6</sup> 및 R<sup>7</sup>은 독립적으로 수소 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬을 나타내고,
- [0232] W<sub>1</sub> 내지 W<sub>5</sub>는 독립적으로 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s2는 0 또는 1이고,
- [0233] W<sub>6</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-알킬, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-알킬 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s1은 0 또는 1이고, C<sub>1-6</sub>-알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH 또는 -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH로 치환되고; 여기서 (\*)는 X<sub>4</sub>에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0234] 추가 구체예에서 I1, I2, I3, I4, I5 및 I6는 독립적으로 0-6이다.
- [0235] 추가 구체예에서 m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-6이다.
- [0236] 추가 구체예에서 m2 및 m5는 독립적으로 0-10이다.
- [0237] 추가 구체예에서 n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 0-10이다.
- [0238] 추가 구체예에서 D1 및 D2는 독립적으로 -O- 또는 -N(R<sup>6</sup>)- 또는 원자가 결합으로부터 선택된다.
- [0239] 추가 구체예에서 E1 및 E2는 독립적으로 -O- 또는 -N(R<sup>6</sup>)- 또는 원자가 결합으로부터 선택된다.
- [0240] 추가 구체예에서 W<sub>1</sub> 내지 W<sub>8</sub>은 독립적으로 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-알킬, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-알킬 또는 원자가 결합으로 구성되는 군으로부터 선택되며, 여기서 알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH 또는 -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH로 치환되고; 여기서 (\*)는 X<sub>4</sub>에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0241] 추가 구체예에서  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 수소, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬로부터 선택되며; 여기서 C<sub>1-6</sub>-알킬기는 선택적으로 -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub> 또는 -S(O)<sub>2</sub>OH로 치환된다.
- [0242] 추가 구체예에서  $-[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$  및  $-[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ , 여기서 E1 및 E2는



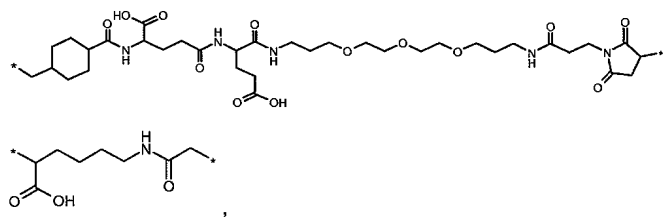
-0-이며, 하기로부터 선택된다.



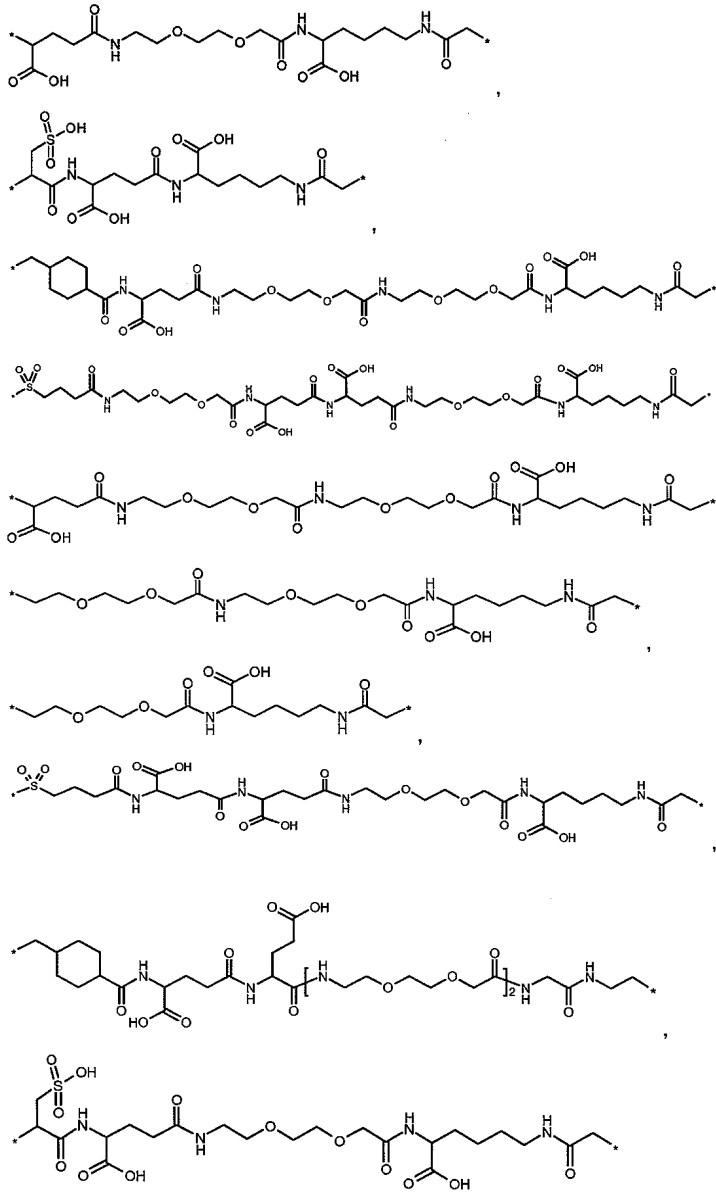
[0243]

[0244] 여기서 \*는 부착점, 즉 열린 결합을 표시하도록 의도된다.

[0245] 추가 구체예에서 B는 하기로부터 선택된다.



[0246]



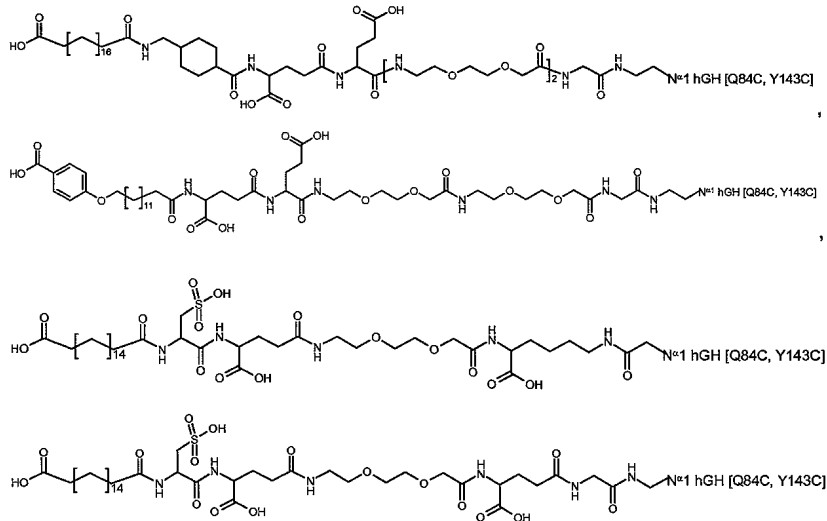
[0247]

[0248]

[0249]

추가 구체예에서 B를 통한 A는 SEQ ID NO:1에서의 위치 40, 위치 141에 대응하는 위치에서의 글루타민 잔기 또는 성장 호르몬 화합물의 N-말단 잔기에 부착된다.

[0250] 추가 구체예에서 GH 접합체는 하기로부터 선택된다.



[0251]

[0252] 추가 양태에서 본 발명은 성장 호르몬 접합체 및 그것의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이고, 성장 호르몬 접합체는 하기 식(I)을 갖는다:

[0253] A-W-B-GH (I)

[0254] 여기서

[0255] GH는 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 다리를 갖는 성장 호르몬 화합물을 나타내고,

[0256] B는 Cys 돌연변이의 황 잔기에 연결된 친수성 스페이서를 나타내고,

[0257] W는 A 및 B를 연결한 화학기를 나타내고, 그리고

[0258] A는 알부민 결합 잔기를 나타낸다.

[0259] 추가 구체예에서 GH는 사람 성장 호르몬(hGH)(SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 성장 호르몬 화합물을 나타낸다. 추가 구체예에서, GH는 hGH(SEQ ID NO:1)와 적어도 80%의 동일성, 예를 들어 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는다. 추가 구체예에서, hGH로의 상기 동일성은, 본원의 어세이I에 측정된 hGH의 성장 호르몬 활성의 적어도 10%로, 예를 들어 적어도 20%, 적어도 40%, 적어도 60%, 적어도 80%와 연관된다. 서열 동일성 구체예의 어떤 하나는 hGH와 적어도 80% 동일성을 갖는 GH와 같은 활성 구체예의 어떤 하나와 조합되고, hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 60%와 연관되며(GH는 hGH와 적어도 90% 동일성을 가짐), hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 40%와 연관되고(GH는 hGH와 적어도 95% 동일성을 가짐), 그리고 hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 80%와 연관되는 등이 가능하다.

[0260] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 GH의 N-말단, H1, H2, L2 또는 H3 영역에서의 단일 Cys 돌연변이 중 어떤 하나로부터 선택된 추가의 이황화 결합 및 단일 Cys 돌연변이를 갖는다. 추가 구체예에서, 단일 Cys 돌연변이는, N-말단에서 T3C, P5C, S7C의 어떤 하나와 같고, 혹은 H1(AA 9-35에 대응함)에서 돌연변이는 D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C의 어떤 하나와 같고, 혹은 L1(AA36-71에 대응함)에서 돌연변이는 K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C의 어떤 하나와 같거나 혹은 바람직하게 Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C의 어떤 하나와 같고, 혹은 H2, L2 또는 H3(AA 72-98, AA 99-106 및 AA 107-127에 대응함)에서 돌연변이는 hGH(SEQ ID NO:1)의 E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다. L3 및 H4(128-154 및 AA155-184)에서 돌연변이는 E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C의 어떤 하나와 같거나 혹은 C-말단에서 돌연변이는 E186C, G187C, G190C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다.

[0261] 단일 Cys 돌연변이가 hGH 변종에 존재하는 경우, 돌연변이는 대응하는 아미노산 잔기에 위치된다.

[0262] 추가 구체예는 추가의 이황화 결합을 갖는 GH 접합체를 포함하며, GH에서의 단일 Cys 돌연변이는 T3C, P5C,

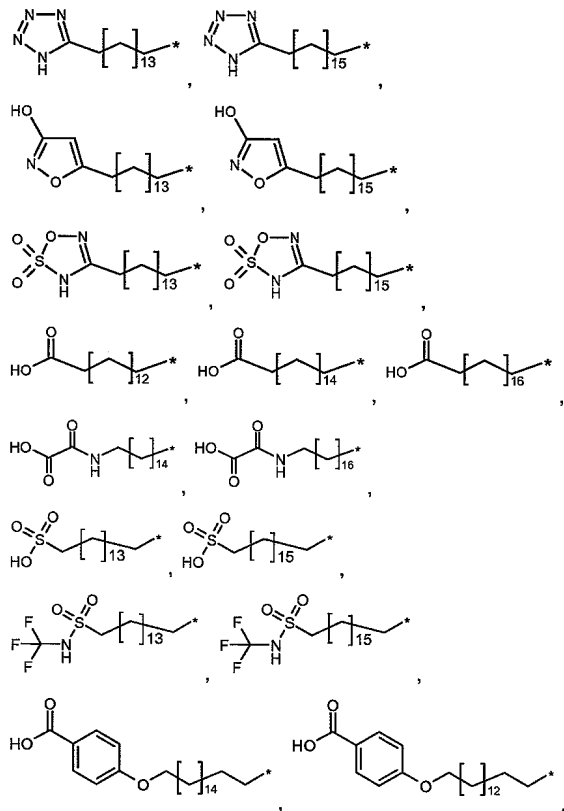
S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55C, S57C, P59C, S62, E65C, Q69C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C, G126C, E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, E186C, G187C 및 G190C의 어떤 하나로부터, 예를 들어 hGH(SEQ ID NO:1)의 T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C의 어떤 하나로부터 선택된다.

- [0263] 추가 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 hGH에서의 AA 93-106 또는 hGH 변종에서의 대응하는 잔기 내에 위치된다. 추가로 명시된 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 L2, 예를 들어 AA 99-106 또는 AA 99-103 또는 대응하는 잔기 내에 위치된다.
- [0264] 추가 구체예에서 추가의 이황화 결합은 추가의 이황화 결합을 루프 부분과 나선 부분 사이에 또는 루프 부분 내에 또는 루프 부분들 사이에 또는 나선 부분들 사이에 포함한다.
- [0265] 추가 구체예에서 GH는 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함하며, 적어도 하나의 시스테인은 아미노산 잔기 128-154(L3)로부터의 이러한 루프 부분에 존재한다.
- [0266] 추가 구체예에서 GH는 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함하고, 추가의 이황화 결합은 나선 B 또는 나선 2(AA 72-98에 대응함)와 같은 나선 부분을 갖는 아미노산 잔기 128-154로부터 이러한 루프 부분과 연결한다.
- [0267] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 단일 Cys 돌연변이 및 루프 3(AA 128-154에 대응함)을 갖는 나선 2(AA 72-98에 대응함)를 연결한 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0268] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 SEQ ID NO:1에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0269] 추가 구체예에서 추가의 이황화 다리는 hGH(SEQ ID NO:1)에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.
- [0270] 추가 구체예에서 접합체의 GH는 SEQ ID NO:1에서의 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 및/또는 R94C/D107C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 하나 사이에 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함한다.
- [0271] 추가 구체예에서 추가의 이황화 결합은 SEQ ID NO:1에서의 D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C 및/또는 R94C/D107C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.
- [0272] 추가 구체예에서 추가의 이황화 결합은 SEQ ID NO:1에서의 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 및/또는 S85C/S144C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.
- [0273] 추가 구체예에서 추가의 이황화 결합은 SEQ ID NO:1에서의 S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C 및/또는 S85C/S144C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.
- [0274] 추가 구체예에서 GH는 L2에서의 단일 시스테인 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함하고, 추가의 이황화 결합은 나선 B 또는 나선 2(AA 72-98에 대응함)와 같은 나선 부분을 갖는 아미노산 잔기 128-154(H3)로부터 루프

부분과 연결한다.

[0275] 한 구체예에서 GH는 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 및 C102C/S85C/S144C의 군으로부터 선택된 변형의 조합을 포함한다.

[0276] 추가 구체예에서 A는 하기로부터 선택된다.



[0277]

[0278] 여기서 \*는 B 내지 W로의 부착을 표시한다.

[0279] 추가 구체예에서 W는 하기 식을 갖는다.

[0280]  $-W_7-Y-$ ,

[0281] 여기서

[0282] Y는  $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -시클로알킬- $W_8-$  또는 원자가 결합이고,

[0283] 17은 0-6이고,

[0284]  $W_7$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s3$ 는 0 또는 1이고,

[0285]  $W_8$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s4$ 는 0 또는 1이다.

[0286] 추가 구체예에서 B는, 상기 기술된 하나 이상의 OEG, 및/또는  $\gamma$ -G를 포함하거나 구성한다.

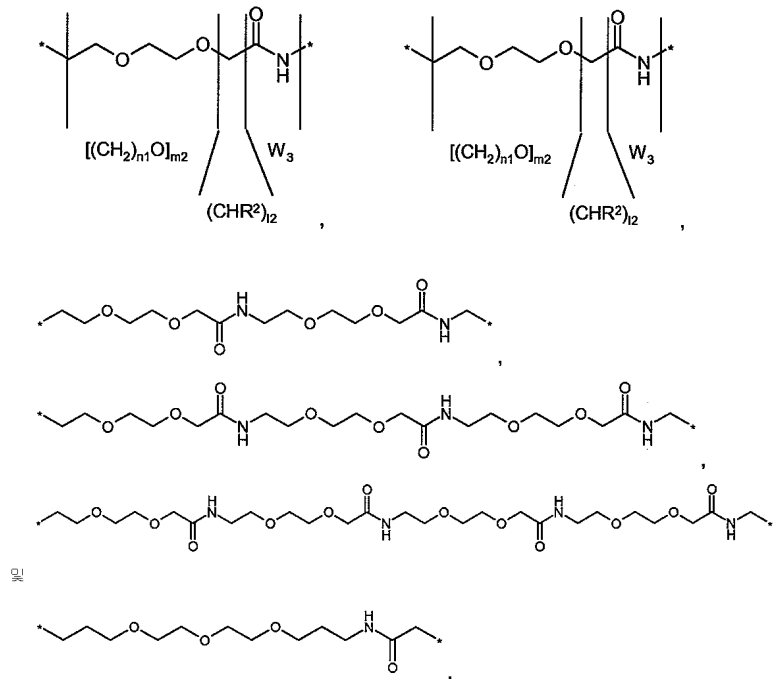
[0287] 추가 구체예에서 B는 하기 식을 갖는다.

- [0288]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$
- [0289] 여기서
- [0290]  $X_1$ 은  $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 이고,
- [0291]  $X_2$ 는  $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 이고,
- [0292]  $X_3$ 는  $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$ 이고,
- [0293]  $X_4$ 는  $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$ 이고,
- [0294]  $I1, I2, I3, I4, I5$  및  $I6$ 는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0295]  $m1, m3, m4, m6$  및  $m7$ 은 독립적으로 0-10으로부터 선택되고,
- [0296]  $m2$  및  $m5$ 는 독립적으로 0-25로부터 선택되고,
- [0297]  $n1, n2, n3$  및  $n4$ 는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0298]  $F$ 는 아릴, 헤타릴, 피롤리딘-2,5-디온 또는 원자가 결합이고, 여기서 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  또는  $C_{1-6}$ -알킬로 치환되고,
- [0299]  $R^1, R^2, R^3, R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 수소,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $C_{1-6}$ -알킬, 아릴 또는 헤타릴로부터 선택되고; 여기서 알킬, 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-CN$  또는  $-OH$ 로 치환되고,
- [0300]  $D1, D2, E1$  및  $E2$ 는 독립적으로  $-O-$ ,  $-N(R^6)-$ ,  $-N(C(O)R^7)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $R^6$  및  $R^7$ 은 독립적으로 수소 또는  $C_{1-6}$ -알킬을 나타내고,
- [0301]  $W_1$  내지  $W_5$ 는 독립적으로  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s2}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s2$ 는 0 또는 1이고,
- [0302]  $W_6$ 는  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s1}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-NHC(O)C_{1-6}$ -알킬,  $-C(O)NHC_{1-6}$ -알킬 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s1$ 은 0 또는 1이고 및  $C_{1-6}$ -알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온,  $-NHC(O)CH*CH_2COOH$  또는  $-NHC(O)CH_2CH*COOH$ 로 치환되고; 여기서 (\*)는  $X_4$ 에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0303] 추가 구체예에서  $I1, I2, I3, I4, I5$  및  $I6$ 는 독립적으로 0-6이다.
- [0304] 추가 구체예에서  $m1, m3, m4, m6$  및  $m7$ 은 독립적으로 0-6이다.
- [0305] 추가 구체예에서  $m2$  및  $m5$ 는 독립적으로 0-10이다.
- [0306] 추가 구체예에서  $n1, n2, n3$  및  $n4$ 는 독립적으로 0-10이다.
- [0307] 추가 구체예에서  $D1$  및  $D2$ 는 독립적으로  $-O-$  또는  $-N(R^6)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택된다.
- [0308] 추가 구체예에서  $E1$  및  $E2$ 는 독립적으로  $-O-$  또는  $-N(R^6)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택된다.
- [0309] 추가 구체예에서  $W_1$  내지  $W_8$ 은 독립적으로  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-NHC(O)C_{1-6}$ -알킬,  $-C(O)NHC_{1-6}$ -알킬 또는 원자가 결합을 구성하는 군으로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온,  $-NHC(O)CH*CH_2COOH$  또는  $-NHC(O)CH_2CH*COOH$ 로 치환되고; 여기서 (\*)는 CH탄소

원자 내지  $X_4$ 의 부착점을 나타낸다.

[0310] 추가 구체예에서  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 수소,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  또는  $C_{1-6}$ -알킬로부터 선택되고; 여기서  $C_{1-6}$ -알킬기는 선택적으로  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$  또는  $-S(O)_2OH$ 로 치환된다.

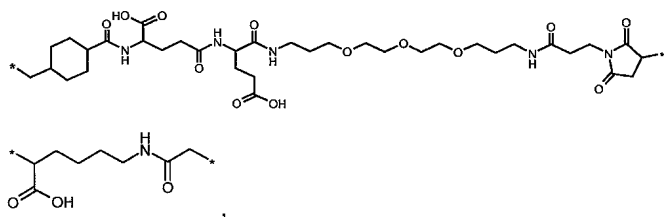
[0311] 추가 구체예에서  $-[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$  및  $-[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ , 여기서 E1 및 E2는 -O-이며, 하기로부터 선택된다.



[0312] 여기서 \*는 부착점, 즉 열린 결합을 표시하도록 의도된다.

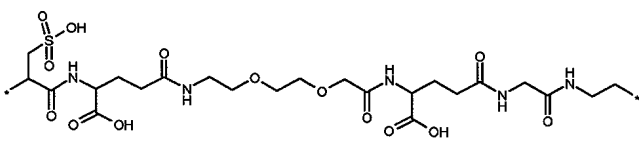
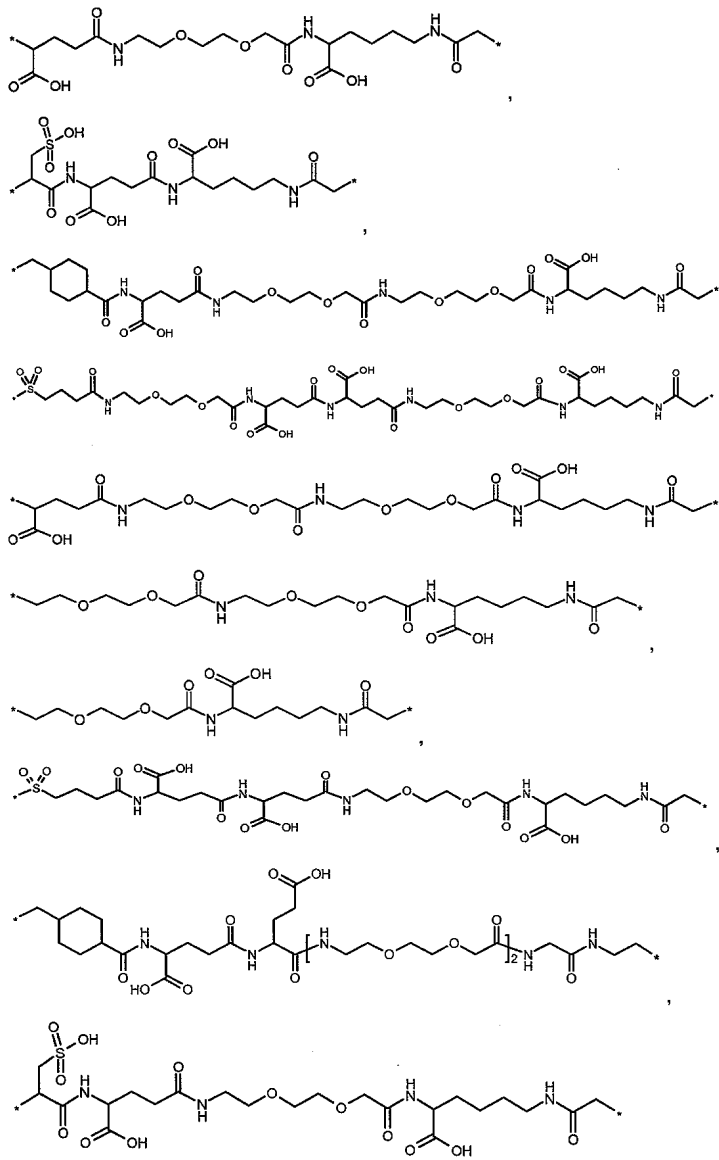
[0314] 추가 구체예에서  $X_4$ 는 원자가 결합이고,  $W_6$ 는 피롤리딘-2,5-디온,  $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$  또는  $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$  중 하나로부터 선택되고, 여기서 (\*)는 GH에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.

[0315] 추가 구체예에서 B는 하기로부터 선택된다.

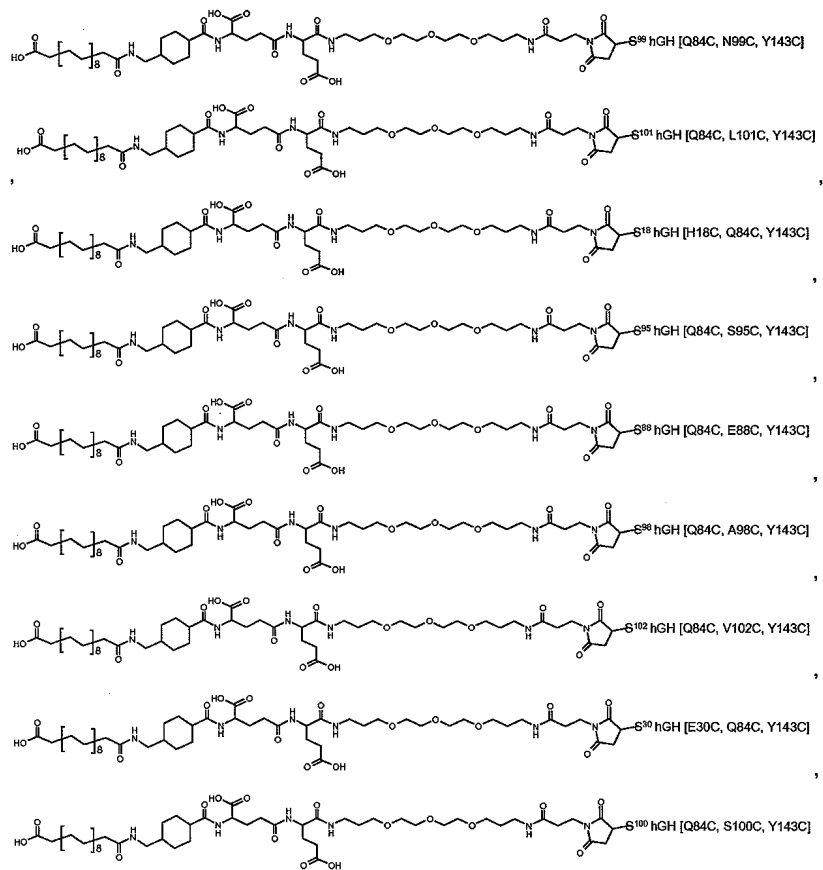


[0316]



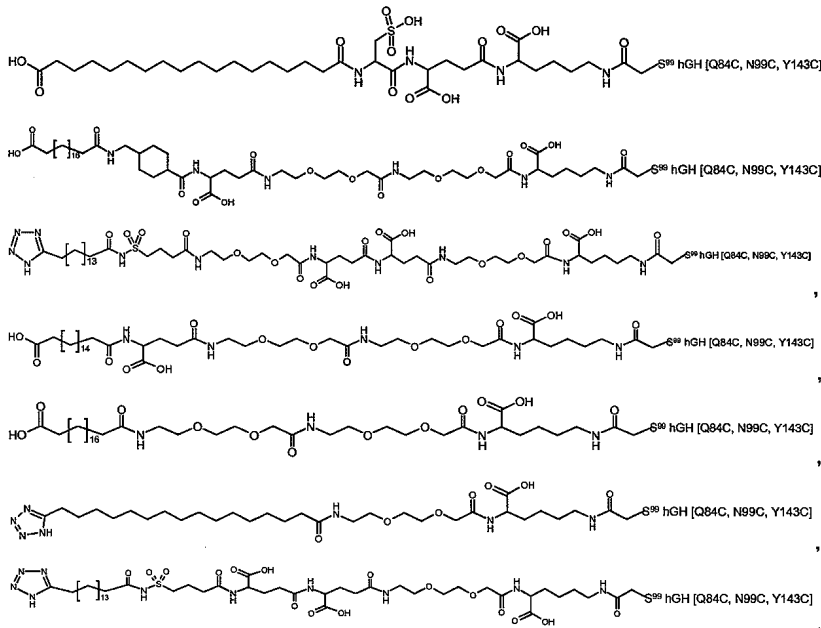


[0319] 추가 구체예에서 GH 접합체는 하기로부터 선택된다.



[0320]

– 50 –



[0322]

[0323] 전형적으로, 본 발명의 접합체는 성장 호르몬 화합물(GH)에 하나의 친수성 스페이서(B)와 같은 친수성 스페이서(B)를 통해 연결된 하나의 알부민 결합 잔기(A)를 갖는다.

[0324] 그러나, 성장 호르몬 화합물(GH)은 친수성 스페이서를 통해 2개의 알부민 결합 잔기에 연결될 수 있다.

[0325] 따라서, 추가 양태에서 본 발명은 하기 식(II)의 성장 호르몬 접합체 및 그것의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:

[0326] A-W-B-GH-B'-W'-A' (II)

[0327] 여기서

[0328] GH는 단일 Cys 돌연변이를 갖는 성장 호르몬 화합물을 나타내고,

[0329] B 및 B'는 독립적으로 Cys 돌연변이의 황 잔기에 연결된 친수성 스페이서이고,

[0330] W는 A 및 B를 연결한 화학기이고,

[0331] W'는 A' 및 B'를 연결한 화학기이고,

[0332] A 및 A'는 독립적으로 알부민 결합 잔기를 나타낸다.

[0333] 추가 다른 양태에서, 본 발명은 하기 식(II)의 성장 호르몬 접합체 및 그것의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:

[0334] A-W-B-GH-B'-W'-A' (II)

[0335] 여기서

[0336] GH는 추가의 이황화 다리를 갖는 성장 호르몬 화합물을 나타내고,

[0337] B 및 B'는 독립적으로 친수성 스페이서이고,

[0338] W는 A 및 B를 연결한 화학기이고,

[0339] W'는 A 및 A'를 연결한 화학기이고,

[0340] A 및 A'는 독립적으로 알부민 결합 잔기를 나타낸다.

[0341] 추가 양태에서 본 발명은 하기 식(II)의 성장 호르몬 접합체 및 그것의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:

[0342] A-W-B-GH-B'-W'-A' (II)

- [0343] 여기서
- [0344] GH는 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 다리를 갖는 성장 호르몬 화합물을 나타내고,
- [0345] B 및 B'는 독립적으로 Cys 돌연변이의 황 잔기에 연결된 친수성 스페이서이고,
- [0346] W는 A 및 B를 연결한 화학기이고,
- [0347] W'는 A 및 A'를 연결한 화학기이고,
- [0348] A 및 A'는 독립적으로 알부민 결합 잔기를 나타낸다.
- [0349] 식(II)의 접합체에서, 상기 기술된 W'는 W로서의 동일한 군으로부터 선택되고, A'는 A로서의 동일한 군으로부터 선택되고, B'는 B로서의 동일한 군으로부터 선택되고, W 및 W', A 및 A'와 B 및 B'는, 본원에서 한정된 독립적으로 각 군들 중 어떤 하나로부터 선택된다고 이해되어야 한다. 따라서, 본원에서의 W, A 및 B의 어떤 구체예는 또한 W', A' 및 B'의 구체예이다. 게다가, 본원에 기술된 구체예들 중 어떤 하나는 독립적으로 식(I) 및 (II) 둘 다의 접합체, 그뿐만 아니라 적합한 경우 전반적인 양태 및 그것의 구체예를 의미한다.
- [0350] 상기 구체예들, 그뿐만 아니라 하기에 기술된 구체예들은 본원에 기술된 양태들 중 어떤 하나, 그뿐만 아니라, 명시되지 않는 한, 본원에 기술된 구체예들 중 어떤 하나를 의미하는 것으로 나타내야 하고, 구체예는 본 발명의 특정 양태 또는 양태들에 관한 것이다.
- [0351] 한 구체예에서 GH는 hGH의 변종이며, 여기서 변종은 하나 이상의 아미노산 잔기를 hGH 서열에서 다른 자연 또는 비자연 아미노산으로 치환함으로써; 및/또는 하나 이상의 자연 또는 비자연 아미노산을 hGH 서열에 첨가함으로써; 및/또는 하나 이상의 아미노산 잔기를 hGH 서열로부터 제거함으로써 제공된 화합물이라고 이해되며, 이들 단계의 어떤 것은, 선택적으로 이후에, 하나 이상의 아미노산 잔기를 추가 유도체화할 수도 있다.
- [0352] 추가 구체예에서 GH는 사람 성장 호르몬(hGH)(SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열에 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 성장 호르몬 화합물을 나타낸다. 추가 구체예에서, GH는 hGH(SEQ ID NO:1)와 적어도 80%의 동일성, 예를 들어 적어도 85%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는다. 추가 구체예에서, hGH로의 상기 동일성은, 본원의 어세이I에 측정된 hGH의 성장 호르몬 활성의 적어도 0%로, 예를 들어 적어도 20%, 적어도 40%, 적어도 60%, 적어도 80%와 연관된다. 서열 동일성 구체예의 어떤 하나는 hGH와 적어도 80% 동일성을 갖는 GH와 같은 활성 구체예의 어떤 하나와 조합되고, hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 60%와 연관되며(GH는 hGH와 적어도 90% 동일성을 가짐), hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 40%와 연관되고(GH는 hGH와 적어도 95% 동일성을 가짐), 그리고 hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 80%와 연관되는 등이 가능하다.
- [0353] 추가 구체예에서 GH는 hGH(SEQ ID NO:1)이다.
- [0354] 추가 구체예에서 B는, 상기 기술된 하나 이상의 OEG, 및/또는  $\gamma$ -Glu 모티프(들)를(을) 포함하거나 구성한다.
- [0355] 식(I) 또는 (II)의 접합체의 추가 구체예에서, 친수성 스페이서(B)는 하기 식을 갖는다.
- [0356]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$
- [0357] 여기서
- [0358]  $X_1$ 은  $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 이고,
- [0359]  $X_2$ 는  $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 이고,
- [0360]  $X_3$ 는  $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ 이고,
- [0361]  $X_4$ 는  $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ 이고,
- [0362] I1, I2, I3, I4, I5 및 I6는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0363] m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-10으로부터 선택되고,
- [0364] m2 및 m5는 독립적으로 0-25로부터 선택되고,

- [0365]  $n_1$ ,  $n_2$ ,  $n_3$  및  $n_4$ 는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0366] F는 아릴, 헤타릴, 피롤리딘-2,5-디온 또는 원자가 결합이고, 여기서 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬로 치환되고,
- [0367] R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 독립적으로 수소, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub>-알킬, 아릴 또는 헤타릴로부터 선택되고; 여기서 알킬, 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -CN 또는 -OH로 치환되고,
- [0368] D1, D2, E1 및 E2는 독립적으로 -O-, -N(R<sup>6</sup>)-, -N(C(O)R<sup>7</sup>)- 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 R<sup>6</sup> 및 R<sup>7</sup>은 독립적으로 수소 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬을 나타내고,
- [0369] W<sub>1</sub> 내지 W<sub>5</sub>는 독립적으로 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s2는 0 또는 1이고,
- [0370] W<sub>6</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-알킬, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-알킬 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s1은 0 또는 1이고 및 알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH 또는 -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH로 치환되고; 여기서 (\*)는 X<sub>4</sub>에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0371] 추가 구체예에서 W<sub>1</sub>은 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- 또는 원자가 결합으로부터 선택된다. 전형적으로, W<sub>1</sub>은 -C(O)NH-, -NHC(O)- 또는 -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-로부터 선택된다.
- [0372] 추가 구체예에서 W<sub>2</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- 또는 원자가 결합으로부터 선택된다. 전형적으로, W<sub>2</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)- 또는 -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-로부터 선택된다.
- [0373] 추가 구체예에서 W<sub>3</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- 또는 원자가 결합으로부터 선택된다. 전형적으로, W<sub>3</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)- 또는 -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-로부터 선택된다.
- [0374] 추가 구체예에서 W<sub>4</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- 또는 원자가 결합으로부터 선택된다. 전형적으로, W<sub>4</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)- 또는 -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-로부터 선택된다.
- [0375] 추가 구체예에서 W<sub>5</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- 또는 원자가 결합으로부터 선택된다. 전형적으로, W<sub>5</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)- 또는 -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-로부터 선택된다.
- [0376] 추가 구체예에서 W<sub>6</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-알킬, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-알킬 또는 원자가 결합으로부터 선택되고, 여기서 알킬기는 선택적으로 피롤리딘-2,5-디온, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH 또는 -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH로 치환되며, 여기서 (\*)는 X<sub>4</sub>에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다. 전형적으로, W<sub>6</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>- 또는 -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-알킬로부터 선택된다.
- [0377] 추가 구체예에서, D1, D2, F는 모두 원자가 결합이고, I6는 0이고, W6는 피롤리딘-2,5-디온, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH 또는 -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH 중 하나로부터 선택되고, 여기서 (\*)는 GH에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0378] 추가 구체예에서 R<sup>1</sup>은 수소, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로 -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH로 치환된다. 전형적으로, R<sup>1</sup>은 -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬로부터 선택

택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ , 또는  $-S(O)_2OH$ 로 치환된다.

[0379] 추가 구체예에서  $R^2$ 는 수소,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  또는  $C_{1-6}$ -알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$ 로 치환된다. 전형적으로,  $R^2$ 는  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ , 또는  $C_{1-6}$ -알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ , 또는  $-S(O)_2OH$ 로 치환된다.

[0380] 추가 구체예에서  $R^3$ 는 수소,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  또는  $C_{1-6}$ -알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$ 로 치환된다. 전형적으로,  $R^3$ 는  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ , 또는  $C_{1-6}$ -알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$ 로 치환된다.

[0381] 추가 구체예에서  $R^4$ 는 수소,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  또는  $C_{1-6}$ -알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$ 로 치환된다. 전형적으로,  $R^4$ 는  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ , 또는  $C_{1-6}$ -알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$ 로 치환된다.

[0382] 추가 구체예에서  $R^5$ 는 수소,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  또는  $C_{1-6}$ -알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$ 로 치환된다. 전형적으로,  $R^5$ 는  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ , 또는  $C_{1-6}$ -알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$ 로 치환된다.

[0383] 추가 구체예에서 E1은  $-O-$  또는  $-N(R^6)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택된다. 전형적으로, E1은  $-O-$ 로부터 선택된다.

[0384] 추가 구체예에서 E2는  $-O-$  또는  $-N(R^6)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택된다. 전형적으로, E2는  $-O-$ 로부터 선택된다.

[0385] 추가 구체예에서 E1 및 E2는 둘 다  $-O-$ 이다.

[0386] 추가 구체예에서 E1 및 E2는 둘 다  $-N(R^6)-$ 이다.

[0387] 추가 구체예에서 F는 페닐, 피롤리딘-2,5-디온 또는 원자가 결합이다.

[0388] 추가 구체예에서 D1은  $-O-$  또는  $-N(R^6)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택된다. 전형적으로, D1은  $-N(R^6)-$ 로부터 선택된다.

[0389] 추가 구체예에서 D2는  $-O-$  또는  $-N(R^6)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택된다. 전형적으로, D2은  $-N(R^6)-$ 로부터 선택된다.

[0390] 추가 구체예에서 I1은 0-6, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0391] 추가 구체예에서 I2는 0-6, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0392] 추가 구체예에서 I3는 0-6, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0393] 추가 구체예에서 I4는 0-6, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0394] 추가 구체예에서 I5는 0-6, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0395] 추가 구체예에서 I6는 0-6, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0396] 추가 구체예에서 m1은 0-6, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0397] 추가 구체예에서 m2는 0-10, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0398] 추가 구체예에서 m3는 0-5, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.



[0399] 추가 구체예에서 m4는 0-5, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0400] 추가 구체예에서 m5는 0-10, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0401] 추가 구체예에서 m6는 0-5, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0402] 추가 구체예에서 m7은 0-5, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

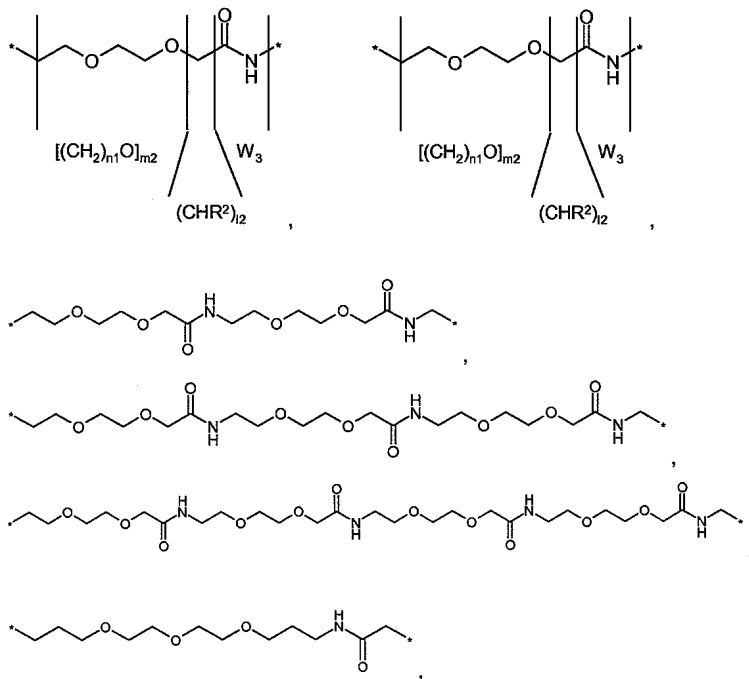
[0403] 추가 구체예에서 n1은 0-10, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0404] 추가 구체예에서 n2는 0-10, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0405] 추가 구체예에서 n3는 0-10, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0406] 추가 구체예에서 n4는 0-10, 예를 들어 0, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이다.

[0407] 추가 구체예에서  $X_1$ 은  $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 이고,  $X_2$ 는  $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 이고, 여기서  $-[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$  및  $-[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 는 하기로부터 선택된다.



