



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I701048 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：104120074

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 22 日

(51)Int. Cl. : **A61K47/50 (2017.01)**
C07K14/475 (2006.01)**A61P3/00 (2006.01)**(30)優先權：2014/06/23 美國 62/015,862
2014/11/20 美國 62/082,327
2015/01/23 美國 62/107,016(71)申請人：瑞士商諾華公司 (瑞士) NOVARTIS AG (CH)
瑞士

(72)發明人：伯尼斯 大衛 溫英傑 BARNES, DAVID WENINGER (US)；山田健 YAMADA, KEN (JP)；伊比邦久 去克溫杜 IBEBUNJO, CHIKWENDU (US)；都塔羅伊 阿洛克許 DUTTARROY, ALOKESH (US)；可曼 路易斯 克萊爾 KIRMAN, LOUISE CLARE (GB)；布魯斯 亞立山卓 馬歇爾 BRUCE, ALEXANDRA MARSHALL (US)；優瑟拉 愛咪 瑞察德森 USERA, AIMEE RICHARDSON (US)；查克利 佛瑞德利克 ZECRI, FREDERIC (FR)；元 強 YUAN, JUN (US)；樓長剛 LOU, CHANGGANG (CN)；肯特 艾倫 KANTER, AARON (US)；博斯 愛薇洛普 BOSE, AVIRUP (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2014083505A1

Acta Chemica Scandinavica Jan 1964 p83-97

審查人員：傅玉妃

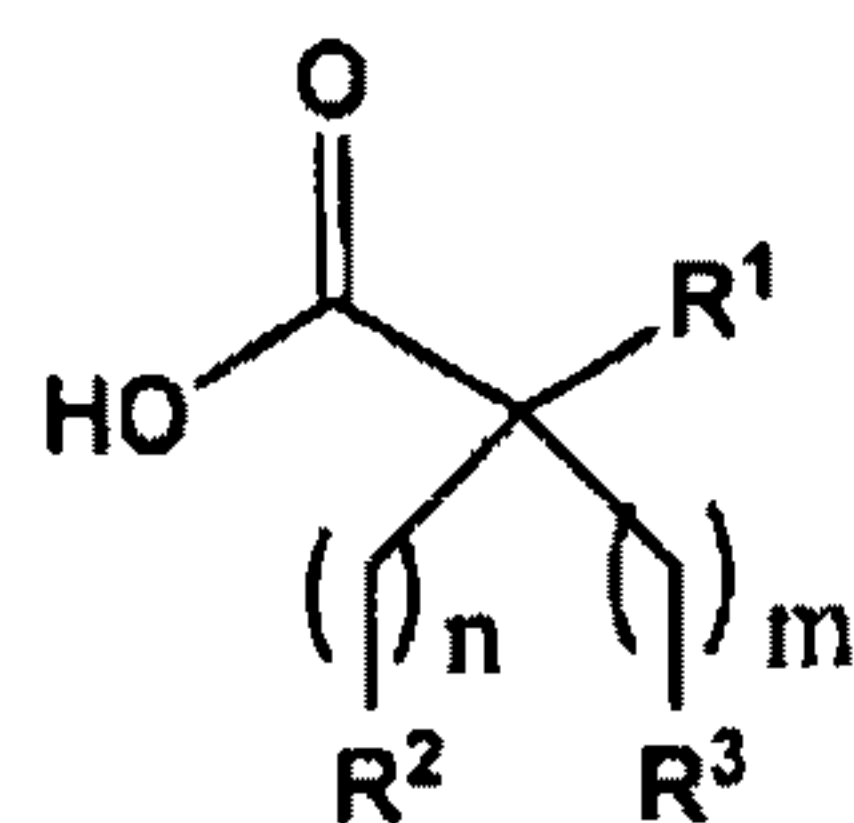
申請專利範圍項數：24 項 圖式數：1 共 245 頁

(54)名稱

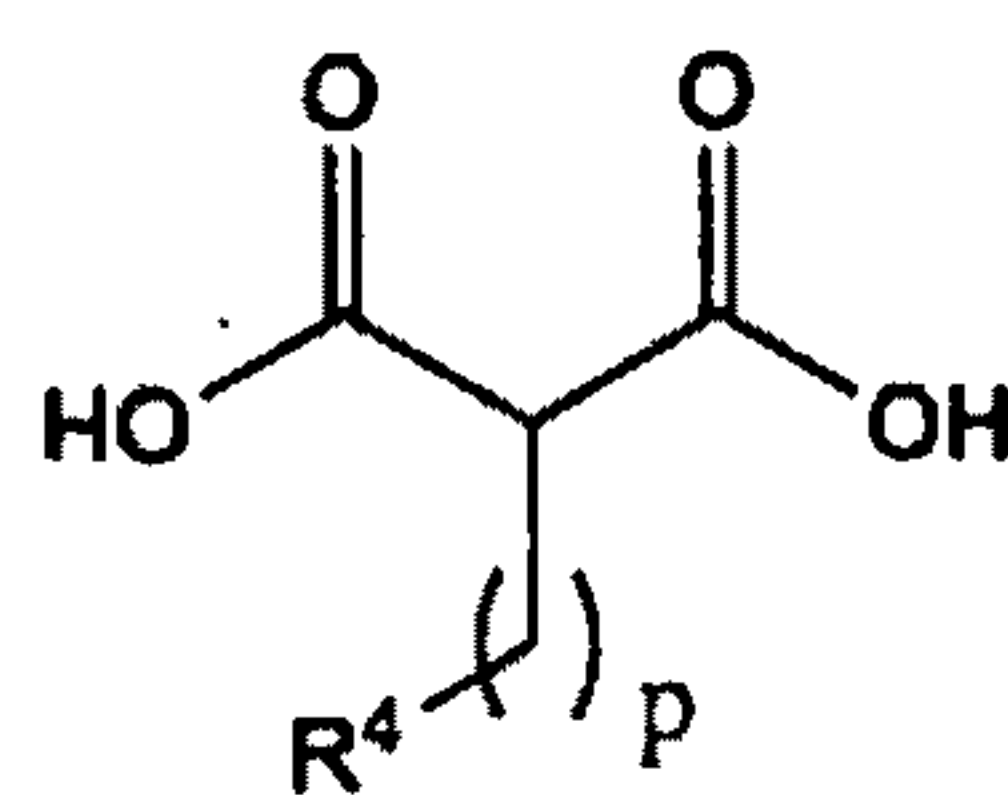
新穎脂肪酸及其於共軛至生物分子之用途

(57)摘要

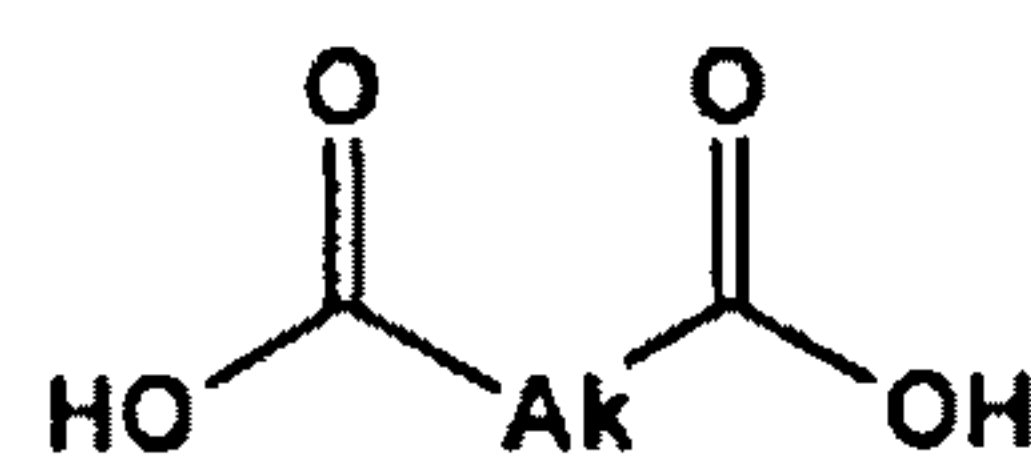
本發明提供一種包含生物分子經由連接子鍵聯至脂肪酸之共軛物，其中該脂肪酸具有下式 A1、A2 或 A3：



A1



A2

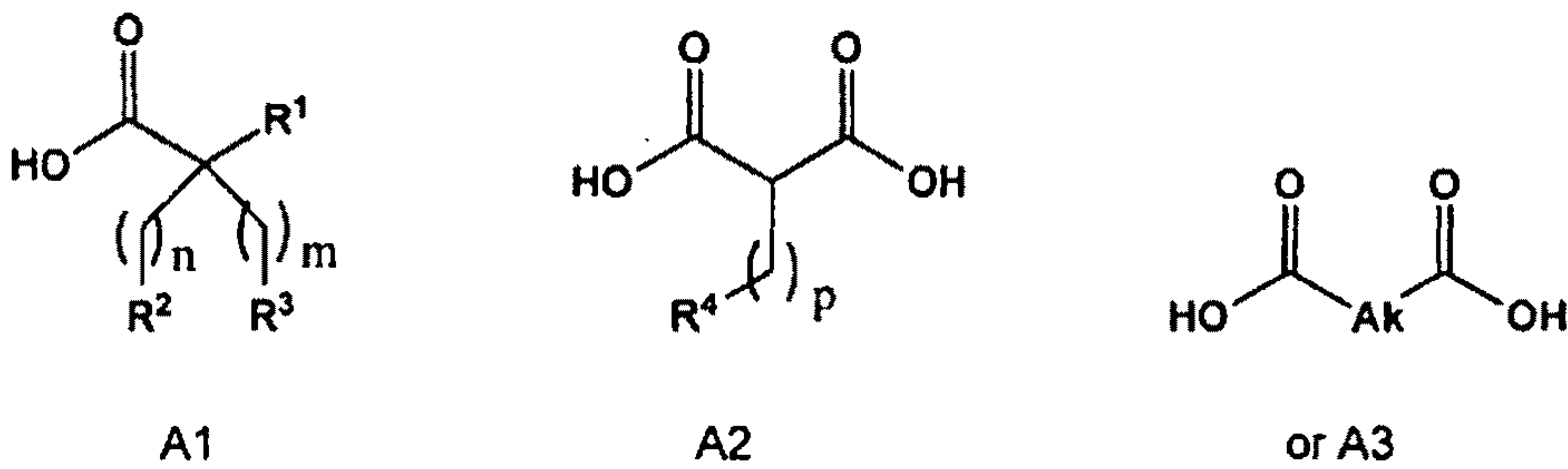


或 A3

其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 A_k 、 n 、 m 及 p 定義於本文中。本發明亦關於一種製造本發明共軛物 (諸如 GDF15 共軛物) 之方法，及其治療用途，諸如治療或預防代謝病症或疾病、第 2 型糖尿病、肥胖症、胰臟炎、異常血脂症、酒精性及非酒精性脂肪肝病/脂肪肝炎及其他進行性肝病、胰島素

抗性、高胰島素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、動脈粥樣硬化、周邊動脈疾病、中風、心臟衰竭、冠心病、糖尿病併發症(包括(但不限於)慢性腎病)、神經病、胃輕癱及其他代謝病症。本發明另外提供藥理活性劑之組合及醫藥組合物。

The invention provides a conjugate comprising a biomolecule linked to a fatty acid via a linker wherein the fatty acid has the following Formulae A1, A2 or A3:



wherein R¹, R², R³, R⁴, Ak, n, m and p are defined herein. The invention also relates to a method for manufacturing the conjugate of the invention such as GDF15 conjugate. and its therapeutic uses such as treatment or prevention of metabolic disorders or diseases, type 2 diabetes mellitus, obesity, pancreatitis, dyslipidemia, alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis and other progressive liver diseases, insulin resistance, hyperinsulinemia, glucose intolerance, hyperglycemia, metabolic syndrome, hypertension, cardiovascular disease, atherosclerosis, peripheral arterial disease, stroke, heart failure, coronary heart disease, diabetic complications (including but not limited to chronic kidney disease), neuropathy, gastroparesis and other metabolic disorders. The present invention further provides a combination of pharmacologically active agents and a pharmaceutical composition.