[0408] 여기서 \*는 부착점, 즉 열린 결합을 표시하도록 의도된다.

[0410] 추가 구체예에서 상기 친수성 스페이서의 물질량은 80 달톤(D) 내지 1500 D 또는 300 D 내지 1100 D의 범위에 있다.

[0411] 추가 구체예에서 W는 하기 식을 갖는다.

[0412]  $-W_7-Y-$ ,

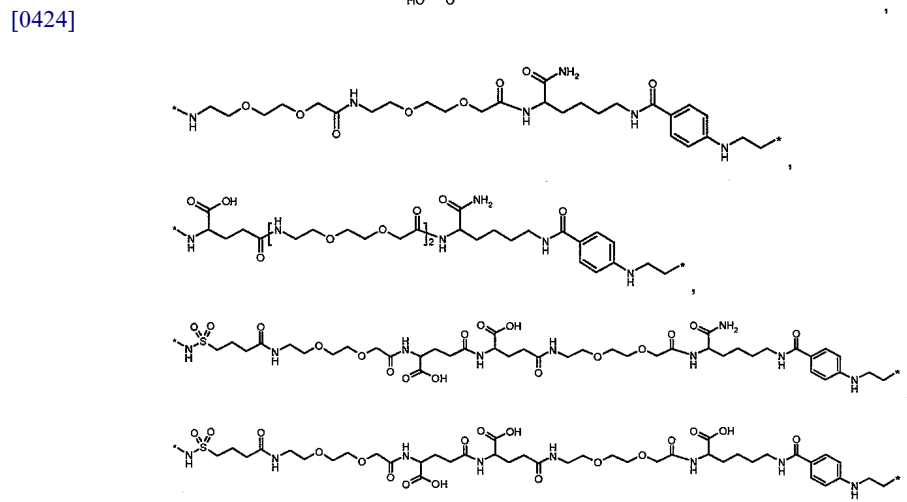
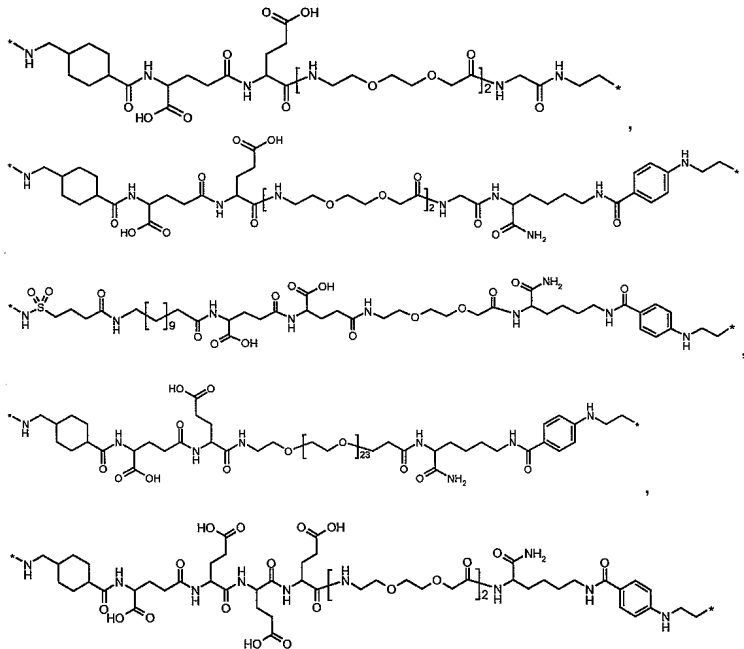
[0413] 여기서

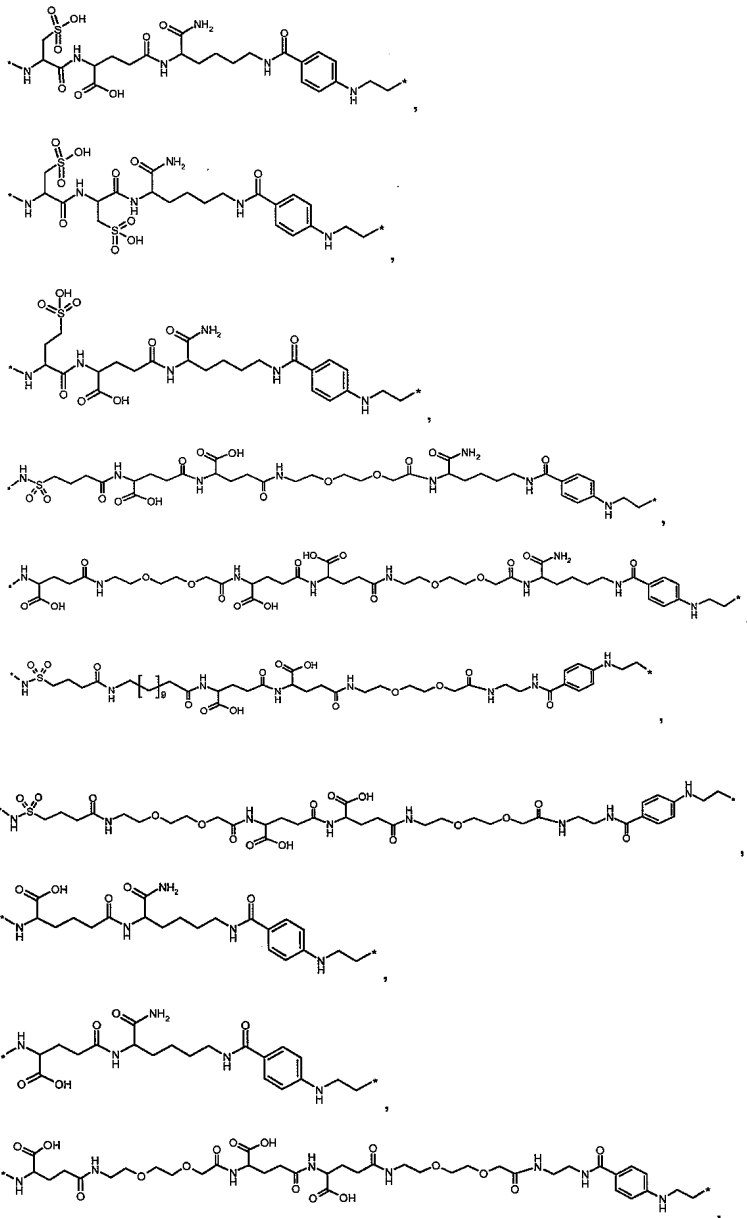
[0414] Y는  $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -시클로알킬- $W_8-$  또는 원자가 결합이고,

[0415] I7은 0-6이고,

[0416]  $W_7$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s3는 0 또는 1이고,

- [0417]  $W_8$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s4$ 는 0 또는 1이다.
- [0418]  $W$ 의 한 구체예에서  $Y$ 는  $-(CH_2)_{17}$ -시클로헥실- $W_8$ -이다.
- [0419] 추가 구체예에서  $Y$ 는 원자가 결합이다.
- [0420] 한 구체예에서  $W_7$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택된다. 전형적으로,  $W_7$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ , 또는  $-C(O)NHS(O)_2$ 로부터 선택된다.
- [0421] 추가 구체예에서  $W_8$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택된다. 전형적으로,  $W_8$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ , 또는  $-C(O)NHS(O)_2$ 로부터 선택된다.
- [0422] 추가 구체예에서  $I7$ 은 0 또는 1이다.
- [0423] 추가 구체예에서 본 발명의 친수성 스페이서(B)는 하기로부터 선택된다.





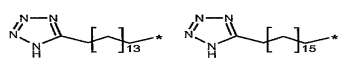
[0428] 여기서 \*는 부착점, 즉 열린 결합을 표시하도록 의도된다.

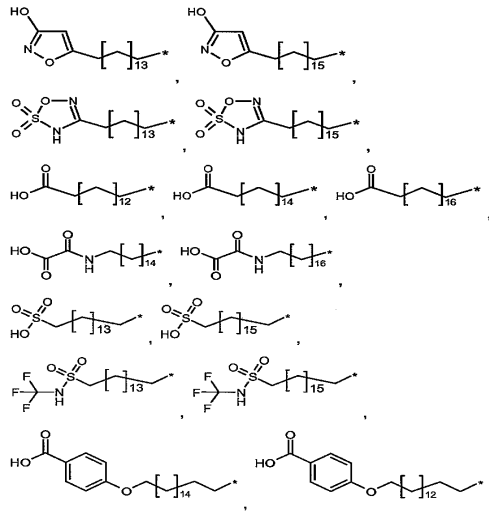
[0429] 본 발명의 성장 호르몬 화합물에 부착된 알부민 결합 잔기(상기 식(I) 또는 (II)에서의 치환체 A)는 친유성 잔기이고, 알부민에 비공유 결합한다. 전형적으로, 알부민 결합 잔기는 생리학적 pH에서 음전하되고, 약 10  $\mu$ M 미만 또는 약 1  $\mu$ M 훨씬 미만인 사람 혈청 알부민과 결합 친화력을 갖는다.

[0430] 본 발명의 성장 호르몬 화합물의 추가 구체예에서 알부민 결합 잔기는 곧은 쇠 알킬기, 분기된 알킬기,  $\omega$ -카르복시산기 또는  $\omega$ -카르복시산 이성질체를 갖는 군으로부터 선택된다. 전형적으로, 알부민 결합 잔기는 6 내지 40개의 탄소 원자를 갖는다. 추가 구체예에서 알부민 결합 잔기는 8 내지 26개의 탄소 원자를 갖는다. 추가 구체예에서 알부민 결합 잔기는 8 내지 20개의 탄소 원자를 갖는다.

[0431] 추가 구체예에서 A는 14 내지 26개의 탄소 원자를 갖고  $\omega$ -카르복시산기를 포함한다. 추가 구체예에서 A는 14 내지 26개의 탄소 원자를 갖고 테트라졸과 같은  $\omega$ -카르복시산 이성질체를 포함한다.

[0432] 추가 구체예에서 A는 하기로부터 선택된다.





[0434]

[0435]

[0436]

여기서 \*는 B 내지 W로의 부착을 표시한다.

친수성 스페이서(B)는 성장 호르몬 화합물(GH)의 위치에서 한개 또는 2개의 알부민 결합 잔기(A)가 성장 호르몬 화합물에 포함되어야 하는지를 조절하기 위해 선택적인 방식에서 바람직하게 도입된다. 친수성 스페이서(B)는 GH 화합물의 아미노산 측쇄에 부착될 수 있다. 이러한 아미노산 측쇄는 GH 화합물의 화학적으로 변형된 아미노산 측쇄일 수 있다. 또 다른, 이러한 아미노산 측쇄는 GH 화합물의 효소로 변형된 아미노산 측쇄일 수 있다. 바람직하게, 트랜스글루타미나제는 친수성 스페이서를 SEQ ID NO:1에서의 위치 40 또는 위치 141에 대응하는 위치에서의 글루타민 잔기에 도입하기 위해 사용된다. 친수성 스페이서를 선택적으로 도입하는 다른 방식은 hGH(SEQ ID NO:1)와 같은 성장 호르몬 화합물의 N-말단 잔기에 있다.

[0437]

식(I)의 성장 호르몬 접합체에서 분절 A-W-B는 선형 또는 분기될 수 있다. 한 구체예에서, A-W-B는 선형 펩티드가 아니다.

[0438]

추가 구체예에서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 SEQ ID NO:1에서의 위치 40에 대응하는 위치에서의 글루타민 잔기에 부착된다.

[0439]

추가 구체예에서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 SEQ ID NO:1에서의 위치 141에 대응하는 위치에서의 글루타민 잔기에 부착된다.

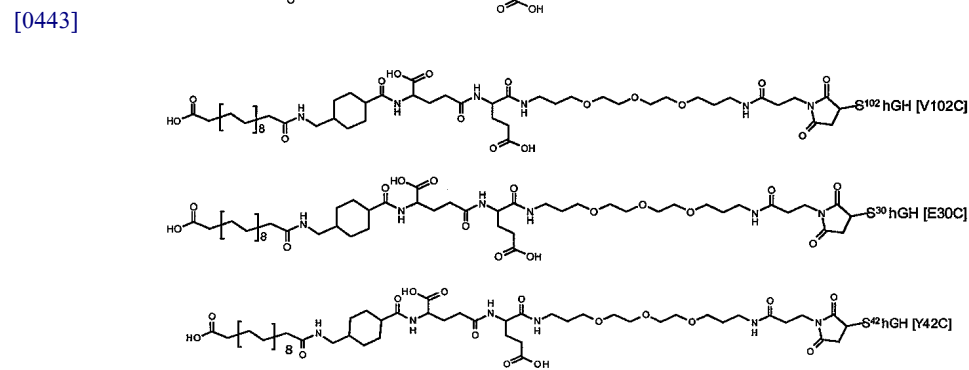
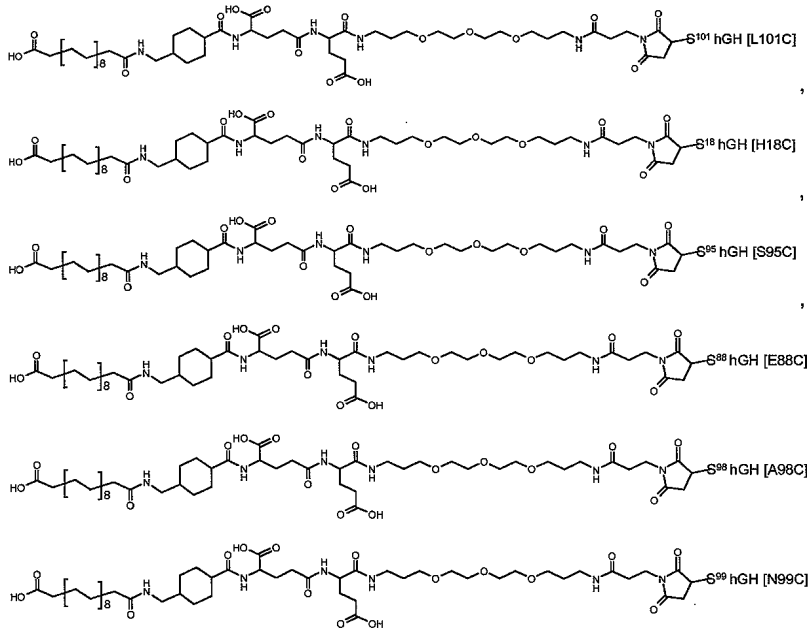
[0440]

추가 구체예에서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 hGH(SEQ ID NO:1)와 같은 성장 호르몬 화합물의 N-말단 잔기에 부착된다.

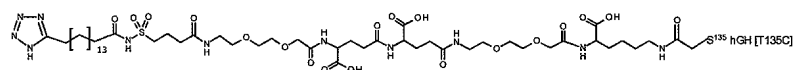
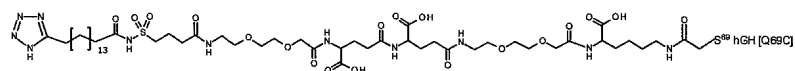
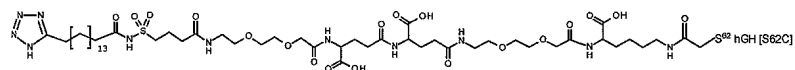
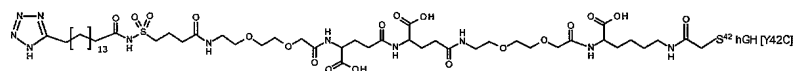
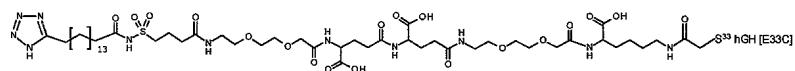
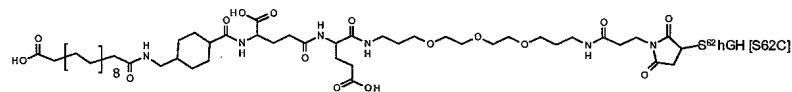
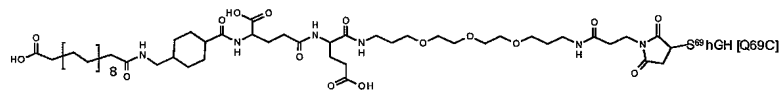
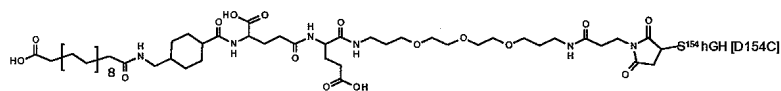
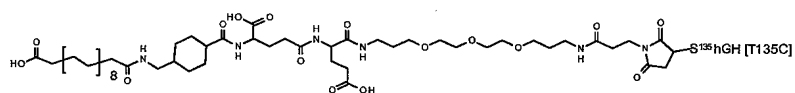
[0441]

추가 구체예에서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 위치 40, 위치 141에 대응하는 위치에서의 글루타민 잔기 및 hGH(SEQ ID NO:1)와 같은 성장 호르몬 화합물의 N-말단 잔기에 부착된다.

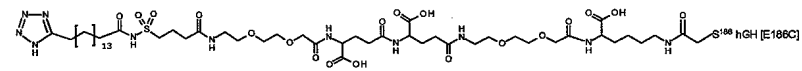
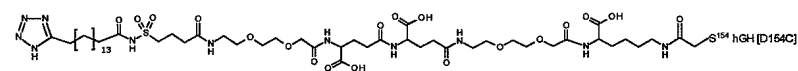
[0442] 본 발명의 성장 호르몬 접합체는 하기로부터 선택된다.



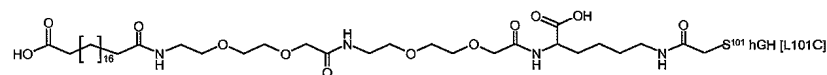
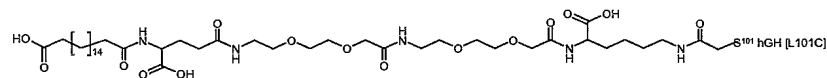
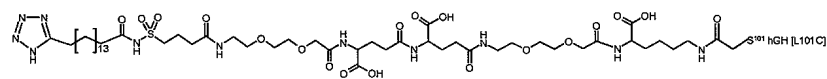
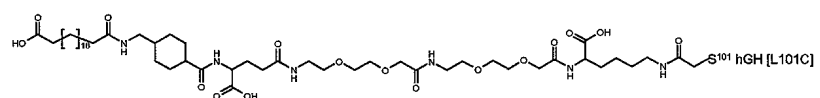
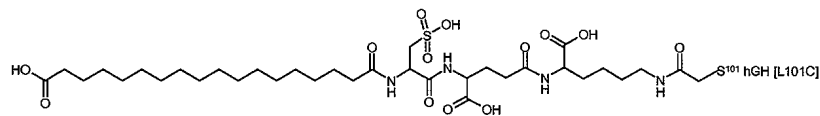
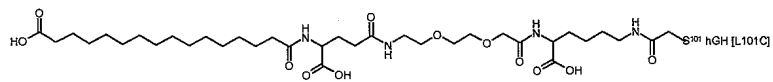
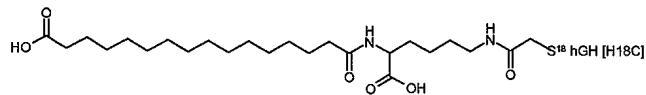
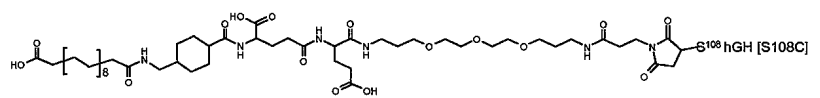
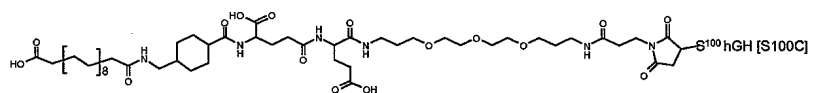
[0444]



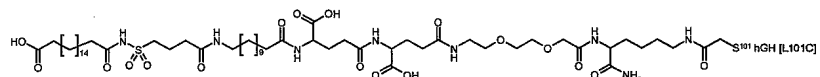
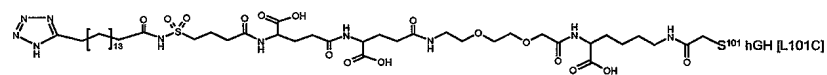
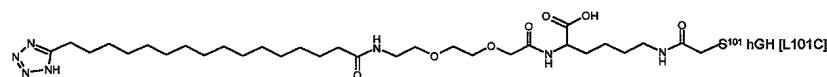
[0445]



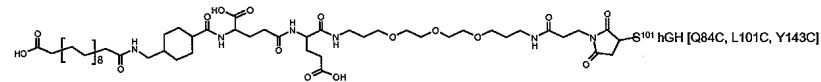
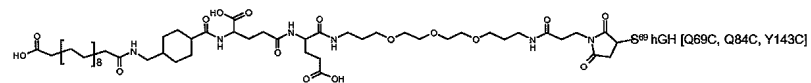
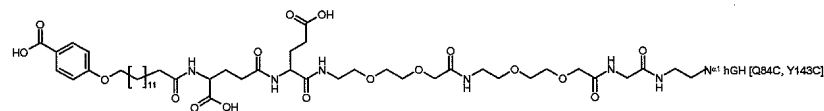
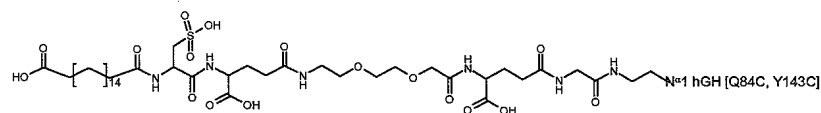
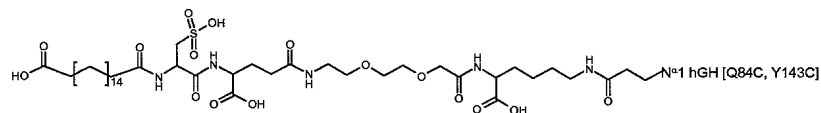
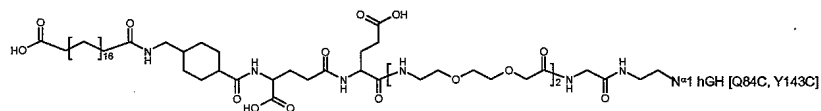
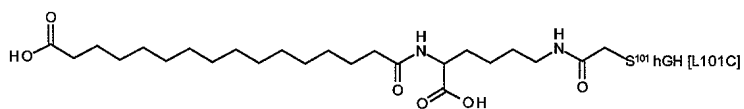
[0446]



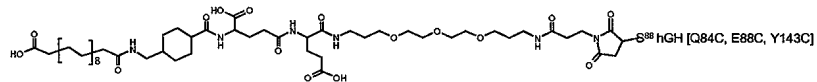
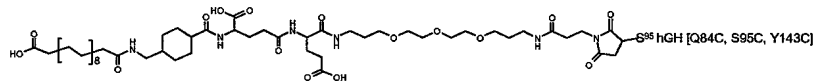
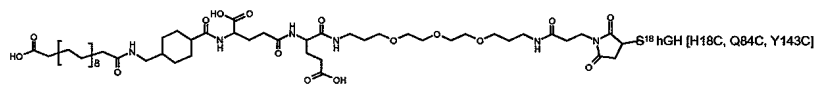
[0447]



[0448]

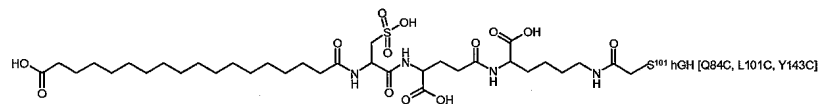
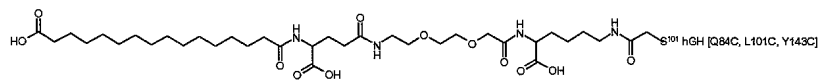
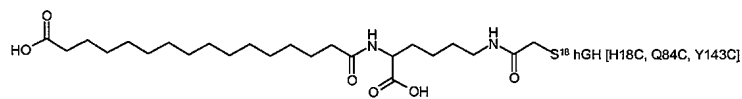
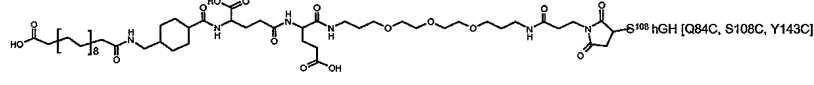
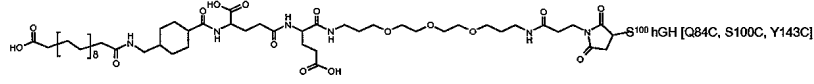
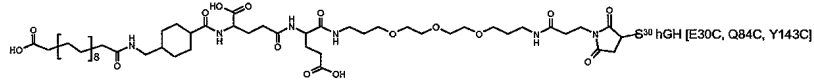
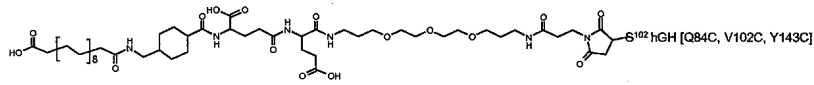
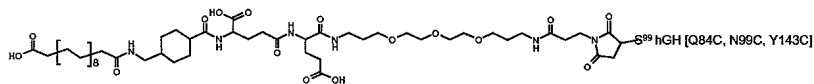
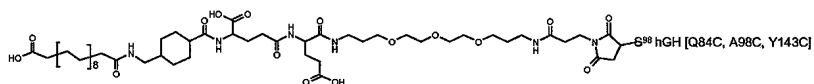


[0449]

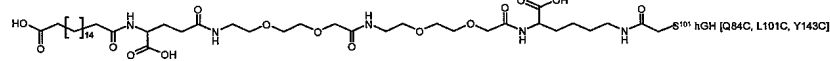
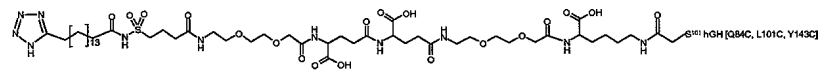
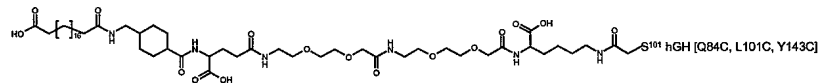


[0450]

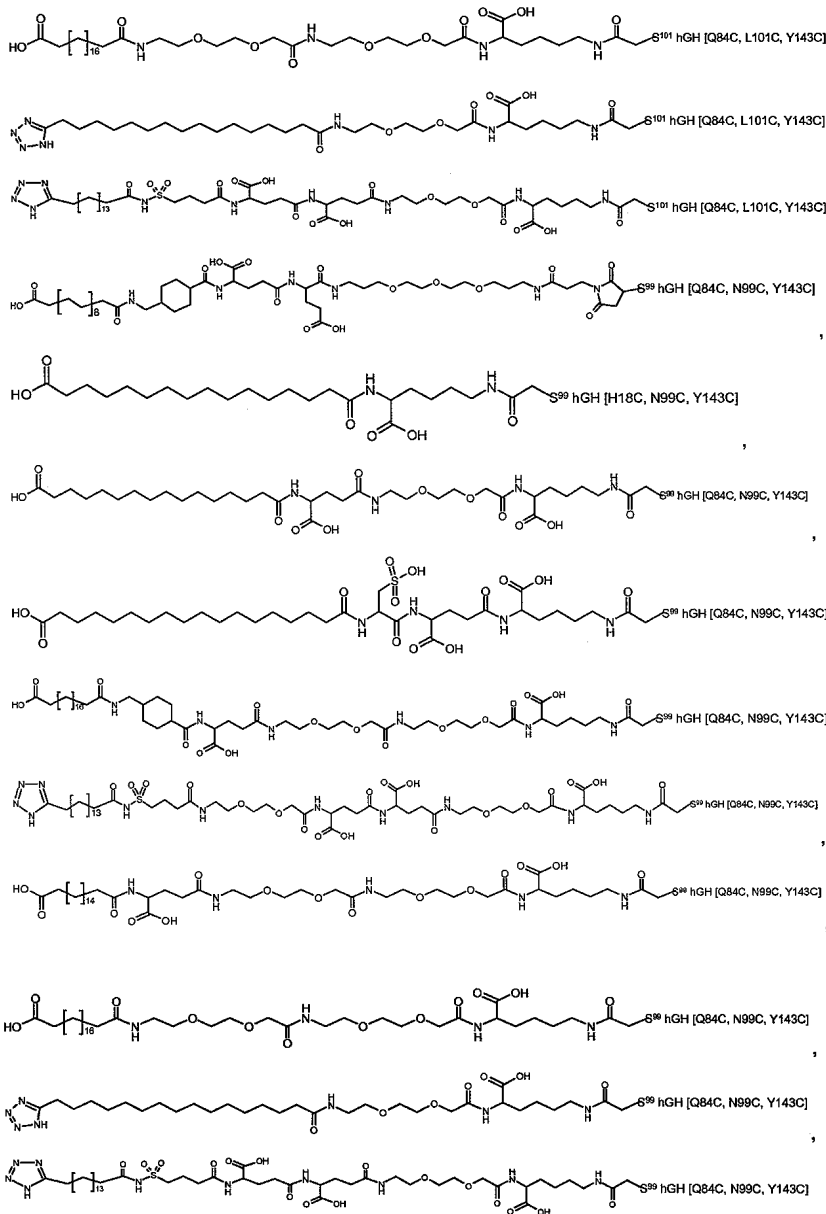




[0451]



[0452]



[0453]

[0454]

[0455]

추가 양태에서 본 발명은 본원에 기술된 성장 호르몬 화합물(GH)과 같은 성장 호르몬 변종에 관한 것이다. 성장 호르몬 변종은 성장 호르몬 접합체의 제조에서 치료제 또는 중간체로서 유용할 수 있다. 성장 호르몬 화합물을 본 분야에 알려진 또는 본원에 기술한 바와 같은 제조합체 방법에 의해 제조할 수 있다. 한 구체예에서 성장 호르몬 변종은 용해성이 있다.

[0456]

추가 양태에서 본 발명은, 본원에 기술한 성장 호르몬 변종을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0457]

한 구체예에서 조성물은 P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C로 구성된 군으로부터 선택된 단일 Cys 돌연변이를 포함하는 성장 호르몬 변종을 포함한다.

[0458]

본 발명의 한 구체예에서 조성물의 성장 호르몬 변종은 단일 Cys 돌연변이를 성장 호르몬 화합물의 N-말단(AA 1-8), 나선 1, 루프 1, 나선 2, 루프 2 또는 나선 3에 가진다.

[0459]

한 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 N-말단에서 P5C, S7C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다. 한 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 H1(AA 9-35에 대응함)에서 D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다. 한 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 L1(AA36-71에 대응함)에서 K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C의 어떤 하나와 같은 또는 바람직하게 Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다. 한 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 H2(AA 72-98)에서 E88C, Q91C, S95C 및 A98C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다. 한 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 AA 99-127 내에

위치된다. 한 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 L2(AA 99-106)에서 N99C, S100C, L101C, V102C 및 Y103C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다. 한 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 H3(AA 107-127)에서 hGH(SEQ ID NO:1)의 D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C의 어떤 하나와 같고, 혹은 L3 또는 H4(AA128-154 및 AA155-184에 대응함)에서 돌연변이는 E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C의 어떤 하나와 같고, 혹은 C-말단에서 돌연변이는 E186C G187C 및 G190C의 어떤 하나와 같은 곳에서 위치된다. 단일 Cys 돌연변이가 hGH 변종에 존재하는 경우, 돌연변이는 대응하는 아미노산 잔기에 위치된다. 추가 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 hGH에서의 AA 93-106 또는 hGH 변종에서의 대응하는 잔기 내에 위치된다. 추가로 명시된 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 AA 99-106 또는 AA 99-104 또는 대응하는 잔기와 같은 L2 내에 위치된다.

[0460] 한 구체예에서 본 발명에 따른 조성물은 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함하는 성장 호르몬 변종을 포함한다. 한 구체예에서 단일 Cys 돌연변이는 상기 기술된 단일 Cys 돌연변이의 어떤 하나이다. 한 구체예에서 GH에서의 단일 Cys 돌연변이는 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 및 G190C의 어떤 하나, 예를 들어 hGH(SEQ ID NO:1) 또는 대응하는 잔기의 P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C의 어떤 하나로부터 선택된다. 한 구체예에서 추가의 이황화 결합은 시스테인 돌연변이쌍들의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C의 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서 성장 호르몬 변종은 단일 시스테인 및 추가의 이황화 결합을 포함하고, 추가의 이황화 결합은 시스테인 돌연변이쌍의 S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C 및/또는 S85C/S144C의 군으로부터 선택된다.

[0461] 한 구체예에서 성장 호르몬 변종은 L2에서의 단일 시스테인 돌연변이 및 추가의 이황화 결합을 포함하고, 추가의 이황화 결합은 나선 B 또는 나선 2(AA 72-98에 대응함)와 같은 나선 부분을 갖는 아미노산 잔기 128-154(H3)로부터 루프 부분과 연결한다. 한 구체예에서 성장 호르몬 변종은 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 및 C102C/S85C/S144C의 군으로부터 선택된 변형의 조합을 포함한다. 한 구체예에서 성장 호르몬 변종은 A98C/Q84C/Y143C, N99C/Q84C/Y143C, S101C/Q84C/Y143C, L101C/Q84C/Y143C 및 C102C/Q84C/Y143C의 군으로부터 선택된 변형의 조합을 포함한다. 한 구체예에서 성장 호르몬 변종은 변형 L101C, Q84C 및 Y143C를 포함한다.

[0462] 추가 양태에서 본 발명은, 치료에서 사용하기 위해, 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기에 연결된 성장 호르몬 화합물(GH)을 포함하는 성장 호르몬 접합체 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다. 게다가, 본 발명 GH의 성장 호르몬 접합체에서, 알부민 결합 잔기, 및 친수성 스페이서는 상기 구체예의 어떤 하나로부터 선택되고, 구체적으로 성장 호르몬 접합체는 식(I) 또는 (II)를 갖는다.

[0463] 추가 양태에서 본 발명은 선택적으로 약학적 허용가능한 부형제와 조합된 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기에 연결된 성장 호르몬 화합물을 포함하는 성장 호르몬 접합체 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0464] 용어 "동일성"은, 본 분야에 알려진 2개 이상의 단백질 서열 사이의 관계를 의미하고, 서열을 비교함으로써 측정된다. 본 분야에서, "동일성"은 또한 단백질 사이의 서열 관련 정도를 의미하고, 2개 이상의 아미노산 잔기의 스트링(string) 사이에 일치되는 수에 의해 측정된다. "동일성"은 구체적인 수학 모형 또는 컴퓨터 프로그램(즉, "알고리즘")에 의해 다뤄진 끊임 정렬(어떤 경우)을 갖는 더 작은 2개 이상의 서열 사이의 동일한 일치를 백분율로 측정한다. 관련된 단백질의 동일성은 알려진 방법에 의해 쉽게 계산될 수 있다. 이들 방법은 Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press,

New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; 및 Carillo et al., *SIAM J. Applied Math.*, **48**, 1073,(1988)에 기술된 것들을 포함하나 제한되지 않는다.

- [0465] 동일성을 측정하는 바람직한 방법은 시험된 서열 사이의 가장 큰 일치치를 주기 위해 디자인된다. 동일성을 측정하는 방법은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 프로그램에 기술된다. 2개의 서열 사이의 동일성을 측정하는 바람직한 컴퓨터 프로그램 방법은 GAP(Devereux et al., *Nucl. Acid. Res.*, **12**, 387,(1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, 및 FASTA(Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410,(1990))를 포함하는 GCG 프로그램 패키지를 포함한다. BLASTX 프로그램은 National Center for Biotechnology Information(NCBI) 및 다른 공급원(BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., *supra*)으로부터 공개적으로 이용가능하다. 잘 알려진 Smith Waterman 알고리즘도 동일성을 측정하기 위해 사용할 수 있다.
- [0466] 예를 들어, 컴퓨터 알고리즘 GAP(Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)를 사용하여, 백분율 서열 동일성을 측정하기 위한 2개의 단백질은 그것들 각각의 아미노산의 최적 일치치를 위해 배열된다("일치된 스패(span)", 알고리즘에 의해 측정된 바와 같음). 꿇김 별점(평균 대각선을 3번 계산함 ; "평균 대각선"은 사용된 비교 매트릭스의 대각선 평균임; "대각선"은 구체적인 비교 매트릭스에 의해 각 완벽한 아미노산 일치에 할당된 스코어 또는 수입) 및 꿇김 확장 별점(보통 꿇김 별점의 {분율(1/10)}번), 그뿐만 아니라 PAM 250 또는 BLOSUM 62와 같은 비교 매트릭스를 알고리즘과 함께 사용했다. 표준 비교 매트릭스(PAM 250 비교 매트릭스를 위한 Dayhoff et al., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5, suppl. 3,(1978); BLOSUM 62 비교 매트릭스를 위한 Henikoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **89**, 10915-10919,(1992) 참고)도 또한 알고리즘에 의해 사용된다.
- [0467] 단백질 서열 비교를 위한 바람직한 파라미터는 알고리즘: Needleman et al., *J. Mol. Biol*, **48**, 443-453,(1970)); 비교 매트릭스: BLOSUM 62 from Henikoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10915-10919,(1992); 꿇김 별점: 12, 꿇김 길이 별점: 4, 유사성의 한계점: 0을 포함한다.
- [0468] 꿇김 프로그램은 상기 파라미터와 함께 유용하다. 상기 언급된 파라미터는 꿇김 알고리즘을 사용하는 단백질 비교(단부 꿇김의 별점 없이)를 위한 디폴트 파라미터이다.
- [0469] 본 발명의 화합물은 모 화합물로서도 언급된 대응하는 비접합 성장 호르몬과 비교된 개선된 약학 성질을 갖는다. 이들 약학의 성질의 예는 생체 내 반감기의 기능, 면역원성, 신장 여과, 프로테아제 보호 및 알부민 결합을 포함한다.
- [0470] 용어 "생체 내 반감기의 기능"은 그것의 정상 의미, 즉, GH 또는 GH 접합체의 생물학적 활성의 50%가 신체/타겟 장기에 여전히 존재하는 시간, 또는 GH 또는 GH 접합체의 활성이 초기 값의 50%인 시간에서 사용된다. 생체 내 반감기의 기능을 측정하는 대안으로서, "생체 내 혈장 반감기"를, 즉 GH 또는 GH 접합체의 50%가 혈장 또는 혈류에서 맑아지기 전에 순환하는 시간으로 측정할 수 있다. 혈장 반감기의 측정은 종종 측정하는 작용 반감기보다 더 간단하고, 혈장 반감기의 규모는 보통 생체 내 반감기 작용 규모의 양호한 표시이다. 혈장 반감기의 선택적인 용어는 혈청 반감기, 순환하는 반감기, 혈액순환 반감기, 혈청 제거율, 혈장 제거율, 및 제거율 반감기를 포함한다.
- [0471] 생체 내 반감기의 기능 또는 혈장 반감기와 관련되어 사용된 용어 "증가된"은 GH 접합체의 관련 반감기가 비교 할만한 상태 하에서 측정된 모 GH의 그것에 비례하여 통계적으로 상당히 증가되었다는 것을 나타내기 위해 사용된다. 예를 들어, 관련 반감기는 적어도 약 50%와 같은 적어도 약 25%, 예를 들어 적어도 약 100%, 150%, 200%, 250% 또는 500%로 증가될 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 모 GH의 반감기에 비례하여 적어도 약 5 시간, 바람직하게 적어도 약 24시간, 더 바람직하게 적어도 약 72시간, 및 가장 바람직하게 적어도 약 7일의 반감기에서의 증가를 나타낸다.
- [0472] 생체 내 혈장 반감기의 측정을, 문헌에 기술된 복수의 방식에서 수행할 수 있다. 생체 내 혈장 반감기의 증가는 제거율(CL) 감소 또는 평균 체류시간(MRT)의 증가로서 정량화될 수 있다. CL이 적합한 분석에서 측정된 모 GH의 CL의 70% 미만, 예를 들어 50% 미만, 20% 미만, 10% 미만으로 감소되기 위한, 본 발명의 접합 GH는 증가된 생체 내 혈장 반감기를 갖는 것으로 언급된다. MRT가 적합한 어세이에서 모 GH MRT의 130% 이상, 예를 들어 150% 이상, 200% 이상, 500% 이상 증가되기 위한, 본 발명의 접합 GH는 증가된 생체 내 혈장 반감기를 갖는 것으로 언급된다. 제거율 및 평균 체류 시간은 적합한 시험 동물을 사용하여 표준 약동학 연구에서 평가될 수 있다. 주어

진 단백질을 위한 적합한 시험 동물을 선택하는 것은 당업자의 능력 내에 있다. 물론, 임상 시험은 최종 시험을 나타낸다. 적합한 시험 동물은 정상, Sprague-Dawley 수컷 래트, 마우스 및 게잡이 원숭이를 포함한다. 전형적으로 마우스 및 래트는 단일 피하의 볼루스(bolus)에서 주사되는 반면, 원숭이는 단일 피하의 볼루스 또는 단일 정맥 투여에서 주사될 수 있다. 주사된 양은 시험 동물에 의존한다. 후속으로, 혈액 샘플은 CL 및 MRT의 평가를 위해 적절한 1 내지 5일의 기간 내에 인계받는다. 혈액 샘플을 ELISA 기술에 의해 편리하게 분석한다.