指定代表圖：

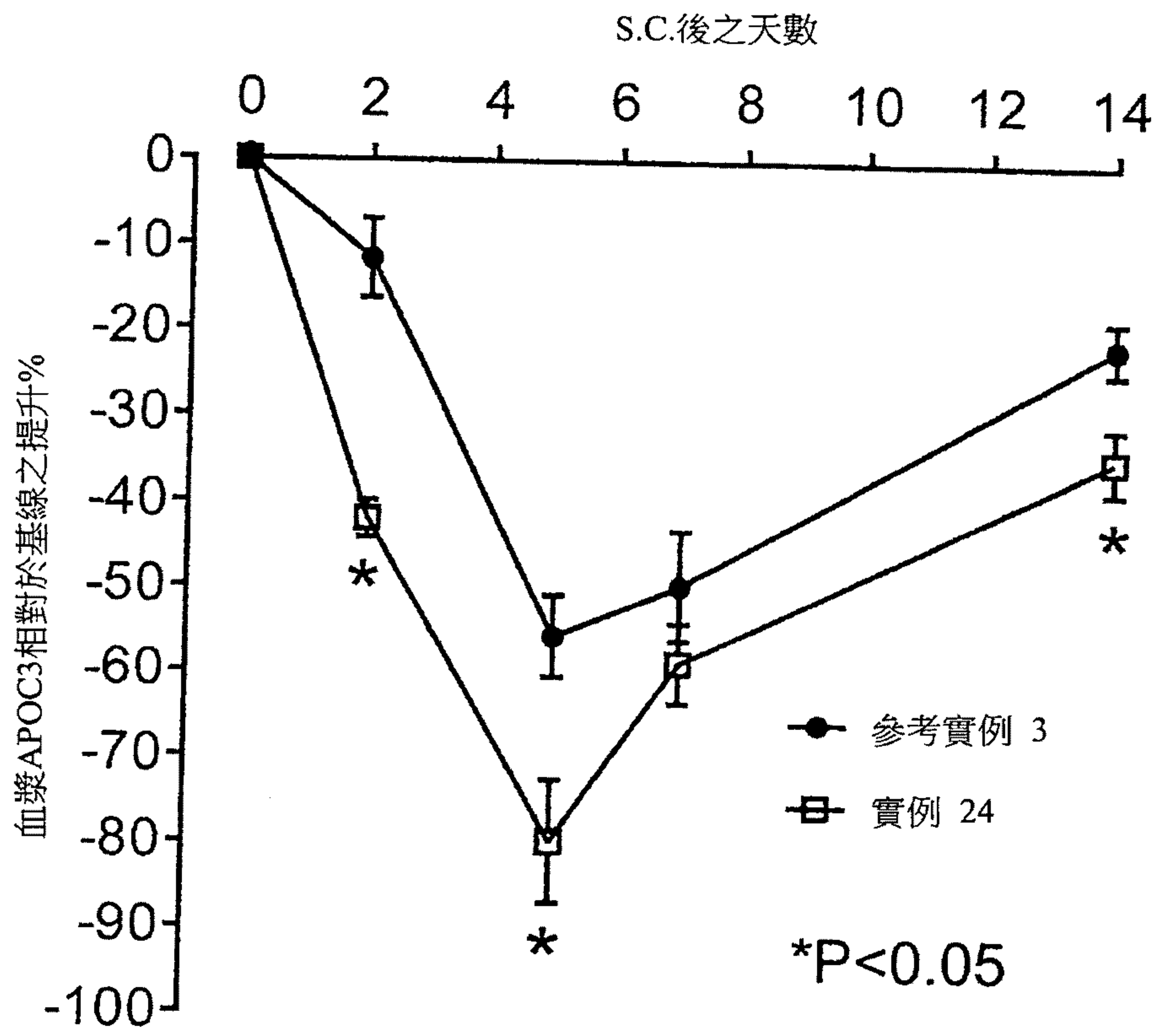
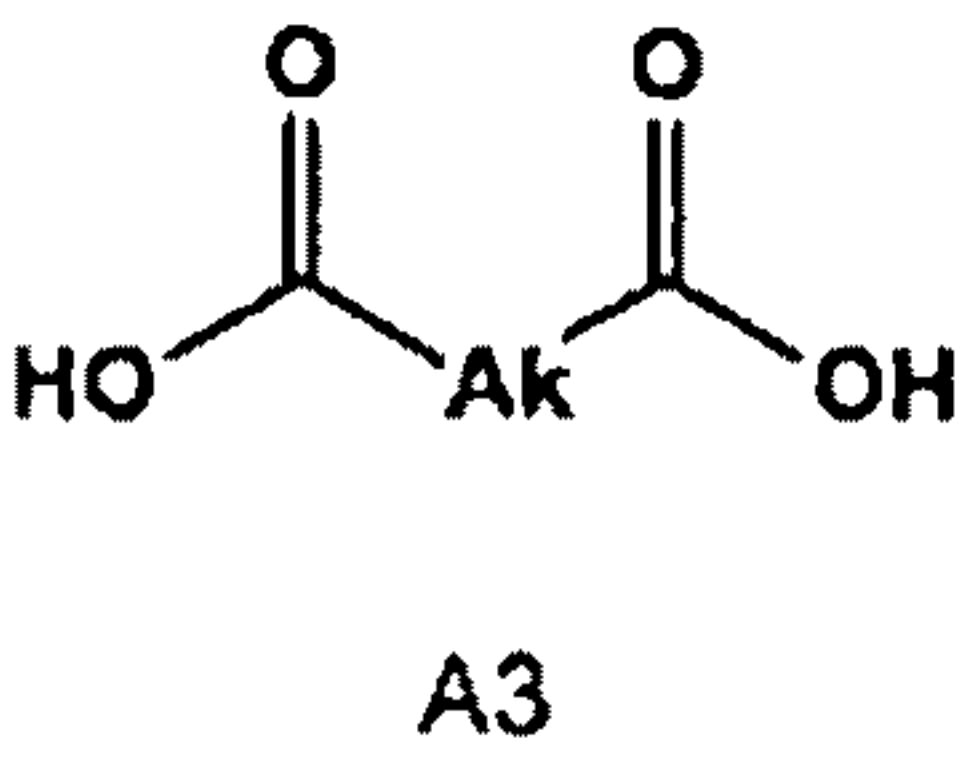
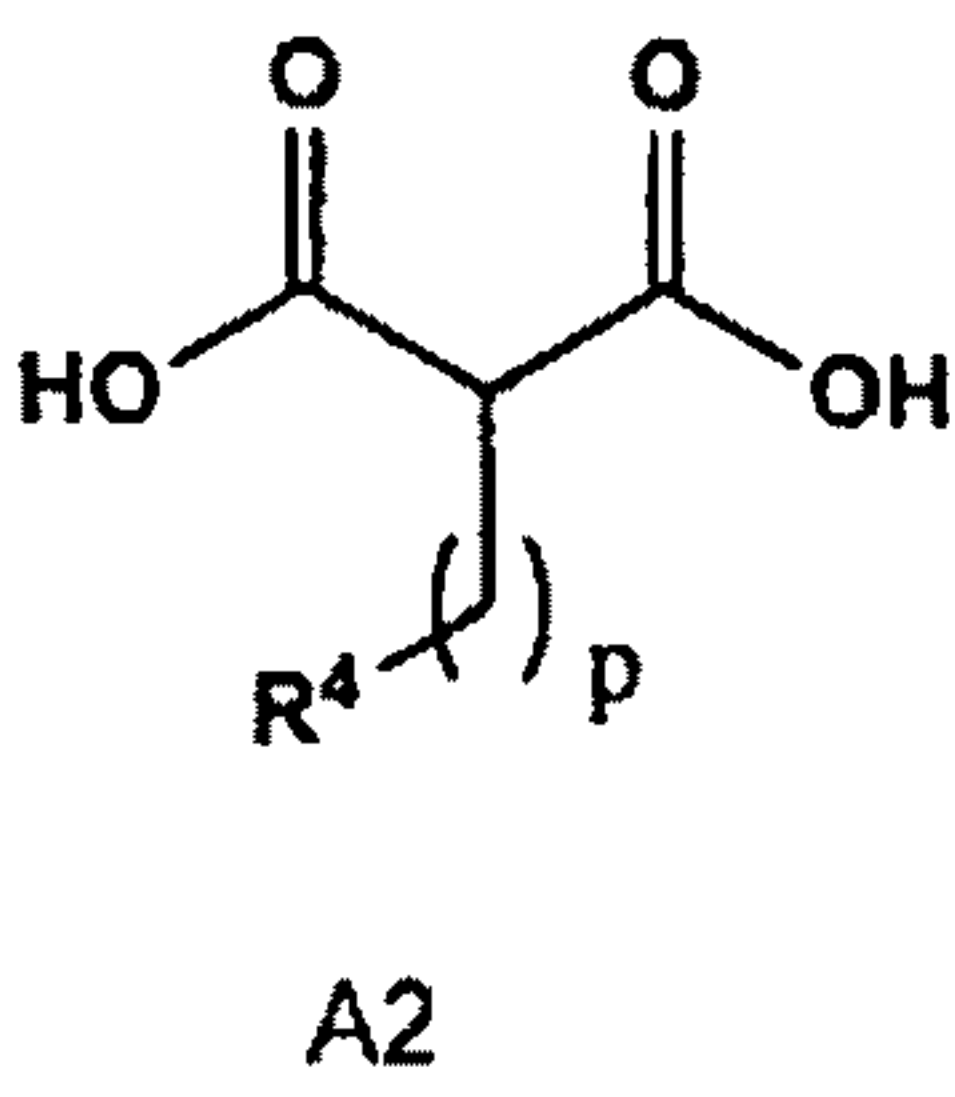
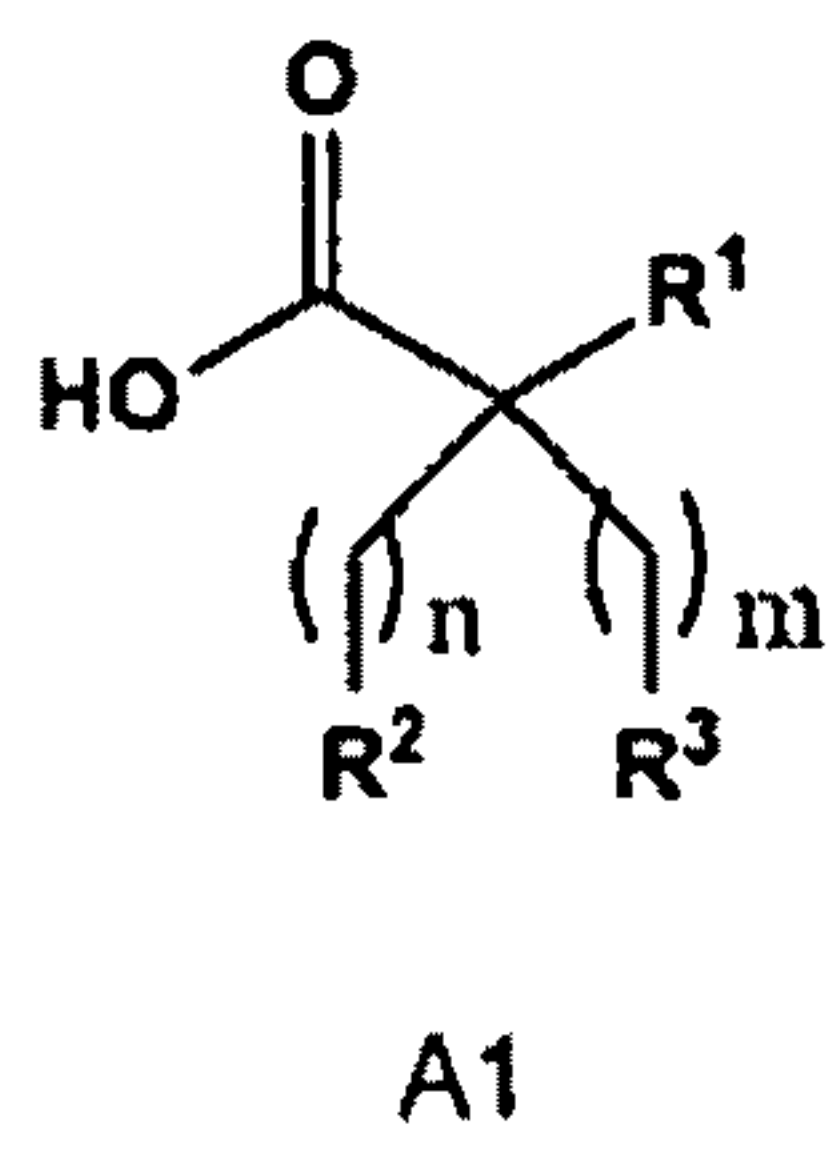


圖1

特徵化學式：



※ 申請案號：104120074

※ 申請日：104年6月22日

 ※IPC 分類：A61K 47/50 (2017.01)
 A61P 3/00 (2006.01)
 C07K 14/475 (2006.01)

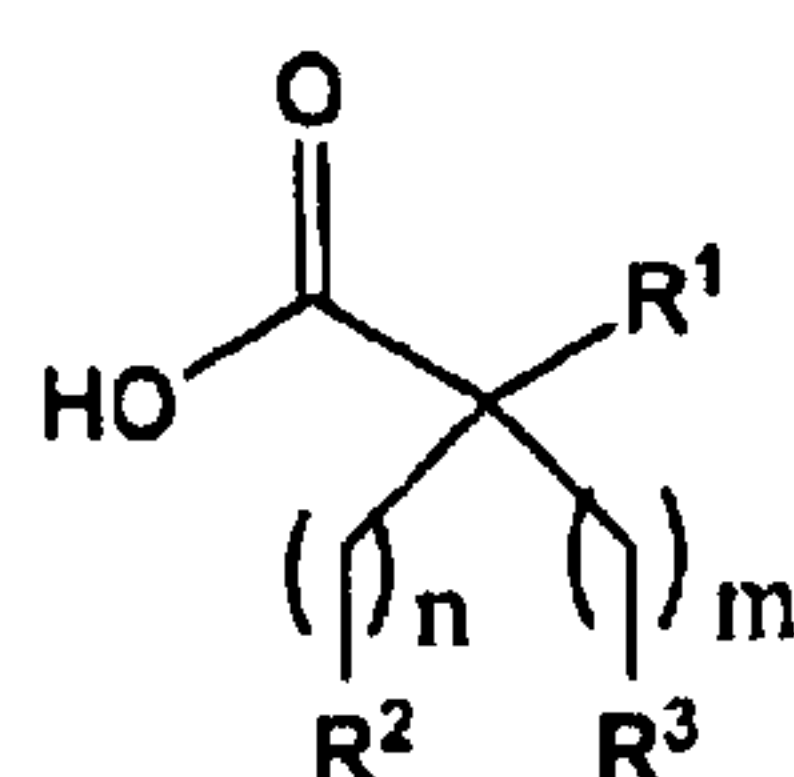
【發明名稱】

新穎脂肪酸及其於共軛至生物分子之用途

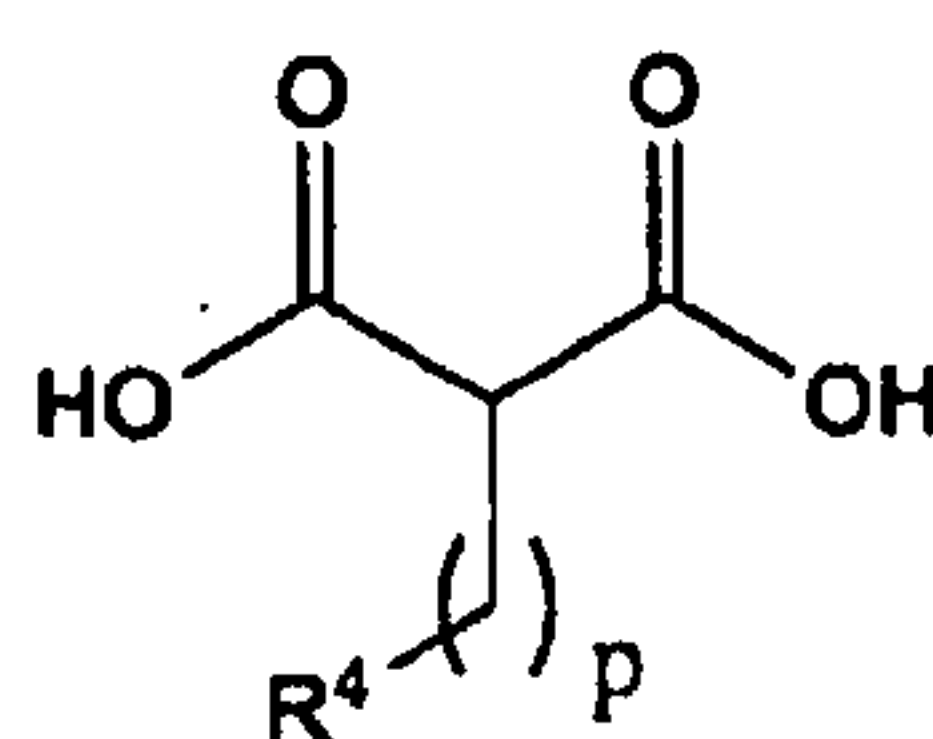
NOVEL FATTY ACIDS AND THEIR USE IN CONJUGATION TO BIOMOLECULES

【中文】

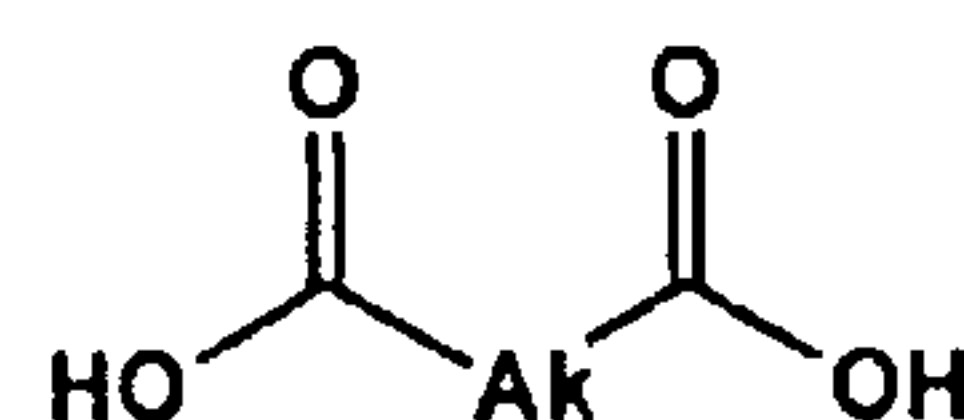
本發明提供一種包含生物分子經由連接子鍵聯至脂肪酸之共軛物，其中該脂肪酸具有下式A1、A2或A3：