[0473] 용어 화합물의 "면역원성"은, 체액, 세포, 또는 둘 다의 해로운 면역 반응을 끌어내기 위해 사람에게 투여될 때, 화합물의 능력을 의미한다. 어떤 인류 소집단에서, 구체적으로 투여된 단백질에 민감성을 나타내는 개체가 존재할 수 있다. 면역원성을, 종래 방법을 사용하여 민감한 개체에서 성장 호르몬 항체 및/또는 성장 호르몬 반응 T-세포의 존재를 정량함으로써 측정할 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 접합 GH는 모 GH의 민감한 개체의 면역원성에 비례하여 적어도 약 10%, 바람직하게 적어도 약 25%, 더 바람직하게 적어도 약 40% 및 가장 바람직하게 적어도 약 50%의 그 개체에서 면역원성 감소를 나타낸다. 용어 "프로테아제 보호" 또는 "보호된 프로테아제"는, 본원에 사용한 본 발명의 접합 GH가 모 GH보다 혈장 펩티다제 또는 프로테아제에 더 저항한다는 것이 나타난다고 의도된다. 혈장에 존재하는 프로테아제 및 펩티다제 효소는, 예를 들어 순환하는 펩티드 호르몬, 성장 호르몬과 같은 순환 단백질의 분해에 포함된다고 알려져 있다. 이러한 프로테아제 보호를, 본원에 기술된 실시예 A의 방법에 의해 측정할 수 있다.

[0474] 성장 호르몬은, 예를 들어 트롬빈, 플라스민, 서브틸리신, 및 키모트립신 유사 세린 프로테아제에 의한 분해에 민감할 수 있다. 이들 프로테아제 분해의 측정을 위한 어세이는 *J. Biotech.*, **65**, 183, (1998)에 기술된다. 한 구체예에서, GH 접합 가수분해의 비율은 모 GH의 70% 미만, 예를 들어 40% 미만, 10% 미만이다.

[0475] 포유류의 순환 혈액에서 가장 풍부한 단백질 성분은 혈청 알부민이며, 이것은 전체 혈액의 100 밀리리터 당 약 3 내지 4.5 그램의 농도에서 보통 존재한다. 혈청 알부민은 혈액순환 시스템에서 몇 가지 중요한 기능을 갖는 약 65,000 달톤의 혈액 단백질이다. 그것은 혈액에서 발견된 여러 가지 유기 분자의 운반체로서, 혈액을 통한 지방산 및 빌리루빈과 같은 다양한 대사산물의 주된 운반체로서, 그리고 그것의 존재비 때문에 순환 혈액의 삼투 조절 장치로서 기능한다. 혈청 알부민은 일주일 이상의 반감기를 갖고, 단백질의 혈장 반감기를 증가시키는 한가지 접근은 혈청 알부민과 결합하는 단백질 군과 결합되었다. 알부민 결합 성질을 *J. Med. Chem.*, **43**, 1986, (2000)에 기술된 바와 같이 측정할 수 있고, 본원에 참고로 포함된다.

[0476] 식(I) 또는 (II)의 성장 호르몬 접합체는 성장 호르몬 활성을 행사하고, 성장 호르몬을 순환하는 양을 증가하는데 유의한 질환 또는 상태의 치료에 사용할 수 있다. 구체적으로, 본 발명은 성장 호르몬 결핍(GHD); 터너 증후군; 프레더-윌리 증후군(PWS); 누난 증후군; 다운 증후군; 만성 신장 질환, 소아류머티스 관절염; 낭포성섬유증, HAART 치료를 받는 아동의 HIV-감염(HIV/HALS 아동); 만성 부당경량아로 출생한 저신장증 환자(SGA); 저출생 체중으로 출생한 저신장증 환자(VLBW)(SGA 아님); 선천성 골이형성증; 연골저형성증; 연골무형성증; 저신장증(ISS); 성인의 GHD; 장골, 같은 경골, 비골, 대퇴골, 상완골, 요골, 척골, 쇄골, 중수골, 중족골, 및 손발가락의 또는 안의 골절; 손 및 음식 기저의 두개골과 같은 해면골의 또는 안의 골절; 예를 들어 손, 무릎, 또는 어깨의 힘줄 또는 인대 수술 후의 환자; 신연골형성술을 갖는 또는 받는 환자; 무릎, 골반, 어깨, 팔꿈치, 손목 또는 턱과 같은 곳에 골반 또는 디스크 복위술, 반월상연골판 봉합술, 척추융합술 또는 보철물 고정술 후의 환자; 네일, 스크류 및 플레이트와 같은 골접합 물질로 고정된 환자; 골절의 불유합 또는 부정유합이 있는 환자; 예를 들어 경골 또는 엄지발가락의 골절술 후의 환자; 그라프트 이식 후의 환자; 트라우마 또는 관절염에 의해 야기된 무릎의 관절 연골 악화; 터너 증후군이 있는 환자의 골다공증; 남성 골다공증; 만성 투석의 성인 환자(APCD); APCD에서의 영양실조 관련 심혈관질환; APCD에서의 악액질 역전; APCD에서의 암; 만성 폐쇄성 폐질환; APCD에서의 HIV; APCD가 있는 노인; APCD에서의 만성 간질환, APCD에서의 피로 증후군; 크론병; 손상된 간 기능; HIV 감염이 있는 남성; 짧은장자 증후군; 복부비만; HIV 연관 지방이상발육 증후군(HALS); 남성 불임; 주요한 대기 수술, 알코올/약물 중독 치료 또는 신경성 트라우마 후의 환자; 노화; 노쇠 노인; 퇴행성 관절염; 트라우마로 손상된 연골; 발기부전; 섬유근육통; 기억 장애; 우울증; 외상성 뇌손상; 지주막하 출혈; 저출생 체중; 대사 증후군; 클루코코르티코이드 근육병; 또는 클루코코르티코이드 치료로 인한 환자의 저신장증의 치료 방법을 제공하고, 방법은 식(I) 또는 (II)에 따라 성장 호르몬 접합체의 치료적으로 효과적인 양을 필요로하는 환자에게 투여를 포함한다.

[0477] 추가 양태에서, 본 발명은 근육 조직, 신경 조직 또는 상처 치료의 가속화; 손상된 조직에 혈류의 가속화 또는 개선; 혹은 손상된 조직의 감염 비율의 감소 방법을 제공하고, 방법은 식(I) 또는 (II)에 따라 성장 호르몬 접합체의 치료적으로 효과적인 양을 필요로하는 환자에게 투여를 포함한다.



- [0478] 추가 구체예에서, 본 발명은 상기 언급된 질환과 같은 성장 호르몬 혈장 수준에서의 증가에 유익한 질환의 제조에서 식(I) 또는 (II)의 성장 호르몬 접합체의 사용에 관한 것이다.
- [0479] 전형적인 주사 용량은  $10^{-9}$  mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 체중당 투여량 범위에 있다. 전형적인 투여량은 약 0.0000001 내지 약 10 mg/kg의 체중당 투여량이다. 정확한 용량은, 예를 들어 표시, 약물, 빈도 및 투여 방식, 치료 대상의 성별, 나이 및 일반적인 상태, 치료된 질환 또는 상태의 본질 및 심각도, 당업자에게 분명한 치료 및 다른 요인의 바람직한 효과에 의존할 것이다.
- [0480] 전형적인 투여 빈도는 1일 2회, 1일 1회, 격일로, 주 2회, 주 1회 또는 훨씬 더 긴 투여 간격이다. 본 발명 용합 단백질의 연장된 반감기로 인한, 주 2회, 주 1회 또는 훨씬 더 긴 투여 간격과 같은 긴 투여 간격의 투여 체계는 본 발명 특정 구체예이다.
- [0481] 많은 질환은 부수적인 투여 또는 후속 투여 치료에서 한가지 이상의 약물을 사용하여 치료된다. 따라서 식(I) 또는 (II)의 성장 호르몬 접합체를, 상기 질환 치료에서 보통 사용된 하나 이상의 다른 치료적 활성 화합물(들)과 결합하여, 상기 언급된 질환 중 하나의 치료를 위한 치료적 방법에서 사용하는 것은 본 발명의 범위 내에 있다. 유추에 의해, 식(I) 또는 (II)의 성장 호르몬 접합체를, 상기 언급된 질환 중 하나의 치료에서 보통 사용된 다른 치료적 활성 화합물과 결합하여, 상기 질환의 약물 제조에서, 사용하는 것은 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0482] **일반적인 방법**
- [0483] **효소 접합:**
- [0484] 본 발명의 성장 호르몬 접합체 제조에서, 식(I)의 A-W-B-GH 접합체 제조에 설정된 전형적으로 적어도 하나의 공유 결합은 하기 실시예에 도시한 효소의 사용에 의해 제조된다. 이러한 효소는, 예를 들어 트랜스클루타미나제, 세린 프로테아제 및 시스테인 프로테아제로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 전형적으로, 상기 효소는 트랜스클루타미나제이다. 이러한 트랜스클루타미나제는, 예를 들어 미생물 트랜스클루타미나제, 조직 트랜스클루타미나제 및 요인XIII 및 그것의 변종으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 효소는 시스테인 프로테아제이다. 본 발명의 성장 호르몬 접합체는 많은 다른 방법에 의해 제조될 수 있고, 비제한 예는 하기에 나타난다.
- [0485] 또한, 본 발명은 식(I)의 A-W-B-GH 접합체 제조 방법을 제공한다.
- [0486] **트랜스클루타미나제**
- [0487] 상기 언급된, 본 발명의 A-W-B-GH 접합체 제조에서 설정된 공유결합의 적어도 하나는 트랜스클루타미나제 사용에 의해 제조될 수 있다. 트랜스클루타미나제는, 예를 들어 *Streptomyces* 종; *S. mobaraense*, *S. cinnamomeum*, *S. griseocarneum*(US5156956, 본원에 참고로 포함됨), *S. lavendulae*(US5252469, 본원에 참고로 포함됨) 및 *S. ladakanum*(JP2003/199569, 본원에 참고로 포함됨)으로부터 분리된 미생물 트랜스클루타미나제를 포함할 수 있다. 다른 유용한 미생물 트랜스클루타미나제는 *Bacillus subtilis*(US5731183에 개시되며, 본원에 참고로 포함됨) 및 다양한 점균류로부터 분리되었다. 유용한 미생물 트랜스클루타미나제의 다른 예는 W01996/06931(예를 들어, *Bacillus lylidicus*로부터의 트랜스클루타미나제) 및 W01996/22366개시된 것들이며, 둘 다 본원에 참고로 포함된다. 유용한 비미생물 트랜스클루타미나제는 편평어 *Pagrus major*(EP0555649에 개시되며, 본원에 참고로 포함됨), 및 굴 *Crassostrea gigas*(US5736356에 개시되며, 본원에 참고로 포함됨)와 같은 다양한 해양 공급원으로부터의 트랜스클루타미나제 및 기니아 피그의 간 트랜스클루타미나제를 포함한다. 기능 유사체 및 그것의 유도체도 유용할 수 있다.
- [0488] 전형적으로, 본 발명의 방법에서 사용된 TGase는 미생물 트랜스클루타미나제이다. 한 구체예에서, TGase는 *S. mobaraense* 또는, 예를 들어 W02007/020290 및 W02008/020075에서 기술된 그것의 변종으로부터 있다. 다른 구체예에서, TGase는 *S. ladakanum* 또는, 예를 들어 W02008/020075에서 기술된 그것의 변종으로부터 있다.
- [0489] 본 발명에 따른 GH의 A-W-B와의 접합은, GH 화합물 서열의 특정 리신(Lys) 또는 글루타민(Gln) 위치에서 사용된 기질에 따라 선택적인 교체를 이끄는, TGase-매개 변형에 의해 달성될 수 있다. 기질로서 아민의 사용은 글루타민의 변형을 이끄는 반면, 일차 아미드의 사용은 리신의 변형을 이끌 것이다. hGH(SEQ ID NO: 1)는 위치 38, 41, 70, 115, 140, 145, 158, 168 및 172에서 9개의 리신 잔기, 위치 22, 29, 40, 46, 49, 68, 69, 84, 91, 122, 137, 141 및 181에서 13개의 글루타민 잔기를 가지며, 모든 이들이 변형에 쉽게 이용가능하지도 않고 변형에 적합하지도 않지만, 이것은 성장 호르몬 결합 단백질에 감소된 결합 효능을 이끌고, 따라서 감소된 생물학적

활성을 이끈다. hGH와 그것의 결합 단백질(pdb:3HHR) 사이의 x-선 단백질 결정 구조는, 적어도 4개의 리신(38, 41, 168 및 172)이 결합 단백질 및 잠재적으로 글루타민(Gln 46)의 하나에만 결합하는 단계에 참여한다고 나타낸다. 이것은 알부민 바인더 링커의 선택적인 도입을 위한 타겟으로서 더 매력적인 글루타민을 제공한다. 이들 구조상의 고려는, N. Chene *et al.*, *Reprod. Nutr. Develop.* **29**, 1-25(1989)의 요약된 결과에 의해 더 지지되고, 이것은, 리신에 영향을 주는 화학적 변형이 GH의 간 수용체와의 생체 내 생물학적 활성 및 결합 능력에 부정적 효과를 갖는다고 발견되었다는 결론을 내렸다.

[0490] **화학I**

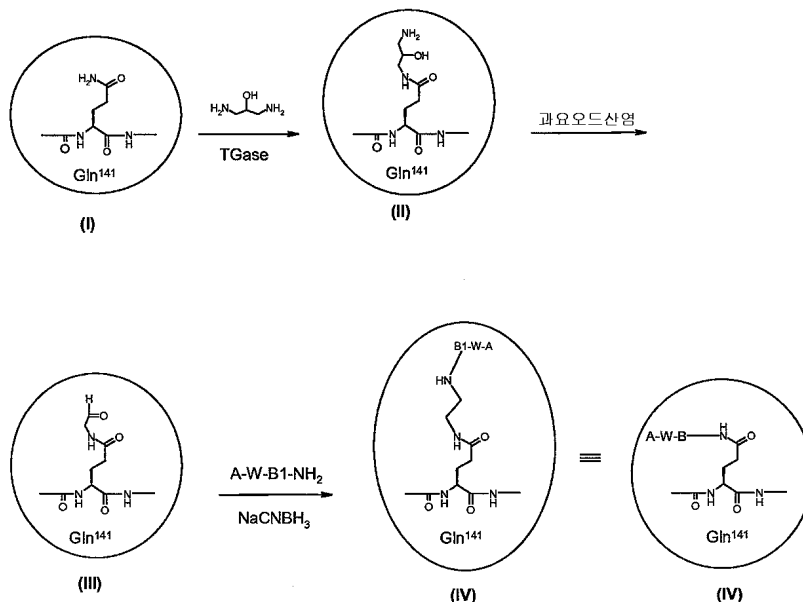
[0491] 한 양태에서 본 발명은 식(I) 성장 호르몬 접합체의 제조에 관한 것으로, GH 화합물은 TGase 촉매 화학을 사용하여 성질-변형군으로 치료된다. 초기에, 알데히드 또는 케톤 관능성은 아미노 알코올을 사용하는 2단계 반응에 의해 설치되고, 아미노 알코올은 후속으로 과요오드산염으로 처리되어 알데히드 또는 케톤 관능성을 산화 절단에 의해 생성한다. 도시를 위한 아미노 알코올의 비제한 예는 1,3-디아미노-2-프로판올 및 1-아미노-2,3-디히드록시프로판 만을 포함한다.

[0492] 추가 양태에서 본 발명은 식(I)의 성장 호르몬 접합체의 제조에 관한 것으로, 식(I)은 성질-변형군-유도 아닐린 또는 헤테로아릴 아민과 함께 GH 화합물로부터 유도된 알데히드 또는 케톤의 처리를 포함하여 아민(III → IV)을 얻는다.

[0493] 한 구체예에서, GH 화합물로부터 유도된 알데히드는 성질-변형군-유도 아닐린 또는 헤테로아릴아민으로 처리된다.

[0494] 용어 "GH 화합물 유도된 알데히드(또는 케톤)" 또는 "GH 화합물로부터 유도된 알데히드 또는 케톤"은 알데히드 또는 케톤 관능기가 공유적으로 부착된 GH 화합물, 혹은 알데히드 또는 케톤 관능기가 생성된 GH 화합물을 나타내는 것으로 의도된다. 아래에 도시한 화합물(III)과 같은 GH 화합물-유도 알데히드의 제조는 당업자에게 잘 알려져있고, 이들 알려진 절차의 어떤 것은 본원에 개시된 본 발명의 달성을 위해 필요한 GH 화합물-유도 알데히드(III)를 제조하는데 사용할 수 있다.

[0495] 한 구체예에서, 접합체 A-W-B-GH(IV)는 아래 도시한 바와 같이 제조된다:

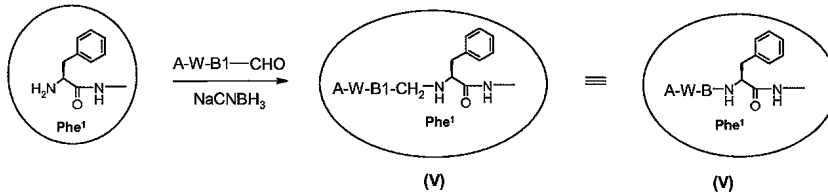


[0496]

[0497] GH(I)와의 TGase-매개 효소 반응은 (II)를 제공하는 위치 141 및/또는 40에서 Gln의 변형을 가져온다. 변형된 GH(II)는 과요오드산염으로 처리되어 아미노알코올을 절단하고, GH 유도 알데히드(III)를 제공한다. A-W-B1-NH<sub>2</sub>로의 GH 알데히드(III) 접합은 환원 알킬화(III → IV)를 통해 발생한다. 본원에 예시화된 환원 알킬화는 본 분야에 잘 인식되고 위치 Gln(141) 및/또는 40에서 변형된 GH 화합물(IV)을 가져온다.

[0498] **화학II**

[0499] 한 구체예에서, 접합체 A-W-B-GH는 아래에 도시한 GH의 N-말단에서 환원 아민화를 사용하여 제조된다:

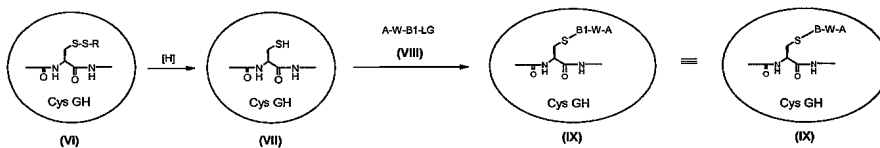


[0500]

[0501] GH의 A-W-B1-CHO와의 접합은 환원 알킬화(GH → V)를 통해 발생한다. 상기 예시화된 환원 알킬화는 GH의 N-말단을 변형하기 위해 본 분야에 잘 인식된다.

[0502] 화학III

[0503] 한 구체예에서, 접합체 A-W-B-GH는 아래 도시한 바와 같이 제조된다:



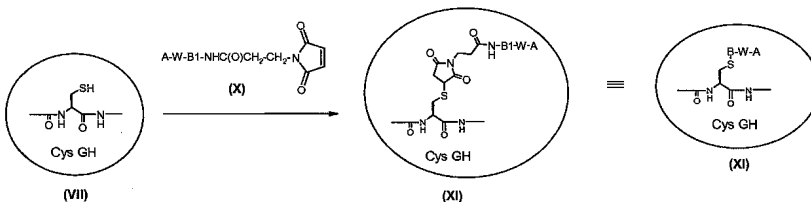
[0504]

[0505] 여기서 시스테인 잔기는 이황화(VI)(GH-S-S-R)을 작은 유기 부분인 R과 혼합되어 선택적으로 보호된다. 혼합된 이황화의 비제한 예는 시스타민(R = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 시스테인(R = -CH<sub>2</sub>CH(C(O)OH)NH<sub>2</sub>); 동종시스테인(R = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(C(O)OH)NH<sub>2</sub>); 및 글루타티온(R = -CH<sub>2</sub>CH(C(O)NH-CH<sub>2</sub>C(O)OH)NH-C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(C(O)OH)NH<sub>2</sub>) 사이에 이황화를 포함할 수 있다.

[0506] 유도체화 공정은 알부민 결합 링커 A-W-B1-LG를 이용하고, LG는 -Cl, -Br, -I와 같은 무기 탈리기 또는 메실레이트 또는 토실레이트와 같은 유기 탈리기를 나타낸다. GH의 A-W-B1-LG와의 접합은 친핵성 치환(VII → IX)을 통해 발생한다.

[0507] 화학IV

[0508] 한 구체예에서, 접합체 A-W-B-GH는 아래 도시한 바와 같이 제조된다:



[0509]

[0510] 상기 (VI)으로부터 제공된, 탈보호된 Cys GH 화합물(VII)은 말레이미드 치환 알부민 바인더 링커(X)와 반응하여 GH 접합 A-W-B1-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-피롤리딘-2,5-디온-3-GH(XI)를 제공할 수 있다.

[0511] 여기서 친수성 스페이서(B1)는 하기 식을 갖는다.

[0512] -X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-

[0513] 여기서

[0514] X<sub>1</sub>은 -W<sub>1</sub>-[(CHR<sup>1</sup>)<sub>11</sub>-W<sub>2</sub>]<sub>m1</sub>-{[(CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>E1]<sub>m2</sub>-[(CHR<sup>2</sup>)<sub>12</sub>-W<sub>3</sub>]<sub>m3</sub>}<sub>n2</sub>-이고,

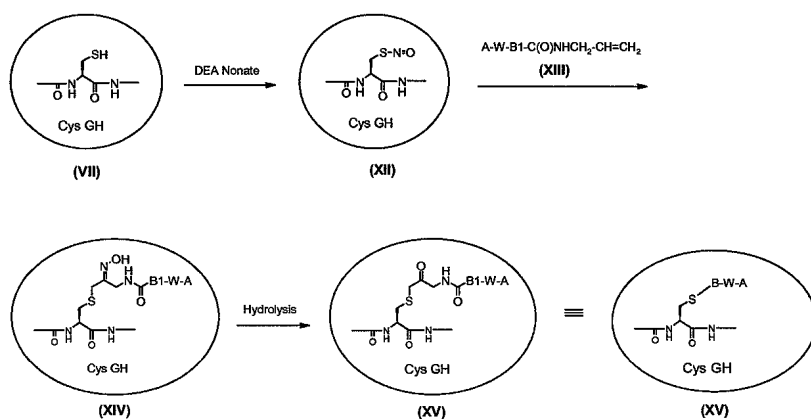
[0515] X<sub>2</sub>는 -[(CHR<sup>3</sup>)<sub>13</sub>-W<sub>4</sub>]<sub>m4</sub>-{[(CH<sub>2</sub>)<sub>n3</sub>E2]<sub>m5</sub>-[(CHR<sup>4</sup>)<sub>14</sub>-W<sub>5</sub>]<sub>m6</sub>}<sub>n4</sub>-이고,

[0516] X<sub>3</sub>는 -[(CHR<sup>5</sup>)<sub>15</sub>]<sub>m7</sub>-이고,

[0517] X<sub>4</sub>는 원자가 결합이고,



- [0518] I1, I2, I3, I4, 및 I5는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0519] m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-10으로부터 선택되고,
- [0520] m2 및 m5는 독립적으로 0-25로부터 선택되고,
- [0521] n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0522]  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 수소,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $C_{1-6}$ -알킬, 아릴 또는 헤테라릴로부터 선택되고; 여기서 알킬, 아릴 및 헤테라릴기는 선택적으로 할로젠,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-CN$  또는  $-OH$ 로 치환되고,
- [0523] E1 및 E2는 독립적으로  $-O-$ ,  $-NR^6-$ ,  $-N(COR^7)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $R^6$  및  $R^7$ 은 독립적으로 수소 또는  $C_{1-6}$ -알킬을 나타내고,
- [0524]  $W_1$  내지  $W_5$ 는 독립적으로  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s2}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s2$ 는 0 또는 1이다.
- [0525] 화학V
- [0526] 한 구체예에서, 접합체 A-W-B-GH는 아래 도시한 바와 같이 제조된다:



- [0527]
- [0528] 알부민 바인더는 단일 Cys GH 유도체에 WO2009/024791에 기술된 S-니트로실 화학을 사용하여 부착될 수 있다.
- [0529] 탈보호된 Cys GH 화합물(VII)은 DEA Nonate(Sigma Aldrich)와 같은 NO 주개의 첨가에 의해 S-니트로실화의 대상이 된다. 그 다음, 니트로실화된 단일 Cys GH(XII)는 옥심(XIV)을 제공하는 알일아민 치환 알부민 바인더(XIII)와 반응하는데, 옥심(XIV)은 가수분해 후 GH 접합 A-W-B1-C(O)NHCH<sub>2</sub>C(O)CH<sub>2</sub>-Cys GH(XV)를 제공한다.
- [0530] 여기서 친수성 스페이서(B1)는 하기 식을 갖는다.
- [0531]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$
- [0532] 여기서
- [0533]  $X_1$ 은  $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 이고,
- [0534]  $X_2$ 는  $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 이고,
- [0535]  $X_3$ 는  $-[(CHR^5)_{I5}]_{m7}-$ 이고,
- [0536]  $X_4$ 는 원자가 결합이고,

- [0537] I1, I2, I3, I4, 및 I5는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0538] m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-10으로부터 선택되고,
- [0539] m2 및 m5는 독립적으로 0-25로부터 선택되고,
- [0540] n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0541]  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 수소,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $C_{1-6}$ -알킬, 아릴 또는 헤테라릴로부터 선택되고; 여기서 알킬, 아릴 및 헤테라릴기는 선택적으로 할로젠,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-CN$  또는  $-OH$ 로 치환되고,
- [0542] E1 및 E2는 독립적으로  $-O-$ ,  $-N(R^6)-$ ,  $-N(C(O)R^7)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $R^6$  및  $R^7$ 은 독립적으로 수소 또는  $C_{1-6}$ -알킬을 나타내고,
- [0543]  $W_1$  내지  $W_5$ 는 독립적으로  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s2}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s2$ 는 0 또는 1이다.
- [0544] 자연 펩티드와 가까운 관계는 일반적으로 이 자연 펩티드의 변종 또는 유사체의 투여를 포함하는 치료적 중재를 갖는 이점으로서 간주되는데, 이것은, 예를 들어 어떤 원하지않은 항체 생성의 위험을 최소화한다.
- [0545] GH는 그것들의 C-말단을 카르복시펩티다제 Y(EC. 3.4.16.5)의 사용에 의해 변형될 수 있고, W02007/093594에 기술된 변형 기질로 적합하다. B. Peschke et al. "C-Terminally PEGylated GH Derivatives" *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 4382-4395, (2007)에 기술된 2단계 절차, C 말단 알라닌이  $N^\epsilon$ -(4-아세틸벤조일)리신과 효소로 교환되고, 그 후 본 발명에 따른 알부민 바인더 유도체와 반응한다.
- [0546] 상기로부터 분명한 본 발명은 추가로 접합체 A-W-B-GH의 제조에 적용된 중간체 링커에 관한 것이다. 상기 링커 화합물은 하기 식(III)에 의해 기술될 수 있다.
- [0547] A-W-B1-U (III)
- [0548] 여기서 A는 알부민 결합 잔기를 나타내고,
- [0549] B1은 친수성 스페이서를 나타내고,
- [0550] W는 A 및 B1을 연결한 화학기이고, U는 접합 부분을 나타낸다.
- [0551] 상기를 기초로, 접합 부분은 적용된 접합 방법에 따라 다양할 것이고, 단부에서 또는 최종 hGH 화합물(A-W-B-GH)에서 알아볼 수 있다.
- [0552] 화합물의 추가 구체예에서, A-W-B1-U, A 및 W는 상기 구체예 중 어떤 것으로 한정된다.
- [0553] 화학IV로서 본원에 상기 기술된 방법이, 화합물 A-W-B1-U에 적용될 때, 구체예로서 더 한정될 수 있고, U는 아릴, 헤테로아릴, 치환된 말레이미드 또는  $-NHC(O)CH_2CH_2$ -피롤리딘-2,5-디온과 같은 피롤리딘-2,5-디온을 포함하거나 또는 이루어진다.
- [0554] 화합물 A-W-B1-U의 선택적인 구체예에서, U는  $D1-(CH_2)_{16}-D2$ 를 포함하고, 여기서 D1 및 D2는 독립적으로  $-O-$ ,  $-N(R^6)-$ ,  $-NC(O)R^7-$  또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 R6 및 R7은 독립적으로 수소 또는  $C_{1-6}$ -알킬을 나타낸다.
- [0555] 마찬가지로 본원에 상기 기술한 화학III의 적용은 링커 화합물을 적용할 것이고, U는 Cl, Br, I,  $-OH$ ,  $-OS(O)_2Me$ ,  $-OS(O)_2CF_3$  또는  $-OTs$ 와 같은 탈리기, 혹은 바람직하게 식(III)에 따른 화합물을 포함하거나 또는 이루어지고, 여기서 탈리기는 Cl, Br 및 I, 바람직하게 Br로부터 선택된 할로젠 화합물이다.
- [0556] 링커 화합물(화학V에 적용됨)의 추가 구체예는 식(III)에 의해 한정된 본 발명에 따르고, U는  $-C(O)NHCH_2-$   $CH=CH_2$ 와 같은 알릴 아민( $H_2C=CH-CH_2-NH_2$ )을 포함하거나 또는 이루어진다.

- [0557] 화학I로서 본원에 상기 기술된 방법이, 화합물 A-W-B1-U를 적용할 때, 구체예로서 더 한정될 수 있고, U는 아민 ( $-NH_2$ )을 포함하거나 또는 이루어진다.
- [0558] 선택적인 구체예에서, U는  $-CHO$ 와 같은 알데히드를 포함하거나 또는 이루어질 수 있다.
- [0559] 화합물은 그 후 "U"가 접합할 수 있는 수용체군을 포함하는 어떤 종류의 치료적 화합물과 접합될 수 있다. 바람직한 구체예에서 치료적 화합물은 폴리펩티드이다. 펩티드는 Gln 잔기, Phe 잔기 및 Cys 잔기와 같은 수용체군으로서 작용하는 AA 잔기를 자연적으로 포함할 수 있다. 선택적으로 이들 아미노산 잔기는 폴리펩티드의 적절한 위치에 도입될 수 있다.
- [0560] **약학적 조성물**
- [0561] 또 다른 목적은 식(I) 또는 (II)의 성장 호르몬 접합체와 같은 본 발명의 성장 호르몬 접합체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이고, 상기 조성물은  $10^{-15}$  mg/mL 내지 200 mg/mL, 예를 들어  $10^{-10}$  mg/mL 내지 5 mg/mL의 농도에서 존재하고, 2.0 내지 10.0의 pH를 갖는다. 조성물은 버퍼 시스템, 방부제(들), 긴장제(tonicity agent)(들), 킬레이트제(들), 안정제 및 계면활성제와 같은 약학적 부형제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서 약학적 조성물은 수성 조성물, 즉 물을 포함하는 조성물이다. 이러한 조성물은 전형적으로 용액 또는 현탁액이다. 본 발명의 추가 구체예에서 약학적 조성물은 수성 용액이다. 용어 "수성 조성물"은 적어도 50% w/w 물을 포함하는 조성물로서 한정된다. 마찬가지로, 용어 "수성 용액"은 적어도 50% w/w 물을 포함하는 용액으로서 한정되고, 용어 "수성 현탁액"은 적어도 50% w/w 물을 포함하는 현탁액으로서 한정된다.
- [0562] 다른 구체예에서 약학적 조성물은 동결건조 조성물로, 의사 또는 환자가 용매를 첨가하고, 및/또는 사용 전에 희석시킨다.
- [0563] 다른 구체예에서 약학적 조성물은 어떤 사전 용해 없는 사용을 위해 준비된 건조 조성물(예를 들어, 동결건조 또는 분무건조)이다.
- [0564] 추가 양태에서 본 발명은 식(I) 또는 (II), 및 버퍼의 성장 호르몬 접합체와 같은 성장 호르몬 접합체의 수성 용액을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것으로, 상기 GH 접합체는 0.1-100 mg/mL 또는 상기의 농도에 존재하고, 상기 조성물은 약 2.0 내지 약 10.0의 pH를 갖는다.
- [0565] 본 발명의 다른 구체예에서 조성물의 pH는 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, 및 10.0으로 구성되는 목록으로부터 선택된다.
- [0566] 본 발명의 추가 구체예에서 버퍼는 아세트산나트륨, 탄산나트륨, 시트르산염, 글리실글리신, 히스티딘, 글리신, 리신, 아르지닌, 아인산 이수소나트륨, 인산수소이나트륨, 인산나트륨, 및 트리스(히드록시메틸)-아미노메탄, 비신, 트리신, 말산, 숙시네이트, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 아스파르트산 또는 그것의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택된다. 이들 특정 버퍼의 각 하나는 본 발명의 선택적인 구체예를 이룬다.
- [0567] 본 발명의 추가 구체예에서 조성물은 약학적으로 허용가능한 방부제를 더 포함한다. 본 발명의 추가 구체예에서 방부제는 페놀, o-크레솔, m-크레솔, p-크레솔, 메틸 p-히드록시벤조에이트, 프로필 p-히드록시벤조에이트, 2-페녹시에탄올, 부틸 p-히드록시벤조에이트, 2-페닐에탄올, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 및 티메로살, 브로노폴, 벤조산, 이미드우레아, 클로로헥시딘, 소듐데히드로아세테이트, 클로로크레솔, 에틸 p-히드록시벤조에이트, 벤젠토늄클로라이드, 클로르페네신(3-(p-클로로페녹시)프로판-1,2-디올) 또는 그것의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택된다. 본 발명의 추가 구체예에서 방부제는 0.1 mg/mL 내지 20 mg/mL의 농도에 존재한다. 본 발명의 추가 구체예에서 방부제는 0.1 mg/mL 내지 5 mg/mL의 농도에 존재한다. 본 발명의 추가 구체예에서 방부제는 10 mg/mL 내지 20 mg/mL의 농도에 존재한다. 이들 특정 방부제의 각 하나는 본 발명의 선택적인 구체예를 이룬다. 약학적 조성물의 방부제 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 편의를 위해 참고는 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>th</sup> edition, 2000에 만들어진다.
- [0568] 본 발명의 추가 구체예에서 조성물은 등장화제를 더 포함한다. 본 발명의 추가 구체예에서 등장화제는 염(예를 들어, 염화나트륨), 당 또는 당 알코올, 아미노산(예를 들어, L-글리신, L-히스티딘, 아르지닌, 리신,

이소류신, 아스파르트산, 트립토판, 트레오닌), 알디톨(예를 들어, 글리세롤(글리세린), 1,2-프로판디올(프로필렌글리콜), 1,3-프로판디올, 1,3-부탄디올) 폴리에틸렌글리콜(예를 들어, PEG 400), 또는 그것의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택된다. 어떤 당, 예를 들어 모노-, 디-, 또는 다당류, 혹은 물-용해성이 있는 글루칸, 예를 들어 프룩토스, 글루코스, 마노스, 소르보스, 크실로스, 말토스, 락토스, 수크로스, 트레할로스, 텍스트란, 폴루란, 텍스트린, 시클로텍스트린, 혹은 용해성이 있는 녹말, 예를 들어 히드록시에틸 녹말 및 카르복시메틸셀룰로오스-Na를 사용할 수 있다. 한 구체예에서 당 첨가제는 수크로스이다. 당 알코올은 적어도 하나의 -OH기를 갖는 C4-C8 탄화수소로서 한정되고, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 갈락티톨, 덤시톨, 자일리톨, 및 아라비톨을 포함한다. 한 구체예에서 당 알코올 첨가제는 만니톨이다. 상기 언급된 당 또는 당 알코올을 각각 또는 결합하여 사용할 수 있다. 당 또는 당 알코올 액체 제조에 용해성이 있고 본 발명의 방법을 사용하여 제공된 안정화 효과를 역으로 영향을 주지 않는 한, 사용된 양에 고정된 제한은 존재하지 않는다. 한 구체예에서, 당 또는 당 알코올 농도는 약 1 mg/mL 내지 약 150 mg/mL이다. 본 발명의 추가 구체예에서 등장화제는 1 mg/mL 내지 50 mg/mL의 농도에 존재한다. 본 발명의 추가 구체예에서 등장화제는 1 mg/mL 내지 7 mg/mL의 농도에 존재한다. 본 발명의 추가 구체예에서 등장화제는 8 mg/mL 내지 24 mg/mL의 농도에 존재한다. 본 발명의 추가 구체예에서 등장화제는 25 mg/mL 내지 50 mg/mL의 농도에 존재한다. 이들 특정 등장화제의 각 하나는 본 발명의 선택적인 구체예를 이룬다. 약학적 조성물에서의 등장화제의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 편의를 위해 참고는 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>th</sup> edition, 2000에 만들어진다.

[0569] 본 발명의 추가 구체예에서 조성물은 킬레이트제를 더 포함한다. 본 발명의 추가 구체예에서 킬레이트제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 시트르산, 및 아스파르트산의 염과 그것의 혼합물로부터 선택된다. 본 발명의 추가 구체예에서 킬레이트제는 0.1 mg/mL 내지 5 mg/mL의 농도에 존재한다. 본 발명의 추가 구체예에서 킬레이트제는 0.1 mg/mL 내지 2 mg/mL의 농도에 존재한다. 본 발명의 추가 구체예에서 킬레이트제는 2 mg/mL 내지 5 mg/mL의 농도에 존재한다. 이들 특정 킬레이트제의 각 하나는 본 발명의 선택적인 구체예를 구성한다. 약학적 조성물에서의 킬레이트제의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 편의를 위해 참고는 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>th</sup> edition, 2000에 만들어진다.

[0570] 본 발명의 추가 구체예에서 조성물은 안정제를 더 포함한다. 약학적 조성물에서의 안정제의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 편의를 위해 참고는 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>th</sup> edition, 2000에 만들어진다.

[0571] 더 구체적으로, 본 발명의 조성물은 안정화된 액체 약학적 조성물로, 이것의 치료적으로 활성 성분은 액체 약학적 조성물에서 저장 중 집합체 형성을 나타내는 단백질을 포함한다. 올리고머의 형성을 가져오는 단백질 분자 사이의 물리적 상호작용은 "집합체 형성"으로 의도되며, 올리고머는 용해성이 있게 또는 용액으로부터 침전한 크게 알아볼 수 있는 집합체로 남을 수 있다. 액체의 약학적 조성물 또는 한번 제조된 조성물은 "저장 중"으로 의도되며, 대상에 즉시 투여되지 않는다. 오히려, 제조 후, 그것은 저장을 위해 액체형, 동결 상태, 또는 건조형 중 하나로 포장되어, 대상에 투여하기 적합한 액체형 또는 다른형으로 후에 복원된다. 액체 약학적 조성물 또는 조성물은 "건조형"으로 의도되고, 동결 건조(즉, 냉동 건조; 예를 들어, Williams and Polli, *J. Parenteral Sci. Technol.*, **38**, 48-59, (1984) 참고), 분무 건조(Masters(1991) in *Spray-Drying Handbook*(5<sup>th</sup> ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp. 491-676 참고; Broadhead et al. *Drug Devel. Ind. Pharm.* **18**, 1169-1206, (1992); 및 Mumenthaler et al., *Pharm. Res.*, **11**, 12-20, (1994) 참고), 또는 공기 건조(Carpenter and Crowe, *Cryobiology* **25**, 459-470, (1988); and Roser, *Biopharm.* **4**, 47-53, (1991) 참고)에 의해 건조된다. 액체 약학적 조성물의 저장 중 단백질에 의한 집합체 형성은 그 단백질의 생물학적 활성에 역으로 영향을 주어, 약학적 조성물의 치료적 효능의 손실을 가져올 수 있다. 게다가, 집합체 형성은, 단백질-함유 약학적 조성물이 주입 시스템을 사용하여 투여될 때, 관, 막, 또는 펌프의 막힘과 같은 다른 문제를 야기할 수 있다.

[0572] 본 발명의 약학적 조성물은 집합체 형성을 감소시키기에 충분한 상당한 아미노산 기제를 조성물의 저장 중 단백질에 의해 더 포함할 수 있다. 아미노산 또는 아미노산의 조합은 "아미노산 기제"로 의도되며, 어떤 주어진 아미노산은 그것의 유리 기제형 또는 염형 중 하나로 존재한다. 아미노산의 조합이 사용된 경우, 모든 아미노산은 그것들의 유리 기제형으로 존재할 수 있고, 모든 것들은 그것들의 염형으로 존재할 수 있고, 또는 다른 것들은 그것들의 염형으로 존재하는 동안, 일부는 유리 기제형으로 존재할 수 있다. 한 구체예에서, 본 발명의 조성물을 제조하는데 사용하는 아미노산은 아르지닌, 리신, 아스파르트산, 및 글루탐산과 같은 전하된 측쇄를 운반하는 것들이다. 구체적인 아미노산(메티오닌, 히스티딘, 아르지닌, 리신, 이소류신, 아스파르트산, 트립토판, 트

레오닌 및 그것의 혼합물)의 어떤 입체이성질체(즉, L 또는 D 이성질체, 또는 그것의 혼합물) 또는 이들 입체이성질체의 조합 또는 글리신 또는 이미다졸과 같은 그러나 제한되지 않는 유기 기체는, 구체적인 아미노산 또는 유기 기체가 그것의 유리 기체형 또는 염형으로 존재하는 동안, 본 발명의 약학적 조성물에 존재할 수 있다. 한 구체예에서 아미노산 L-입체이성질체가 사용된다. 본 발명의 조성물도 이들 아미노산의 유사체로 조제할 수 있다. 자연적으로 발생하는 아미노산의 유도체는 "아미노산 유사체"로 의도되고, 본 발명의 액체 약학적 조성물 저장 중 단백질에 의한 집합체 형성을 감소시키는 바람직한 효과를 초래한다. 적합한 아르지닌 유사체는 예를 들어, 아미노구아니딘, 오르니틴 및 N-모노에틸 L-아르지닌을 포함하고, 적합한 메티오닌 유사체는 메티오닌 및 부티오닌을 포함하고, 적합한 시스테인 유사체는 S-메틸-L 시스테인을 포함한다. 다른 아미노산을 갖는, 아미노산 유사체는 유리 기체형 또는 염형에서의 조성물로 포함된다. 본 발명의 추가 구체예에서 아미노산 또는 아미노산 유사체는 단백질의 집합화를 방지하거나 지연시키기에 충분한 농도에서 사용된다.