A1



A2

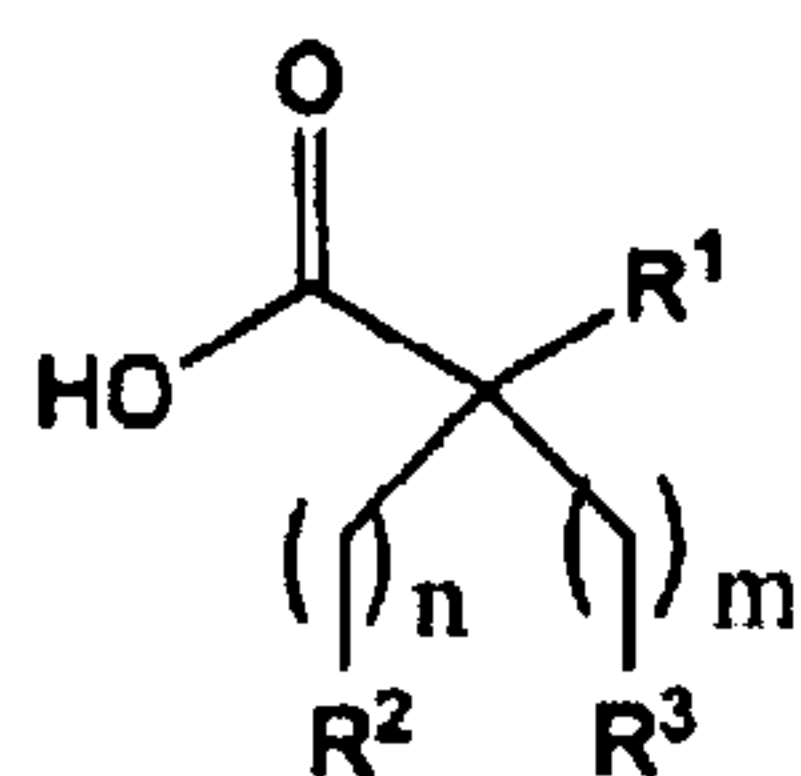


或 A3

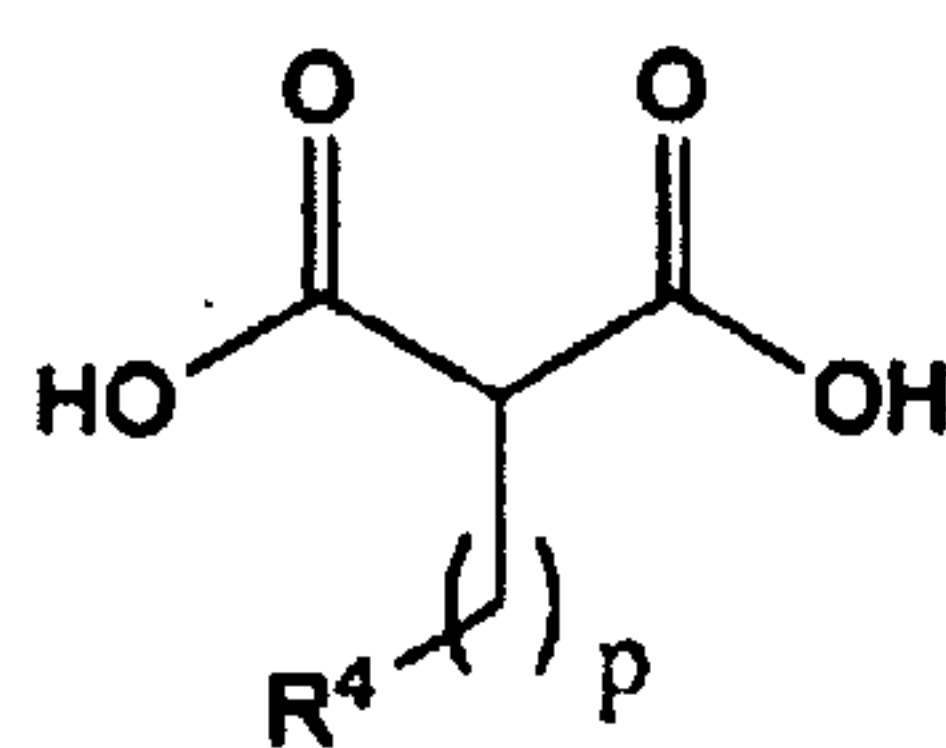
其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、Ak、n、m及p定義於本文中。本發明亦關於一種製造本發明共軛物(諸如GDF15共軛物)之方法，及其治療用途，諸如治療或預防代謝病症或疾病、第2型糖尿病、肥胖症、胰臟炎、異常血脂症、酒精性及非酒精性脂肪肝/脂肪肝炎及其他進行性肝病、胰島素抗性、高胰島素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、動脈粥樣硬化、周邊動脈疾病、中風、心臟衰竭、冠心病、糖尿病併發症(包括(但不限於)慢性腎病)、神經病、胃輕癱及其他代謝病症。本發明另外提供藥理活性劑之組合及醫藥組合物。

【英文】

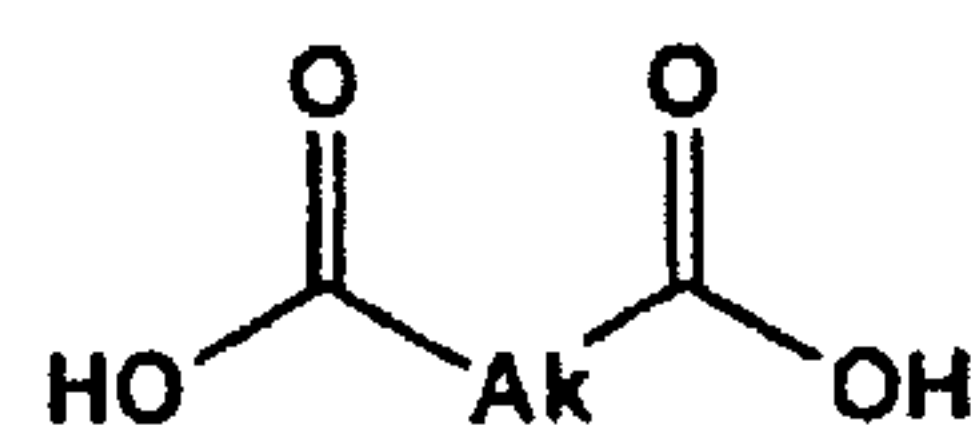
The invention provides a conjugate comprising a biomolecule linked to a fatty acid via a linker wherein the fatty acid has the following Formulae A1, A2 or A3:



A1



A2



or A3

wherein R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , A_k , n , m and p are defined herein. The invention also relates to a method for manufacturing the conjugate of the invention such as GDF15 conjugate, and its therapeutic uses such as treatment or prevention of metabolic disorders or diseases, type 2 diabetes mellitus, obesity, pancreatitis, dyslipidemia, alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis and other progressive liver diseases, insulin resistance, hyperinsulinemia, glucose intolerance, hyperglycemia, metabolic syndrome, hypertension, cardiovascular disease, atherosclerosis, peripheral arterial disease, stroke, heart failure, coronary heart disease, diabetic complications (including but not limited to chronic kidney disease), neuropathy, gastroparesis and other metabolic disorders. The present invention further provides a combination of pharmacologically active agents and a pharmaceutical composition.

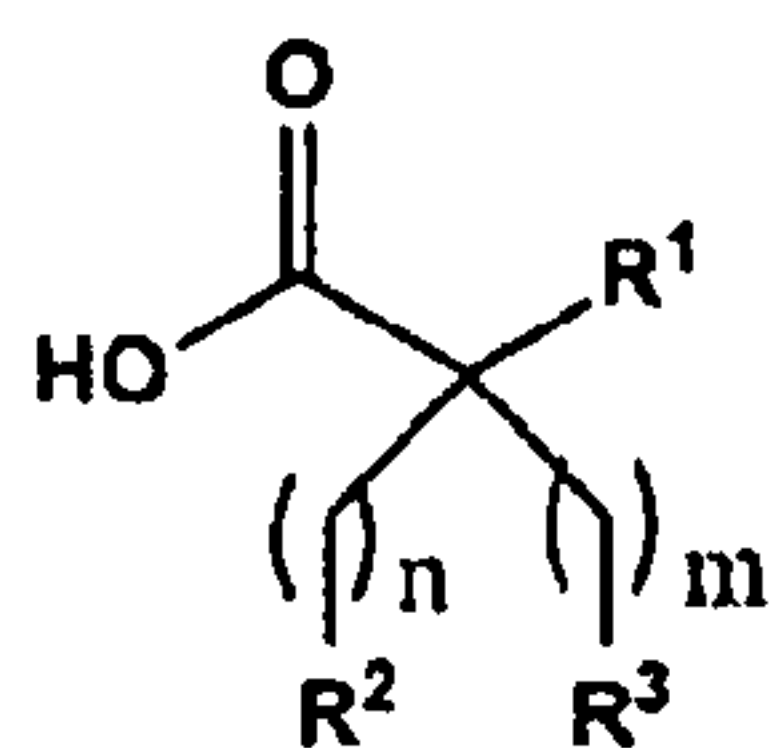
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

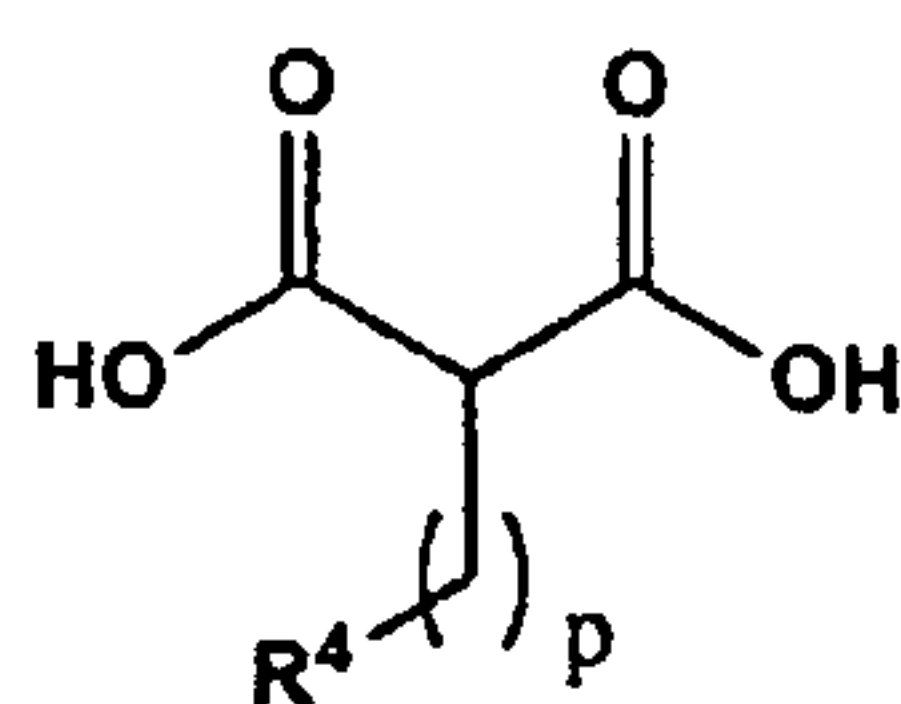
【本代表圖之符號簡單說明】：

無

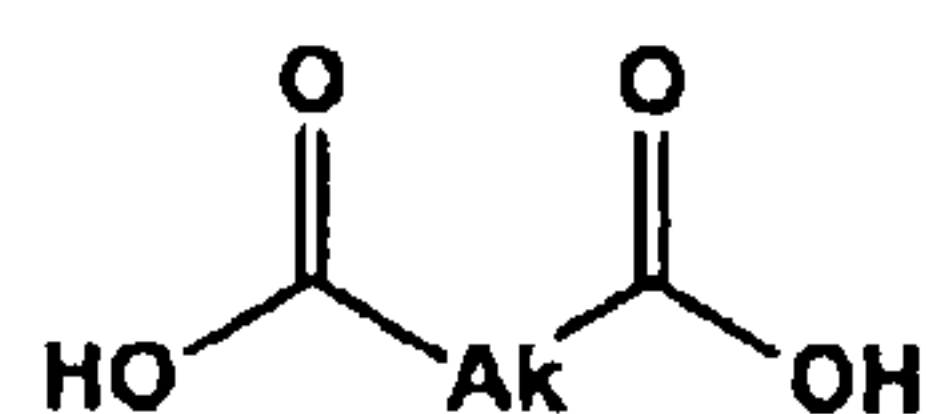
【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



A1



A2



A3

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

新穎脂肪酸及其於共軛至生物分子之用途

NOVEL FATTY ACIDS AND THEIR USE IN CONJUGATION TO
BIOMOLECULES

【技術領域】

本發明係關於具有提高半衰期及作用時間之GDF15之新穎共軛物、其製造方法及其使用方法。本發明另外係關於新穎脂肪酸及其於經由共軛作用延長生物分子半衰期之用途。

【先前技術】

肽及蛋白質被廣泛用於醫療實務中，且因為其可藉由重組DNA技術生產，所以可預期，其重要性在未來幾年內亦將上升。同時由於對人類基因組之不斷探索，已知具有受關注生物活性之內源性肽及蛋白質之數量迅速增加。由於其生物活性之故，此等多肽及蛋白質中有許多原則上可用作治療劑。然而，內源性肽或蛋白質並不總是適合作為候選藥物，因為其通常具有幾分鐘之半衰期，原因在於受到肽酶之迅速降解及/或腎過濾及於尿液中排出。多肽或蛋白質在人類血漿中之半衰期差異巨大(自幾分鐘至超過一週)。

在期望長時間內維持高血液濃度之情形下，治療劑之高清除率係不合時宜。一種當前用於克服此缺點之方式係對患者投與大劑量所欲之治療肽或蛋白質，以使得即使一些治療肽或蛋白質被降解，亦足以維持治療效果。然而，此方法使患者感到不適。因為大多數治療肽或蛋白質無法口服投與，所以該等治療肽或蛋白質將不得不不斷輸注、藉由靜脈注射頻繁輸注或藉由不方便的皮下注射途徑頻繁投與。

頻繁投與之需求亦致使極有潛力的肽或蛋白質治療法具有高得難以接受之預計治療成本。存在大量降解肽或蛋白質亦可產生非期望之副作用。

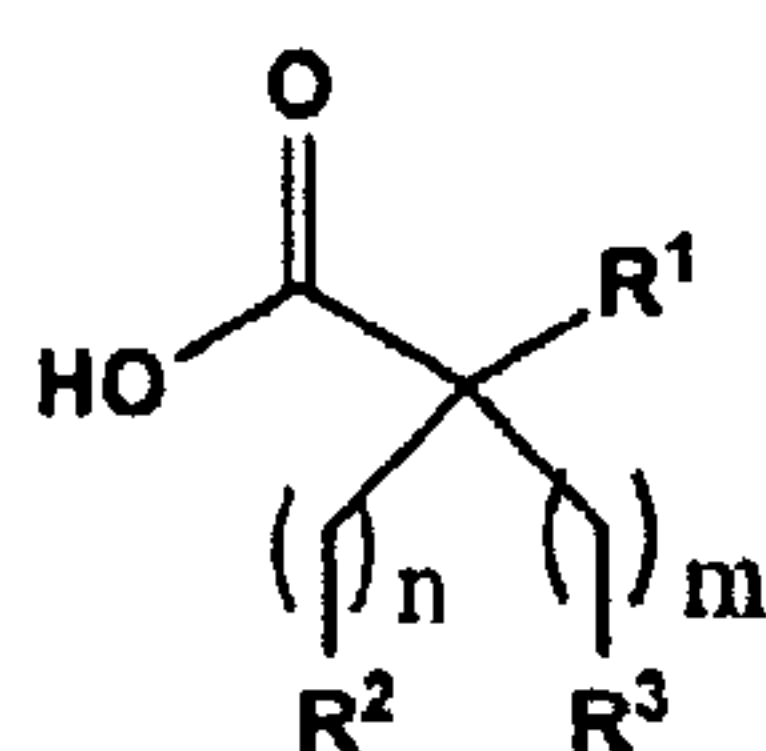
投與之不適性及高成本係為什麼大多數具有誘人生物活性曲線之治療肽或蛋白質無法研發成候選藥物之兩個原因。

因此，一種延遲肽或蛋白質之半衰期之方法係修飾該等治療肽或蛋白質，修飾方式為使其降解變慢，同時仍維持生物活性。血清白蛋白之半衰期超過一週，且一種提高肽或蛋白質之血漿半衰期之方法係使其衍生出結合至血清白蛋白或其他血漿蛋白質之化學實體。

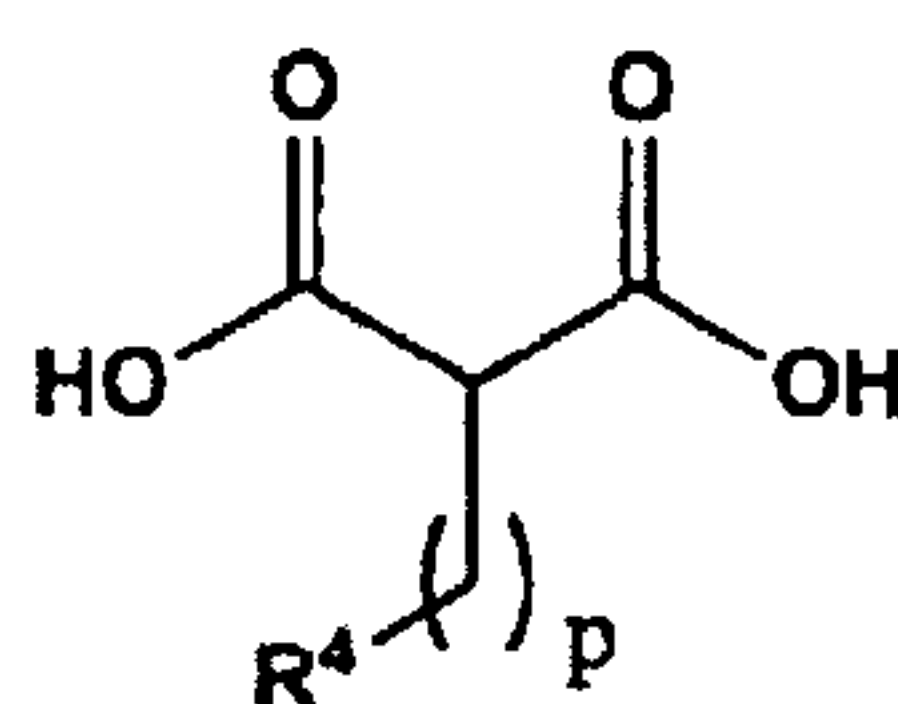
然而，仍需鑑定新的半衰期延長實體來修飾治療生物分子(諸如肽及蛋白質)，以提供更長活體內作用時間，同時維持低毒性及治療優勢。

【發明內容】

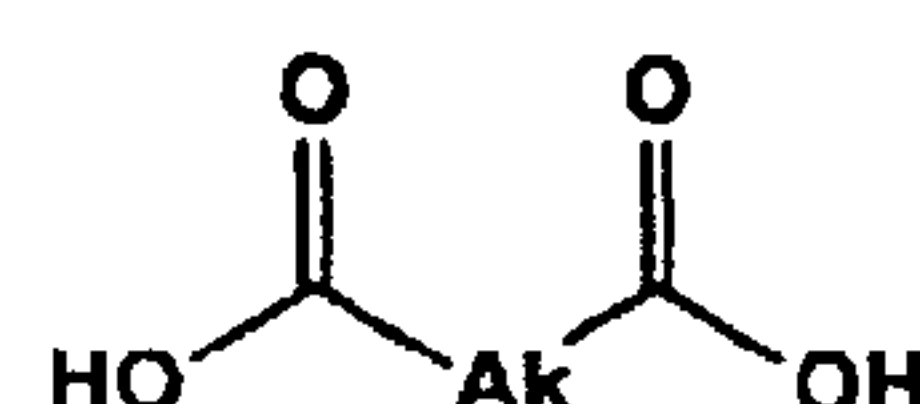
本發明係關於一種包含經由連接子鍵聯至脂肪酸之生物分子之共軛物，其中該脂肪酸具有下式A1、A2或A3：



A1



A2



或 A3

R^1 係 CO_2H 或 H ；

R^2 、 R^3 及 R^4 彼此獨立地為 H 、 OH 、 CO_2H 、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 或 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ；

Ak 係分支鏈 C_6 - C_{30} 伸烷基；

n 、 m 及 p 彼此獨立地為 6 與 30 間之整數；或其鹼胺、酯或醫藥上可接受的鹽。

已發現，在經由連接子共軛至所欲生物分子時，式 A1、A2 及 A3 之脂肪酸提高該生物分子之半衰期，其提高程度遠大於較常用的脂肪

酸殘基。

在另一實施例中，本發明係關於包含生物分子鍵聯至式A1脂肪酸之共軛物，其中 R^2 及 R^3 中之至少一者為 CO_2H 。

在本發明之另一實施例中，該所欲生物分子係治療肽、治療蛋白質或RNA。在此實施例之另一態樣中，該所欲生物分子係肽或多肽。在此實施例之另一態樣中，該肽或多肽係APJ促效劑肽、催產素受體促效劑肽、舒張素(serelaxin)、NPFF、PIP肽、FGF23肽、AgRP肽或生長分化因子15 (GDF15)蛋白質、其同系物、變體、片段及其他修飾形式。

在另一實施例中，本發明係關於含本發明共軛物及一或多種醫藥上可接受的載劑之醫藥組合物。

在另一實施例中，本發明係關於含本發明共軛物及一或多種治療活性劑之醫藥組合之組合。

在另一實施例中，本發明係關於式A1、A2或A3之脂肪酸。

在另一實施例中，本發明預期本文所述共軛物及其組合物治療及/或預防各種疾病、病症及病狀及/或其症狀之用途。

例如，本發明係關於一種活化有此需求之個體中之APJ受體之方法，其包括：向該個體投與治療有效量之本發明共軛物，其中該生物分子係APJ促效劑。經由活化該APJ受體，本發明共軛物在治療以下疾病中具有效用：急性失償型心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺性高血壓、心房纖維性顫動、布魯格達氏(Brugada)症候群、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄症、缺血性心血管疾病、心肌病、心肌纖維化、心律失常、水腫、糖尿病(包括妊娠糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、暫時性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化症、燒傷(包括曬傷)及初期子癇。在本發明之一較佳態樣中，本發明共軛物可用於治療急性失償型心臟衰竭

(ADHF)或慢性心臟衰竭。

在另一實施例中，本發明係關於一種活化有此需求之個體中之催產素受體之方法，其包括：向該個體投與治療有效量之本發明共軛物，其中該生物分子係催產素受體促效劑肽。經由活化該催產素受體，本發明共軛物在治療自閉症(治療性或預防性)、偏頭痛、注意力不足過動症(ADHD)、對立違抗性障礙(ODD)、壓力(包括創傷後壓力症)、焦慮(包括焦慮症及抑鬱)、精神分裂症、精神病症及失憶症、酒精戒斷、藥物成癮、普威(Prader-Willi)二氏症候群、代謝病症或疾病、第2型糖尿病、肥胖症、異常血脂症、葡萄糖濃度升高、胰島素濃度升高及糖尿病性腎病、纖維肌痛、睡眠障礙、睡眠呼吸暫停、舒張性心臟衰竭、尿失禁、動脈粥樣硬化、高血壓、勃起功能障礙、前列腺肥大症候群、非酒精性脂肪肝病、泌乳功能受損(compromised lactation condition)、引產障礙、子宮乏力病、失血過多、炎症、疼痛、腹部疼痛、背痛、男性及女性性功能障礙、大腸激燥症候群(IRS)、便秘、胃腸道梗阻、術中出血、產後出血、傷口愈合、感染、乳腺炎、胎盤娩出障礙、骨質疏鬆症；及診斷癌症及胎盤功能不全方面具有效用。在此實施例之一較佳態樣中，本發明共軛物可用於治療自閉症、焦慮(包括焦慮症及抑鬱)、偏頭痛、ADHD、對立違抗性障礙、精神分裂症、精神病症、肥胖症、泌乳功能受損、引產障礙、子宮乏力病、失血過多、產後出血。在一更佳實施例中，本發明共軛物可用於治療普威二氏(Prader-Willi)症候群。