[0573] 본 발명의 추가 구체예에서 메티오닌(또는 다른 황산 아미노산 또는 아미노산 유사체)은 메티오닌 잔기의 메티오닌 설폭시드로의 산화를 억제하는데 첨가될 수 있고, 이때 치료제로서의 단백질 활성이 이러한 산화에 민감한 적어도 하나의 메티오닌 잔기를 포함하는 단백질이다. 시간이 지나면서 메티오닌 산화 중의 최소 축적은 "억제한다"로 의도된다. 메티오닌 산화를 억제하는 단계는 그것의 알맞은 분자형에서 더 많은 잔류 단백질을 가져온다. 메티오닌의 어떤 입체이성질체(L 또는 D 이성질체) 또는 그것의 어떤 조합을 사용할 수 있다. 메티오닌 설폭시드의 양이 규제 기관에 허용가능하도록, 첨가되는 양은 메티오닌 잔기의 산화를 억제하기에 충분한 양이어야 한다. 전형적으로, 이것은 조성물이 약 10% 내지 약 30% 미만의 메티오닌 설폭시드를 함유한다는 것을 의미한다. 일반적으로, 첨가된 메티오닌: 메티오닌 잔기 비율의 범위가 약 1:1 내지 약 1000:1, 예를 들어 10:1 내지 약 100:1이 되도록, 메티오닌을 첨가함으로써 제공될 수 있다.

[0574] 본 발명의 추가 구체예에서 조성물은 고분자량 중합체 또는 저분자 화합물의 군으로부터 선택된 안정제를 더 포함한다. 본 발명의 추가 구체예에서 안정제는 폴리에틸렌 글리콜(예를 들어, PEG 3350), 폴리비닐 알코올(PVA), 폴리비닐피롤리돈, 카르복시-/히드록시셀룰로오스 또는 그것의 유도체(예를 들어, HPC, HPC-SL, HPC-L 및 HPMC), 시클로덱스트린, 모노티오글리세롤로서의 황-함유 물질, 티오글리콜산 및 2-메틸티오에탄올과 다른 염(예를 들어, 염화나트륨)으로부터 선택된다. 이들 특정 안정제의 각 하나는 본 발명의 선택적인 구체예를 이룬다.

[0575] 약학적 조성물은 또한 추가 안정제를 포함할 수 있고, 이것은 거기서 치료적 활성 단백질의 안정성을 더 높일 수 있다. 본 발명에 구체적인 관심의 안정제는 메티오닌 및 EDTA(이들은 메티오닌 산화에 대해 단백질을 보호함)와 비이온성 계면활성제(동결-융해 또는 기계적 절단과 관련된 집합화에 대해 단백질을 보호함)를 포함하나 제한되지 않는다.

[0576] 본 발명의 추가 구체예에서 조성물은 계면활성제를 더 포함한다. 본 발명의 추가 구체예에서 계면활성제는 세제로부터 선택되고, 예로서화된 피마자 오일, 폴리글리콜화된 글리세리드, 아세틸화된 모노글리세리드, 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시프로필렌-폴리옥시에틸렌 블럭 중합체(예를 들어, Triton X-100, Pluronic® F68, 폴록사머 188 및 407과 같은 폴록사머), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 및 폴리에틸렌 유도체, 예를 들어 알킬화된 및 알콕시화된 유도체(Tweens, 예를 들어 Tween-20, Tween-40, Tween-80 및 Brij-35), 모노글리세리드 또는 예로서화된 그것의 유도체, 그것의 디글리세리드 또는 폴리옥시에틸렌 유도체, 알코올, 글리세롤, 렉틴 및 인지질(예를 들어, 포스파티딜 세린, 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 이노시톨, 디포스파티딜 글리세롤 및 스프고미엘린), 인지질의 유도체(예를 들어, 디팔미토일 포스파티딘산) 및 리소인지질(예를 들어, 에탄올아민, 콜린, 세린 또는 트레오닌의 팔미토일 리소포스파티딜-L-세린 및 1-아실-스-글리세로-3-포스페이트 에스테르) 및 리소포스파티딜의 알킬, 알콕실(알킬 에스테르), 알콕시(알킬 에테르) 유도체 및 포스파티딜콜린, 예를 들어 리소포스파티딜콜린, 디팔미토일포스파티딜콜린의 라우로일 및 미리스토일 유도체, 및 극성 머리 군의 변형, 즉 콜린, 에탄올아민, 포스파티딘산, 세린, 트레오닌, 글리세롤, 이노시톨, 및 양전하된 DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, 리소포스파티딜세린 및 리소포스파티딜트레오닌, 및 글리세로인지질(예를 들어, 세팔린), 글리세로당지질(예를 들어, 갈락토피란소이드), 스프고당지질(예를 들어, 세라미드, 강글리오시드), 도데실포스포콜린, 달걀 리소lesi틴, 푸시딘산 유도체(예를 들어, 소듐 타우로-디히드로푸시데이트 등), 긴-쇄 지방산 및 그것의 염, C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>(예를 들어, 올레산 및 카프릴산), 아실카르니틴 및 유도체, 리신, 아르지닌 또는 히스티딘의 N<sup>a</sup>-아실화된 유도체, 또는 리신 또는 아르지닌의 측쇄 아실화된 유도체, 리신, 아르지닌 또는 히스티딘의 어떤 조합을 포함하는 디펩티드의 N<sup>a</sup>-아실화된 유도체 및 자연 또는 산성 아미



노산, 자연 아미노산 및 2개 전하된 아미노산의 어떤 조합을 포함하는 트리캡티드의  $N^a$ -아실화된 유도체, DSS (도큐세이트 나트륨, CAS 등록 번호 [577-11-7]), 도큐세이트 칼슘, CAS 등록 번호 [128-49-4]), 도큐세이트 칼륨, CAS 등록 번호 [7491-09-0]), SDS(도데실황산나트륨 또는 라우릴황산나트륨), 카프릴산나트륨, 콜산 또는 그것의 유도체, 담즙산 및 그것의 염 및 글리신 또는 타우린 접합체, 우루소데옥시콜산, 콜산나트륨, 데옥시콜산나트륨, 타우로콜산나트륨, 글리콜콜산나트륨, N-헥사데실-N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판술포네이트, 음이온성(알킬-아릴-술포네이트) 1가 계면활성제, 양쪽이온성 계면활성제(예를 들어, N-알킬-N,N-디메틸암모니오-1-프로판술포네이트, 3-콜아미도-1-프로필디메틸암모니오-1-프로판술포네이트, 양이온 계면활성제(제4 암모늄 기체)(예를 들어, 세틸-트리메틸암모늄 브로마이드, 세틸피리디늄 클로라이드), 비이온성 계면활성제(예를 들어, 도데실  $\beta$ -D-글루코피라노시드), 산화프로필렌 및 산화에틸렌의 에틸렌디아민으로의 후속 첨가로부터 유도된 4관능성 블록 공중합체인 폴록사민(예를 들어, Tetronic's), 또는 계면활성제는 이미다졸린 유도체, 또는 그것의 혼합물의 군으로부터 선택된다. 이들 특정 계면활성제의 각 하나는 본 발명의 선택적인 구체예를 이룬다.

[0577] 약학적 조성물의 계면활성제 사용은 당업자에게 잘 알려져있다. 편의를 위해 참고는 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20<sup>th</sup> edition, 2000에 만들어진다.

[0578] 다른 성분이 본 발명의 약학적 조성물에 존재할 수 있다는 것은 가능하다. 이들 추가 성분은 습윤제, 유화제, 향산화제, 증량제, 긴장 조절제, 킬레이트제, 금속 이온, 유성 매개체, 단백질(예를 들어, 사람 혈청 알부민, 젤라틴 또는 단백질) 및 양쪽성이온(예를 들어, 아미노산, 예를 들어 베타인, 타우린, 아르지닌, 글리신, 리신 및 히스티딘)을 포함할 수 있다. 물론, 이들 추가 성분은 본 발명 약학적 조성물의 전체 안정성에 역으로 영향을 주면 안된다.

[0579] 본 발명에 따른 약학적 조성물 함유 성장 호르몬 접합체는 몇 가지 부위 예를 들어, 국부 부위, 예를 들어, 피부 및 점막 부위, 예를 들어, 동맥, 정맥, 심장 내에 투여로 흡수를 우회하는 부위, 예를 들어, 피부 내, 피하, 근육 내 또는 복부 내 투여로 흡수를 포함하는 부위에서 이러한 치료가 필요한 환자에게 투여될 수 있다.

[0580] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여는 몇 가지 경로로, 예를 들어, 혀, 혀 밑, 볼 내, 입, 경구, 위 및 장, 코, 폐로의 투여, 예를 들어, 세기관지 및 폐포 또는 그것의 조합을 통해, 상피, 표피, 경피, 질, 직장, 눈, 예를 들어 결막, 요관, 및 비경구를 통해 이들 치료가 필요한 환자에게 투여될 수 있다.

[0581] 본 발명의 조성물은 몇 가지 투여 형태로, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유화액, 마이크로유화액, 다중 유화액, 발포제, 연고, 페이스트, 반창고, 연고, 정제, 코팅된 정제, 행균액, 캡슐, 예를 들어, 경질 젤라틴 캡슐 및 연질 젤라틴 캡슐, 좌약, 직장 투여 캡슐, 적제, 겔, 분무제, 분말, 에어로졸, 흡입제, 점안액, 안 연고, 안 행균액, 질좌약, 질내고리, 질연고, 주사 용액, 제자리 형질전환 용액, 예를 들어 제자리 겔링, 제자리 설정, 제자리 침전, 제자리 결정화, 주입 용액, 및 삼입물로 투여될 수 있다.

[0582] 본 발명의 조성물은, 예를 들어 공유, 소수성 및 정전기 상호작용, 약물 담체, 약물 전달 시스템 및 고급 약물 전달 시스템을 통해 더 혼합 또는 부착될 수 있고, 이는 성장 호르몬 접합체의 안정성을 더 높이고, 생체이용률을 증가시키고, 용해도를 증가시키고, 역효과를 감소시키고, 당업자에게 잘 알려진 시간 요법을 달성하고, 그리고 환자의 순응 또는 어떤 그것의 조합을 증가시키는 데 있다. 담체, 약물 전달 시스템 및 고급 약물 전달 시스템의 예는 중합체, 예를 들어 셀룰로오스 및 유도체, 다당류, 예를 들어 텍스트란 및 유도체, 녹말 및 유도체, 폴리(비닐 알코올), 아크릴레이트 및 메타크릴레이트 중합체, 폴리젯산 및 폴리글리콜산 및 그것의 블록 공중합체, 폴리에틸렌 글리콜, 담체 단백질, 예를 들어 알부민, 겔, 예를 들어, 터모겔링 시스템, 예를 들어 당업자에게 잘 알려진 블록 공중합체 시스템, 미셀, 리포솜, 마이크로스피어, 나노입자, 그것의 액정 및 그것의 분산, 지방-물 시스템 상 거동의 당업자에게 잘 알려진 L2 상 및 그것의 분산, 중합체 미셀, 다중 유화액, 자가-유화, 자가-마이크로유화, 시클로텍스트린 및 그것의 유도체, 및 덴드리머를 포함하나 제한되지 않는다.

[0583] 본 발명의 조성물은, 당업자에게 잘 알려진 모든 장치, 예를 들어 계량된 용량 흡입기, 건조 분말 흡입기 및 분무기를 사용하여, 성장 호르몬 접합체의 폐 투여를 위한 고체, 반고체, 분말 및 용액의 조성물에 유용하다.

[0584] 본 발명의 조성물은 구체적으로 조절된, 지속성, 장기간, 지연된, 및 서방성 약물 전달 시스템의 조성물에서 유용하다. 더 구체적으로, 그러나 제한되지 않는, 조성물은, 당업자에게 잘 알려진, 비경구 조절된 방출 및 지속된 방출 시스템(둘 다 투여 횟수를 몇 배의 감소를 이끄는 시스템)의 조성물에 유용하다. 훨씬 더 바람직하게, 피하에 투여된 시스템은 조절되며 지속된 방출이다. 본 발명 범위의 제한 없이, 유용한 조절된 방출 시스템 및 조성물의 예는 히드로겔, 유성 겔, 액정, 중합체 미셀, 마이크로스피어, 나노입자이다.

- [0585] 본 발명의 조성물에 유용한 조절된 방출 시스템의 제조 방법은 결정화, 응축, 공결정화, 침전, 공침전, 유화, 분산, 고압 균질화, 캡슐화, 분무 건조, 마이크로캡슐화, 코아세르베이션(coacervation), 상 분리, 용매 증발을 포함하나 제한되지 않고, 마이크로스피어, 압출 및 초임계유체 공정을 제조한다. 일반적인 참고는 Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) 및 Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Composition and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000)에 만들어진다.
- [0586] 비경구 투여는 주사기, 선택적으로 펜 유사 주사기를 사용하여 피하, 근육 내, 복강 내 또는 정맥 내에 수행할 수 있다. 선택적으로, 비경구 투여는 주입 펌프를 사용하여 수행할 수 있다. 추가 선택은 코 또는 폐 분무의 형태로 성장 호르몬 접합체의 투여를 위한 용액 또는 현탁액일 수 있는 조성물이다. 추가 선택으로, 본 발명의 약학적 조성물 함유 성장 호르몬 접합체는 경피 투여, 예를 들어 바늘-없는 주사 또는 패치, 선택적으로 이온영동 패치, 또는 경점막, 예를 들어 볼 내 투여로도 개조될 수 있다.
- [0587] 용어 "안정화된 조성물"은 증가된 물리적 안정성, 증가된 화학적 안정성 또는 증가된 물리적 및 화학적 안정성을 갖는 조성물을 의미한다.
- [0588] 본원에 사용한 용어 단백질 조성물의 "물리적 안정성"은, 단백질이 열 기계 응력에 노출 및/또는 소수성 표면 및 계면과 같은 불안정한 계면 및 표면과 상호작용의 결과로서, 단백질의 생물학적으로 불활성 및/또는 불용해성이 있는 집합체를 형성하는 단백질의 경향을 의미한다. 수성 단백질 조성물의 물리적 안정성은 적합한 용기(예를 들어, 카트리지 또는 바이알병)에 채워진 조성물을 다른 온도에서 다양한 시간 동안 기계적/물리적 응력(예를 들어, 교반)에 노출한 후 육안 검사 및/또는 혼탁도 측정을 사용하여 평가된다. 조성물의 육안 검사는 어두운 배경에서 날카롭고 집중된 불빛으로 수행된다. 조성물의 혼탁도는 혼탁도의 시각적 스코어 순위, 예를 들어 0 내지 3(혼탁도를 나타내지 않는 조성물은 시각적 스코어 0에 대응하고, 시각적 혼탁도가 일광을 나타내는 조성물은 시각적 스코어 3에 대응됨)의 규모로 특성화된다. 조성물의 시각적 혼탁도가 일광으로 나타날 때, 그것은 단백질 집합화에 대하여 물리적 불안정으로 분류된다. 선택적으로, 조성물의 혼탁도는 당업자에게 잘 알려진 간단한 혼탁도 측정에 의해 평가될 수 있다. 수성 단백질 조성물의 물리적 안정성도 분광 물질 또는 단백질 구조 상태의 프로브를 사용함으로써 평가될 수 있다. 프로브는 단백질의 비자연 형태 이성질체에 우선적으로 결합하는 바람직하게 작은 분자이다. 단백질 구조의 작은 분자 분광 프로브의 한 예는 Thioflavin T이다. Thioflavin T는 아밀로이드 피브릴의 검출에 광범위하게 사용되는 형광 염료이다. 피브릴의 존재 하에서, 그리고 아마도 다른 단백질 배열도 또한, Thioflavin T는 피브릴 단백질형과 결합될 때, 약 450 nm에서의 새로운 최대 자극 및 약 482 nm에서의 높은 방출을 일으킨다. 비결합 Thioflavin T는 이들 파장에서 본질적으로 비형광이다.
- [0589] 다른 작은 분자를, 자연에서 비자연 상태로의 단백질 구조의 변화의 프로브로서 사용할 수 있다. 예를 들어, "소수성 패치" 프로브는 단백질의 노출된 소수성 패치에 우선적으로 결합한다. 소수성 패치는 자연 상태에서 단백질의 3차 구조 내에 일반적으로 매몰되지만, 단백질이 펼쳐지거나 변질되기 시작하기 때문에, 노출된다. 이들 작은 분자인, 분광 프로브의 예는 안트라센, 아크리딘, 페난트롤린 등과 같은 방향족, 소수성 염료이다. 다른 분광 프로브는 페닐알라닌, 류신, 이소류신, 메티오닌, 및 발린, 등과 같은 소수성 아미노산의 코발트 금속 복합체와 같은 금속-아미노산 복합체이다.
- [0590] 본원에 사용한 용어 단백질 조성물의 "화학적 안정성"은 자연 단백질 구조와 비교된 생물학적 효능이 감소된 가능성 및/또는 면역성 성질이 증가된 가능성이 있는 화학적 분해 생성물의 형성을 이끄는 단백질 구조에서의 화학적 공유 변화를 의미한다. 다양한 화학적 분해 생성물은 자연 단백질의 타입 및 본질과 단백질이 노출된 환경에 따라 형성될 수 있다. 화학적 분해의 제거는 아마도 완전히 방지되지는 못할 수 있고, 화학적 분해 생성물의 증가량은 당업자에 의해 잘 알려진 단백질 조성물의 저장 및 사용 중에 종종 보여진다. 대부분의 단백질은 탈아미드화(글루타민일 또는 아스파라긴일 잔기의 측쇄 아미드기가 가수분해되어 유리 카르복시산을 형성하는 공정)하기 쉽다. 다른 분해 경로는 고분자량 변형 생성물의 형성을 포함하고, 여기서 2개 이상의 단백질 분자가 아미드기전이 및/또는 이황화 상호작용을 통해 서로 공유 결합되어 공유 결합된 이합체, 올리고머 및 중합체 분해 생성물의 형성을 이끈다(Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). (예를 들어, 메티오닌 잔기의) 산화는 화학적 분해의 다른 변종으로서 언급될 수 있다. 단백질 조성물의 화학적 안정성은 다른 환경 상태의 노출(분해 생성물의 형성은, 예를 들어 증가하는 온도에 의해 종종 가속화될 수 있음) 후 다양한 시간-지점에서 화학적 분해 생성물의 양을 측정함으로써 평가될 수 있다. 각 개체 분해 생성물의 양은 다양한 크로마토그래피 기술(예를 들어, SEC-HPLC 및/또는 RP-HPLC)을 사용하여 분

자 크기 및/또는 전하에 따른 분해 생성물의 분리에 의해 종종 측정된다.

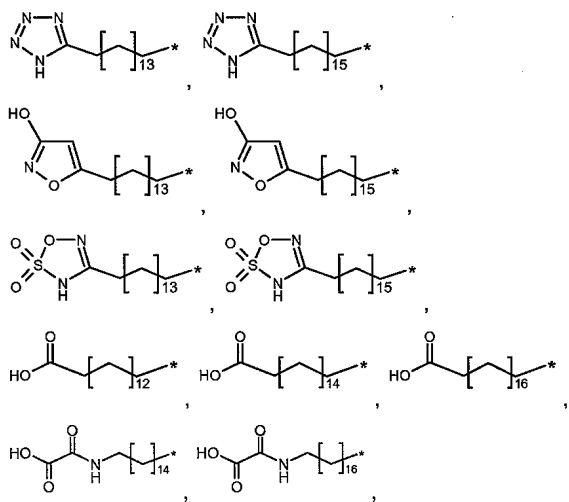
- [0591] 따라서, 상기 개요된, "안정화된 조성물"은 증가된 물리적 안정성, 증가된 화학적 안정성 또는 증가된 물리적 및 화학적 안정성을 가진 조성물을 의미한다. 일반적으로, 조성물은, 유효기간이 도달될 때까지, (권한 사용 및 저장 상태를 갖는 순응에서) 사용 및 저장 동안 안정되어야 한다.
- [0592] 본 발명의 한 구체예에서 식(I) 또는 (II)의 성장 호르몬 접합체를 포함하는 약학적 조성물은 6주 이상의 사용 및 3년 이상의 저장에 안정된다.
- [0593] 본 발명의 다른 구체예에서 식(I) 또는 (II)의 성장 호르몬 접합체를 포함하는 약학적 조성물은 4주 이상의 사용 및 3년 이상의 저장에 안정된다.
- [0594] 본 발명의 추가 구체예에서 식(I) 또는 (II)의 성장 호르몬 접합체를 포함하는 약학적 조성물은 4주 이상의 사용 및 2년 이상의 저장에 안정된다.
- [0595] 본 발명의 추가 구체예에서 식(I) 또는 (II)의 성장 호르몬 접합체를 포함하는 약학적 조성물은 2주 이상의 사용 및 2년 이상의 저장에 안정된다.
- [0596] 본원에 인용된 공개, 특허출원 및 특허를 포함하는 모든 참고는, 각 참고가 본원에 참고로 포함되고 전체로 제시되어 각각 및 구체적으로 나타낸 것처럼, 동일한 정도로 여기에 참고로 포함된다.
- [0597] 모든 제목 및 부제목은 본원에 편의를 위해서만 사용되고, 어떤 방식에서 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며,
- [0598] 그것의 모든 가능한 변화에서 상기-기술된 원소의 어떤 조합도, 본원에 달리 나타내지 않는 한 또는 상황에 의해 달리 명백히 반박되지 않는 한, 본 발명에 의해 망라된다.
- [0599] 본 발명을 기술하는 상황에서 사용된 용어 "하나" "하나의" 및 "그" 및 유사한 지시대상은, 본원에 달리 나타내지 않는 한 또는 상황에 의해 달리 명백히 반박되지 않는 한, 단수 및 복수(즉 하나 이상) 둘 다를 망라하도록 해석된다.
- [0600] 본원에 값 범위의 설명은, 본원에 달리 나타내지 않는 한, 범위 내에 떨어지는 각 분리 값으로 각각을 언급하는 약칭 방법의 역할을 하도록 단지 의도되며, 각 분리 값은 본원에 각각 재인용된 것처럼 명세서에 포함된다. 달리 언급되지 않는 한, 본원에 제공된 모든 정확한 값은 대응하는 근사값을 대표한다(예를 들어, 구체적인 요인 또는 측정에 대하여 제공된 모든 정확한 예시적인 값은 적절하게 "약"에 의해 변형된 대응하는 근사 측정을 또한 제공하도록 고려될 수 있음).
- [0601] 본원에 기술된 모든 방법은, 본원에 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 명백히 반박되지 않는 한, 어떤 적합한 순서로 수행할 수 있다.
- [0602] 본원에 제공된, 어떤 및 모든 예의 사용, 또는 예시적인 언어(예를 들어, "-와/과 같은")는 본 발명을 더 밝히도록만 의도되며, 달리 나타내지 않는 한, 본 발명의 범위를 제한을 제기하지 않는다. 명세서에서 어떤 언어도, 그것과 동일하게 분명하게 언급되지 않는 한, 어떤 원소가 본 발명의 실시예 필요하다고 나타낸다고 해석되지 않는다.
- [0603] 본원에 특허 문서의 인용구 및 혼합은 편의를 위해서만 수행되며, 이들 특허 문서의 타당성, 특허자격 및/또는 시행가능성의 어떤 관점을 반영하지 않는다.
- [0604] 본 발명에 기술한 구체예의 완전하지 않는 목록은 하기 본원에 제공된다.
- [0605] **구체예의 목록**
- [0606] 구체예 1: 성장 호르몬 화합물(GH)을 포함하는 성장 호르몬 접합체 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염으로서, 성장 호르몬 화합물(GH)은
- [0607] a) 단일 Cys 돌연변이,
- [0608] b) 추가의 이황화 다리, 또는
- [0609] c) 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 다리를 포함하고,
- [0610] 여기서 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 상기 GH에 연결된다.



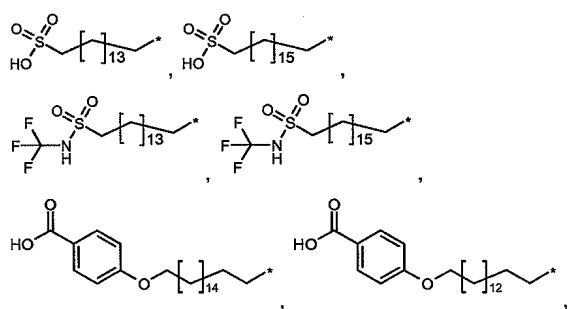
- [0611] 2. 구체예 1의 접합체로서, GH는 사람 성장 호르몬(hGH)(SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열에 적어도 80% 동일성, 예를 들어 hGH, 또는 GH와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 성장 호르몬 화합물을 나타낸다.
- [0612] 3. 구체예 1의 접합체로서, GH 또는 GH 접합체는 hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 80%를 갖는다.
- [0613] 4. 구체예 1 내지 3의 어떤 것의 접합체로서, 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 단일 Cys 돌연변이를 갖는 GH에 연결된다.
- [0614] 5. 구체예 4의 접합체로서, 단일 Cys 돌연변이는 GH의 N-말단, H1, H2, L2 또는 H3으로부터 선택된 영역의 어떤 하나에 위치된다.
- [0615] 6. 구체예 5의 접합체로서, GH는 T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C의 어떤 하나로부터 선택된 단일 Cys 돌연변이를 갖는다.
- [0616] 7. 구체예 1 내지 3의 어떤 하나의 접합체로서, 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 추가의 이황화 다리를 갖는 GH에 연결된다.
- [0617] 8. 구체예 7의 접합체로서, 추가의 이황화 결합은 루프 부분과 나선 부분 사이에 또는 루프 부분 내에 또는 루프 부분들 사이에 또는 나선 부분들 사이에 있다.
- [0618] 9. 구체예 7 내지 8의 어떤 하나의 접합체로서, GH는 추가의 이황화 결합을 포함하며, 여기서 적어도 하나의 시스테인이 아미노산 잔기 128-154(L3)로부터의 루프 부분에 존재한다.
- [0619] 10. 구체예 7 내지 9의 어떤 하나의 접합체로서, GH는 추가의 이황화 결합을 포함하며, 여기서 추가의 이황화 결합은 루프 부분을 나선 B 또는 H2와 같은 나선 부분으로 연결한다.
- [0620] 11. 구체예 7 내지 10의 어떤 하나의 접합체로서, 추가의 이황화 결합은 L3을 H2로 연결한다.
- [0621] 12. 구체예 7 내지 11의 어떤 하나의 접합체로서, 추가의 이황화 다리는 Q84C/Y143C와 같은 hGH(SEQ ID NO:1)에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.
- [0622] 13. 구체예 1 내지 3의 어떤 하나의 접합체로서, 친수성 스페이서를 통한 알부민 결합 잔기는 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 다리를 갖는 GH에 연결된다.
- [0623] 14. 구체예 13의 접합체로서, GH는 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 및 G126C의 어떤 하나로부터 선택된 단일 Cys 돌연변이를 갖는다.
- [0624] 15. 구체예 13 내지 14의 어떤 하나의 접합체로서, 추가의 이황화 결합은 루프 부분과 나선 부분 사이에 또는 루프 부분 내에 또는 루프 부분들 사이에 또는 나선 부분들 사이에 있다.
- [0625] 16. 구체예 13 내지 15의 어떤 하나의 접합체로서, GH는 추가의 이황화 결합을 포함하며, 여기서 적어도 하나의 시스테인이 아미노산 잔기 128-154(L3)로부터의 루프 부분에 존재한다.
- [0626] 17. 구체예 13 내지 16의 어떤 하나의 접합체로서, GH는 추가의 이황화 결합을 포함하며, 여기서 추가의 이황화 결합은 루프 부분을 나선 B 또는 H2와 같은 나선 부분으로 연결한다.
- [0627] 18. 구체예 13 내지 17의 어떤 하나의 접합체로서, 추가의 이황화 결합은 아미노산 잔기 128-154(L3)로부터의 루프 부분을 나선 B 또는 H2와 연결한다.
- [0628] 19. 구체예 13 내지 18의 어떤 하나의 접합체로서, 추가의 이황화 다리는 Q84C/Y143C와 같은 hGH(SEQ ID NO:1)에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.

[0629] 20. 구체예 1 내지 19의 어떤 하나의 접합체로서, 알부민 결합 잔기는 하기로부터 선택된다.



[0630]



[0631]

[0632] 여기서 \*는 알부민 결합 잔기 및 친수성 스페이서를 연결한 화학기를 통해 친수성 스페이서에 부착을 표시한다.

[0633] 21. 구체예 1 내지 20의 어떤 하나의 접합체로서, 알부민 결합 잔기 및 친수성 스페이서를 연결한 화학기는 하기 식을 갖는다.

[0634]  $-W_7-Y-$ ,

[0635] 여기서

[0636] Y는  $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -시클로알킬- $W_8-$  또는 원자가 결합이고,

[0637] 17은 0-6이고,

[0638]  $W_7$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s3$ 는 0 또는 1이고,

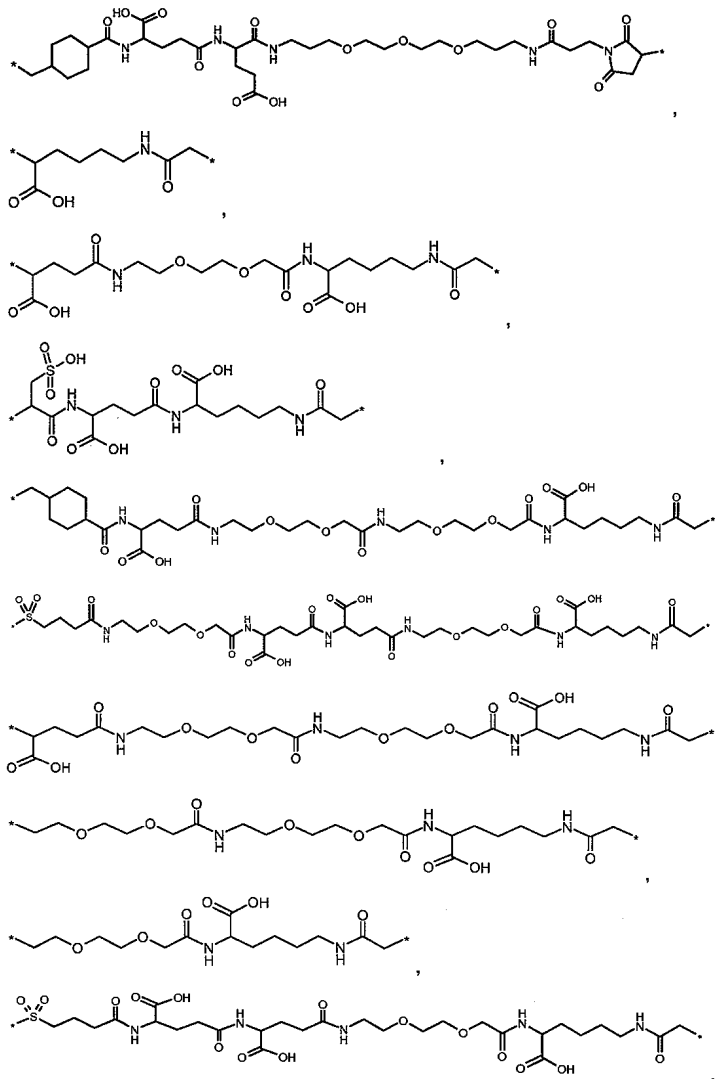
[0639]  $W_8$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s4$ 는 0 또는 1이다.

[0640] 22. 구체예 1 내지 21의 어떤 하나의 접합체로서, 친수성 스페이서는 하기 식을 갖는다.

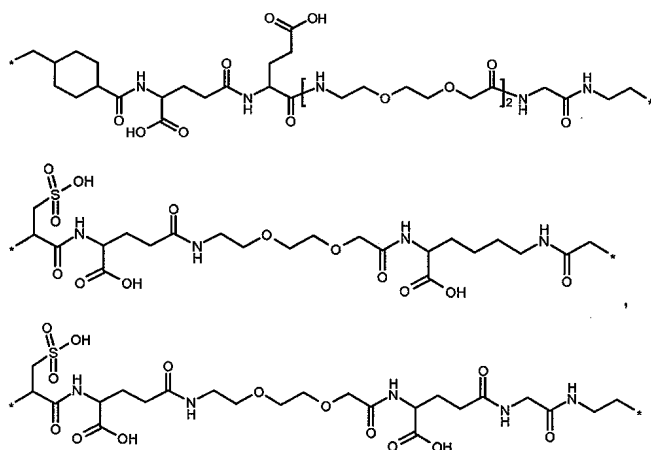
[0641]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

- [0642] 여기서
- [0643]  $X_1$ 은  $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 이고,
- [0644]  $X_2$ 는  $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 이고,
- [0645]  $X_3$ 는  $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ 이고,
- [0646]  $X_4$ 는  $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ 이고,
- [0647] I1, I2, I3, I4, I5 및 I6는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0648] m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-10으로부터 선택되고,
- [0649] m2 및 m5는 독립적으로 0-25로부터 선택되고,
- [0650] n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0651] F는 아릴, 헤타릴, 피롤리딘-2,5-디온 또는 원자가 결합이고, 여기서 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬로 치환되고,
- [0652] R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 독립적으로 수소, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, C<sub>1-6</sub>-알킬, 아릴 또는 헤타릴로부터 선택되고; 여기서 알킬, 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)OH, -S(O)<sub>2</sub>OH, -CN 또는 -OH로 치환되고,
- [0653] D1, D2, E1 및 E2는 독립적으로 -O-, -N(R<sup>6</sup>)-, -N(C(O)R<sup>7</sup>)- 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 R<sup>6</sup> 및 R<sup>7</sup>은 독립적으로 수소 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬을 나타내고,
- [0654] W<sub>1</sub> 내지 W<sub>5</sub>는 독립적으로 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s2는 0 또는 1이고,
- [0655] W<sub>6</sub>는 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-알킬, -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-알킬 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s1은 0 또는 1이고 C<sub>1-6</sub>-알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH 또는 -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH로 치환되고; 여기서 (\*)는 X<sub>4</sub>에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0656] 23. 구체예 1 내지 22의 어떤 하나의 집합체로서, X<sub>4</sub>는 원자가 결합이고, W<sub>6</sub>는 피롤리딘-2,5-디온, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH 또는 -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH 중 하나로부터 선택되고, 여기서 (\*)는 GH에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.

[0657] 24. 구체에 22의 접합체로서, 친수성 스페이서는 하기로부터 선택된다.



[0658]



[0659]

[0660] 25. 하기 식(I)을 갖는 성장 호르몬 접합체 및 그것의 약학적으로 허용가능한 염:

[0661] A-W-B-GH (I)

[0662] 여기서

[0663] GH는 단일 Cys 돌연변이를 갖는 성장 호르몬 화합물을 나타내고,

[0664] B는 Cys 돌연변이의 황 잔기에 연결된 친수성 스페이서를 나타내고,

[0665] W는 A 및 B를 연결한 화학기를 나타내고, 그리고

[0666] A는 알부민 결합 잔기를 나타낸다.

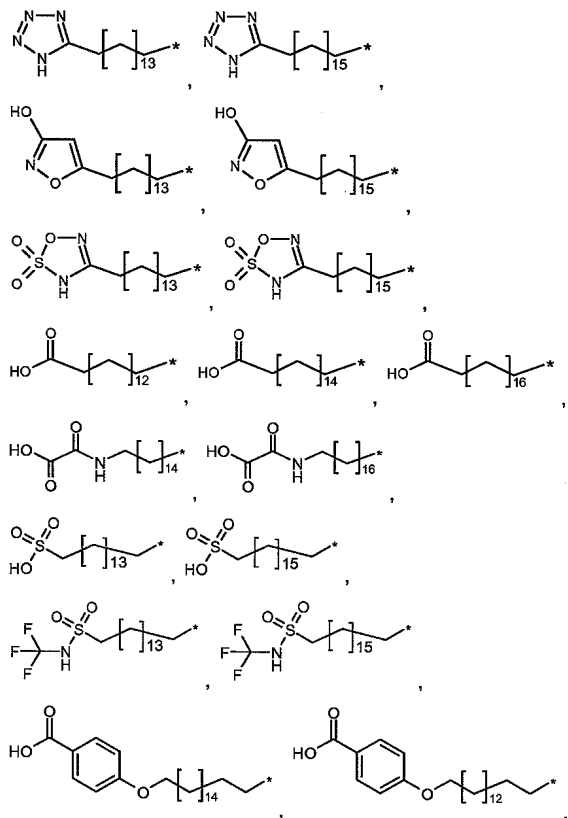
[0667] 26. 구체예 25의 접합체로서, GH는 사람 성장 호르몬(hGH)(SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열에 적어도 80% 동일성, 예를 들어 hGH, 또는 GH와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 성장 호르몬 화합물을 나타낸다.

[0668] 27. 구체예 25의 접합체로서, GH 또는 GH 접합체는 hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 80%를 갖는다.

[0669] 28. 구체예 25 내지 27의 어떤 하나의 접합체로서, 단일 Cys 돌연변이는 GH의 N-말단, H1, H2, L2 또는 H3로부터 선택된 영역의 어떤 하나에 위치된다.

[0670] 29. 구체예 25 내지 28의 어떤 하나의 접합체로서, GH는 T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C의 어떤 하나로부터 선택된 단일 Cys 돌연변이를 갖는다.

[0671] 30. 구체예 25 내지 29의 어떤 하나의 접합체로서, A는 하기로부터 선택된다.



[0672]

[0673] 여기서 \*는 B 내지 W로의 부착을 표시한다.

[0674] 31. 구체예 25 내지 30의 어떤 하나의 접합체로서, W는 하기 식을 갖는다.

[0675]  $-W_7-Y-$ ,

[0676] 여기서

[0677] Y는  $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -시클로알킬- $W_8-$  또는 원자가 결합이고,

[0678] I7은 0-6이고,

[0679]  $W_7$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{3-3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합인

로부터 선택되고; 여기서 s3는 0 또는 1이고,

[0680]  $W_8$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s4는 0 또는 1이다.

[0681] 32. 구체예 25 내지 31의 어떤 하나의 집합체로서, B는 하기 식을 갖는다.

[0682]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0683] 여기서

[0684]  $X_1$ 은  $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 이고,

[0685]  $X_2$ 는  $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 이고,

[0686]  $X_3$ 는  $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ 이고,

[0687]  $X_4$ 는  $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ 이고,

[0688] I1, I2, I3, I4, I5 및 I6는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,

[0689] m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-10으로부터 선택되고,

[0690] m2 및 m5는 독립적으로 0-25로부터 선택되고,

[0691] n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,

[0692] F는 아릴, 헤타릴, 피롤리딘-2,5-디온 또는 원자가 결합이고, 여기서 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  또는  $C_{1-6}$ -알킬로 치환되고,

[0693]  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 수소,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $C_{1-6}$ -알킬, 아릴 또는 헤타릴로부터 선택되고; 여기서 알킬, 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-CN$  또는  $-OH$ 로 치환되고,

[0694] D1, D2, E1 및 E2는 독립적으로  $-O-$ ,  $-N(R^6)-$ ,  $-N(C(O)R^7)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $R^6$  및  $R^7$ 은 독립적으로 수소 또는  $C_{1-6}$ -알킬을 나타내고,

[0695]  $W_1$  내지  $W_5$ 는 독립적으로  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s2}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s2는 0 또는 1이고,

[0696]  $W_6$ 는  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s1}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-NHC(O)C_{1-6}$ -알킬,  $-C(O)NHC_{1-6}$ -알킬 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s1은 0 또는 1이고  $C_{1-6}$ -알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온,  $-NHC(O)CH*CH_2COOH$  또는  $-NHC(O)CH_2CH*COOH$ 로 치환되고; 여기서 (\*)는 CH의 탄소 내지  $X_4$ 의 부착점을 나타낸다.