在另一實施例中，本發明係關於一種治療以下疾病之方法：庫欣氏(Cushing's)症候群、高皮質醇症、異位性ACTH症候群、腎上腺皮質質量變化、原發性色素性結節狀腎上腺皮質病(PPNAD)、卡奈綜合症(Carney complex) (CNC)、皮質醇誘導之礦物皮質激素過量、與創傷後壓力症有關之病狀、多毛症、皮膚薄、肌病、骨質疏鬆症、組

纖維性增加、傷口愈合不良、高血壓、糖尿病、低血清鉀、低嗜酸性細胞及淋巴球減少症，其包括向個體投與治療有效量之本發明共軛物，其中該生物分子係AgRP肽。在本發明之一較佳態樣中，本發明共軛物可用於治療庫欣氏症候群、高皮質醇症、異位性ACTH症候群、骨質疏鬆症。

在另一實施例中，本發明係關於一種治療或預防以下疾病之方法：FGF23-相關疾病，諸如年齡相關病狀(選自由下列組成之群：肌少症、皮膚萎縮、肌肉消瘦、腦萎縮、動脈粥樣硬化、動脈硬化、肺氣腫、骨質疏鬆症、骨關節炎、免疫不全、高血壓、癡呆症、亨廷頓氏(Huntington's)症、阿茲海默氏(Alzheimer's)症、白內障、年齡相關之黃斑變性、前列腺癌、中風、減壽、失憶症、起皺、腎功能受損及年齡相關性聽力喪失)、代謝病症(選自由下列組成之群：第II型糖尿病、代謝症候群、高血糖症及肥胖症)、高磷酸鹽血症(腫瘤樣鈣質沉著症、高磷酸鹽骨肥大症候群)、慢性腎病、慢性腎衰竭、癌症、乳癌及/或肌肉萎縮；其包括：向該個體投與治療有效量之本發明共軛物，其中該生物分子係FGF23肽。

在另一實施例中，本發明係關於一種治療以下疾病之方法：急性心臟衰竭、搏出分率減少的慢性心臟衰竭(HFrEF)、搏出分率正常的慢性心臟衰竭(HFpEF)、舒張性功能障礙、心肌梗死後重構、心絞痛、高血壓、肺性高血壓、肺動脈高壓、纖維化(瀰漫性纖維化、心臟纖維化、腎臟纖維化、肺纖維化、肝臟纖維化)、硬皮病、傷口愈合、嚴重肢體缺血、周邊血管疾病、間歇性不走症、腎功能障礙及慢性腎病；其包括：向該個體投與治療有效量之本發明共軛物，其中該生物分子係舒張素(serelaxin)肽。在此實施例之一較佳態樣中，本發明之舒張素共軛物可用於治療急性心臟衰竭、搏出分率減少的慢性心臟衰竭(HFrEF)、搏出分率正常的慢性心臟衰竭(HFpEF)、舒張性功能

障礙、心肌梗死後重構、心絞痛、高血壓、肺性高血壓或肺動脈高壓。

在另一實施例中，本發明係關於一種治療或預防以下疾病之方法：代謝病症，諸如第2型糖尿病(T2DM)、胰腺 β 細胞損傷、葡萄糖不耐症、高血糖症、胰島素抗性、肥胖症、異常血脂症、非酒精性脂肪肝炎(NASH)、代謝症候群及其他代謝病症；其包括：向該個體投與治療有效量之本發明共軛物，其中該生物分子係PIP肽。

在另一實施例中，本發明係關於一種治療或預防以下疾病之方法：代謝病症或疾病、第2型糖尿病、肥胖症、胰臟炎、異常血脂症、非酒精性脂肪肝炎、胰島素抗性、高胰島素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、動脈粥樣硬化、周邊動脈疾病、中風、心臟衰竭、冠心病、糖尿病併發症(包括(但不限於)慢性腎病)、神經病、胃輕癱、急迫性尿失禁、鎮靜狀態、神經性及炎症性疼痛、失憶症及其他代謝病症；其包括：向該個體投與治療有效量之本發明共軛物，其中該生物分子係NPFF肽。

在本發明之另一態樣中，本發明係關於一種治療有此需求之個體中之以下疾病之方法：代謝病症或疾病、糖尿病、第2型糖尿病、肥胖症、酒精性及非酒精性脂肪肝病/脂肪肝炎及其他進行性肝病、胰臟炎、異常血脂症、胰島素抗性、高胰島素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、動脈粥樣硬化、周邊動脈疾病、中風、心臟衰竭、冠心病、糖尿病併發症(包括(但不限於)慢性腎病)、神經病、胃輕癱及其他代謝病症；其包括：向該個體投與治療有效量之本發明共軛物，其中該生物分子係人類生長分化因子15 (GDF15)、其同系物、變體、突變體、片段及其他修飾形式。

本發明之以下詳細說明將闡述本發明之此等及其他態樣。

【圖式簡單說明】

圖1顯示實例24比參考實例3更有效降低血漿APOC3濃度。

【實施方式】

定義：

出於說明本說明書之目的，將適用下列定義，除非另外指出且只要合適，以單數形式使用之術語亦將包括複數形式，且反之亦然。

必須注意，除非上下文另有明確規定，否則如本文及隨附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a)」、「一(an)」及「該」包括複數形式。因此，例如，提及「共軛物」包括提及一或多個共軛物；提及「多肽」包括提及一或多個多肽；以此類推。

術語烷基係指含1至30個碳原子之完全飽和分支鏈或無分支鏈(或者直鏈或線性)烴基。較佳地，該烷基包含5至20個碳原子，及更佳10至15個碳原子。C₁₀₋₁₅烷基係指含10至15個碳之烷基鏈。術語「伸烷基」係指如上所定義之二價烷基。

術語「烯基」係指具有至少一個碳-碳雙鍵之分支鏈或無分支鏈烴。術語「C₂₋₃₀-炔基」係指具有兩個至七個碳原子且包含至少一個碳-碳三鍵之烴。

術語「炔基」係指具有至少一個碳-碳三鍵之分支鏈或無分支鏈烴。術語「C₂₋₃₀-炔基」係指具有兩個至七個碳原子且包含至少一個碳-碳三鍵之烴。

術語芳基係指環部分中具有6至10個碳原子之單環或雙環芳族烴基。芳基之代表性實例係苯基或萘基。

術語雜芳基包括含5至10個選自碳原子及1至5個雜原子之環成員之單環或雙環雜芳基，且各雜原子係獨立地選自O、N或S，其中S及N可氧化成各種氧化態。就雙環雜芳基系統而言，該系統係完全芳族(亦即，所有環均係芳族)。

術語環烷基係指具有3至12個碳原子，較佳3至8或3至7個碳原子

之飽和或不飽和但非芳族單環、雙環或三環烴基。就雙環及三環環烷基系統而言，所有環均係非芳族。例如，環烷基包括環烯基及環炔基。術語「環烯基」係指具有3至12個碳原子及至少一個碳-碳雙鍵之雙環或三環烴基。術語「環炔基」係指具有3至12個碳原子及至少一個碳-碳三鍵之雙環或三環烴基。

術語雜環基係指含至少一個選自O、S及N之雜原子之飽和或不飽和非芳族(部分不飽和但非芳族)單環、雙環或三環環系統，其中N及S亦可視情況氧化成各種氧化態。在一實施例中，雜環基部分代表含5至7個環原子及視情況包含另一選自O、S或N之雜原子之飽和單環環。該雜環環可經烷基、鹵基、側氧基、烷氧基、鹵代烷基、鹵代烷氧基取代。在其他實施例中，雜環基係二環或三環。就多環系統而言，一些環可係芳族環且稠合至飽和或部分飽和環。總體稠合系統係不完全芳族。例如，雜環環系統可係與飽和或部分飽和環烷基環系統稠合之芳族雜芳基環。

術語「共軛物」意指由於生物分子與脂肪酸部分經由連接子共價結合所形成之實體。術語「共軛作用」係指致使該生物分子與該脂肪酸部分共價結合之化學反應。

生物分子：

如本文所使用，術語生物分子包括(但不限於)抗體(例如，單株抗體、嵌合抗體、人源化抗體、奈米抗體及其片段等)、膽固醇、激素、肽、蛋白質、化療藥物及其他類型之抗腫瘤劑、低分子量藥物、維生素、輔因子、核苷、核苷酸、寡核苷酸、酶促核酸、反義核酸、三鏈體形成寡核苷酸、反義DNA或RNA組合物、嵌合DNA:RNA組合物、同功異構酶、核適體、核酶、引誘物及其類似物、質體及其他類型之表現載體、及小型核酸分子、RNAi劑、短干擾核酸(siNA)、信使核糖核酸(信使RNA，mRNA)、短干擾RNA (siRNA)、雙鏈RNA

(dsRNA)、微RNA (miRNA)、及短髮夾RNA (shRNA)分子、肽核酸(PNA)、鎖核酸核糖核苷酸(LNA)、嗎啉基核苷酸、蘇糖核酸(TNA)、二醇核酸(GNA)、sisiRNA (小型內部分段干擾RNA)、aiRNA (不對稱干擾RNA)及(諸如細胞培養物、個體或生物中)相關細胞及/或組織之正義與反義鏈間具有1、2或更多個失配之siRNA。此等化合物可經純化或部分純化，且可係天然或合成，且可經化學修飾。

在一實施例中，該生物分子係多肽、肽、蛋白質或RNAi劑、短干擾核酸(siNA)、短干擾RNA (siRNA)、雙鏈RNA (dsRNA)、微RNA (miRNA)或短髮夾RNA (shRNA)分子。

在其他實施例中，該生物分子係多肽(或蛋白質)或肽。多肽或肽之實例係APJ促效劑肽、催產素肽、舒張素、NPFF、PIP肽、FGF23肽、AgRP肽及GDF15肽。在一較佳實施例中，該生物分子係GDF15多肽、其同系物、變體、突變體、片段及其他修飾形式。

「核糖核酸」(RNA)係藉由磷酸二酯鍵鍵聯之核苷酸之聚合物，其中各核苷酸包含核糖或其修飾物(modification)作為糖組分。各核苷酸包含腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、尿嘧啶(U)或其修飾物作為鹼基。mRNA分子中之遺傳資訊係編碼在mRNA分子之核苷酸鹼基之序列中，該等鹼基係配置成各由三個核苷酸鹼基組成之密碼子。各密碼子編碼多肽之一特定胺基酸，終止密碼子除外，其使轉譯(蛋白質合成)終止。在活細胞中，mRNA被轉運至核糖體，蛋白質合成場所，在核糖體中，其為蛋白質合成(轉譯)提供遺傳資訊。就較全面描述而言，參見Alberts B等人(2007) *Molecular Biology of the Cell*，第五版，Garland Science。