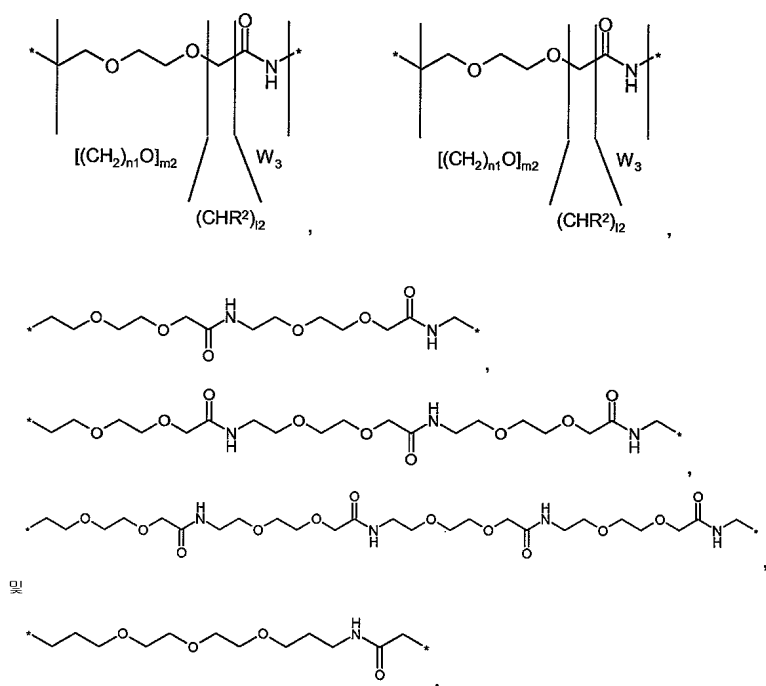
[0697] 33. 구체예 25 내지 32의 어떤 하나의 집합체로서,

[0698] I1, I2, I3, I4, I5 및 I6는 독립적으로 0-6이고,

[0699] m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-6이고,

[0700] m2 및 m5는 독립적으로 0-10이고, 그리고

- [0701]  $n_1, n_2, n_3$  및  $n_4$ 는 독립적으로 0-10이다.
- [0702] 34. 구체예 25 내지 33의 어떤 하나의 접합체로서, D1 및 D2는 독립적으로 -O- 또는  $-N(R^6)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택된다.
- [0703] 35. 구체예 25 내지 34의 어떤 하나의 접합체로서, E1 및 E2는 독립적으로 -O- 또는  $-N(R^6)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택된다.
- [0704] 36. 구체예 25 내지 35의 어떤 하나의 접합체로서,  $W_1$  내지  $W_8$ 은 독립적으로  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-NHC(O)C_{1-6}$ -알킬,  $-C(O)NHC_{1-6}$ -알킬 또는 원자가 결합으로 구성되는 군으로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온,  $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$  또는  $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ 로 치환되고; 여기서 (\*)는  $X_4$ 에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0705] 37. 구체예 25 내지 36의 어떤 하나의 접합체로서,  $R^1, R^2, R^3, R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 수소,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  또는  $C_{1-6}$ -알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$  또는  $-S(O)_2OH$ 로 치환된다.
- [0706] 38. 구체예 25 내지 37의 어떤 하나의 접합체로서,  $-[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}n_2-$  및  $-[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}n_4-$ , 여기서 E1 및 E2는 -O-이며, 하기로부터 선택된다.

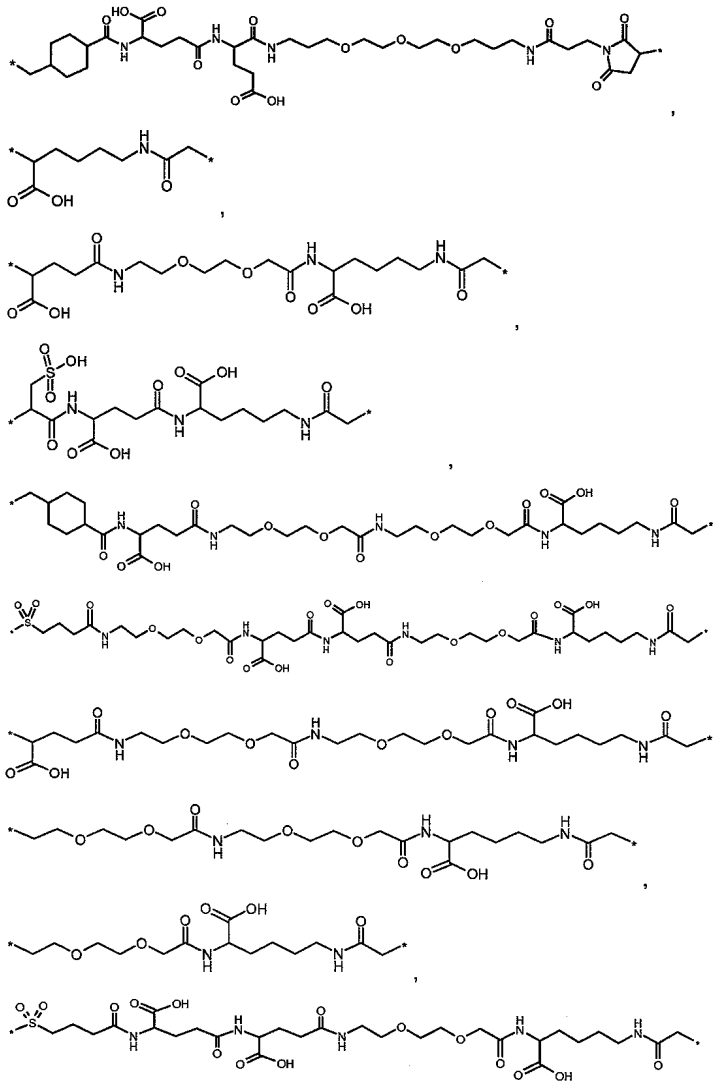


- [0707]
- [0708] 여기서 \*는 부착점, 즉 열린 결합을 표시하도록 의도된다.
- [0709]

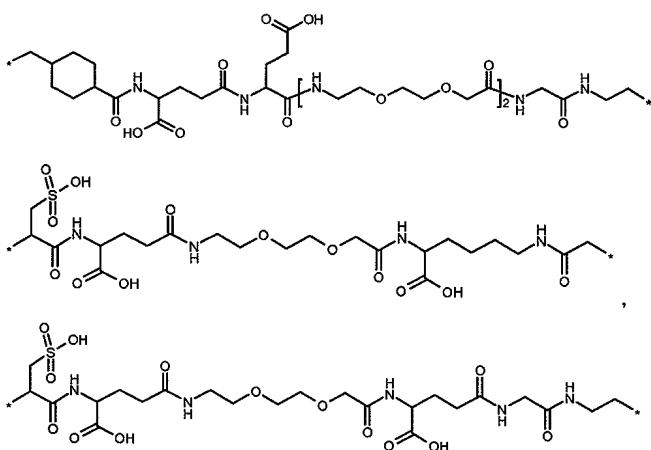
39. 구체예 25 내지 38의 어떤 하나의 접합체로서,  $X_4$ 는 원자가 결합이고,  $W_6$ 는 피롤리딘-2,5-디온,  $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$  또는  $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$  중 하나로부터 선택되고, 여기서 (\*)는 GH에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.

[0710]

40. 구체에 25 내지 39의 어떤 하나의 집합체로서, 여기서 B는 하기로부터 선택된다.



[0711]

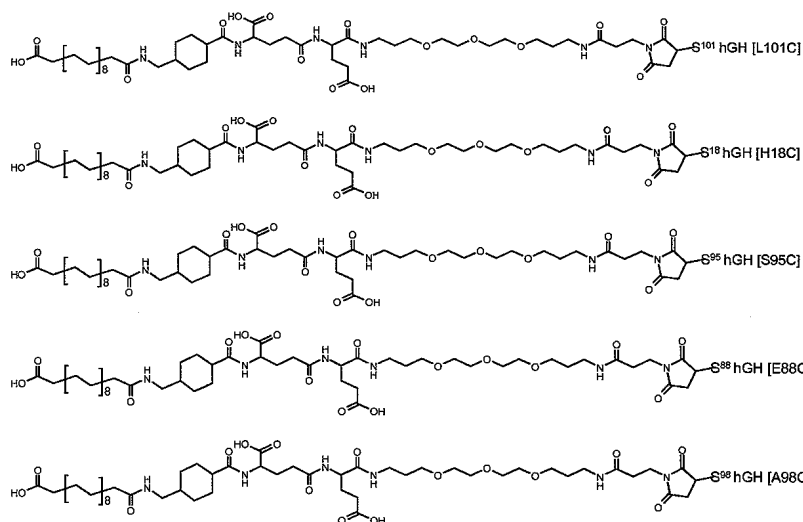


[0712]

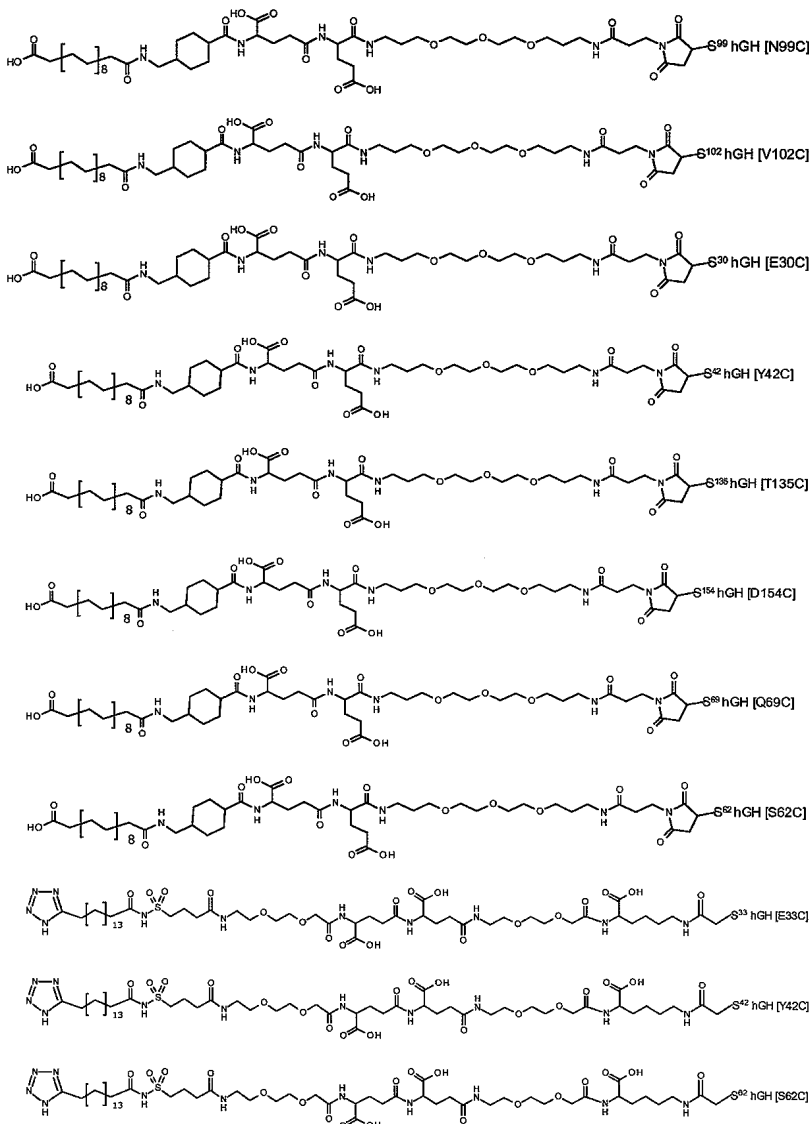


[0713]

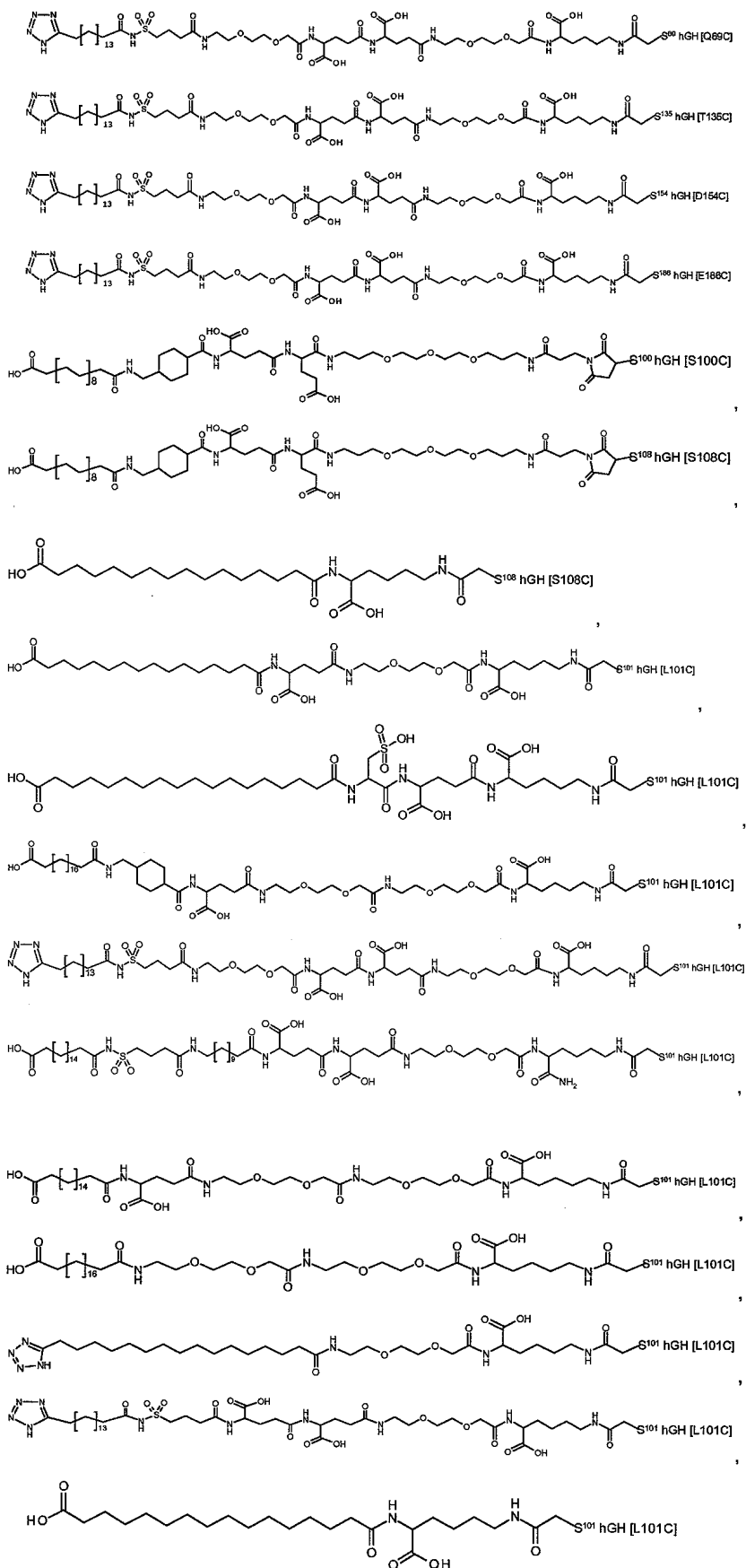
41. 구체에 25 내지 40의 어떤 하나의 집합체로서, 여기서 상기 화합물은 하기로부터 선택된다.



[0714]



[0715]



[0716]

[0717]

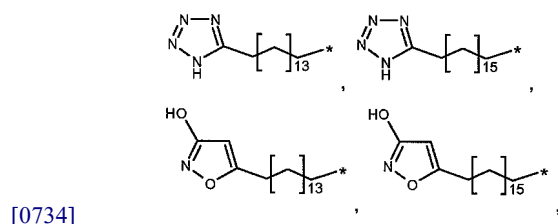
[0718]

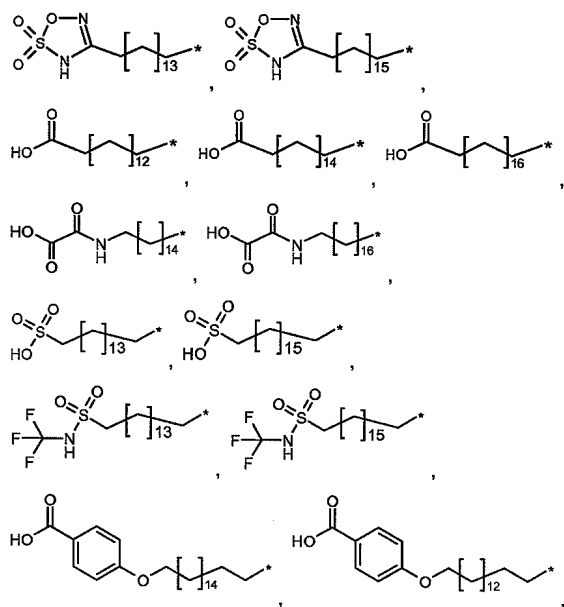
[0719]

42. 하기 식(I)을 갖는 성장 호르몬 접합체 및 그것의 약학적으로 허용가능한 염:

$$A-W-B-GH \quad (I)$$

- [0720] 여기서
- [0721] GH는 추가의 이황화 다리를 갖는 성장 호르몬 화합물을 나타내고,
- [0722] B는 친수성 스페이서를 나타내고,
- [0723] W는 A 및 B를 연결한 화학기를 나타내고, 그리고
- [0724] A는 알부민 결합 잔기를 나타낸다.
- [0725] 43. 구체예 42의 접합체로서, GH는 사람 성장 호르몬(hGH)(SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열에 적어도 80% 동일성, 예를 들어 hGH, 또는 GH와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 성장 호르몬 화합물을 나타낸다.
- [0726] 44. 구체예 42의 접합체로서, GH 또는 GH 접합체는 hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 80%를 갖는다.
- [0727] 45. 구체예 44의 접합체로서, 활성은 시험관 내 BAF 어세이(어세이I)에서 측정된다.
- [0728] 46. 구체예 42 내지 45의 어떤 하나의 접합체로서, GH는 추가의 이황화 결합을 루프 부분과 나선 부분 사이 또는 루프 부분 내에 또는 루프 부분들 사이에 또는 나선 부분들 사이에 포함한다.
- [0729] 47. 구체예 42 내지 46의 어떤 하나의 접합체로서, GH는 추가의 이황화 결합을 포함하며, 여기서 적어도 하나의 시스테인이 아미노산 잔기 128-154(L3)로부터의 루프 부분에 존재한다.
- [0730] 48. 구체예 42 내지 47의 어떤 하나의 접합체로서, GH는 추가의 이황화 결합을 포함하고, 추가의 이황화 결합은 나선 B 또는 나선 2와 같은 나선 부분을 갖는 루프 부분과 연결한다.
- [0731] 49. 구체예 42 내지 48의 어떤 하나의 접합체로서, GH는 추가의 이황화 결합을 포함하고, 추가의 이황화 결합은 나선 B 또는 나선 2를 갖는 L3(128-154)와 연결한다.
- [0732] 50. 구체예 42 내지 49의 어떤 하나의 접합체로서, 추가의 이황화 다리는 Q84C/Y143C와 같은 hGH(SEQ ID NO: 1)에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.
- [0733] 51. 구체예 42 내지 50의 어떤 하나의 접합체로서, A는 하기로부터 선택된다.





[0735]

[0736]

여기서 \*는 B 내지 W로의 부착을 표시한다.

[0737]

52. 구체예 42 내지 51의 어떤 하나의 집합체로서, W는 하기 식을 갖는다:

[0738]

$-\text{W}_7-\text{Y}-$ ,

[0739]

여기서

[0740]

Y는  $-(\text{CH}_2)_{17}-\text{C}_{3-10}-\text{시클로알킬}-\text{W}_8-$  또는 원자가 결합이고,

[0741]

17은 0-6이고,

[0742]

$\text{W}_7$ 은  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ ,  $-(\text{CH}_2)_{s3}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s3$ 는 0 또는 1이고,

[0743]

$\text{W}_8$ 은  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ ,  $-(\text{CH}_2)_{s4}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s4$ 는 0 또는 1이다.

[0744]

53. 구체예 42 내지 52의 어떤 하나의 집합체로서, B는 하기 식을 갖는다:

[0745]

$-\text{X}_1-\text{X}_2-\text{X}_3-\text{X}_4-$

[0746]

여기서

[0747]

$\text{X}_1$ 은  $-\text{W}_1-[(\text{CHR}^1)_{11}-\text{W}_2]_{m1}-\{[(\text{CH}_2)_{n1}\text{E}1]_{m2}-[(\text{CHR}^2)_{12}-\text{W}_3]_{m3}\}_{n2}-$ 이고,

[0748]

$\text{X}_2$ 는  $-(\text{CHR}^3)_{13}-\text{W}_4]_{m4}-\{[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E}2]_{m5}-[(\text{CHR}^4)_{14}-\text{W}_5]_{m6}\}_{n4}-$ 이고,

[0749]

$\text{X}_3$ 는  $-(\text{CHR}^5)_{15}-\text{W}_6]_{m7}-$ 이고,

[0750]

$\text{X}_4$ 는  $\text{F-D1}-(\text{CH}_2)_{16}-\text{D2}-$ 이고,

[0751]

11, 12, 13, 14, 15 및 16는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,

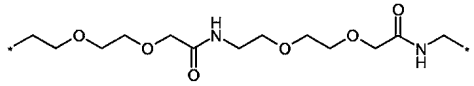
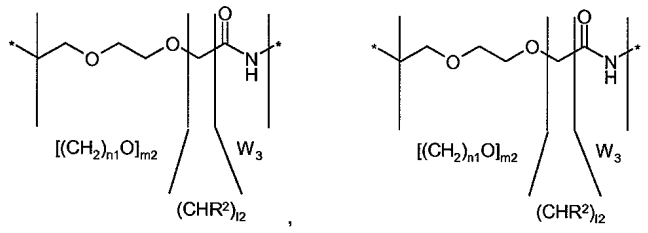
[0752]

$m1$ ,  $m3$ ,  $m4$ ,  $m6$  및  $m7$ 은 독립적으로 0-10으로부터 선택되고,

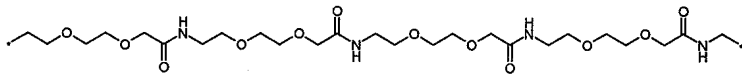
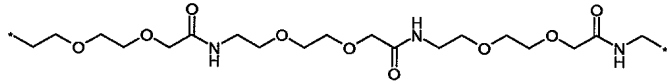
[0753]

$m2$  및  $m5$ 는 독립적으로 0-25로부터 선택되고,

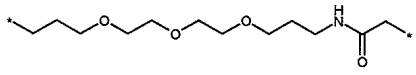
- [0754]  $n_1, n_2, n_3$  및  $n_4$ 는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0755] F는 아릴, 헤타릴, 피롤리딘-2,5-디온 또는 원자가 결합이고, 여기서 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$  또는  $\text{C}_{1-6}$ -알킬로 치환되고,
- [0756]  $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4$  및  $\text{R}^5$ 는 독립적으로 수소,  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ ,  $\text{C}_{1-6}$ -알킬, 아릴 또는 헤타릴로부터 선택되고; 여기서 알킬, 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠,  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ ,  $-\text{CN}$  또는  $-\text{OH}$ 로 치환되고,
- [0757] D1, D2, E1 및 E2는 독립적으로  $-\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^6)-$ ,  $-\text{N}(\text{C}(\text{O})\text{R}^7)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $\text{R}^6$  및  $\text{R}^7$ 은 독립적으로 수소 또는  $\text{C}_{1-6}$ -알킬을 나타내고,
- [0758]  $\text{W}_1$  내지  $\text{W}_5$ 는 독립적으로  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ ,  $-(\text{CH}_2)_{s2}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s_2$ 는 0 또는 1이고,
- [0759]  $\text{W}_6$ 는  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ ,  $-(\text{CH}_2)_{s1}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -알킬,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHC}_{1-6}$ -알킬 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $s_1$ 은 0 또는 1이고,  $\text{C}_{1-6}$ -알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}*\text{CH}_2\text{COOH}$  또는  $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}*\text{COOH}$ 로 치환되고; 여기서 (\*)는  $\text{X}_4$ 에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0760] 54. 구체예 42 내지 53의 어떤 하나의 접합체로서, 여기서
- [0761] I1, I2, I3, I4, I5 및 I6는 독립적으로 0-6이고,
- [0762]  $m_1, m_3, m_4, m_6$  및  $m_7$ 은 독립적으로 0-6이고,
- [0763]  $m_2$  및  $m_5$ 는 독립적으로 0-10이고, 그리고
- [0764]  $n_1, n_2, n_3$  및  $n_4$ 는 독립적으로 0-10이다.
- [0765] 55. 구체예 42 내지 54의 어떤 하나의 접합체로서, 여기서 D1 및 D2는 독립적으로  $-\text{O}-$  또는  $-\text{N}(\text{R}^6)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택된다.
- [0766] 56. 구체예 42 내지 55의 어떤 하나의 접합체로서, 여기서 E1 및 E2는 독립적으로  $-\text{O}-$  또는  $-\text{N}(\text{R}^6)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택된다.
- [0767] 57. 구체예 42 내지 56의 어떤 하나의 접합체로서,  $\text{W}_1$  내지  $\text{W}_8$ 은 독립적으로  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ ,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -알킬 또는  $-\text{C}(\text{O})\text{NHC}_{1-6}$ -알킬 또는 원자가 결합으로 구성되는 군으로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온,  $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}*\text{CH}_2\text{COOH}$  또는  $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}*\text{COOH}$ 로 치환되고; 여기서 (\*)는  $\text{X}_4$ 에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0768] 58. 구체예 42 내지 57의 어떤 하나의 접합체로서,  $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4$  및  $\text{R}^5$ 는 독립적으로 수소,  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$  또는  $\text{C}_{1-6}$ -알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$  또는  $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 로 치환된다.
- [0769] 59. 구체예 42 내지 58의 어떤 하나의 접합체로서,  $-\{[(\text{CH}_2)_{n1}\text{E1}]_{m2}-[(\text{CHR}^2)_{12}-\text{W}_3]_{m3}\}_{n2}-$  및  $-\{[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E2}]_{m5}-[(\text{CHR}^4)_{14}-\text{W}_5]_{m6}\}_{n4}-$ , 여기서 E1 및 E2는  $-\text{O}-$ 이고, 하기로부터 선택된다.



[0770]



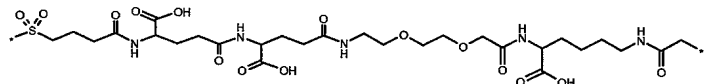
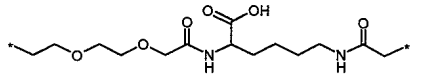
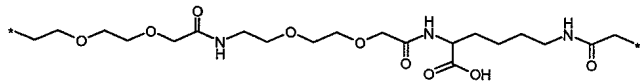
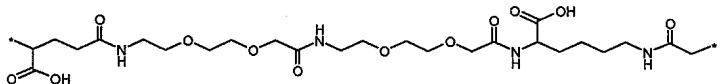
및



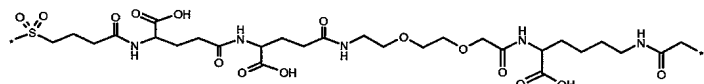
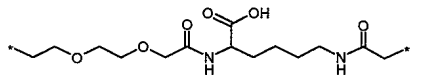
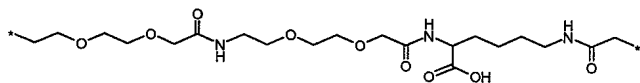
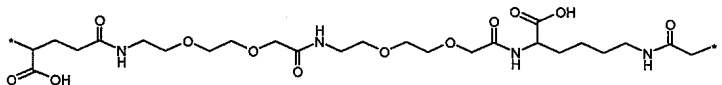
[0771]

[0772] 여기서 \*는 부착점, 즉 열린 결합을 표시하도록 의도된다.

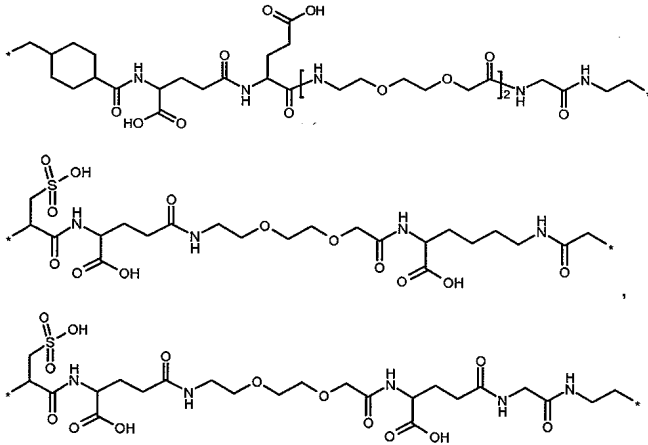
[0773] 60. 구체예 42 내지 59의 어떤 하나의 접합체로서, B는 하기로부터 선택된다.



[0774]



[0775]



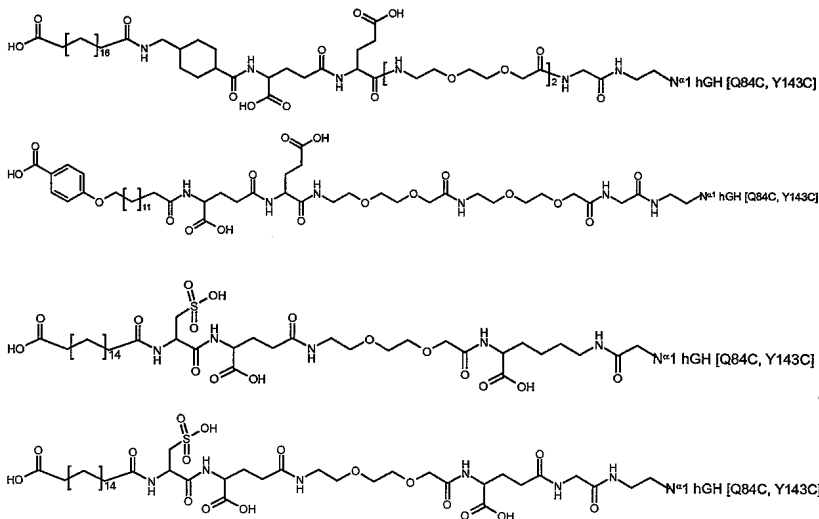
[0776]

[0777]

61. 구체예 42 내지 60의 어떤 하나의 접합체로서, B를 통한 A는 hGH SEQ ID NO:1에서의 위치 40, 위치 141에 대응하는 위치에서의 글루타민 잔기 또는 성장 호르몬 화합물의 N-말단 잔기에 부착된다.

[0778]

62. 구체예 42 내지 61의 어떤 하나의 접합체로서, 상기 화합물은 하기로부터 선택된다.



[0779]

[0780]

63. 하기 식(I)을 갖는 성장 호르몬 접합체 및 그것의 약학적으로 허용가능한 염:

[0781]

A-W-B-GH (I)

[0782]

여기서

[0783]

GH는 단일 Cys 돌연변이 및 추가의 이황화 다리를 갖는 성장 호르몬 화합물을 나타내고,

[0784]

B는 Cys 돌연변이의 황 잔기에 연결된 친수성 스페이서를 나타내고,

[0785]

W는 A 및 B를 연결한 화학기를 나타내고, 그리고

[0786]

A는 알부민 결합 잔기를 나타낸다.

[0787]

64. 구체예 63의 접합체로서, GH는 사람 성장 호르몬(hGH)(SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열에 적어도 80% 동일성, 예를 들어 hGH, 또는 GH와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 성장 호르몬 화합물을 나타낸다.

[0788]

65. 구체예 64의 접합체로서, GH 또는 GH 접합체는 hGH 성장 호르몬 활성의 적어도 80%를 갖는다.

[0789]

66. 구체예 63 내지 65의 어떤 하나의 접합체로서, 단일 Cys 돌연변이는 GH의 N-말단, H1, H2, L2 또는 H3으로부터 선택된 영역의 어떤 하나에 위치된다.

[0790]

67. 구체예 63 내지 66의 어떤 하나의 접합체로서, GH는 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 및 G190C의 어떤 하나, 예를 들어 T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C 및 G126C의 어떤 하나로부터 선택된 단일 Cys 돌연변이를 갖는다.

[0791] 68. 구체예 63 내지 67의 어떤 하나의 집합체로서, 추가의 이황화 결합은 루프 부분과 나선 부분 사이에 또는 루프 부분 내에 또는 루프 부분들 사이에 또는 나선 부분들 사이에 있다.

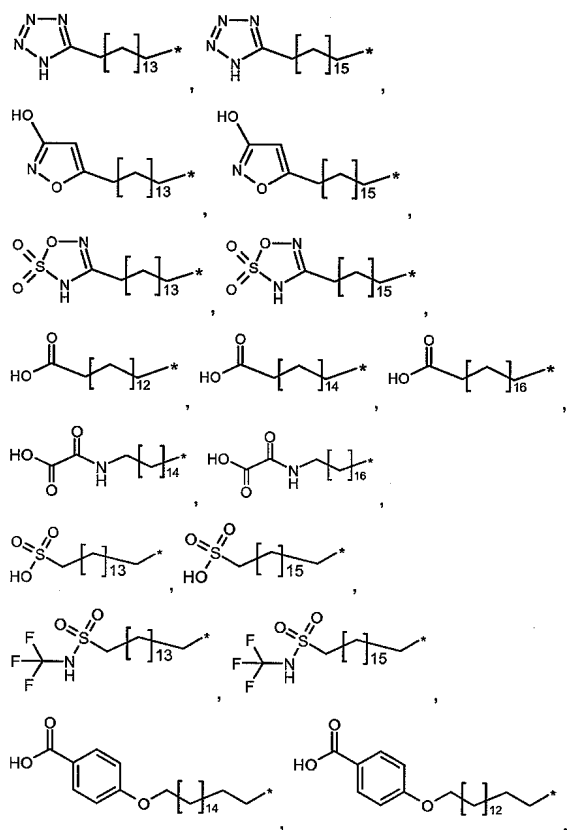
[0792] 69. 구체예 63 내지 68의 어떤 하나의 집합체로서, GH는 추가의 이황화 결합을 포함하며, 여기서 적어도 하나의 시스테인이 아미노산 잔기 128-154(L3)로부터의 루프 부분에 존재한다.

[0793] 70. 구체예 63 내지 69의 어떤 하나의 집합체로서, 추가의 이황화 결합은 루프 부분을 H2와 같은 나선 부분과 연결한다.

[0794] 71. 구체예 63 내지 70의 어떤 하나의 집합체로서, 추가의 이황화 결합은 L3을 나선 H2와 연결한다.

[0795] 72. 구체예 63 내지 71의 어떤 하나의 집합체로서, 추가의 이황화 다리는 Q84C/Y143C와 같은 hGH(SEQ ID NO: 1)에서의 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, I73C/S132C, I73C/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 및/또는 V185C/S188C에 대응하는 위치에서의 아미노산쌍들 중 적어도 하나 사이에 있다.

[0796] 73. 구체예 63 내지 72의 어떤 하나의 집합체로서, A는 하기로부터 선택된다.



[0797]

[0798] 여기서 \*는 B 내지 W로의 부착을 표시한다.

[0799] 74. 구체예 63 내지 73의 어떤 하나의 집합체로서, W는 하기 식을 갖는다:

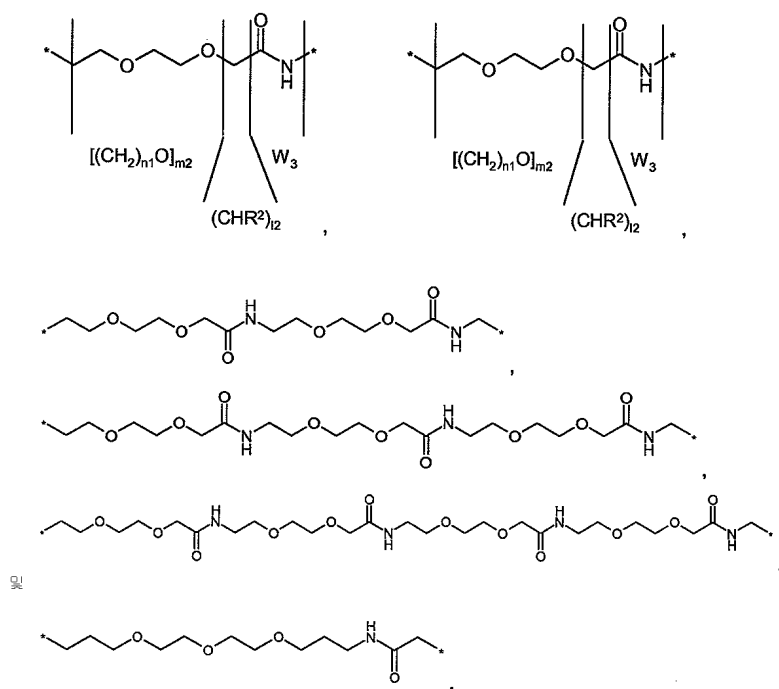
[0800]  $-W_7-Y-$ ,



- [0801] 여기서
- [0802] Y는  $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ -시클로알킬- $W_8$ - 또는 원자가 결합이고,
- [0803] I7은 0-6이고,
- [0804]  $W_7$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s3}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s3는 0 또는 1이고,
- [0805]  $W_8$ 은  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s4}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s4는 0 또는 1이다.
- [0806] 75. 구체예 63 내지 74의 어떤 하나의 집합체로서, B는 하기 식을 갖는다:
- [0807]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$
- [0808] 여기서
- [0809]  $X_1$ 은  $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 이고,
- [0810]  $X_2$ 는  $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 이고,
- [0811]  $X_3$ 는  $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ 이고,
- [0812]  $X_4$ 는  $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ 이고,
- [0813] I1, I2, I3, I4, I5 및 I6는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0814] m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-10으로부터 선택되고,
- [0815] m2 및 m5는 독립적으로 0-25로부터 선택되고,
- [0816] n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0817] F는 아릴, 헤타릴, 피롤리딘-2,5-디온 또는 원자가 결합이고, 여기서 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠,  $-CN$ ,  $-OH$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)_2OH$  또는  $C_{1-6}$ -알킬로 치환되고,
- [0818]  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  및  $R^5$ 는 독립적으로 수소,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-NH-C(=NH)-NH_2$ ,  $C_{1-6}$ -알킬, 아릴 또는 헤타릴로부터 선택되고; 여기서 알킬, 아릴 및 헤타릴기는 선택적으로 할로젠,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-S(O)OH$ ,  $-S(O)_2OH$ ,  $-CN$  또는  $-OH$ 로 치환되고,
- [0819] D1, D2, E1 및 E2는 독립적으로  $-O-$ ,  $-N(R^6)-$ ,  $-N(C(O)R^7)-$  또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $R^6$  및  $R^7$ 은 독립적으로 수소 또는  $C_{1-6}$ -알킬을 나타내고,
- [0820]  $W_1$  내지  $W_5$ 는 독립적으로  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s2}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ , 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s2는 0 또는 1이고,
- [0821]  $W_6$ 는  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHCH_2-$ ,  $-CH_2NHC(O)-$ ,  $-C(O)NHS(O)_2-$ ,  $-S(O)_2NHC(O)-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-C(O)CH_2-$ ,  $-CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH=CH-$ ,  $-CH=CHC(O)-$ ,  $-(CH_2)_{s1}-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-NHC(O)C_{1-6}$ -알킬,  $-C(O)NHC_{1-6}$ -알킬 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s1은 0 또는 1이고,  $C_{1-6}$ -알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온,  $-NHC(O)CH*CH_2COOH$  또는  $-NHC(O)CH_2CH*COOH$ 로 치환되고; 여기서 (\*)는  $X_4$ 에 대한 CH의

탄소 원자의 부착점을 나타낸다.

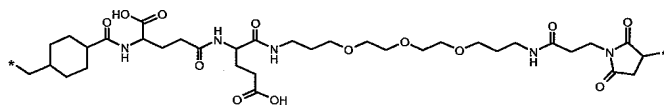
- [0822] 76. 구체예 63 내지 75의 어떤 하나의 접합체로서,
- [0823] I1, I2, I3, I4, I5 및 I6는 독립적으로 0-6이고,
- [0824] m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-6이고,
- [0825] m2 및 m5는 독립적으로 0-10이고, 그리고
- [0826] n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 0-10이다.
- [0827] 77. 구체예 63 내지 75의 어떤 하나의 접합체로서, D1 및 D2는 독립적으로 -O- 또는  $-N(R^6)-$  또는 원자가 결합 으로부터 선택된다.
- [0828] 78. 구체예 63 내지 77의 어떤 하나의 접합체로서, E1 및 E2는 독립적으로 -O- 또는  $-N(R^6)-$  또는 원자가 결합 으로부터 선택된다.
- [0829] 79. 구체예 63 내지 78의 어떤 하나의 접합체로서, W<sub>1</sub> 내지 W<sub>8</sub>은 독립적으로 -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH<sub>2</sub>NHC(O)-, -C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-, -NHC(O)C<sub>1-6</sub>-알킬 또는 -C(O)NHC<sub>1-6</sub>-알킬 또는 원자가 결합으로 구성되는 군으로 부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로 옥소, 피롤리딘-2,5-디온, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH 또는 -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH로 치환되고; 여기서 (\*)는 X<sub>4</sub>에 대한 CH의 탄소 원자의 부착점을 나타낸다.
- [0830] 80. 구체예 63 내지 79의 어떤 하나의 접합체로서, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 독립적으로 수소, -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -S(O)<sub>2</sub>OH 또는 C<sub>1-6</sub>-알킬로부터 선택되고; 여기서 알킬기는 선택적으로 -C(O)OH, -C(O)NH<sub>2</sub> 또는 -S(O)<sub>2</sub>OH로 치환 된다.
- [0831] 81. 구체예 63 내지 80의 어떤 하나의 접합체로서,  $-[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$  및  $-[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ , 여기서 E1 및 E2는 -O-이며, 하기로부터 선택된다.



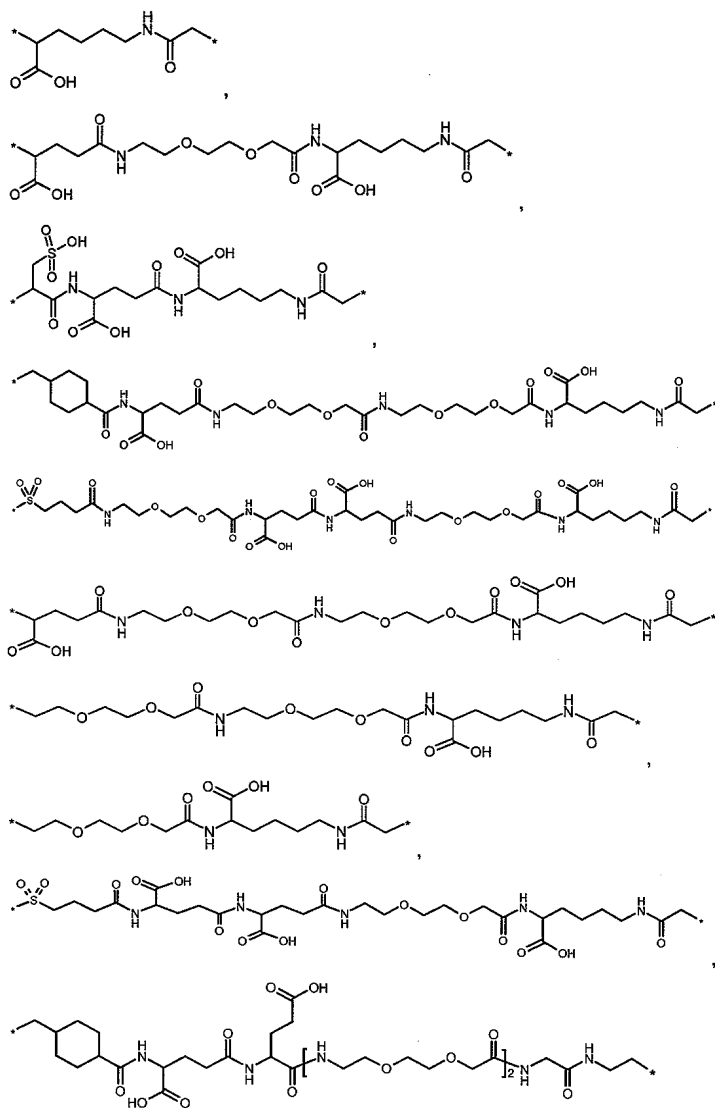
- [0832] 여기서 \*는 부착점, 즉 열린 결합을 표시하도록 의도된다.
- [0833]
- [0834] 82. 구체예 63 내지 81의 어떤 하나의 접합체로서, X<sub>4</sub>는 원자가 결합이고, W<sub>6</sub>는 피롤리딘-2,5-디온, -NHC(O)CH\*CH<sub>2</sub>COOH 또는 -NHC(O)CH<sub>2</sub>CH\*COOH 중 하나로부터 선택되고, 여기서 (\*)는 GH에 대한 CH의 탄소 원자의

부착점을 나타낸다.

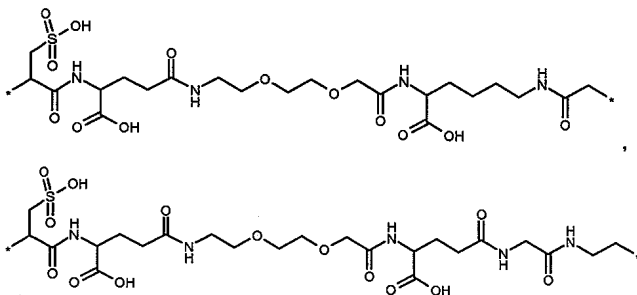
[0835] 83. 구체예 63 내지 82의 어떤 하나의 접합체로서, B는 하기로부터 선택된다.



[0836]



[0837]

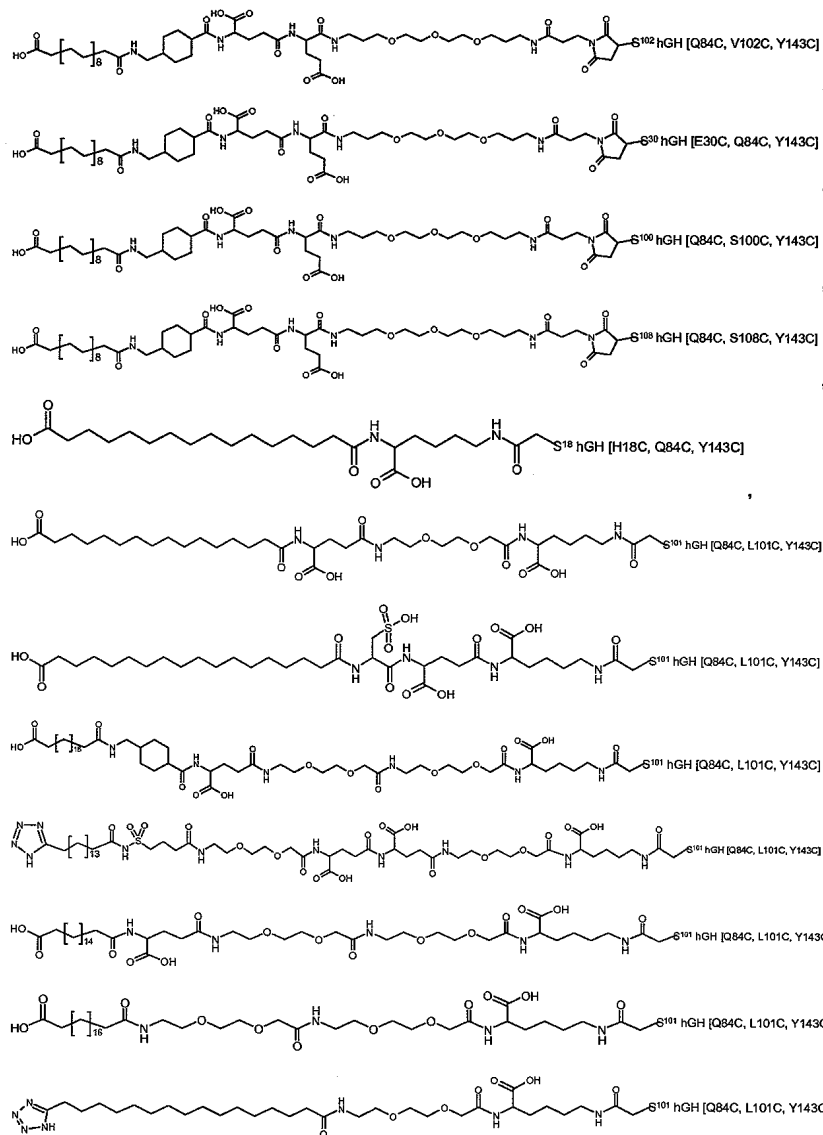


[0838]

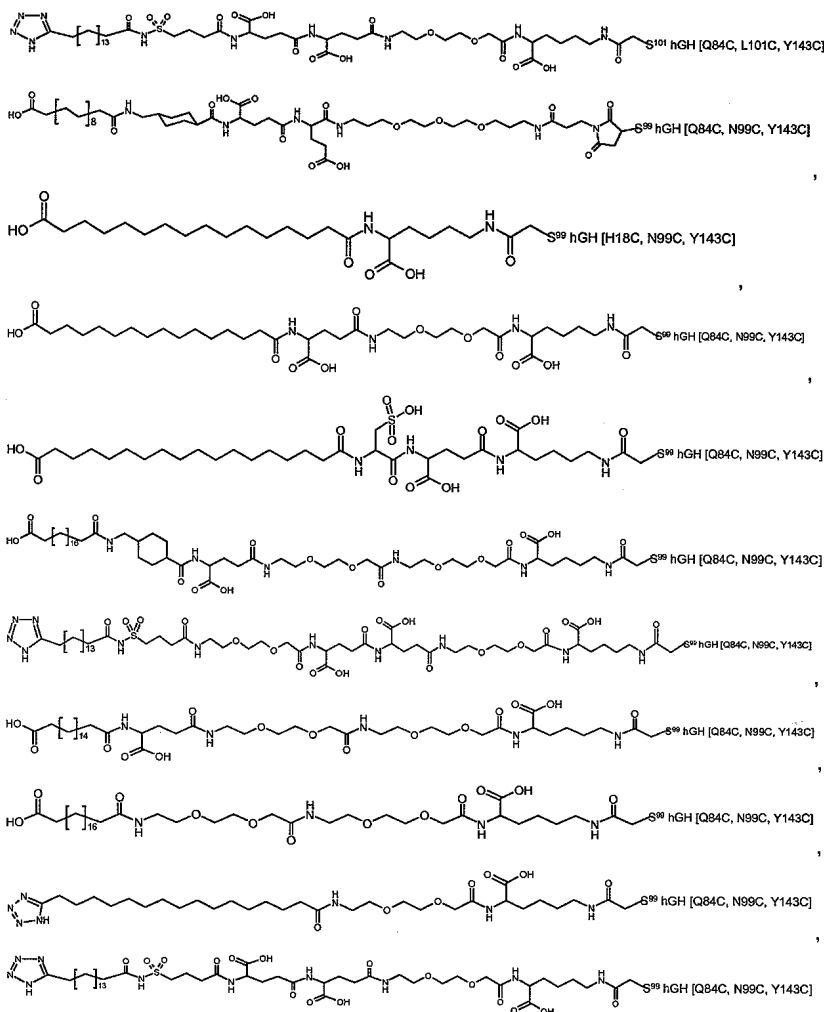
[0839] 84. 구체에 1 내지 83의 어떤 하나의 접합체로서, 친수성 스페이서(B)를 통한 하나의 알부민 결합 잔기(A)는 상기 GH에 연결된다.

The figure displays six chemical structures of growth hormone (hGH) variants, each consisting of two polypeptide chains linked by a disulfide bond. The chains are connected via a common C-terminal sequence. The variants are labeled as follows:  
- Top row:  $\text{S}^{101}$  hGH [Q84C, L101C, Y143C]  
- Second row:  $\text{S}^{18}$  hGH [H18C, Q84C, Y143C]  
- Third row:  $\text{S}^{98}$  hGH [Q84C, S95C, Y143C]  
- Fourth row:  $\text{S}^{62}$  hGH [Q84C, E88C, Y143C]  
- Fifth row:  $\text{S}^{98}$  hGH [Q84C, A98C, Y143C]  
- Bottom row:  $\text{S}^{98}$  hGH [Q84C, N99C, Y143C]

[0841]



– 98 –



[0843]

[0844]

86. 구체예 1 내지 85의 어떤 하나의 접합체로서, 친수성 스페이서는  $m\text{LogP} < 0$  을 갖는다.

[0845]

87. 구체예 1 내지 86의 어떤 하나의 접합체로서, 상기 친수성 스페이서의 물질량은 80 D 내지 1500 D의 범위 또는 300 D 내지 1100 D의 범위에 있다.

[0846]

88. 구체예 1 내지 87의 어떤 하나의 접합체로서, 상기 알부민 결합 잔기는 친유성 잔기이다.

[0847]

89. 구체예 1 내지 88의 어떤 하나의 접합체로서, 상기 알부민 결합 잔기는 알부민과 비공유 결합한다.

[0848]

90. 구체예 1 내지 89의 어떤 하나의 접합체로서, 상기 알부민 결합 잔기는 생리학적 pH에서 음전하된다.

[0849]

91. 구체예 1 내지 90의 어떤 하나의 접합체로서, 상기 알부민 결합 잔기는 약 10  $\mu\text{M}$  미만 또는 약 1  $\mu\text{M}$  미만의 사람 혈청 알부민과 결합 친화력을 갖는다.

[0850]

92. 구체예 1 내지 91의 어떤 하나의 접합체로서, 상기 알부민 결합 잔기는 곧은쇄 알킬기, 분기된 알킬기,  $\omega$ -카르복시산기 또는  $\omega$ -카르복시산 이성질체를 갖는 군으로부터 선택된다.

[0851]

93. 구체예 1 내지 92의 어떤 하나의 접합체로서, 상기 알부민 결합 잔기는 6 내지 40개의 탄소 원자, 8 내지 26개의 탄소 원자 또는 8 내지 20개의 탄소 원자를 갖는다.

[0852]

94. 구체예 1 내지 93의 어떤 하나의 접합체로서, 상기 알부민 결합 잔기는 펩티드, 예를 들어 40개 미만의 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드이다.

[0853]

95. 구체예 1 내지 94의 어떤 하나의 접합체로서, 친수성 스페이서(B)를 통한 2개의 알부민 결합 잔기(A)는 상기 GH에 연결된다.

[0854]

96. 치료에 사용하기 위한 구체예 1 내지 95의 어떤 하나의 접합체.

[0855]

97. 구체예 1 내지 95의 어떤 하나의 접합체를 포함하는 약학적 조성물로서, 선택적으로 약학적으로 허용가능한

부형제와 결합한다.

- [0856] 98. 구체에 97의 약학적 조성물로서, 상기 조성물은 환자에게 혀, 혀 밑, 볼 내, 입, 경구, 위 및 장, 코, 폐 상피, 표피, 경피, 및 비경구를 통해 투여될 수 있다.
- [0857] 99. 성장 호르몬 결핍(GHD)을 치료하는 방법으로서, 방법은 구체에 1 내지 95의 어떤 하나의 접합체의 치료적으로 효과적인 양을 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0858] 100. 터너 증후군; 프레더-윌리 증후군(PWS); 누난 증후군; 다운 증후군; 만성 신장 질환, 소아류머티스 관절염; 낭포성섬유증, HAART 치료를 받는 아동의 HIV-감염(HIV/HALS 아동); 만삭 부당경량아로 출생한 저신장 증 환자(SGA); 저출생 체중으로 출생한 저신장증 환자(VLBW)(SGA 아님); 선천성 골이형성증; 연골저형성증; 연골무형성증; 저신장증(ISS); 성인의 GHD; 장골, 같은 경골, 비골, 대퇴골, 상완골, 요골, 척골, 쇄골, 중수골, 중족골, 및 손발가락의 또는 안의 골절; 손 및 음식 기저의 두개골과 같은 해면골의 또는 안의 골절; 예를 들어 손, 무릎, 또는 어깨의 힘줄 또는 인대 수술 후의 환자; 신연골형성술을 갖는 또는 받는 환자; 무릎, 골반, 어깨, 팔꿈치, 손목 또는 턱과 같은 곳에 골반 또는 디스크 복위술, 반월상연골판 봉합술, 척추융합술 또는 보철물 고정술 후의 환자; 네일, 스크류 및 플레이트와 같은 골접합 물질로 고정된 환자; 골절의 불유합 또는 부정유합이 있는 환자; 예를 들어 경골 또는 엄지발가락의 골절술 후의 환자; 그라프트 이식 후의 환자; 트라우마 또는 관절염에 의해 야기된 무릎의 관절 연골 악화; 터너 증후군이 있는 환자의 골다공증; 남성 골다공증; 만성 투석의 성인 환자(APCD); APCD에서의 영양실조 관련 심혈관질환; APCD에서의 악액질 역전; APCD에서의 암; 만성 폐쇄성 폐질환; APCD에서의 HIV; APCD가 있는 노인; APCD에서의 만성 간질환, APCD에서의 피로 증후군; 크론병; 손상된 간 기능; HIV 감염이 있는 남성; 짧은창자 증후군; 복부비만; HIV 연관 지방이상발육 증후군(HALS); 남성 불임; 주요한 대기 수술, 알코올/약물 중독 치료 또는 신경성 트라우마 후의 환자; 노화; 노쇠 노인; 퇴행성 관절염; 트라우마로 손상된 연골; 발기부전; 섬유근육통; 기억 장애; 우울증; 외상성 뇌손상; 지주막하 출혈; 저출생 체중; 대사 증후군; 클루코코르티코이드 근육병; 클루코코르티코이드 치료로 인한 환자의 저신장증, 근육 조직, 신경 조직 또는 상처의 치료 가속화; 손상된 조직으로의 혈류 가속화 또는 개선; 또는 손상된 조직에 감염을 감소로 치료하는 방법으로서, 방법은 구체에 1 내지 95의 어떤 하나의 접합체의 치료적으로 효과적인 양을 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0859] 101. 성장 호르몬 결핍(GHD)의 치료를 위한 약물의 제조에서 구체에 1 내지 95의 어떤 하나의 접합체의 사용.
- [0860] 102. 터너 증후군; 프레더-윌리 증후군(PWS); 누난 증후군; 다운 증후군; 만성 신장 질환, 소아류머티스 관절염; 낭포성섬유증, HAART 치료를 받는 아동의 HIV-감염(HIV/HALS 아동); 만삭 부당경량아로 출생한 저신장 증 환자(SGA); 저출생 체중으로 출생한 저신장증 환자(VLBW)(SGA 아님); 선천성 골이형성증; 연골저형성증; 연골무형성증; 저신장증(ISS); 성인의 GHD; 장골, 같은 경골, 비골, 대퇴골, 상완골, 요골, 척골, 쇄골, 중수골, 중족골, 및 손발가락의 또는 안의 골절; 손 및 음식 기저의 두개골과 같은 해면골의 또는 안의 골절; 예를 들어, 손, 무릎, 또는 어깨에 힘줄 또는 인대 수술 후의 환자; 신연골형성술을 갖는 또는 받는 환자; 무릎, 골반, 어깨, 팔꿈치, 손목 또는 턱과 같은 곳에 골반 또는 디스크 복위술, 반월상연골판 봉합술, 척추융합술 또는 보철물 고정술 후의 환자; 네일, 스크류 및 플레이트와 같은 골접합 물질로 고정된 환자; 골절의 불유합 또는 부정유합이 있는 환자; 예를 들어 경골 또는 엄지발가락의 골절술 후의 환자; 그라프트 이식 후의 환자; 트라우마 또는 관절염에 의해 야기된 무릎의 관절 연골 악화; 터너 증후군이 있는 환자의 골다공증; 남성 골다공증; 만성 투석의 성인 환자(APCD); APCD에서의 영양실조 관련 심혈관질환; APCD에서의 악액질 역전; APCD에서의 암; 만성 폐쇄성 폐질환; APCD에서의 HIV; APCD가 있는 노인; APCD에서의 만성 간질환, APCD에서의 피로 증후군; 크론병; 손상된 간 기능; HIV 감염이 있는 남성; 짧은창자 증후군; 복부비만; HIV 연관 지방이상발육 증후군(HALS); 남성 불임; 주요한 대기 수술, 알코올/약물 중독 치료 또는 신경성 트라우마 후의 환자; 노화; 노쇠 노인; 퇴행성 관절염; 트라우마로 손상된 연골; 발기부전; 섬유근육통; 기억 장애; 우울증; 외상성 뇌손상; 지주막하 출혈; 저출생 체중; 대사 증후군; 클루코코르티코이드 근육병; 클루코코르티코이드 치료로 인한 환자의 저신장증, 근육 조직, 신경 조직 또는 상처의 치료 가속화; 손상된 조직으로의 혈류 가속화 또는 개선; 또는 손상된 조직에 감염을 감소로 치료하는 방법으로서, 방법은 구체에 1 내지 95의 어떤 하나의 접합체의 사용.
- [0861] 103. 식(III)의 화합물
- [0862] A-W-B1-U (III)
- [0863] 여기서 A는 알부민 결합 잔기를 나타내고,
- [0864] B1은 친수성 스페이서를 나타내고,

- [0865] W는 A 및 B1을 연결하는 화학기이고, U는 집합 부분을 나타낸다.
- [0866] 104. 구체예 103에 따른 화합물로서, A 및 W는 상기 구체예의 어떤 것으로 한정된다.
- [0867] 105. 구체예 103 또는 104에 따른 화합물로서, U는 아릴, 헤테로아릴, 치환된 말레이미드 또는  $\text{-NHC(O)CH}_2\text{CH}_2\text{-}$  피롤리딘-2,5-디온과 같은 피롤리딘-2,5-디온을 포함하거나 또는 이루어진다.
- [0868] 106. 구체예 103 또는 104에 따른 화합물로서, U는  $\text{D1-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-D2}$ 를 포함하고, 여기서 D1 및 D2는 독립적으로  $\text{-O-}$ ,  $\text{-N(R6)-}$ ,  $\text{-NC(O)R7-}$  또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 R6 및 R7은 독립적으로 수소 또는  $\text{C}_{1-6}$ -알킬을 나타낸다.
- [0869] 107. 구체예 103 또는 104에 따른 화합물로서, U는 탈리기, 예를 들어 Cl, Br, I,  $\text{-OH}$ ,  $\text{-OS(O)}_2\text{Me}$ ,  $\text{-OS(O)}_2\text{CF}_3$ ,  $\text{-Ots}$ 를 포함하거나 또는 이루어진다.
- [0870] 108. 구체예 107에 따른 화합물로서, 탈리기는 Cl, Br 및 I, 바람직하게 Br로부터 선택된 할로겐 화합물이다.
- [0871] 109. 구체예 103 또는 104에 따른 화합물로서, U는  $\text{-C(O)NHCH}_2\text{-CH=CH}_2$ 와 같은 알릴 아민( $\text{H}_2\text{C=CH-CH}_2\text{-NH}_2$ )을 포함하거나 또는 이루어진다.
- [0872] 110. 구체예 103 또는 104에 따른 화합물로서, U는  $\text{-NH}_2$ 와 같은 아민을 포함하거나 또는 이루어진다.
- [0873] 111. 구체예 103 내지 110의 어떤 것에 따른 화합물로서, 치료적 화합물은 폴리펩티드이다.
- [0874] 112. 구체예 103 내지 110의 어떤 것에 따른 화합물로서, 치료적 화합물은 단일 유리 시스테인을 갖는 폴리펩티드이다.
- [0875] 113. 구체예 103 또는 104에 따른 화합물로서, U는  $\text{-CHO}$ 와 같은 알데히드를 포함하거나 또는 이루어진다.
- [0876] 114. 구체예 103 내지 113의 어떤 것에 따른 화합물로서, 친수성 스페이서(B1)는 하기 식을 갖는다:
- [0877]  $\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-X}_3\text{-X}_4\text{-}$
- [0878] 여기서
- [0879]  $\text{X}_1$ 은  $\text{-W}_1\text{-[(CHR}^1\text{)}_{11}\text{-W}_2\text{]}_{m1}\text{-}\{[(\text{CH}_2)_{n1}\text{E1}]_{m2}\text{-[(CHR}^2\text{)}_{12}\text{-W}_3\text{]}_{m3}\}_{n2}\text{-}$ 이고,
- [0880]  $\text{X}_2$ 는  $\text{-[(CHR}^3\text{)}_{13}\text{-W}_4\text{]}_{m4}\text{-}\{[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E2}]_{m5}\text{-[(CHR}^4\text{)}_{14}\text{-W}_5\text{]}_{m6}\}_{n4}\text{-}$ 이고,
- [0881]  $\text{X}_3$ 는  $\text{-[(CHR}^5\text{)}_{15}\text{]}_{m7}\text{-}$ 이고,
- [0882]  $\text{X}_4$ 는 원자가 결합이고,
- [0883] I1, I2, I3, I4, 및 I5는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0884] m1, m3, m4, m6 및 m7은 독립적으로 0-10으로부터 선택되고,
- [0885] m2 및 m5는 독립적으로 0-25로부터 선택되고,
- [0886] n1, n2, n3 및 n4는 독립적으로 0-16으로부터 선택되고,
- [0887]  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$  및  $\text{R}^5$ 는 독립적으로 수소,  $\text{-C(O)OH}$ ,  $\text{-C(O)NH}_2$ ,  $\text{-S(O)OH}$ ,  $\text{-S(O)}_2\text{OH}$ ,  $\text{-NH-C(=NH)-NH}_2$ ,  $\text{C}_{1-6}$ -알킬, 아릴 또는 헤테라릴로부터 선택되고; 여기서 알킬, 아릴 및 헤테라릴기는 선택적으로 할로겐,  $\text{-C(O)OH}$ ,  $\text{-C(O)NH}_2$ ,  $\text{-S(O)OH}$ ,  $\text{-S(O)}_2\text{OH}$ ,  $\text{-CN}$  또는  $\text{-OH}$ 로 치환되고,
- [0888] E1 및 E2는 독립적으로  $\text{-O-}$ ,  $\text{-N(R}^6\text{)-}$ ,  $\text{-N(C(O)R}^7\text{)-}$  또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서  $\text{R}^6$  및  $\text{R}^7$ 은 독립적으로 수소 또는  $\text{C}_{1-6}$ -알킬을 나타내고,
- [0889]  $\text{W}_1$  내지  $\text{W}_5$ 는 독립적으로  $\text{-C(O)NH-}$ ,  $\text{-NHC(O)-}$ ,  $\text{-C(O)NHCH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{NHC(O)-}$ ,  $\text{-C(O)NHS(O)}_2\text{-}$ ,  $\text{-S(O)}_2\text{NHC(O)-}$ ,

-OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, 또는 원자가 결합으로부터 선택되고; 여기서 s2는 0 또는 1이다.

[0890] 원소 또는 원소들을 참고로 하여 "포함하는" "갖는", "포함하는" 또는 "함유하는"과 같은 용어를 사용하는 본 발명의 어떤 양태 또는 구체예의 기술은, 달리 언급되지 않는 한 또는 상황에 의해 달리 명백히 반박되지 않는 한, 그 구체적인 원소 또는 원소들을 "구성한다", "본질적으로 구성한다" 또는 "실질적으로 포함한다"로, 본 발명의 유사한 양태 또는 구체예를 위한 지지를 제공하도록 의도된다(예를 들어, 구체적인 원소를 포함하는 본원에 기술된 조성물은, 달리 언급되지 않는 한 또는 상황에 의해 달리 명백히 반박되지 않는 한, 그 원소로 구성되는 조성물을 기술하는 것으로서도 이해되어야 함).

[0891] 본 발명은 본원에 존재하는 양태 또는 청구범위에서 재인용된 대상 물질의 모든 변형 및 등가물을 적용되는 법칙에 의해 허용되는 최대 정도로 포함한다.

[0892] 본 발명은 하기 실시예에 의해 더 도시되나, 보호의 범위를 제한하도록 해석되지는 않는다. 하기 기술 및 하기 실시예에 개시된 특징은, 각각 및 그것의 어떤 조합 둘다로, 그것의 다양한 형에서 본 발명을 실현하는 물질이다.

### [0893] 실시예

#### [0894] 약어:

[0895] amu = 원자 질량 단위

[0896] CV = 컬럼 부피

[0897] hr(s) = 시간(들)

[0898] Hz = 헤르츠

[0899] L = 리터(들)

[0900] M = 몰농도

[0901] mbar = 밀리바

[0902] mg = 밀리그램(들)

[0903] min. = 분(들)

[0904] mL = 밀리리터(들)

[0905] mM = 밀리몰농도

[0906] mm = 밀리미터(들)

[0907] mmol = 밀리몰(들)

[0908] nmol = 나노몰(들)

[0909] mol = 몰(들)

[0910]  $\mu$  L = 마이크로리터

[0911] N = 정상

[0912] nm = 나노미터(들)

[0913] sec = 초(들)

[0914] ppm = 백만분율

[0915] ESI = 전자분무 이온화

[0916] i.v. = 정맥 내

[0917] m/z = 단위 전하당 질량



[0918]	MS = 질량 분석법
[0919]	HPLC = 고압 액체 크로마토그래피
[0920]	RP = 역상
[0921]	HPLC-MS = 고압 액체 크로마토그래피 - 질량 분석법
[0922]	NMR = 핵자기공명 분광법
[0923]	p.o. = 경구의
[0924]	rt 또는 체류 시간 = 실온
[0925]	s.c. = 피하의
[0926]	tr = 체류 시간
[0927]	Boc = <i>tert</i> 부틸옥시카보닐
[0928]	O- <i>t</i> -Bu = <i>tert</i> 부틸 에스테르
[0929]	<i>t</i> -Bu = <i>tert</i> 부틸
[0930]	Boc-4-ABZ-OH = 4- <i>tert</i> -부톡시카보닐아미노-벤조산
[0931]	DCM = 디클로로메탄, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 염화메틸렌
[0932]	DIC = 디이소프로필카르보디이미드
[0933]	DIPEA = N,N-디이소프로필에틸아민
[0934]	DMF = N,N-디메틸포름아미드
[0935]	DMSO = 디메틸설폭시드
[0936]	DTT = 디티오프레이톨
[0937]	EDAC = 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 히드로클로리드
[0938]	Et <sub>2</sub> O = 디에틸 에테르
[0939]	EtOAc = 아세트산에틸
[0940]	Fmoc = 9H-플루오렌-9-일메톡시카보닐
[0941]	Fmoc-Glu-O- <i>t</i> -Bu = N-Fmoc-글루탐산-1- <i>t</i> -부틸 에스테르
[0942]	Fmoc-Lys(Mtt)-OH =(S)-6-[(디페닐-p-톨일-메틸)-아미노]-2-(9H-플루오렌-9-일메톡시카보닐아미노)-헥산산
[0943]	Fmoc-OEG-OH =(2[2-(Fmoc-아미노)에톡시]에톡시)아세트산
[0944]	OEG =(2[2-(아미노)에톡시]에톡시)아세틸
[0945]	Fmoc-Thx-OH = N-Fmoc- <i>trans</i> -4-아미노메틸시클로헥산카르복시산
[0946]	H <sub>2</sub> O = 물
[0947]	HOBt = 1-히드록시벤조트리아졸
[0948]	MeCN = 아세토니트릴
[0949]	MeOH = 메탄올
[0950]	MTP = 3-메틸-티오-1-프로판올
[0951]	NaCl = 염화나트륨
[0952]	NaOH = 수산화나트륨

- [0953] NMP = N-메틸피롤리딘-2-온
- [0954] OEG =(2[2-(아미노)에톡시]에톡시)아세트산
- [0955] TFA = 트리플루오로아세트산
- [0956] THF = 테트라히드로푸란
- [0957] TIS = 트리아이소프로필실란
- [0958]  $\text{CDCl}_3$  = 듀테로 클로로포름
- [0959]  $\text{CD}_3\text{OD}$  = 테트라듀테로 메탄올
- [0960]  $\text{DMSO}-d_6$  = 헥사듀테로 디메틸설폭시드
- [0961] TNBS = 트리니트로벤젠술포산
- [0962] TSTU = O-(N-숙신이미딜)-1,1,3,3-테트라메틸 우라늄 테트라플루오로보레이트
- [0963] 실시예들 또한 하기 일반적인 방법을 이용한다:
- [0964] **hGH 화합물을 제조하는 일반적인 방법.**
- [0965] 성장 호르몬 화합물을 위한 유전자 코딩화는 플라스미드벡터에 재조합체로 삽입되었다. 적합한 *E.coli* 균주는 후속으로 플라스미드벡터를 사용하여 변형되었다. hGH 또는 GH 변종은 N-말단 메티오닌으로 또는 (MEAE 서열이 후속으로 절단된 것으로부터의) MEAE 융합으로서 발현될 수 있다.
- [0966] 세포 저장액을 25% 글리세롤에 제조하고  $-80^\circ\text{C}$ 에 저장하였다. 글리세롤 저장액의 균주를 LB 플레이트에 접종하였고, 후속으로  $37^\circ\text{C}$ 에서 밤새도록 배양하였다. 각 플레이트의 내용물을 LB 배지로 세척하고, 발현을 위해 500 mL LB 배지에 희석하였다.  $\text{OD}_{600}$  0.6에 도달할 때까지, 배양을  $37^\circ\text{C}$ 에서 220 rpm으로 교반하면서 배양시켰다. 계속되는 유도를 0.2 mM IPTG를  $25^\circ\text{C}$ 에서 6시간 동안 사용하여 수행하였다. 세포를 최종적으로 원심분리에 의해 수확하였다.
- [0967] 세포를 후속으로 0.05% Tween 20, 2.5 mM EDTA, 10 mM 시스테인 및 4M 우레아를 함유하는 10 mM 트리스-HCl pH = 9.0에 부유하고, 30kPSI에서 세포 분해기(cell disrupter)를 사용하여 분해했다. 상층액을 원심분리 및 후속으로 크로마토그래피 정제를 위해 수집했다.
- [0968] 정제를 이온 교환 크로마토그래피 및 소수성 상호작용을 사용하여 수행한 뒤, CHO 세포로부터 발현된 사람 디펩티딜 펩티다제I(hDPPI)을 사용하여 펩티드 태그를 제거하였다. 최종 정제를 이소침전 및 이온 교환 크로마토그래피에 의해 달성하였다. 정제를 또한 당업자에게 알려진 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화력 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 막 기초 분리 기술로 제한되지 않지만 사용함으로써 달성할 수 있다.
- [0969] **정제된 성장 호르몬 화합물의 단백질 화학적 특성화.**
- [0970] 온전히 정제된 단백질을 MALDI-MS를 사용하여 분석하였다. 관찰된 질량은 아미노산 서열로부터 추측된 이론적인 질량에 대응되었다.
- [0971] 예상되는 연결 이황화 결합은 트립신 및 AspN 소화를 사용하는 펩티드 맵핑(mapping)과 그 후 DTT와의 이황화 결합의 감소 전 및 후의 소화를 MALDI-MS 분석에 의해 증명될 수 있다.
- [0972] **GH 및 hGH 화합물 접합체의 프로테아제 분해율을 측정하는 어세이**
- [0973] 관심있는 화합물을  $37^\circ\text{C}$  적절한 버퍼(예를 들어, PBS 또는 탄화수소암모늄)에서 24시간 까지 관련 프로테아제(트립신, 키모트립신, 펩신, 엘라스타제, 요인VIIa, 요인Xa, 프로테아제K, 카르복시 펩티다제, DPPIV, 자연 엔도펩티다제, 그랜자임B, 프롤린-엔도펩티다제, 포도상구균 펩티다제I, 서물리신, 트롬빈, Arg-C 프로테아제, Asp-N 엔도펩티다제, 카스파제 1-10, 클로스트리파인, 엔테로키나제, 글루타밀 엔도펩티다제, 그랜자임B, LysC, LysN, 프롤린-엔도펩티다제 및 포도상구균 펩티다제I 또는 조직 추출물)로 소화시킨다. 단백질 분해성 분해를 HPLC 어세이에 의해 평가한다.

- [0974] 단백질 분해성 소화:
- [0975] 탄화수소암모늄 버퍼 중의 시험 화합물 용액(1 mg/mL)의 100  $\mu$ L를 37°C에서 24시간까지 효소에 의해 분해시켰다. 부샘플을 다양한 시간 지점에서 취하고, 단백질 분해성 반응은 샘플을 1% TFA로 10번 희석에 의해 산성화함으로써 멈추게 한다. 이들 희석된 샘플을 단백질 분해성 소화의 정도를 평가하도록 역상 HPLC에 의해 분석한다.
- [0976] HPLC 방법:
- [0977] 10  $\mu$ L의 상기 용액을, 역상 Vydac C42 $\times$ 50 mm 컬럼(물 중의 0.1% TFA 내지 0.1% TFA를 함유하는 100% 아세토니트릴의 선형 구배로 30분 이상 0.2 mL/분의 유속으로 용리됨)에 주입한다. 피크의 검출은 214 nm UV 흡수에서 수행한다. 시간 지점  $t=T$ 에서의 온전한 화합물 백분율(%)을  $(A_T/A_0)\times 100\%$ 로서 [시간 지점  $t=T(A_T)$ 에서의 피크 면적]/[ $t=0(A_0)$ 에서의 피크 면적]으로부터 계산한다. 온전한 화합물 백분율(%)은 GraphPad Prims 소프트웨어 5.01판을 사용하여 시간에 대해 나타낸다. 반감기( $T_{1/2}$ )는 한가지 상의 봉피로서 GraphPad Prism 소프트웨어에 의해서도 계산된다. 사용할 수 있는 효소의 예는 엘라스타제(Sigma, 돼지 췌장으로부터) 및 키모트립신(Roche 서열화 등급)이다. 버퍼의 예는 50 mM 탄화수소암모늄 pH = 8.5이다.
- [0978] 모세관 전기영동법:
- [0979] 모세관 전기영동법은 Agilent Technologies 3DCE 시스템(Agilent Technologies)을 사용하여 수행하였다. 데이터 수집 및 신호 처리는 Agilent Technologies 3DCE ChemStation을 사용하여 수행하였다. 모세관은 Agilent로부터의 "확장된 빛의 경로 모세관"으로 64.5 cm의 길이(56.0 cm 효율적 길이), 50  $\mu$ m의 내경이었다. UV 검출은 200 nm(16 nm Bw, 참고 380 nm 및 50 nm Bw)에서 수행하였다. 가동하는 전해질은 포스페이트 버퍼 50 mM pH 7 (방법 A)이었다. 모세관은 0.1M NaOH로 3분 동안, 그 다음 Milli-Q 물로 2분 동안 및 전해질로 3분 동안 조절하였다. 각 가동 후, 모세관을 Milli-Q 물로 2분 동안, 그 다음 인산으로 2분 동안, 그리고 Milli-Q 물로 2분 동안 세척하였다. 유체역학적 주입을 50 mbar에서 4.0초 동안 수행하였다. 전압은 +25 kV이었다. 모세관 온도는 30°C이었고, 가동시간은 10.5분이었다.
- [0980] MALDI-TOF 질량 분석법:
- [0981] 분자량을 AuTOFlex MALDI-TOF 기기(Bruker)를 사용하여 측정하였다. 샘플을 매트릭스로서  $\alpha$ -시아노-4-히드록시- $\beta$ -신남산을 사용하여 제조하였다.
- [0982] RP-HPLC:
- [0983] RP-HPLC 분석을 Vydac 218TP54 4.6 mm $\times$ 250 mm 5  $\mu$ m C-18 실리카 컬럼(The Separations Group, Hesperia)을 사용하는 Agilent 1100 시스템 상에서 수행하였다. 검출은 214 nm, 254 nm, 280 nm 및 301 nm에서의 UV에 의해 수행하였다. 컬럼을 0.1% 트리플루오로아세트산 / H<sub>2</sub>O으로 평형시키고, 샘플을 0.1% 트리플루오로아세트산 / H<sub>2</sub>O에 대해 0 내지 90% 아세토니트릴의 적합한 구배에 의해 용리시켰다.
- [0984] LC-MS:
- [0985] LC-MS 분석을 2개의 Perkin Elmer Series 200 Micropumps, Perkin Elmer Series 200 자동샘플러, Applied Biosystems 785A UV 검출기 및 Sedex 75 Evaporative Light Scattering 검출기가 있는 PE-Sciex API 100 또는 150 질량분석기 상에서 수행하였다. Waters Xterra 3.0 mm $\times$ 50 mm 5  $\mu$ m C-18 실리카 컬럼을 실온에서 1.5 mL/분으로 용리시켰다. 그것을 5% MeCN / 0.1% TFA / H<sub>2</sub>O로 평형시키고, 5% MeCN / 0.1% TFA / H<sub>2</sub>O로 1.0분 동안, 그 다음 90% MeCN / 0.1% TFA / H<sub>2</sub>O로 7분 이상의 선형 구배로 용리시켰다. 검출은 214 nm에서의 UV 검출 및 Evaporative Light Scattering에 의해 수행하였다. 컬럼 용출액의 분획들을 PE-Sciex API 100 질량분석기의 이온분무 계면으로 도입하였다. 질량 범위 300 - 2000 amu를 가동 중 매 2초 마다 스캔하였다.
- [0986] 단백질의 정량:
- [0987] 단백질 농도를 NanoDrop ND-1000 UV-분광광도계를 사용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 평가하였다.
- [0988] 유도체화 부위(들)의 측정을 위한 효소 펩티드 맵핑:
- [0989] 펩티드 맵핑을 환원되고 알킬화된 단백질의 Asp-N 소화를 사용하여 수행하였다. 먼저 단백질을 표준 절차에 따라 DTT 및 요오도아세트아미드로 처리하였다. 알킬화된 생성물을 HPLC를 사용하여 정제하였다. 후속으로 알킬화되고 정제된 생성물을 1:100의 효소:기질 비율에서 엔도프로테아제 Asp-N(Boehringer)으로 밤새도록

소화시켰다. 소화를 C-18 컬럼 및 표준 TFA/MeCN 버퍼 시스템을 사용하여 HPLC 분리시켰다. 결과되는 펩티드 맵을 비유도체화된 hGH의 그것과 비교하였고, 다른 잔류시간에 있는 분획들을 수집하여 MALDI-TOF 질량 분석법을 사용하여 더 분석하였다.

[0990] SDS 페이지(page):

[0991] SDS 폴리-아크릴아미드 겔 전기영동법을 NuPAGE 4% - 12% 비스-트리스 겔(Invitrogen NP0321BOX)을 사용하여 수행하였다. 겔을 은착색(Invitrogen LC6100) 또는 Coomassie 착색(Invitrogen LC6065)하였고, 또한 M. M. Kurfurst, *Anal. Biochem.* **200**(2), 244-248, (1992)에 의해 기술된 PEG를 위해 요오드화바륨 으로 관련 착색하였다.

[0992] 단백질 크로마토그래피:

[0993] 단백질 크로마토그래피를 Akta Explorer 크로마토그래피 시스템 및 GE Health Care로부터의 컬럼 상에서 수행하였다. 음이온 교환을 Q-Sepharose HP 26/10 컬럼을 사용하여 수행하였다. 시작 버퍼는 20 mM 트리에탄올아민 버퍼 pH 8.5이었고, 용리 버퍼는 시작 버퍼 + 0.2 M NaCl이었다. 화합물은 15 컬럼 부피 이상 0-75% 용리 버퍼의 구배로 전형적으로 용리되었다. 탈염 및 버퍼 교환은 HiPrep 26/10 컬럼을 사용하여 수행하였다.