如本文所使用之術語「RNAi劑」、「短干擾RNA」、「siRNA」、「短干擾核酸」、「siNA」等係指任何可藉由介導RNA干擾(RNAi)抑制或向下調節基因表現或病毒複製，或以序列特異性方式使基因沉默

之核酸分子。該等術語包括短干擾RNA (siRNA)、短髮夾RNA (shRNA)、微RNA (miRNA)、短干擾寡核苷酸、經化學修飾之短干擾核酸分子、sisiRNA (小型內部分段干擾RNA)、aiRNA (不對稱干擾RNA)、相關細胞及/或組織之正義與反義鏈間具有1、2或更多個失配之siRNA、其中正義與反義鏈間存在一或多個失配之RNAi劑、其中正義鏈相對於反義鏈極短及/或具有一或多個單鏈缺口(nick)之RNAi劑、或任何其他可介導RNA干擾之分子。RNAi劑可包含核糖核苷酸，或其一或多個糖、鹼基及/或磷酸酯經修飾或取代。作為非限制性實例，RNAi劑之2'位置可經選自由下列組成之群之2'-修飾物修飾：2'-脫氧、2'-脫氧-2'-氟、2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-胺基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基胺基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基胺基丙基(2'-O-DMAP)、2'-O-二甲基胺基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)及2'-O-N-甲基乙醯胺基(2'-O-NMA)。在一實施例中，所有嘧啶(尿嘧啶核苷及胞嘧啶核苷)均為經2'-O-甲基-修飾之核苷。在各種實施例中，一或多個磷酸酯可經選自硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、硼烷磷酸酯(boranophosphonate)之經修飾核苷間連接子及醯胺連接子取代。在各種實施例中，一或多個核苷可經DNA、肽核酸(PNA)、鎖核酸(LNA)、嗎啉基核苷酸、蘇糖核酸(TNA)、二醇核酸(GNA)、阿拉伯糖核酸(ANA)、2'-氟阿拉伯糖核酸(FANA)、環己烯核酸(CeNA)、失水己糖醇核酸(HNA)、未鎖核酸(UNA)修飾或取代。此項技術中已知RNAi劑之各種修飾及取代，且可在發明範圍內使用。siRNA負責動物或植物中之RNA干擾，序列特異性轉錄後基因沉默過程。siRNA係藉由核糖核酸酶III裂解自與沉默基因標靶同源或對其具有特異性之較長雙鏈RNA (dsRNA)自然產生；人造RNAi劑可藉由此項技術中已知之任何方法產生。

如本文所使用，術語「多肽」係指藉由肽鍵鍵聯之胺基酸殘基

之聚合物，不論係天然或合成產生。少於約10個胺基酸殘基之多肽常稱為「肽」。術語「肽」意指兩個或更多個藉由肽鍵鍵聯之胺基酸之序列，其中該等胺基酸可係天然或非天然。該術語涵蓋術語多肽及蛋白質，其可由兩個或更多個藉由共價相互作用(諸如例如半胱胺酸橋)或非共價相互作用結合在一起之肽組成。使用此項技術公認之三字母或單字母縮寫來代表構成本發明肽及多肽之胺基酸殘基。除非前面帶有「D」，否則胺基酸係L-胺基酸。當單字母縮寫係大寫字母時，其係指D-胺基酸。當單字母縮寫係小寫字母時，其係指L-胺基酸。胺基酸縮寫之群或串係用於表示肽。肽之左側表示N端，且該序列係自N端書寫至C端。

本發明肽包含非天然胺基酸(亦即不會出現在自然界之化合物)，且亦可使用此項技術中已知之其他胺基酸類似物。

某些非天然胺基酸可藉由以下文獻中所述技術引入：Deiters等人，J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003；Wang and Schultz, Science 301:964-967, 2003；Wang等人，Science 292:498-500, 2001；Zhang等人，Science 303:371-373, 2004或美國專利案第7,083,970號。簡而言之，此等表現系統中有一些涉及到以定點突變將無意義密碼子(諸如琥珀TAG)引入至編碼本發明多肽之開放閱讀框架中。然後將此等表現載體引入至可使用對所引入無意義密碼子具有特異性並負責選擇該非天然胺基酸之tRNA之宿主中。對於將部分(moieties)共軛至本發明多肽有益之特定非天然胺基酸包括彼等具有乙炔及疊氮基側鏈者。

「蛋白質」係包含一或多條多肽鏈之大分子。彼等多肽鏈各可與式A1、A2或A3之脂肪酸分子共軛。蛋白質亦可包含非肽組分，諸如碳水化合物基團。碳水化合物及其他非肽取代基可藉由產生蛋白質之細胞添加至該蛋白質，且其將隨著細胞類型而變化。本文依據其胺

基酸主鏈結構定義蛋白質；諸如碳水化合物基團之取代基通常不會指出，但可能存在。非宿主DNA分子編碼之蛋白質或多肽係「異種」蛋白質或多肽。

「單離多肽或單離蛋白質」係基本上不含細胞組分(諸如在自然界中與多肽相連之碳水化合物、脂質或其他蛋白雜質)的多肽或蛋白質(例如GDF15)。通常，單離多肽或蛋白質之製劑包含該多肽或蛋白質之高度純化形式，亦即純度至少約80%，純度至少約90%，純度至少約95%，純度高於95%，諸如96%、97%或98%或更高純度，或純度高於99%。一種顯示特定蛋白質製劑包含單離多肽或蛋白質之方法係藉由對該蛋白質製劑進行十二烷基硫酸鈉(SDS)-聚丙烯醯胺凝膠電泳及對該凝膠進行考馬斯亮藍(Coomassie Brilliant Blue)染色後之單頻帶外觀。然而，術語「單離」並不排除存在呈替代性物理形式(諸如二聚體)或糖基化或衍生化形式之相同多肽或蛋白質。較佳地，單離多肽實質上不含將干擾其治療、診斷、預防或研究用途之任何其他污染性多肽或見於其自然環境之其他污染物。

一般技術者將瞭解，可對本文所述任何多肽或蛋白質之序列進行各種胺基酸取代，例如保守胺基酸取代，但不一定降低其活性。如本文所使用，「常用作其取代物之胺基酸」包括保守取代(亦即經具有相當化學特性之胺基酸取代)。出於保守取代之目的，非極性(疏水性)胺基酸包括丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、纈胺酸、甘胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、色胺酸及甲硫胺酸。極性(親水性)、中性胺基酸包括絲胺酸、蘇胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、天冬醯胺及麩醯胺酸。帶正電(鹼性)胺基酸包括精胺酸、離胺酸及組胺酸。帶負電(酸性)胺基酸包括天冬胺酸及麩胺酸。胺基酸取代之實例包括用L-胺基酸取代其相應D-胺基酸，用半胱胺酸取代高半胱胺酸或其他具有含硫醇側鏈之非天然胺基酸，用離胺酸取代高離胺酸、二胺基丁酸、二胺基丙酸、鳥胺酸或

其他具有含胺基側鏈之非天然胺基酸，或用丙胺酸取代正纈胺酸或類似物。

如本文所使用，術語「胺基酸」係指天然胺基酸、非天然胺基酸、胺基酸類似物及以類似於天然胺基酸之方式起作用之胺基酸擬似物，所有胺基酸均呈其D及L立體異構體，只要其結構容許存在此等立體異構形式。胺基酸在本文中係以其名稱、其通常為人所知之三字母符號或IUPAC-IUB生化命名委員會推薦之單字母符號指代。

術語「天然(naturally occurring)」係指見於自然界且未經人類處理之材料。類似地，如本文所使用之「非天然(non-naturally occurring)」、「非天然(un-natural)」及類似用詞係指未見於自然界或者結構經修飾或由人類合成之材料。當與胺基酸連用時，術語「天然」係指20種習知胺基酸(亦即，丙胺酸(A或Ala)、半胱胺酸(C或Cys)、天冬胺酸(D或Asp)、麩胺酸(E或Glu)、苯丙胺酸(F或Phe)、甘胺酸(G或Gly)、組胺酸(H或His)、異白胺酸(I或Ile)、離胺酸(K或Lys)、白胺酸(L或Leu)、甲硫胺酸(M或Met)、天冬醯胺(N或Asn)、脯胺酸(P或Pro)、麩醯胺酸(Q或Gln)、精胺酸(R或Arg)、絲胺酸(S或Ser)、蘇胺酸(T或Thr)、纈胺酸(V或Val)、色胺酸(W或Trp)及酪胺酸(Y或Tyr))。

如本文所使用之術語「非天然胺基酸(non-natural amino acid)」及「非天然胺基酸(unnatural amino acid)」可互換地用於表示無法在任何生物中用來自任何生物(無論相同或不同)之未經修飾或經修飾基因以生物合成方式產生之胺基酸結構。該等術語係指不存在天然(野生型)蛋白質序列或本發明序列中之胺基酸殘基。此等包括(但不限於)並非20種天然胺基酸中之一者之經修飾胺基酸及/或胺基酸類似物，硒半胱胺酸、吡咯離胺酸(Pyl)或吡咯啉-羧基-離胺酸(Pcl，例如如PCT專利公開案WO2010/48582中所述)。此等非天然胺基酸殘基可藉

由取代天然胺基酸及/或藉由將非天然胺基酸插入天然(野生型)蛋白質序列或本發明序列中引入。亦可併入非天然胺基酸殘基，以賦予分子期望之功能，例如鍵聯功能部分(例如，PEG)之能力。如本文所使用，當與胺基酸連用時，符號「U」當意指「非天然胺基酸(non-natural amino acid)」及「非天然胺基酸(unnatural amino acid)」。

如本文所使用，提及多肽或蛋白質之術語「類似物」意指經修飾之肽或蛋白質，其中該肽/蛋白質之一或多個胺基酸殘基已經其他胺基酸殘基取代及/或其中該肽/蛋白質已刪除一或多個胺基酸殘基及/或其中該肽/蛋白質已添加一或多個胺基酸殘基。此等胺基酸殘基添加或缺失可出現在肽之N端及/或肽之C端。

如本文所使用，術語「共軛物之酯」係指包含其中存在羧酸基團之酯衍生物(例如，C端之 $\text{-CO}_2\text{H}$ 被轉化為 -COOR)之肽或多肽之共軛物形式，其中該酯之R係指 C_{1-6} 烷基(諸如甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基等)、 C_{3-8} 環烷基(諸如環戊基、環己基等)、 C_{6-10} 芳基(諸如苯基、 α -萘基等)、 C_{6-10} 芳基- C_{1-6} 烷基(例如苯基- C_{1-2} 烷基，諸如苄基、苯乙基、二苯甲基等)及 α -萘基- C_{1-2} 烷基(諸如 α -萘基甲基與類似物)。當該共軛物之肽或多肽部分在不同於C端之位置具有其他羧基或羧酸酯基時，彼等其中此等基團被醯胺化或酯化之多肽亦落於本發明多肽之範疇下。在此等情形下，該等酯可為(例如)與上述C端酯相同類別之酯。