[0994] TNBS 시험

[0995] DMF(용액 1) 중의 10% DIPEA 용액 및 1 M 수성 TNBS(용액 2) 용액을 제조하였다. 약간의 수지 비드를 작은 시험관에 위치시키고, 각 용액(1 및 2)을 1-3 방울 첨가하였다. 짧은 혼합 후, 혼합물을 실온에서 10분 동안 남겨두고, 비드를 관찰하였다. 강렬한 오렌지색 또는 적색 비드는 양성 결과(즉 유리 아민의 존재)를 나타내고; 노란색 또는 약간 오렌지색 비드는 약간 양성을 나타내고, 무색 비드는 음성을 나타낸다.

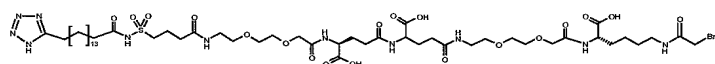
[0996] LogP 계산

[0997] LogP 값을 공개된 알고리즘(*J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5175-5180, (1964) "A New Substituent Constant,  $\sigma$ , Derived from Partition Coefficients", C. A. Lipinski *et al. Advanced Drug Delivery Reviews*, **23**, 3-25 (1997), "Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings" 및 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")을 사용하여 알부민 바인더 부분 및/또는 친수성 스페이서 부분의 mLogP 및/또는 cLogP로서 계산할 수 있다. 본원에 clogP - Pomona College logP(옥탄올/물 분배 계수)를 clogP 알고리즘의 Tripos(<http://www.tripos.com>) 4.2판으로부터의 Sybyl 7.0 및 BioByte Corp(<http://www.biobyte.com/>)에 의해 제공된 그것의 관련 분절 데이터베이스 22판으로 계산한다.

[0998] 알부민 바인더의 제조

[0999] 실시예 1

[1000] 4-(1H-테트라졸-16-일-헥사데카노일술파모일)부타노일-OEG- $\gamma$  Glu- $\gamma$  Glu-OEG- $N^{\epsilon}$  (C(O)CH<sub>2</sub>Br)Lys-OH(I):



[1001]

[1002] (I)

[1003] 화합물(I)을 도식 1(ABI433 합성기 상에 표준 Fmoc-펩티드 화학을 사용하여 1mM 규모로)에 따라 고체 지지체에 합성하였다. 펩티드를 Fmoc-OEG-OH 및 Fmoc-Glu-OtBu가 보호된 아미노산을 사용하는 Fmoc-Lys(MTT)-Wang 수지 상에 모았다. 4-(16-1H-테트라졸-5-일-헥사데카노일술파모일)부티르산을 DCM/NMP, 2 당량 중의 DIC/NHS를 사용하여 밤새도록 수동 커플링하였고, TNBS 시험이 반응이 완료됨을 나타내었다. 그 다음 수지를 50 mL DCM/TFA/TIS/물(94:2:2:2)로 노란색이 사라질 때까지, 약 20분 동안 흘려 통과시키는 배치로 처리한 다음, DIPEA/DMF로 세척하며 중화시켰다. DCM/NMP(1:1) 중의 브로모아세트산(4 mM)을 NHS 및 DIC의 1 mM 혼합물로 활성화시키고, 여과하고, DIPEA 1 mM이 더 첨가된 수지에 첨가하였다. 1시간 후 반응을 완료하였다. 수지를 80 mL TFA/TIS/물(95:2.5:2.5)로 1시간 동안 처리하였다. N<sub>2</sub> 스트림으로 증발시키고, Et<sub>2</sub>O 첨가에 의해 침전시키고, Et<sub>2</sub>O로 세척하고 건조하였다. 미정제 생성물을, 물 중의 0.1% TFA에 대해 30-80% 0.1 TFA / MeCN으로부터의 구

[1005]

도식 1



[1007]

[1008]



[1010]

[1011]

[1012]



[1014]

## [1015]

[1016]



[1018]

## [1019]

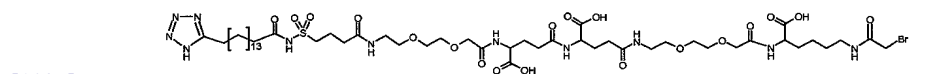
[1020]



[1022] TOF-MS: 질량 1151.27(M+1)

[1023] 실시예 6

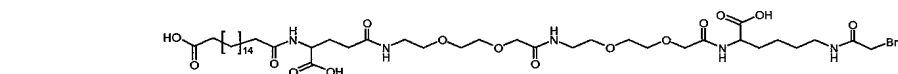
[1024] 상기 실시예 1에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Wang 수지를 사용하여 제조하였다.



[1026] TOF-MS: 질량 1272.30(M+1)

[1027] 실시예 7

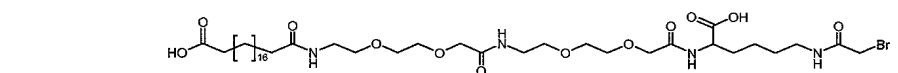
[1028] 상기 실시예 1에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Wang 수지를 사용하여 제조하였다.



[1030] TOF-MS: 질량 984.01(M+1)

[1031] 실시예 8

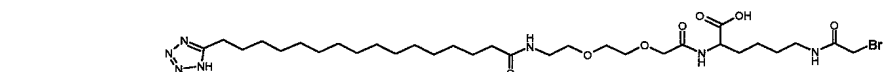
[1032] 상기 실시예 1에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Wang 수지를 사용하여 제조하였다.



[1034] TOF-MS: 질량 882.95(M+1)

[1035] 실시예 9

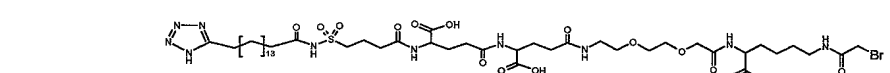
[1036] 상기 실시예 1에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Wang 수지를 사용하여 제조하였다.



[1038] TOF-MS: 질량 782.74(M+1)

[1039] 실시예 10

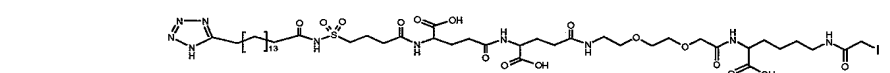
[1040] 상기 실시예 1에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Wang 수지를 사용하여 제조하였다.



[1042] TOF-MS: 질량 1127.14(M+1)

[1043] 실시예 11

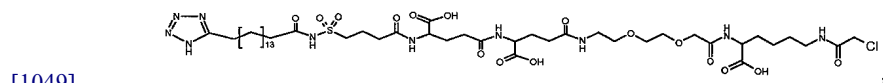
[1044] 상기 실시예 1에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH, 요오도아세트산 및 Wang 수지를 사용하여 제조하였다.



[1046] TOF-MS: 질량 1174.14(M+1)

[1047] 실시예 12

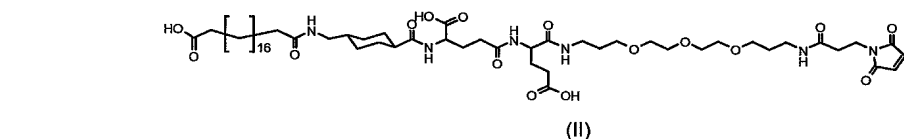
[1048] 상기 실시예 1에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH, 클로로아세트산 및 Wang 수지를 사용하여 제조하였다.



[1050] TOF-MS: 질량 1061.89(M+1)

[1051] 실시예 13

[1052] (19-카르복시노나데카노일)-Thx-γ Glu-Glu-N-{3-[2-(2-{3-[3-말레이미도-프로피오닐아미노]프로폭시}에톡시)에톡시]프로필} 아마이드(II)



[1054] 2-클로로트리틸 수지(2.0 g, 2.6 mmol)를 DCM에서 0.5시간 동안 팽창시켰다. DCM(30 mL) 중의 4,7,10-트리옥사-1,13-디아민 용액을 첨가하였다. 수지를 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 수지를 DCM으로 한번 세척하고, 그 다음 DIPEA:MeOH:DCM(15 mL:15 mL:20 mL) 용액을 첨가하였다. 수지를 0.5시간 동안 교반하고, 그 다음 DCM으로 2번 세척하였다. 그 다음, 후속으로 Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu-OtBu 및 FmocThexOH를 표준 펩티드 화학(NMP(11.7 mL) 중의 각 Fmoc-AA-OH/DIC/HOBt 0.5 M 용액을 혼합하고 2분 후 수지에 첨가함)에 의하여 커플링하였다. 수지를 실온에서 45분 동안 교반하고, 그 다음 5×NMP 및 5×DCM으로 세척하였다. Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/NMP(1:1:5) 용액을 첨가하고, 수지를 실온에서 10분 동안 교반하였다. 수지를 세척하였다(5×NMP 및 5×DCM). 그 다음 수지를 NMP 중의 30% 피페리딘으로 2×10분 동안 처리하고, 최종적으로 5×NMP 및 5×DCM으로 세척하였다. 그 다음 펩티드를 아이코센산(6 당량) 함유 0.125 M HOAt(3 당량), 0.125 M DIC(3 당량) 및 0.125 M 루티딘(3 당량)의 0.25 M 용액에 첨가하였다. 수지를 실온에서 2시간 동안 교반한 뒤, 5×NMP 및 8×DCM으로 세척하였다. 생성물을 10% TFA-DCM을 사용하여 20분 동안 수지로부터 절단하였다. 수지를 여과하고, 한번 더 10% TFA-DCM로 추가 20분 동안 처리하였다. 조합된 여과액을 수집하고, 건조될 때까지 증발하였다.

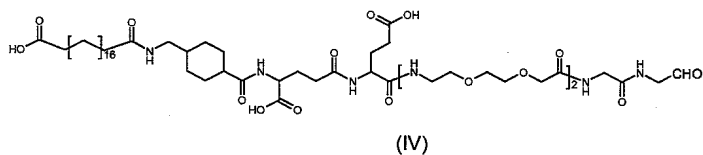
[1055] 상기로부터의 건조 생성물을 DMF(6 mL)에 용해하고, TSTU-활성화된 3 말레이미도프로피온산(TSTU를 DMF(2 mL) 중의 3 말레이미도프로피온산으로 45분 동안 반응함으로써 미리 만듦) 및 DIPEA(200 μL)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 건조될 때까지 증발하고, 잔여물을 95% TFA-MilliQ 물에 용해하고, 실온에서 20분 동안 교반하였다. 혼합물을 건조될 때까지 증발하였다. 잔여물에 최소량의 물을 첨가하여 고체를 침전시켰다. 침전물을 여과하고, MeCN으로부터 재결정화하였다. 결정을 수집하고, Et<sub>2</sub>O로 광범위하게 세척하여, 흰색 고체로서의 화합물(II)를 얻었다.

[1056] TOF-MS: 질량 1094.39(M+1).

[1057] 실시예 14

[1058] 상기 실시예 1에서 기술되고 하기 도식 2에 도시한 유사한 방식으로 하기 화합물을 시작 물질로서 Boc-Gly-PAM 수지 및 모노-*tert*-부틸-에이코센산, 4-Boc-아미노벤조산, Fmoc-Thx-OH, Fmoc-OEG-OH, Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH, Fmoc-Glu(OH)-*t*-Bu가 보호된 아미노산을 사용하여 제조하였다. 약한 탈보호 후, 펩티드 생성물을 수지로부터 2,2-디메톡시에틸아민을 사용하여 절단시킨 후, 알부민 바인더(IV)를 제공하는 TFA를 사용하여 탈아세틸화하였다.

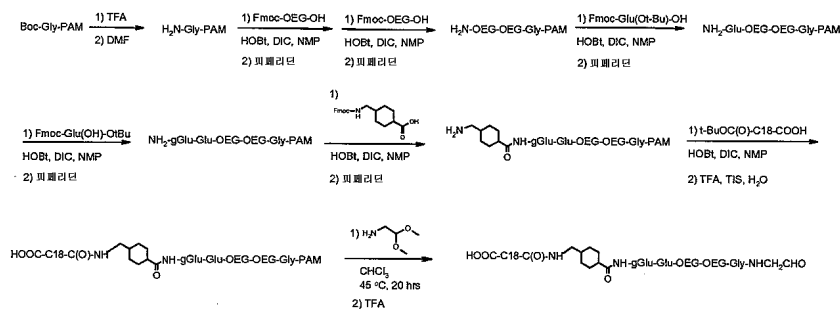




[1059]

[1060] TOF-MS: 질량 1128.38(M+1)

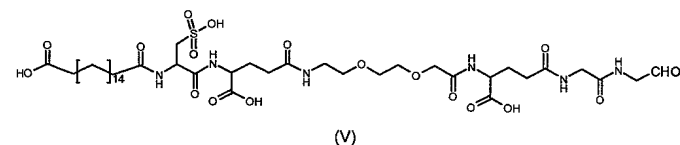
[1061] 도식 2:



[1062]

[1063] 실시예 15

[1064] 상기 실시예 14에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 시작 물질로서 Boc-Gly-PAM 수지 및 모노-*tert*-부틸-에이코센산, 4-Boc-아미노벤조산, Fmoc-Thx-OH, Fmoc-OEG-OH, Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH, Fmoc-Glu(OH)-*t*-Bu가 보호된 아미노산을 사용하여 제조하였다. 약한 탈보호 후, 펩티드 생성물을 수지로부터 2,2-디메톡시에틸아민을 사용하여 절단한 뒤, 알부민 바인더(V)를 제공하는 TFA를 사용하여 탈아세틸화하였다.



[1065]

[1066] TOF-MS: 체류 시간 = 15.2분, 질량 = 967.11(M+1)

[1067] 실시예 16

[1068] 상기 실시예 14에서 기술된 유사한 방식으로 상기 화합물(VI)을 시작 물질로서 Fmoc-Lys(Mtt)-Wang 수지 및 모노-*tert*-부틸-옥타데칸2산, Boc-Ser(*t*-Bu)-OH, Fmoc-OEG-OH, Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH, 및 산화된 Fmoc-Cys-OH가 보호된 아미노산을 사용하여 제조하였다. 펩티드 생성물을 수지로부터 THF 중의 2.5% TIS, 2.5% H<sub>2</sub>O를 3시간 동안 사용하여 절단하고, 예비 HPLC에 의해 정제하였다:

[1069] 컬럼 : 2 cm C18

[1070] 용리액 A : 0.1% TFA i Milli-Q 물

[1071] 용리액 B : 0.1% TFA i MeCN

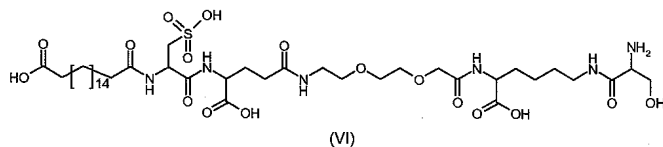
[1072] 시작% B : 40%

[1073] 종료% B : 75%

[1074] 구배 : 10% MeCN으로 5분, 시작%B까지 5-10분 후 51분 이상, 종료%B + 10% MeCN으로 5분 후 약 1시간

[1075] 분획들을 LC-MS-TOF에 의해 분석하였다.

[1076] 바람직한 분획들을 수집 및 모아서 동결건조하여, 화합물(VI)를 얻었다.



[1077]

[1078] TOF-MS: 체류 시간 = 6.3분, 질량 = 955.1(M+1)

[1079] (VI)의 산화:

[1080] MTP-용액:

[1081] 4 mL 25 mM HEPES에 용해된 3-메틸-티오-1-프로판올(290 mg), pH = 7.00

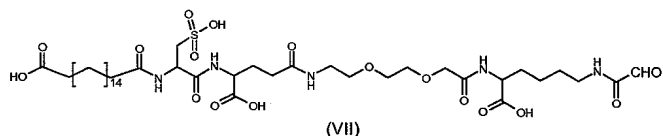
[1082] 과요오드산염-용액:

[1083] 2 mL Milli-Q 물에 용해된 96 mg NaIO<sub>4</sub>

[1084] Milli-Q 물(1 mL) 중의 화합물(VI) 용액에 MTP-용액(3.6 mL) + 과요오드산염-용액(560 μL)을 첨가하고, pH를 한방울의 1N NaOH로 9.5를 조정하였다.

[1085] 반응 플라스크를 얇은 포일로 감싸고, 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 추가 부분의 과요오드산염-용액(560 μL)을 첨가하고, 반응 혼합물을 주위 온도에서 4.5시간 동안 남겨두었다. 결과되는 혼합물을 2개의 NAP 컬럼을 통해 가동시켜, NaIO<sub>4</sub>를 제거하였다. 컬럼을 25 mM HEPES(5×2.5 mL) pH = 7.0으로 미리세척하였다.

[1086] 샘플(2.5 mL)을 각 컬럼 상에 적용시키고, 3.5 mL 25 mM HEPES, pH = 7.00으로 용리하였다. 2×3.5 mL는, GH 유사체와의 접합에 직접적으로 사용되는 케토-알데히드(VII)를 함유하는 전체 10.5 mL로 모았다.

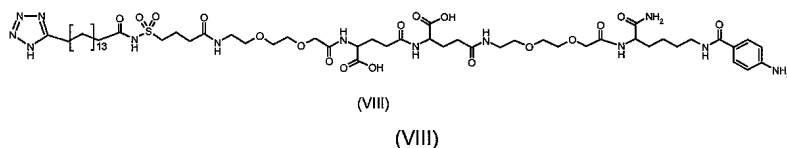


[1087]

[1088] TOF-MS: 질량 = 924.08(M+1)

[1089] 실시예 17

[1090] 4-(1H-테트라졸-16-일-헥사데카노일술포모일)부타노일-OEG-γ Glu-γ Glu-OEG-N<sup>ε</sup> (4-아미노벤조일)Lys-NH<sub>2</sub> (VIII):



[1091]

[1092] 화합물(VIII)을 도식 3에 따라 고체 지지체 상에 합성하였다. Fmoc 보호된 Rink-아미드-수지(2.2 g, 0.6 mmol/g)의 무게를 재어 플라스크에 넣었다. 수지를 NMP(3×30 mL)로 2시간 동안 팽창시켰다. 수지를 NMP(30 mL) 중의 25% 피페리딘으로 10분 동안 교반하였다. 수지를 배수시켜, NMP(30 mL) 중의 25% 피페리딘으로 1시간 동안 처리한 뒤, 배수하고 NMP(6×30 mL)로 세척하였다. Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 HOBt의 무게를 재어 플라스크에 넣고, NMP 중의 브로모페놀블루(30 mL, 0.5 mM)에 용해하였다. 이 용액을 상기 배수된 수지에 첨가한 뒤, DIC를 첨가하였다. 반응을 주위 온도에서 21시간 동안 교반하였다. 수지를 배수시키고, NMP(6×30 mL)로 세척한 뒤, DCM(3×30 mL)으로 세척하였다. 수지를 헥사플루오로이소프로판올(20 mL)로 10분 동안 처리하고, 10분 동안 교반하였다. 수지를 배수시키고, DCM(3×30 mL)으로 세척하였다. 수지를 헥사플루오로이소프로판올(20 mL)로 10분 동안 처리하고, 다시 10분 동안 교반하였다. 수지를 배수시키고, DCM(3×30 mL)으로 세척한 뒤, 배수시키고, NMP(3×30 mL)로 세척하였다. 4-(Boc-아미노)벤조산 및 HOBt의 무게를 재어 플라스크에 넣고, NMP 중의 브로모페놀블루(30 mL, 0.5 mM)에 용해하였다. 이 용액을 상기 배수된 수지에 첨가한 뒤, DIC를 첨가하였다. 반응을 주위 온도에서 교반하였다. 수지를 배수시키고, NMP(6×30 mL)로 세척하였다. 수지를 NMP 중의 25% 피페리딘(10 mL)으로

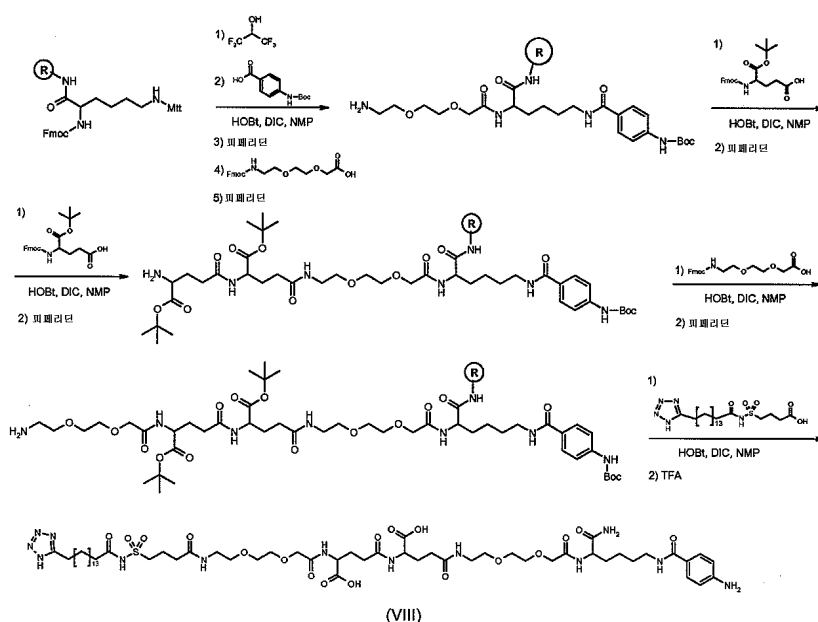
10분 동안 교반하였다. 수지를 배수시키고, NMP 중의 25% 피페리딘(10 mL)으로 1시간 동안 처리한 뒤, 배수시키고 NMP(6×15 mL)로 세척하였다. Fmoc-OEG-OH 및 HOBt의 무게를 재어 플라스크에 넣고, NMP 중의 브로모페놀불루(15 mL, 0.5 mM)에 용해하였다. 이 용액을 배수된 수지에 첨가한 뒤, DIC를 첨가하였다. 반응을 주위 온도에서 23시간 동안 교반하였다. 수지를 배수시키고, NMP(6×15 mL)로 세척하였다. 수지를 NMP 중의 25% 피페리딘(10 mL)에 10분 동안 교반하였다. 수지를 배수시키고, NMP 중의 25% 피페리딘(10 mL)으로 1시간 동안 처리한 뒤, 배수시키고, NMP(6×15 mL)로 세척하였다. Fmoc-Glu-O-*t*-Bu 및 HOBt의 무게를 재어 플라스크에 넣고, NMP 중의 브로모페놀불루(15 mL, 0.5 mM)에 용해하였다. 이 용액을 배수된 수지에 첨가한 뒤, DIC를 첨가하였다. 반응을 주위 온도에서 18시간 동안 교반하였다. 수지를 배수시키고, NMP(6×15 mL)로 세척하였다. 수지를 NMP 중의 25% 피페리딘(10 mL)으로 10분 동안 교반하였다. 수지를 배수시키고, NMP 중의 25% 피페리딘(10 mL)으로 1시간 동안 처리한 뒤, 배수시키고, NMP(6×15 mL)로 세척하였다. Fmoc-OEG-OH 및 HOBt의 무게를 재어 플라스크에 넣고, NMP 중의 브로모페놀불루(15 mL, 0.5 mM)에 용해하였다. 이 용액을 배수된 수지에 첨가한 뒤, DIC를 첨가하였다. 반응을 주위 온도에서 18시간 동안 교반하였다. 수지를 배수시키고, NMP(6×15 mL)로 세척하였다. 수지를 NMP 중의 25% 피페리딘(10 mL)으로 10분 동안 교반하였다. 수지를 배수시키고, NMP 중의 25% 피페리딘(10 mL)으로 1시간 동안 처리한 뒤, 배수시키고, NMP(6×15 mL)로 세척하였다.

[1093] 4-(16-1H-테트라졸-5-일-헥사데카노일술폰과모일)부티르산 및 HOBt의 무게를 재어 플라스크에 넣고, NMP 중의 브로모페놀불루(15 mL, 0.5 mM)에 용해하였다. 이 용액을 배수된 수지에 첨가한 뒤, DIC를 첨가하였다. 반응을 주위 온도에서 21시간 동안 교반하였다. 수지를 배수시키고, NMP(6×15 mL)로 세척한 뒤, 배수시키고, DCM(6×15 mL)으로 세척하였다. 수지를 물(10 mL) + DCM(0.25 mL) 중의 95% TFA 및 TIS(0.25 mL)의 혼합물로 절단하였다. 수지를 주위 온도에서 2 시간 동안 교반하였고, 얼음처럼 차가운 Et<sub>2</sub>O(75 mL)로 여과하였다. 결과되는 침전물을 원심분리로 분리한 뒤, Et<sub>2</sub>O(3×)로 세척하고, 진공에서 48시간 동안 건조하여, 화합물(VIII)의 미정제 300 mg을 얻었다.

[1094] 미정제 화합물(VIII)을 예비 HPLC(GILSON), 30→80% MeCN 상에서 정제하였다. 모아진 분획들을 건조될 때까지 증발하고, 잔류물을 H<sub>2</sub>O/MeCN 1:1에 용해하고, 밤새도록 동결건조하여, 170 mg의 화합물(VIII)을 얻었다.

[1095] TOF-MS: 체류 시간 = 4.7분, 질량 1268.71(M+1)

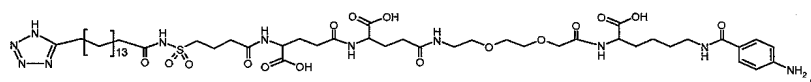
[1096] 도식 3.



[1097]

[1098] 실시예 18

[1099] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Wang 수지를 사용하여 제조하였다.

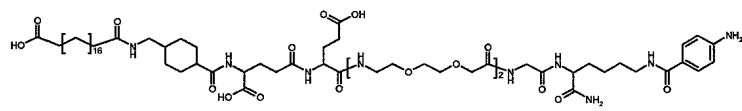


[1100]

[1101] TOF-MS: 질량 1124.33(M+1)

### [1102] 실시예 19

[1103] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

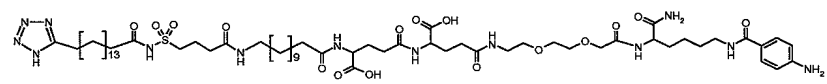


[1104]

[1105] TOF-MS: 질량 1333.64(M+1)

### [1106] 실시예 20

[1107] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

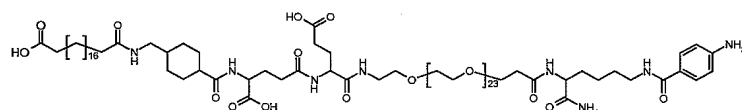


[1108]

[1109] TOF-MS: 질량 1320.67(M+1)

### [1110] 실시예 21

[1111] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

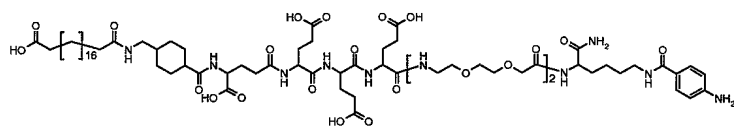


[1112]

[1113] TOF-MS: 질량 2114.64(M+1)

### [1114] 실시예 22

[1115] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

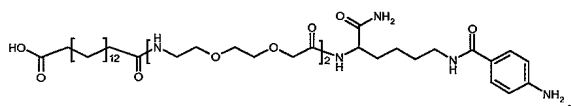


[1116]

[1117] TOF-MS: 질량 1534.82(M+1)

### [1118] 실시예 23

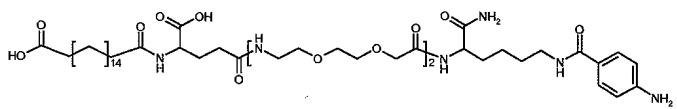
[1119] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.



TOF-MS: 질량 823.05(M+1)

#### 실시예 24

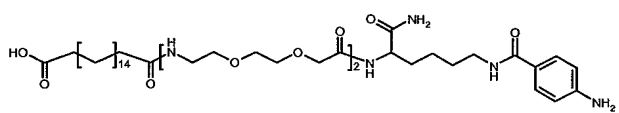
상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Wang 수지를 사용하여 제조하였다.



TOF-MS: 질량 980.22(M+1)

#### 실시예 25

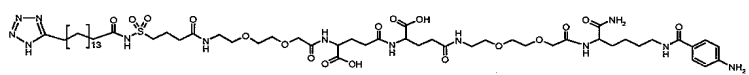
상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.



TOF-MS: 질량 851.10(M+1)

#### 실시예 26

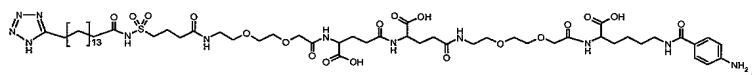
상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.



TOF-MS: 질량 1258.51(M+1)

#### 실시예 27

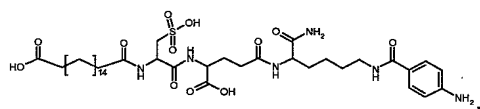
상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Wang 수지를 사용하여 제조하였다.



TOF-MS: 질량 1269.49(M+1)

#### 실시예 28

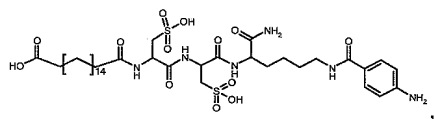
상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.



TOF-MS: 질량 841.04(M+1)

#### 실시예 29

[1143] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

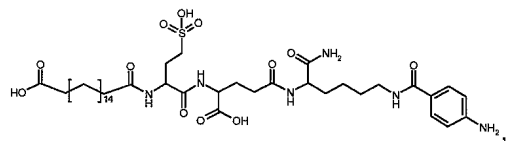


[1144]

[1145] TOF-MS: 질량 863.07(M+1)

#### [1146] 실시예 30

[1147] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

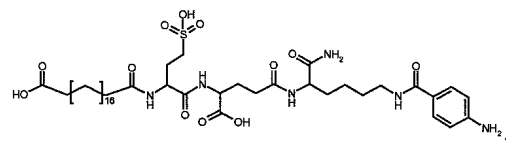


[1148]

[1149] TOF-MS: 질량 855.07(M+1)

#### [1150] 실시예 31

[1151] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

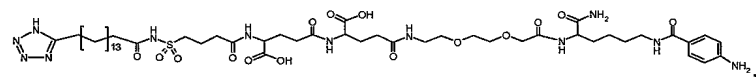


[1152]

[1153] TOF-MS: 질량 883.12(M+1)

#### [1154] 실시예 32

[1155] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

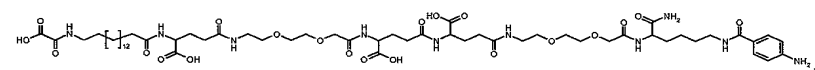


[1156]

[1157] TOF-MS: 질량 1123.35(M+1)

#### [1158] 실시예 33

[1159] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

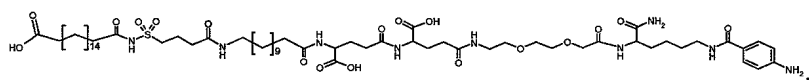


[1160]

[1161] TOF-MS: 체류 시간 = 4.7분, 질량 1267.45(M+1)

#### [1162] 실시예 34

[1163] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

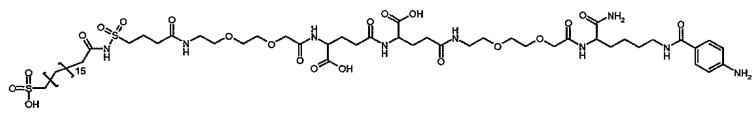


[1164]

[1165] TOF-MS: 질량 1310.67(M+1)

[1166] **실시예 35**

[1167] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

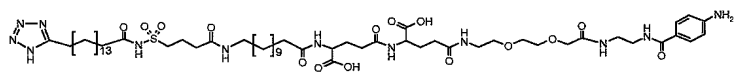


[1168]

[1169] TOF-MS: 질량 1308.58(M+1)

[1170] **실시예 36**

[1171] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Glu(ODmab)-OH 및 2-염화클로로트리틸 수지를 사용하여 제조하였다.

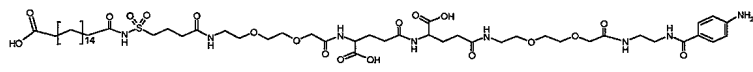


[1172]

[1173] TOF-MS: 질량 1235.56(M+1)

[1174] **실시예 37**

[1175] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Glu(ODmab)-OH 및 2-염화클로로트리틸 수지를 사용하여 제조하였다.

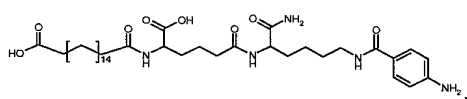


[1176]

[1177] TOF-MS: 질량 1173.40(M+1)

[1178] **실시예 38**

[1179] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.

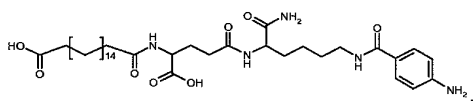


[1180]

[1181] TOF-MS: 질량 703.93(M+1)

[1182] **실시예 39**

[1183] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 및 Rink 아미드 수지를 사용하여 제조하였다.



[1184]

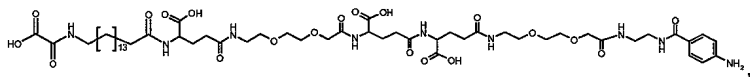
[1185] TOF-MS: 질량 689.90(M+1)

[1186] **실시예 40**

[1187] 상기 실시예 17에서 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 Fmoc-Glu(ODmab)-OH 및 2-염화클로로트리틸 수지를 사용하여 제조하였다.



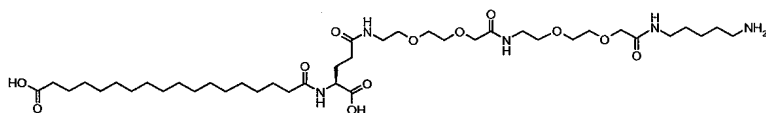
사용하여 제조하였다.



TOF-MS: 질량 1182.34(M+1)

#### 실시예 41

17-[(S)-3-(2-(2-[(2-{(5-아미노헨틸카바모일)메톡시}에톡시)에틸카바모일)-메톡시}에톡시)에틸카바모일)-1-카르복시-프로필카바모일]-헵타데칸산:



N-*tert*-부톡시카보닐 카다베린(24.3 mg; 0.12 mmol)을 THF(2.0 mL) 중의 17-((S)-1-카르복시-3-{2-[2-((2.5-디옥소-피콜리딘-1-일옥시카보닐)메톡시)-에톡시]에틸카바모일}메톡시)에톡시)에틸카바모일)프로필카바모일)-헵타데칸산(100 mg; 0.12 mmol) 및 DIPEA(46.68 mg; 0.36 mmol) 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새도록 교반하고, 그 다음 진공에서 농축하였다. 잔류물을 물(5 mL) 및 THF(2 mL)의 혼합물에 용해하고, 예비 HPLC(RP18 컬럼)에 의해 정제하였다. Boc-보호 결합 생성물을 함유하는 분획들을 모으고, 건조시켰다. 잔류물을 50% TFA-DCM(4 mL)에 용해하고, 실온에서 1시간 동안 교반하고, 그 다음 진공에서 농축하여, 그것의 트리플루오로아세트산 염으로서의 제독 물질 54 mg(55%)을 얻었다.

TOF-MS: 질량 815.5(M+1)

#### GH 알부민 바인더 화합물의 제조:

#### 실시예 42

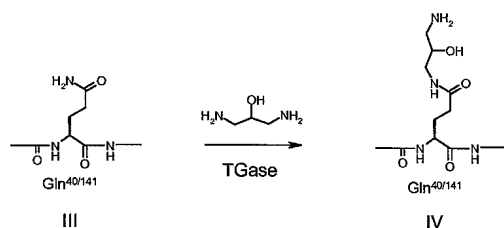
GH로의 핸들을 부착시키기 위한 트랜스클루타미나제의 사용은 이전에 WO2005/070468에 기술되었고, 본 발명에 따라 알부민 바인더의 부착을 위해 사용할 수 있다. 사용된 TGase는 US5156956에 따른 *Streptoverticillium mobaraense*로부터의 미생물 트랜스클루타미나제이다. 일반적인 방법은 상기 화학I 섹션에 기술되었다.

1. 산화된 아미노기전이 GH 화합물(I)의 알부민 바인더(II)와의 결합

하기 용액이 제조된다:

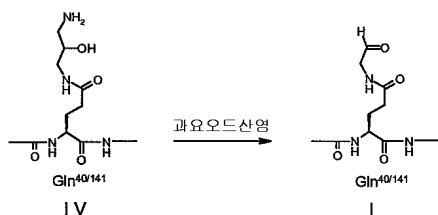
버퍼 A: 트리에탄올아민(119 mg, 0.8 mmol)을 물(40 mL)에 용해하고, pH를 8.5로 조정하였다.

(A) hGH(III)의 1,3-디아미노-2-프로판올과의 아미노기 전이반응



다음 트리스에서, 아미노기전이 GH(III)를 과요오드산염에 첨가한다. 산화는 전형적으로 4-10°C와 같은 낮은 온도에서 30분 이상 선택적으로 어둠 속에서 수행되었다. 과요오드산염은 GH의 메티오닌 잔기를 그것들의 대응하는 메티오닌 설펍시드 잔기로 산화시킬 수 있다. 이 산화 위험을 최소화하기 위해, 작은 분자 유기 티오에테르를 과요오드산염의 산화 동안 첨가할 수 있다. 적합한 유기 티오에테르는 3-메틸티오프로판-1-올이지만, 당업자가 다른 것들을 제안할 수 있을 것이다.

[1204] 아미노기전이 GH 화합물(IV)의 산화:



[1205]

[1206] 효율적인 소듐 시아노보로하이드리드 감소를 위해 필요한 산성 용액을 제공하도록, 버퍼 변화를 수행할 수 있다. 전형적으로, 과잉의 A-W-B1-NH2 아민을 사용하고, 소듐 시아노보로하이드리드를 시간이 지남에 따라 더 작은 부분으로 첨가할 수 있다.

[1207] 하기 용액을 제조하였다:

[1208] 버퍼 A: 트리에탄올아민(119 mg, 0.8 mmol)을 물(40 mL)에 용해하고, pH를 8.5로 조정하였다.

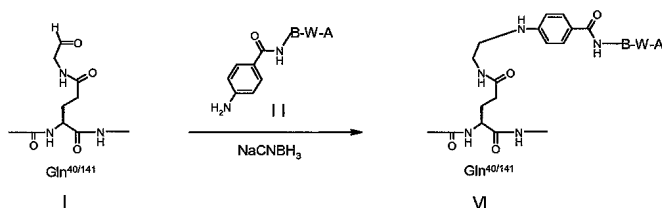
[1209] 버퍼 B: 3-메틸티오프로판올(725 mg, 7.1 mmol)을 버퍼 A(10 mL)에 용해하였다.

[1210] 버퍼 C: HEPES(5.96 g)를 물(1.0 L)에 용해하고, pH를 7.0으로 조정하였다.

[1211] 과요오드산염: NaIO<sub>4</sub>(48.1 mg, 0.225 mmol)를 물(1.0 mL)에 용해하였다.

[1212] (IV)의 용액(10 mg, 0.5 μmol)에 버퍼 B(0.2 mL) 그 다음 과요오드산염 용액(0.03 mL)을 첨가하였다. 저온 배양 20분 후, 혼합물을 버퍼 C로 4번 투석하였다, 잔류물을 1 mL로 농축하였다.

[1213] (C) (I)의 알부민 바인더(II)와의 환원 아민화



[1214]

[1215] 실시예 17 내지 40에 기술된 알부민 바인더(II)를 사용할 수 있다.

[1216] (B)로부터의 최종 용액(1 mL, 10 mg, 0.45 μmol(I))을 25 mM HEPES 버퍼 pH 7.0 중의 알부민 바인더(II) 용액(2 mL, 10 mg, 0.3 μmol)과 혼합하고, 결과되는 혼합물을 실온에서 1시간 동안 천천히 교반하였다. 1시간 후 NaCNBH<sub>3</sub>(물(0.5 mL) 중의 NaCNBH<sub>3</sub>(20 mg) 용액, 100 μL)를 첨가하였다. 혼합물을 어둠 속 실온에서 18-24시간 동안 유지하였다.

[1217] 하기의 반응을 이어서 수행할 수 있다:

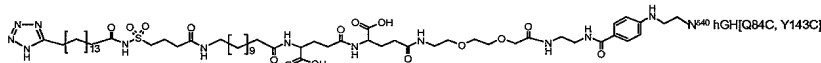
[1218] 산화된 아미노기전이 GH의 용액을 pH 6.00의 AcOH(1.5 mL) 및 50 mM MES(0.5 mL) 혼합물 중의 알부민 바인더 링커 용액에 첨가한다. 결과되는 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 약하게 교반하는데, 이 시간 동안 NaCNBH<sub>3</sub> 용액(15 μL(Milli-Q 물(500 μL) + AcOH(15 μL)에 용해된 NaCNBH<sub>3</sub>(22 mg))이 첨가된다. 샘플을 얇은 포일로 감싸고, 밤새도록 실온에서 교반한다.

[1219] 접합체를 하기의 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 분리할 수 있다:

[1220] 아세트산을 순수(3×)로 변화된 버퍼로, Amicon Ultra15 장치(Ultracel 10K 관)를 사용하여 4000 rpm/분에서 3×8분 동안 원심분리에 의해 제거한다. 그 다음 혼합물을 Amicon Filter 장치를 사용하여 20 mM TEA, pH: 8.50 버퍼로 변화시키고, 20 mM TEA가 있는 50 mL의 최종 부피로 희석하여, 그것을 HiLoad Q Sepharose, 26/10 컬럼에 로딩한다. 컬럼을 20 mM TEA, pH 8.50(버퍼 A)으로 초기에 세척하고, 그 다음 20 mM TEA, 500 mM NaCl, pH 8.50(버퍼 B)로 용리한다(2 mL/분의 유속, 20 CV 이상의 0-100%(B) 구배 사용). 모은 분획들을 Amicon Ultra15 장치(Ultracel 10K 관)를 사용하여 4000 rpm/분에서 3×8분 동안 원심분리에 의해 순수의 10 mM 탄화수소암모늄 버퍼로 5번 변화시킨다.

[1221] 실시예 18로부터의 알부민 바인더 사용은 하기 화합물을 가져올 것이다.

[1222] 42.1

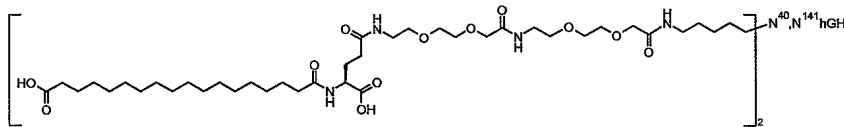


[1223]

[1224] TOF-MS: 질량 23301.63

[1225] 하기 화합물을 실시예 41로부터의 알부민 바인더를 사용하여 제조되었다.

[1226] 42.2



[1227]

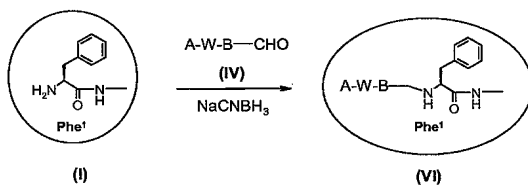
[1228] TOF-MS: 질량 23727.6245

[1229] 20 mM 트리에탄올아민(1000  $\mu$ L; pH 8.5) 중의 hGH(1 mg, 45 nmol) 및 17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(5-아미노펜틸 카바모일)메톡시]에톡시}에틸카바모일)메톡시]에톡시}에틸카바모일)-1-카르복시-프로필카바모일]헵타데칸산(2.10 mg; 2250 nmol) 용액에 TGase(0.12 nmol; *Streptovorticillium mobaraense*)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 25  $^{\circ}$ C에서 146시간 동안 배양하였고, 그 결과 상기 식의 이중 유도체화된 hGH 유사체가 제공된다.

### [1230] 실시예 43

[1231] 1. GH 화합물(I) N-말단의 알부민 바인더(IV)와의 결합

[1232] (A) (I)의 알부민 바인더 알데히드(IV)와의 환원 알킬화



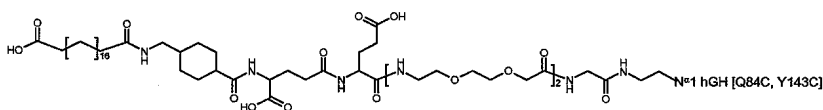
[1233]

[1234] 상기에 나타난 유도체화 공정은 알부민 결합 링커 A-W-B를 이용하며, B는 말단 알데히드 관능성을 갖는다. hGH의 A-W-B-CHO와의 접합은 환원 알킬화(hGH  $\rightarrow$  VI)를 통해 발생한다. 환원 알킬화는 본원에 예시화되고, 본 분야에 잘 인식되며, N-말단 위치에서 변형된 hGH 화합물을 가져온다.

[1235] 알부민 바인더(IV)를 실시예 14에 기술된 바와 같이 제공하였다.

[1236] 2-(C<sub>20</sub>이산-Trx- $\gamma$  Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-글리신 아마이드)-에틸-N<sup>a1</sup>-hGH [Q84C, Y143C]의 합성

[1237] 43.0



[1238]

[1239] hGH[Q84C, Y143C](23 mg)을 Hepes 버퍼(2.3 mL 0.25 mM pH 7.0)에 용해하였다.

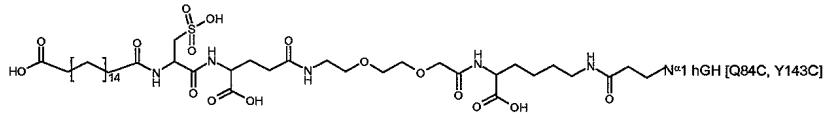
[1240] C<sub>20</sub>이산-Trx- $\gamma$  Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly-디메틸아세탈(2 mg, 상기 실시예 14 참고)을 TFA(50  $\mu$ L)로 6분 동안 처리하고, 건조될 때까지 진공에서 증발하였다. 잔류물을 EtOH(200  $\mu$ L)로 분해하고, 건조될 때까지 진공에서 증발하였다. 잔류물을 DMF(100  $\mu$ L)에 용해하고, hGH 용액에 첨가하였다. 침전물을 형성하고, DMF(1 mL)를 첨가하여 재용해하였다. 1시간 후, NaCNBH<sub>3</sub>(20 mg / 0.5 mL MeCN(230  $\mu$ L)) 용액을 적가하고, 20시간 동안 남겨두었다. 반응을 AcOH(2 mL)를 첨가하여 퀀칭시키고, 물로 전체 부피가 20 mL가 되도록 희석하고, 물 중의 0.1% TFA에 대해 40-80%로부터의 MeCN 중의 0.1% TFA의 구배가 있는 예비 HPLC C18 컬럼 상에 정제하였다. 최종 용리 피

크를 수집하고, 물 중의 70% 내지 10% MeCN로 희석하고, 동결건조하여 2-(C<sub>20</sub>이산-Trx-γ Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-글리신 아미드)-에틸-N<sup>a1</sup>-hGH [Q84C, Y143C]를 4.51 mg 얻었다.

TOF-MS: 체류 시간 = 15.25분, 질량 = 23150

상기 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 실시예 16으로부터의 알부민 바인더를 사용하여 제조하였다.

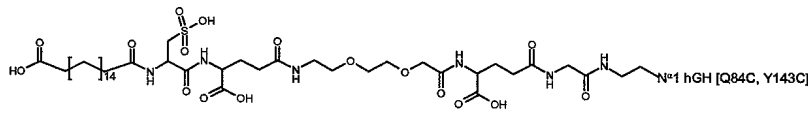
43.1



TOF-MS: 체류 시간 = 15.2분, 질량 = 23033

상기 기술된 유사한 방식으로 하기 화합물을 실시예 15로부터의 알부민 바인더를 사용하여 제조하였다.

43.2



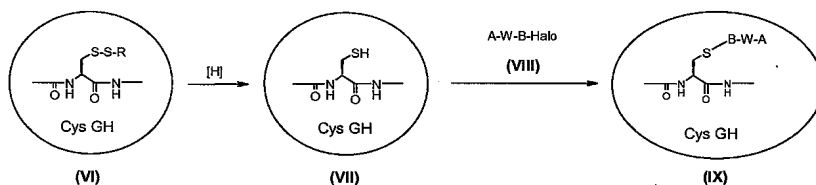
TOF-MS: 체류 시간 = 15분, 질량 = 22989.1

#### 실시예 44

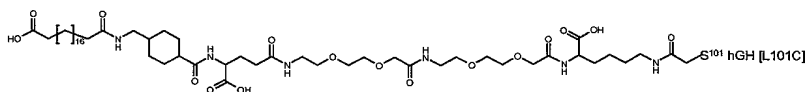
1. 내부 유리 단일 Cys를 갖는 GH 화합물(VII)의 알부민 바인더(VIII)와의 결합

1) 이황화(VI)의 감소를 통한 유리 Cys GH(VII)의 적합한 선택적 환원제로의 분리:

2) 유리 Cys GH(VII)의 할로젠 활성화된 알부민 바인더(VIII)와의 알킬화로 Cys 접합 GH 화합물(IX) 제공



44.1



2-(C<sub>20</sub>이산-Trx-γ Glu-OEG-OEG-δ Lys)-카보닐메틸렌-S<sup>101</sup>-hGH[L101C]

#### hGH[L101C](VII)의 제조:

상기 제공된 hGH[L101C]는 글루타티온 및 시스테인으로 차단된 그것의 유리 시스테인의 부분을 가졌다. 차단해제는 GSH 및 GSSG를 함유하는 평형 버퍼에서 글루타레독신 II(Gr×2)를 사용하여 효소로 수행되었다. 차단해제된 hGH[L101C]는 Sephadex G25 컬럼 상에서 교환된 버퍼에 의해 저분자량 GSH/GSSG로부터 분리되었다.

#### 알부민 바인더(VIII)의 hGH[L101C](VII)와의 접합:

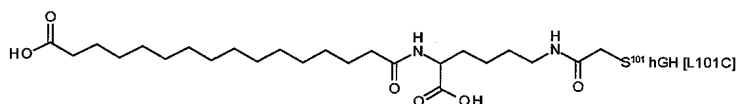
실시예 5로부터의 알부민 바인더(78 mg, 5 당량)를 5% 히드록시프로필-β-시클로텍스트린이 있는 170 mL HEPES/EDTA 버퍼에 용해하고, MTP(2.1 mL, 1%) 및 0.5 M NaCl(6.34 g)을 첨가하였다.

이 혼합물에 농축된 hGH[L101C](1 eq, 46 mL)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 밤새도록 남겨두었다. 용액은 밤새도록 흐리게 되었다. HPLC가 미반응된 시작 물질을 나타내기 때문에, 실시예 5로부터 최소의 NMP에 용해된 또

다른 5 당량의 알부민 바인더를 첨가하였다. 결과되는 혼합물을 실온에서 추가 16시간 동안 교반하였다.

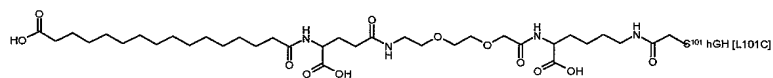
- [1263] **정제:**
- [1264] 사용된 버퍼:
- [1265] **버퍼 A.**
- [1266] **20 mM 트리에탄올아민(TEA) + 10% 에틸렌 글리콜**
- [1267] 5,96 g 트리에탄올아민
- [1268] 200 mL 에틸렌 글리콜
- [1269] 2 L로 첨가된 MQ 물
- [1270] 1N HCl로 조정된 pH 8.5
- [1271] **버퍼 B:**
- [1272] **20 mM 트리에탄올아민(TEA) + 1,0 M NaCl + 10% 에틸렌 글리콜**
- [1273] 5,96 g 트리에탄올아민
- [1274] 116,88 g NaCl
- [1275] 200 mL 에틸렌 글리콜
- [1276] 2 L로 첨가된 MQ 물
- [1277] 1N HCl로 조정된 pH 8.5
- [1278] 반응 버퍼를 Sephadex 컬럼 상에 에틸렌 글리콜을 갖는 TEA-버퍼 A로 3회 이상 변화시켰다:
- [1279] 컬럼: 50/30 Sephadex G25 fine
- [1280] 버퍼 A:
- [1281] 유속: 10 mL/분
- [1282] 온도: 실온(12℃에서 수집된 분획들)
- [1283] 분획들: 분획 당 30 mL
- [1284] 바람직한 분획들을 수집하고 모아서, 그 다음 Q Sepharose 컬럼 상에서 정제하였다:
- [1285] 컬럼: 26/10 Q Sepharose HP
- [1286] 버퍼 A:
- [1287] 버퍼 B:
- [1288] 구배 1: 1 CV 이상의 0-10% 버퍼 B
- [1289] 구배 2: 20 CV 이상의 10-40% 버퍼 B
- [1290] 구배 3: 1 CV 이상의 40-100% 버퍼 B
- [1291] 유속: 8 mL/분
- [1292] 온도: 실온(실온에서 수집된 분획들)
- [1293] 분획들: 분획 당 5 mL
- [1294] 바람직한 분획들을 수집하고 모아서, Sephadex G25 컬럼 상에서 10 mM 탄화수소암모늄 pH 8.0으로 버퍼 교환하였다:
- [1295] 컬럼: 50/30 Sephadex G25 fine
- [1296] 버퍼 A: 10 mM 탄화수소암모늄 pH 8.0

- [1297] 유속: 10 mL/분
- [1298] 온도: 실온(12℃에서 수집된 분획들)
- [1299] 분획들: 분획 당 30 mL
- [1300] 5개의 분획들을 모아서 동결건조하였다.
- [1301] 모은 것은 MS에 의해 분석하였고, 고분자량의 이합체(MS 44491.7)가 관찰되었다.
- [1302] 동결건조 바이알병을 버퍼 A에 용해하고, 새로운 Q Sepharose 컬럼 상에서 다시 정제하였다:
- [1303] 컬럼: 26/10 Q Sepharose HP
- [1304] 버퍼 A:
- [1305] 버퍼 B:
- [1306] 구배 1: 1 CV 이상의 0-10% 버퍼 B
- [1307] 구배 2: 20 CV 이상의 10-40% 버퍼 B
- [1308] 구배 3: 1 CV 이상의 40-100% 버퍼 B
- [1309] 유속: 8 mL/분
- [1310] 온도: 실온(실온에서 수집된 분획들)
- [1311] 분획들: 분획 당 5 mL
- [1312] 분획들을 모아서, 초미세여과에 의해 10 mM 탄화수소암모늄으로 탈염/버퍼 교환되었다. 모은 것은 25 mL로 농축하고, RP-HPLC 및 MS-TOF로 정량화하였다:
- [1313] TOF-MS: 체류 시간 = 16.15분, 질량 = 23315.96
- [1314] 하기 화합물을 동일한 방법을 사용하여 제조하였다.
- [1315] 44.2



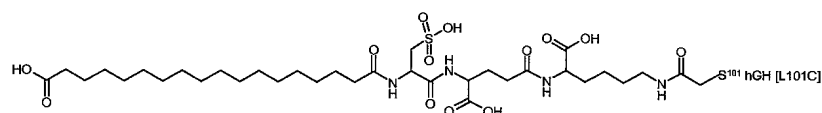
- [1316]
- [1317] TOF-MS: 체류 시간 = 15.24분, 질량 = 22676.8

- [1318] 44.3



- [1319]
- [1320] TOF-MS: 체류 시간 = 10.5분, 질량 = 22975.1

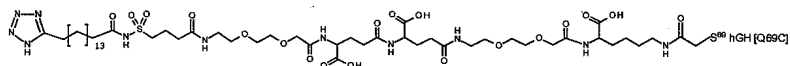
- [1321] 44.4



- [1322]
- [1323] TOF-MS: 체류 시간 = 15.5분, 질량 = 23009

[1324]	44.5	
[1325]		,
[1326]	TOF-MS: 체류 시간 = 14.0분, 질량 = 23305.5	
[1327]	44.6	
[1328]		,
[1329]	TOF-MS: 체류 시간 = 15.27분, 질량 = 23148	
[1330]	44.7	
[1331]		,
[1332]	TOF-MS: 체류 시간 = 16.40분, 질량 = 23048	
[1333]	44.8	
[1334]		,
[1335]	TOF-MS: 체류 시간 = 15.3분, 질량 = 22884.4	
[1336]	44.9	
[1337]		,
[1338]	TOF-MS: 체류 시간 = 14.6분, 질량 = 23291.4	
[1339]	44.10	
[1340]		,
[1341]	TOF-MS: 체류 시간 = 15.05분, 질량 = 23097.76	
[1342]	44.11	
[1343]		,
[1344]	TOF-MS: 체류 시간 = 14.2분, 질량 = 23420.83	
[1345]	44.12	
[1346]		,
[1347]	TOF-MS: 체류 시간 = 15.7분, 질량 = 23289.6	

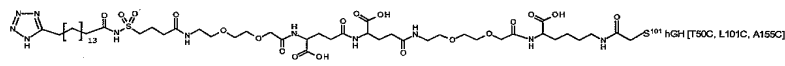
[1348] 44.13



[1349]

[1350] TOF-MS: 체류 시간 = 17.0분, 질량 = 23324.55

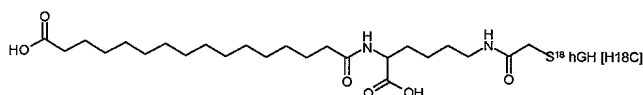
[1351] 44.15



[1352]

[1353] TOF-MS: 체류 시간 = 12.85분, 질량 = 23337.5

[1354] 44.16



[1355]

[1356] TOF-MS: 체류 시간 = 15.24분, 질량 = 22676.8

[1357] **실시예 45**

[1358] 1. 내부 유리 단일 cys를 갖는 GH 화합물(VII)의 알부민 바인더(X)와의 결합

[1359] 1) 유리 Cys GH(VII)의 말레이미드 치환된 알부민 바인더(X)와의 알킬화하여 Cys 접합 GH 화합물(XI) 제공

[1360] 상기 실시예 44에 제공된 탈보호된 Cys GH 화합물(VII)은 말레이미드 치환된 알부민 바인더 링커(X)와 반응하여 GH 접합 A-W-B1-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-피롤리딘-2,5-디온-3-hGH(XI)을 얻을 수 있고, B1은 상기 화학IV에 기술된 바와 같이 한정된다.

[1361] **말레이미드 관능화된 알부민 바인더(X)의 hGH L101C와의 접합**

[1362] *단계(a) 시스테인 잔기의 차단해제*

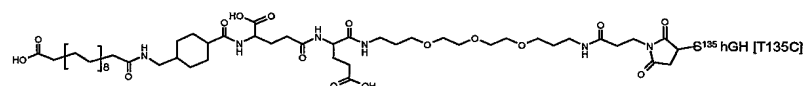
[1363] 글루타티온/시스테인 차단된 Cys hGH(VI)를 GSH 및 GSSG를 함유하는 평형 버퍼에서 글루타레독신 II(Gr×2)을 사용하여 효소로 차단해제하였다. 차단해제된 Cys hGH(VII)를 Sephadex G25 컬럼 상에서 교환된 버퍼에 의해 저분자 GSH/GSSG로부터 분리되었다.

[1364] *단계(b) 말레이미드 기능화된 알부민 바인더(X)로의 결합*

[1365] 말레이미드 기능화된 알부민 바인더(X)를 5% 히드록시프로필-β-시클로텍스트린을 함유하는 버퍼에서 용해하였다. 그 다음 용액을 차단해제된 Cys hGH(VII)에 첨가하고, 실온에서 밤새도록 반응하도록 허용하였다.

[1366] 접합 후, 접합 단백질을 Q Sepharose HiLoad 컬럼 상에서 pH 8.5의 10% 에틸렌 글리콜을 함유하는 20 mM 트리에탄올아민 버퍼에서 염화나트륨의 구배를 사용하여 정제하였다. 수집된 분획들을 모아서, G25 컬럼을 사용하여 10 mM 탄화수소암모늄에 옮기고, 동결건조하였다.

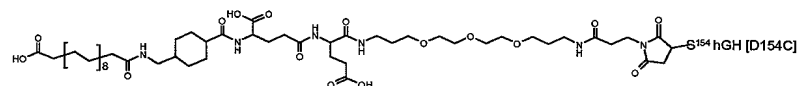
[1367] 45.1



[1368]

[1369] TOF-MS: 체류 시간 = 16.0분, 질량 = 23352

[1370] 45.2

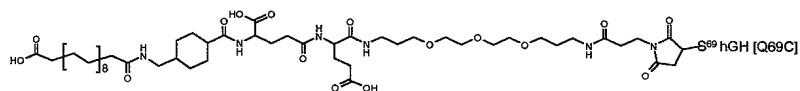


[1371]



[1372] TOF-MS: 체류 시간 = 15.98분, 질량 = 23338

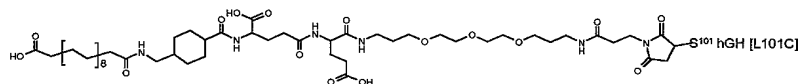
[1373] 45.3



[1374]

[1375] TOF-MS: 체류 시간 = 16.62분, 질량 = 23324.6

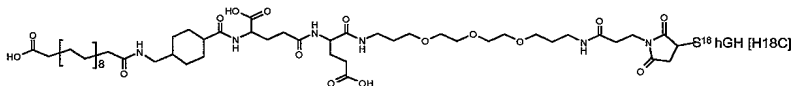
[1376] 45.4



[1377]

[1378] TOF-MS: 체류 시간 = 16.20분, 질량 = 23339.7

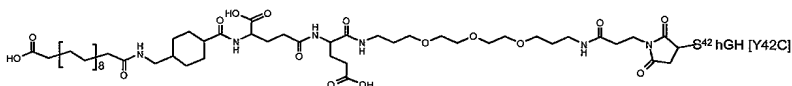
[1379] 45.5



[1380]

[1381] TOF-MS: 체류 시간 = 15.72분, 질량 = 23316.35

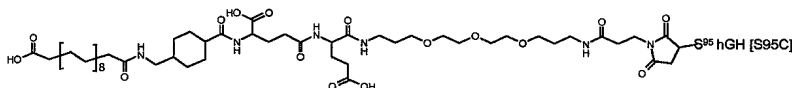
[1382] 45.6



[1383]

[1384] TOF-MS: 체류 시간 = 17.2분, 질량 = 23365.9

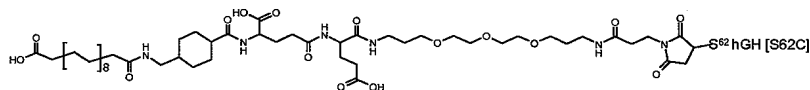
[1385] 45.7



[1386]

[1387] TOF-MS: 체류 시간 = 17.2분, 질량 = 23366

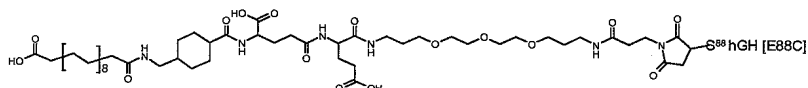
[1388] 45.8



[1389]

[1390] TOF-MS: 체류 시간 = 16.5분, 질량 = 23366

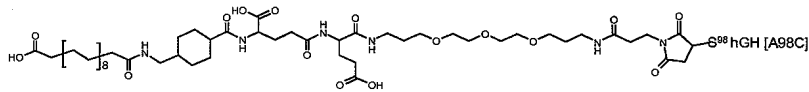
[1391] 45.9



[1392]

[1393] TOF-MS: 체류 시간 = 16.8분, 질량 = 23323.8

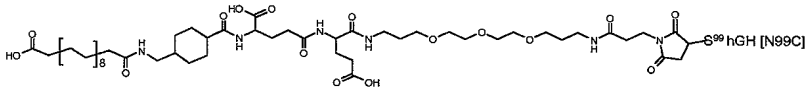
[1394] 45.10



[1395]

[1396] TOF-MS: 체류 시간 = 17.1분, 질량 = 23382

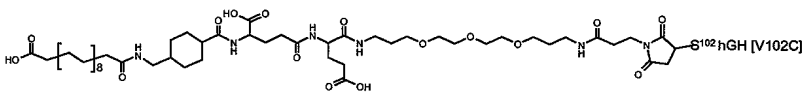
[1397] 45.11



[1398]

[1399] TOF-MS: 체류 시간 = 17.2분, 질량 = 23338.8

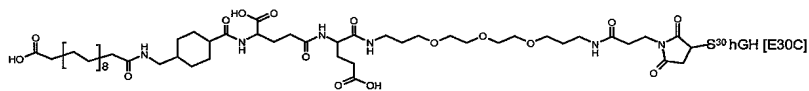
[1400] 45.12



[1401]

[1402] TOF-MS: 체류 시간 = 17분, 질량 = 23353.9

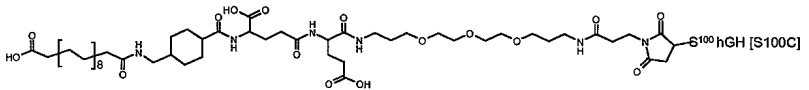
[1403] 45.13



[1404]

[1405] TOF-MS: 체류 시간 = 15.65분, 질량 = 23323.7

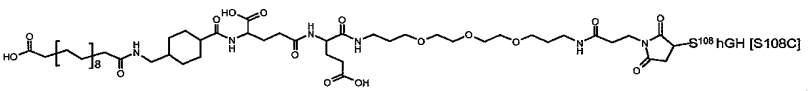
[1406] 45.14



[1407]

[1408] TOF-MS: 체류 시간 = 16.5분, 질량 = 23365.8

[1409] 45.15



[1410]

[1411] TOF-MS: 체류 시간 = 17.2분, 질량 = 23365.9

[1412] **실시예 46**

[1413] **어세이(I) 성장 호르몬 활성을 측정하기 위한 BAF-3GHR 어세이**

[1414] BAF-3 세포(위과의 골수로부터 유도된 pro-B 림포이드 세포주)는 본래 성장 및 생존을 위한 IL-3 의존형이었다. IL-3는 동일한 중개체인 JAK-2 및 STAT를 활성화시키고, GH는 자극에 따라 활성화하고 있다. 사람 성장 호르몬 수용체의 형질주입 후 세포주는 성장 호르몬-의존형 세포주로 변하게 되었다. 이 복제를, BAF-3GHR의 생존 상의 다른 성장 호르몬 샘플의 효과를 평가하기 위해 사용할 수 있다.

[1415] BAF-3GHR 세포는 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 기아 배지(성장 호르몬이 없는 배양 배지)에서 24시간 동안 성장한다.

[1416] 세포를 세척하고, 기아 배지에서 재부유시키고, 플레이트에 10 μL의 성장 호르몬 화합물 또는 사람 성장 호르몬을 다른 농도에서 시딩(seeding)하거나, 또는 대조군을 세포에 첨가하고, 플레이트를 37℃, 5% CO<sub>2</sub>에서 68시

간 동안 배양한다.

[1417] AlamarBlue®를 각 웰에 첨가하고, 그 다음 세포를 또 다른 4시간 동안 배양한다. AlamarBlue®는 산화환원 지시약이고, 세포 대사로의 선천적인 반응에 의해 환원되고, 따라서, 생세포계수의 간접적인 측정을 제공한다.

[1418] 최종적으로, 세포의 대사 활성을 형광 플레이트 리더에서 측정한다. 샘플에서의 흡광도는 성장 호르몬 화합물 또는 대조군으로 자극되지 않는 세포의 %로 표현되고, 농도-반응 곡선으로부터 활성(세포 50%를 자극하는 화합물의 양)을 계산할 수 있다.

[1419] BAF-3 hGH 수용체 어세이에서 화합물 45.4의 시험관 내 효능은 아래 표 1에 나타난다.

[1420] 화합물 45.5의 프로테아제 안정성을 일반적인 방법에서 기술된 바와 같이 화합물을 키모트립신 또는 엘라스타제와 4시간 동안 배양함으로써 측정하였다. 온전한 GH 화합물의 백분율을 측정하고, 결과를 표 1에 포함한다.

**표 1**

[1421] 화합물 45.4에 관한 데이터

화합물	EC50 (nM)	비율 (EC <sub>50</sub> cmp/EC <sub>50</sub> hGH)	개수	키모트립신 (% 온전한 GH 화합물)	엘라스타제 (% 온전한 GH 화합물)
hGH	0.026±0.012	1	6	40	25
45.4	0.09±0.043	3.5	6	75	65

[1422] 실시예 47

[1423] 약동학

[1424] 실시예들의 화합물 약동학은 정맥 내(i.v.) 및 피하의(s.c.) 단일 용량 투여 후 숫컷 Sprague Dawley 래트에서 연구된다.

[1425] 시험 화합물을 희석 버퍼("글리신 20 mg/mL, 만니톨 2 mg/mL, NaHCO<sub>3</sub> 2.5 mg/mL, pH 8.2로 조정"으로 구성됨)에서 1 mg/mL의 최종 농도로 희석한다.

[1426] 시험 화합물은 250 g 무게의 숫컷 Sprague Dawley 래트에서 연구된다. 시험 화합물을 꼬리 정맥 내의 i.v. 또는 목에서의 s.c.로 60 nmol/kg 체중의 용량에서 25 G 바늘로 단일 주사로서 투여된다.

[1427] 각 시험 화합물을 위한 혈액 샘플링은 표 2에 존재하는 하기 일정에 따라 유도된다.

**표 2**

[1428] 각 시험 화합물을 위한 혈액 샘플링 일정.

동물 번호	투여 경 로	샘플링 시간(시간)												
		투여 전	0.08	0.25	0.5	1	2	4	6	8	18	24	48	72
1	s.c.							×	×	×		×	×	×
2								×	×	×		×	×	×
3				×	×	×	×							
4				×	×	×	×							
5			×								×			
6			×								×			
7	i.v.				×	×			×	×		×	×	×
8					×	×			×	×		×	×	×
9		×	×								×			
10		×	×								×			

[1429] 각 샘플링 시간에서 0.25 mL 혈액은 25 G 바늘을 사용하여 꼬리 정맥으로부터 뽑아진다. 혈액을 EDTA 코팅된 시험관으로 샘플링하고, 4℃에서 1200×G로 10분 동안 원심분리할 때까지 얼음 상에 보관된다. 혈장은 Micronic

관으로 옮기고, 분석할 때까지 -20℃에서 저장한다.

[1430] 시험 화합물 농도를 기니피그 항hGH 다클론성 항체를 캐처(catcher)로서, 그리고 바이오틴 hGH 결합-단백질(사람 GH 수용체의 용해성이 있는 부분)을 검출기로서 사용하여 샌드위치 ELISA에 의해 측정한다. 어세이의 검출 한계는 0.2 nM이었다.

[1431] 비구획 약동학 분석을 WinNonlin Professional(Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA)을 사용하여 각 시험 화합물의 평균 농도-시간 프로파일 상에서 수행한다. 약동학 파라미터는 말단 반감기( $t_{1/2}$ )를 평가하고, 평균 체류 시간(MRT)은 계산된다.

### 표 3

[1432] 실시예들로부터 단일 용량 i.v. 및 s.c. 투여 후 Sprague Dawley 래트에서 GH 화합물의 반감기( $t_{1/2}$ ) 및 평균 체류 시간(MRT).

화합물 (실시예 번호)	투여 경로	$T_{1/2}$ (시간)	MRT(시간)
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
44.10	i.v.	4.1	7.1
45.4	i.v.	8.6	9.8
45.4	s.c.	19.8	31.2
45.12	i.v.	5.8	6.8

[1433] 실시예 45.4의 생체이용률은 48.3%로 평가되었다. 피하의 투여 후 최대 혈장 농도에서의 시간( $t_{max}$ )은 8.0시간이었다.  $C_{max}$ 는 i.v. 및 s.c. 투여 후, 각각 1670 및 151 nM이었다. i.v. 투여 후, 시간 0에서의 외삽 혈장 농도는 1710 nM이었다.

[1434] 실시예 48

[1435] 일련 화합물의 시험관 내 효능 및 반감기는 상기 기술된 바와 같이 측정되었다. 화합물의 접합체는 동일하지만, 표 4에 기술된 돌연변이에 의해 도입된선택적인 시스테인을 통해 부착된다.

### 표 4

[1436] 시험관 내 효능 및 반감기( $t_{1/2}$ ).

화합물	시험관 내 효능	$T_{1/2}$ (i.v. 래트) (시간)	MRT (시간)	부착 부위 (변종)
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
45.6		4.1	5.5	Y42C
45.7		0.72	6.5	S95C
45.8		0.59	2.0	S62C
45.9		1.8	4.1	E88C
45.10	2.6	3.4	4.3	A98C
45.11	3.1	5.8	6.8	N99C

45.12	2.5	1.9	3.0	V102C
45.13	16.5	1.9	2.6	E30C
45.14	4.4	1.5	2.0	S100C

[1437] 실시예 49

[1438] 뇌하수체제거된 Sprague Dawley 래트에서의 생체 내 용량-반응 연구

[1439] 생체 내 용량-반응 관계를 뇌하수체제거된 수컷 Sprague Dawley 래트에서 연구하였다. 뇌하수체제거된 래트는 성장 호르몬 결핍의 인식된 동물 모형으로서 잘 알려져있고, 성장 호르몬을 전혀 생산하지 않는 것은 뇌하수체의 수술적 제거 후에 발생한다. 또한 이것은 사람에게 성장 호르몬 결핍의 또 다른 중요한 임상적 특징인 인슐린 유사 성장 요인-1(IGF-1)이 낮게 순환하는 수준을 이끈다.

[1440] 뇌하수체제거는 90-100 g 무게의 4주령 수컷 래트에게 수행된다. 이 연구에 들어가는 동물은 이 수술 3-4 주 후의 무게가 100-110 g이었다. 수술 후 3-4주 동안 10% 이상의 체중이 늘어난 동물은 이 연구에 들어가도록 허용되지 않는다.

[1441] 용량 반응 연구는 1-150 nmol/래트로부터 화합물 45.4의 5개의 용량 수준을 사용하여 수행된다.

[1442] 뇌하수체제거된 Sprague Dawley 래트에서 기준 수준의 혈장 IGF-1은 모든 투여 군에서 약 80-100 ng/mL이었다. 단일 투여 후, IGF-1 수준은 1일에 투여에 거의 독립적으로 800-1000 ng/mL로 급속히 증가되었다. 혈장 IGF-1 수준은 용량-의존형 방식(가장 적은 용량은 가장 빠른 감소, 가장 높은 용량은 가장 느린 감소)으로 이후 다시 감소되었다. 가장 높은 용량에서 IGF-1 혈장 수준은, 그것이 더 급속히 감소하기 시작하기 전에, 800-900 ng/mL에서 3일 동안 유지되었다. IGF-1 혈장 농도 수준은 3일까지 모든 투여군의 매개체 조절군과 비교해 상승되었다. 10 nmol, 50 nmol 및 150 nmol의 투여군의 경우, 그것은 총 연구기간(7일) 동안 상승되었다.

[1443] 실시예 50

[1444] 소멸

[1445] 흡수율은 피하의 모세혈관의 폐쇄막을 통과하는 분자의 능력과 관련되고, 성질은 분자 크기와 관련된다는 가설을 세웠다. 40 kDa PEG가 있는 PEG-hGH는 150-250 kDa의 분명한 분자량(mw)을 갖는다. 알부민과 공유 결합된 hGH 분자는 mw = 87 kDa를 갖는 반면, 알부민과 비공유 결합된 hGH 분자는 시간의 알부민 부분으로부터 분리되어, 따라서 mw = 22 kDa를 가질 것이다. 분리된 상태에서의 시간 소비는 알부민 결합 부분의 친화력에 의존할 것이다. 따라서 이들 화합물의 흡수율은 PEG-hGH보다 더 빨라야하고, 속도는 알부민의 더 낮은 친화력을 갖는 알부민 결합 부분의 사용으로 증가해야 한다.

[1446] 시험 용액을 표준 버퍼("글리신 20 mg/mL, 만니톨 2 mg/mL, NaHCO<sub>3</sub> 2.4 mg/mL, pH는 8.2로 조정"으로 구성됨)로 희석하였다.

[1447] <sup>125</sup>I로의 요오드화를 Chemistry & Isotope Lab. Novo Nordisk A/S에 의해 수행하였다. 최종 방사성 조제는 3 µCi/mL의 특정 방사성 활성을 가졌고, 3 mL Penfills에 공급되었다.

[1448] 용액을 사용시까지 2-8°C에서 저장하였다.

[1449] 선택된 화합물의 소멸율을 이중 LYD의 5마리 암컷 돼지에서 측정하였다. 돼지는 무게를 재고, 금식시키고, 감마 카운터 및 송신기를 휴대하기 위해 특정 "피그 코트"를 지급하고, 연구를 시작하기 전 단일 우리에 위치시켰다.

[1450] 모든 돼지들은 연구 전 18시간 동안 금식시켰다.

[1451] 동물의 목 각각 왼쪽 및 오른쪽 피하에 고정된 검은색 바늘 마개가 있는 바늘로 Novopen3<sup>®</sup> 및 NovoFine<sup>®</sup> 28G를 가지고 투여하였다(60 nmol). 주사 깊이는 5 mm이었다.

[1452] 방사성 추적물의 소멸은 휴대용 장비에 의해 약 24-48시간 동안 측정되었다.

[1453] 각 개체 동물의 결과가 AUC(0-45시간)로 존재하여 표 5에 나타내었다.

[1454] 시험관 내 효능, 반감기 및 일련의 화합물의 추가 특성을 상기 기술된 바와 같이 측정하고 표 5에 나타내었다.

표 5

화합물 특성.

화합물	시험관 내 효능	T <sub>1/2</sub> (i.v. 래트) (시간)	소멸 AUC (0-45시간)	IGF-1 증가 기간 (시간)
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

실시예 51

돼지의 생체 내 연구

hGH 알부민 접합체의 관능성을 추가로 확인하기 위해, 본 발명에 따른 3개의 화합물을 돼지의 추가 약동학 연구를 위해 선택하였다. 화합물 44.1, 44.4 및 44.5와 동일한 화합물을 MAEA 정제 태그의 제거 후 hGH 변종과 결합하는 알부민을 접합하여 제조하였다.

시험 화합물을 표준 버퍼(20 mg/mL 글리신, 2 mg/mL 만니톨, 2.4 mg/mL NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.2로 조정)에서 100 nmol/mL의 최종 농도로 희석하였다. 24마리 숫컷 Gottingen 미니돼지 5달령 9-12 kg 무게를 연구에 사용하였다. 각 시험 화합물을, 4마리는 정맥 내 볼루스 투여를 받도록, 그리고 4마리는 피하 투여를 받도록, 8마리 동물에게 투여하였다. 정맥 내 주사는 귀에서 24 G Venflon을 통해 주어졌다. 용량은 볼루스로서 최대 5초 이상 2 mL의 0.9% NaCl로 주어졌다. 피하 주사는 목 가운데에서 오른쪽으로 7-9 cm 및 귀로부터 5-7 cm 아래에 주어졌다. 각 동물은 10 nmol/kg의 시험 화합물을 단일 용량으로 받았다. 혈액 샘플을 각 동물로부터 투여 전, 주사 후 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240, 및 336 시간의 시간 지점에서 수집되었다. 혈장을 각 혈액 샘플로부터 분리하여TRh, 시험 화합물의 분석 전 -20℃에서 저장하였다. 혈장 농도-시간 데이터를 비구획 약동학 방법에 의해 분석하였다.

표 6

10 nmol/kg의 단일 용량 피하 투여 후 약동학 파라미터의 평가.

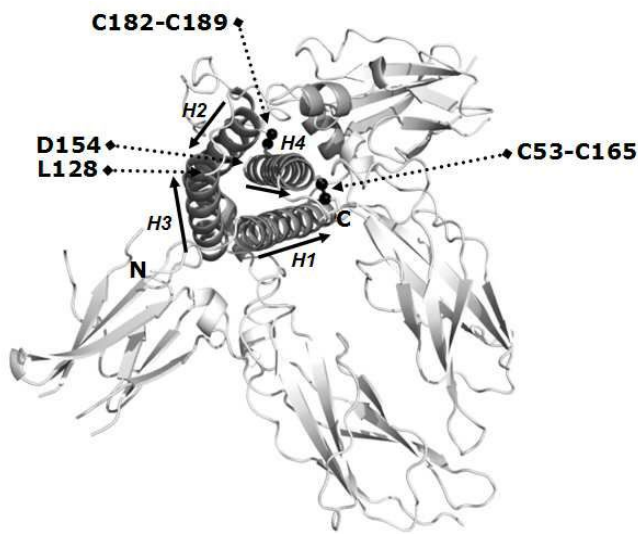
화합물	하기 화합물에서 ABW-할로	AUC/용량 (시간*kg/L)	T <sub>1/2</sub> (시간)	MRT(시간)	MAT(시간)	F(%)
51.1	44.1	139(37.5)	11(1.2)	30.6(4.1)	10.0	38.6
51.2	44.5	101(22.5)	12(2.7)	25.2(3.9)	11.6	60.8
51.3	44.4	144(34.7)	12.6(3.5)	33.1(1.7)	12.1	35.6

평균±[( ) 안의 편차]

표 6은 3개 시험 화합물의 가장 중요한 약동학 파라미터를 나타내고 있다. AUC/용량은 시험 화합물의 용량 교정된 노출을 위한 평가이다. T<sub>1/2</sub>은 흡수상이 완료된 후의 시험 화합물의 말단 반감기이다. MRT는 체내에서 평균 시험 화합물 분자 시간에 대응하는 시험 화합물의 평균 체류 시간이다. MAT는 대응하는 평균 흡수시간이며, 분자가 흡수상에 있는 평균 시간의 평가이다. F는 정맥 내 투여에 비례하여 시험 화합물의 절대 생체이용률이다.

도면

도면1



도면2

```
1  FFTIPLSRL1LF DNAMLRH1AHRL HQLAFDTYQE FEEAYIPKEQ KYSFLQNPQT SLCFSES IPT
61 PSNREETQL1QK SNLELLRISL LLIQSWLEPV QFLRSVFANS LVYGASDSNV YDLLKDLEEG
121 IQH2TLMGRLL2ED GSPRTGQIFK QH3TYSKFDL3TNS HNDDALLKNY GLLYCFRKDM DKVETFLRIV
181 QCRSVEGSCG FH4
```

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Novo Nordisk A/S  
Behrens, Carsten  
Buchardt, Jens  
N?skov-Lauritsen, Leif  
Andersen, Henrik S  
Johansen, Nils L
- <120> GROWTH HORMONES WITH PROLONGED IN-VIVO EFFICACY
- <130> 8069.204-WO
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 191
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<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  
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