如本文所使用，術語「共軛物之醯胺」係指包含其中存在羧酸基團之醯胺衍生物(例如， $\text{-CO}_2\text{H}$ 已轉化為 -CO(NR'R'))之肽或多肽之共軛物，其中R'係H或R，且R係上文所定義。術語「共軛物之醯胺」亦係指包含其中存在胺基團之醯胺衍生物(亦即不同於共軛至脂肪酸之胺基)(例如， -NH_2 已轉化為 -NH-C(O)R)之肽或多肽之共軛物，其中R係上文所定義。在一較佳實施例中，「共軛物之醯胺」係包含其

中C端之羧酸基已經醯胺化(例如 $-\text{CO}_2\text{H}$ 已轉化為 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{C}_{1-6}$ 烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{C}_{1-2}$ 烷基苯基或 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{烷基})_2$)之肽或多肽之共軛物。

術語「APJ」(亦稱為「愛帕琳(apelin)受體」、「血管收縮素樣1型受體」、「第II型血管收縮素樣1型受體」與類似物)指具有380個殘基、7個跨膜結構域之 G_i 偶合受體，其基因位在人類11號染色體之長臂上(NCBI參考序列：NP_005152.1，且係由NCBI參考序列：NM_005161編碼)。APJ首次在1993年使用簡併(degenerate)寡核苷酸引子自人類基因組DNA選殖(O'Dowd等人 Gene, 136:355-60, 1993)且與第II型血管收縮素受體1型共享明顯同源性。然而，儘管存在此同源性，但第II型血管收縮素不結合APJ。雖然多年來孤立存在(orphan)，但已單離出內源性配體，並命名為愛帕琳(Tatemoto等人，Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998))。

術語「APJ促效劑」包括愛帕琳多肽：愛帕琳指具有77個殘基之前蛋白質(NCBI參考序列：NP_0059109.3，且係由NCBI參考序列：NM_017413.3編碼)，其加工成愛帕琳肽之生物活性形式，諸如愛帕琳-36、愛帕琳-17、愛帕琳-16、愛帕琳-13、愛帕琳-12。全長成熟肽(稱為「愛帕琳-36」)包含36個胺基酸，但最強效同功異型物係愛帕琳之13員(愛帕琳-13)之焦麩胺酸酯形式，稱為「Pyr-1-愛帕琳-13或Pyr¹-愛帕琳-13」，不同愛帕琳形式描述在(例如)美國專利案6,492,324B1中。愛帕琳肽促效劑亦描述在專利申請案第WO 2013/111110號、美國申請案第14/082771號及美國臨時申請案第61/858263號、第61/858280號及第61/858290號中，其以引用的方式併入本文中。

術語「催產素受體促效劑肽」或「催產素肽」可互換使用，且包括催產素及其類似物。催產素為具有在位置1與6之間形成雙硫橋之兩個半胱胺酸殘基之九個胺基酸的環肽激素。人類催產素包含序列

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly。術語「催產素受體促效劑肽」亦包括保留生物活性之催產素類似物。該等類似物分子能夠以類似於內源性催產素之方式作用，包括結合催產素受體。特別受到關注之催產素類似物係彼等揭示於PCT專利案第WO 2014/095773號(特定言之實例13)中者；彼等揭示於美國專利申請案第US2011/044905號(特定言之實例49)中者；及彼等揭示於Kazimierz Wisniewski等人，*Journal of Medicinal Chemistry* 2014, 57, 5306-5317及Zbigniew Grzonka等人，*Journal of Medicinal Chemistry* 1983, 26, 1786-1787中者；上述所有文獻以引用的方式併入本文中。

所謂「PIP」或「催乳素誘導肽」意指 GenBank 寄存編號 NP_002643 之蛋白質，其在各種生物過程中發揮作用。此項技術中亦將 PIP 稱為巨囊性病液體蛋白-15 (GCDFP-15)；分泌肌動蛋白結合蛋白(SABP)；腮腺外糖蛋白(EP-GP)；及 17-kDa CD4-結合蛋白(GP17)。PIP 表現在外分泌器官以及良性及惡性人類乳腺腫瘤中。成熟的 PIP 分泌蛋白之分子質量為 13 kDa，且在 SDS-PAGE 中為 17-20 kDa 多肽，表明存在糖基化事件。PIP 表現在促進人類體液之大多數器官中；PIP 之表現在唾液腺中最高，隨後為淚腺、前列腺、肌肉、氣管及乳腺。PIP 基因編碼 PIP 多肽。

如本文所使用，所謂「PIP 肽」意指人類 PIP 或其保留人類 PIP 之至少一種活性之同系物、變體、片段或修飾形式。

人類 PIP 之非限制性實例之序列呈現在 SEQ ID NO:11 中：

```
1 MRLLQLLFRA SPATLLLVLG LQLGANKAQD NTRKIIKNF DIPKSVRPND EVTAVLAVQT
61 ELKECMVVKY YLISSIPLQG AFNYKYTACL CDDNPKTFYW DFYTNRTVQI AAVVDVIREL
121 GICPDAAVI PIKNNRFYTI EILKVE (SEQ ID NO: 11)
```

SEQ ID NO:11 代表人類野生型全長 PIP，包括信號肽(胺基酸 1-28)，其係並非發揮作用所需。

如本文所使用之術語「PIP」之另一非限制性實例係 SEQ ID

NO:11之胺基酸(aa) 29-146，因此，其缺乏信號肽(胺基酸1-28)，且在下文中以SEQ ID NO:12表示。

```
1 QDNTRKIIK NFDIPKSVRP NDEVTAVLAV QTELKECMVW KTYLISSIPL QGAFNYKYTA
61 CLCDDNPKTF YWDFYTNRTV QIAAVVDVIR ELGICPDDAA VIPIKNNRFY TIEILKVE
(SEQ ID NO: 12)
```

所謂PIP之「同系物」、「變體」、「片段」或「修飾形式」或類似用語意指與人類PIP類似但不相同，但是保留人類PIP之至少一種活性之多肽。此多肽可具有不與人類PIP(例如，SEQ ID NO:12)相同之序列，或具有與人類PIP(例如，SEQ ID NO:12)相同，但以某種其他方式發生變化(例如，轉譯後修飾)之序列。此多肽可包括(例如)與SEQ ID NO:12至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列一致性，或與SEQ ID NO:12之胺基酸序列具有(例如)最多5、10、15、20、25、30、35、40、45或50個胺基酸差異(例如，取代、缺失及/或添加)。在一些實施例中，PIP同系物、變體、片段或其修飾形式保留至少90%序列一致性或者與SEQ ID NO:12具有最多25個胺基酸差異。PIP同系物、變體、片段或修飾形式保留人類PIP之至少一種活性。

所謂「FGF23」或「纖維母細胞生長因子23」意指多肽，亦稱為FGF-23、ADHR；FGFN；HPDR2；HYPF；PHPTC；外部ID：OMIM：605380 MGI：1891427同源基因：10771 GeneCards：FGF23基因；物種：人類；Entrez 8074；Ensembl ENSG00000118972；UniProt：Q9GZV9；RefSeq (mRNA)：NM_020638；RefSeq (蛋白質)：NP_065689；位置(UCSC)：Chr 12:4.48-4.49 Mb；物種：小鼠；Entrez：64654；Ensembl：ENSMUSG00000000182；UniProt：Q9EPC2；RefSeq (mRNA)：NM_022657；RefSeq (蛋白質)：NP_073148；位置(UCSC)：Chr 6:127.07-127.08 Mb。FGF23基因編碼FGF23多肽。

如本文所使用，所謂「FGF23肽」意指人類FGF23或其保留人類

FGF23之至少一種活性之同系物、變體、片段或修飾形式。

人類FGF23之非限制性實例之序列(包括信號肽)呈現在SEQ ID NO:9中：

10	20	30	40	50
MLGARLRLWV	CALCSVCSMS	VLRAYPNASP	LLGSSWGGLI	HLYTATARNs
60	70	80	90	100
YHLQIHKNGH	VDGAPHQTIY	SALMIRSEDA	GFVVITGVMS	RRYLCMDFRG
110	120	130	140	150
NIFGSHYFDP	ENCRFQHQTL	ENGYDVYHSP	QYHFLVSLGR	AKRAFLPGMN
160	170	180	190	200
PPPYSQFLSR	RNEIPLIHFN	TPIPRRHTRS	AEDDSERDPL	NVLKPRARMT
210	220	230	240	250
PAPASCSQEL	PSAEDNSEMA	SDPLGVVRGG	RVNTHAGGTG	PEGCRPFAKF
260				

I (SEQ ID NO: 9)

SEQ ID NO:9代表人類野生型全長FGF23，包括信號肽(胺基酸1-24)，其係並非發揮作用所需。Yamashita等人2000 Biochem. Biophys. Res. Comm.277:494-498；Shimada等人2001 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:6500-6505；及Zhang等人2004 Protein Sci.13:2819-2824。

如本文所使用之術語「FGF23」之一非限制性實例係SEQ ID NO:9之胺基酸(aa) 25-251，因此，其缺乏信號肽(胺基酸1-24)，且在下文中以SEQ ID NO:8表示。

10	20	30	40	50
		YPNASP	LLGSSWGGLI	HLYTATARNs
60	70	80	90	100
YHLQIHKNGH	VDGAPHQTIY	SALMIRSEDA	GFVVITGVMS	RRYLCMDFRG
110	120	130	140	150
NIFGSHYFDP	ENCRFQHQTL	ENGYDVYHSP	QYHFLVSLGR	AKRAFLPGMN
160	170	180	190	200
PPPYSQFLSR	RNEIPLIHFN	TPIPRRHTRS	AEDDSERDPL	NVLKPRARMT
210	220	230	240	250
PAPASCSQEL	PSAEDNSEMA	SDPLGVVRGG	RVNTHAGGTG	PEGCRPFAKF
260				

I (SEQ ID NO: 8)

所謂FGF23之「同系物」、「變體」、「片段」或「修飾形式」或類

似用語意指與人類FGF23 (例如, SEQ ID NO:8)類似但不相同, 但是保留人類FGF23之至少一種活性之多肽。此多肽可包括(例如)與SEQ ID NO:8至少70%、至少80%、至少90%或至少95%序列一致性, 或與SEQ ID NO:8之胺基酸序列具有(例如)最多5、10、15、20、25、30、35、40、45或50個胺基酸差異(例如, 取代、缺失及/或添加)。在一些實施例中, FGF23同系物、變體、片段或其修飾形式保留至少90%序列一致性或者與SEQ ID NO:8具有最多25個胺基酸差異。FGF23同系物、變體、片段或修飾形式保留人類FGF23之至少一種活性。作為非限制性實例, 此等活性(或功能)包括就人類FGF23而言已知者, 包括在結合至FGF23受體、與克羅索(Klotho)蛋白質相互作用、細胞增殖及細胞信號傳遞方面所起作用; 及在各種FGF23活性之活體外分析中之活性, 包括Egr-1-螢光素酶分析; 及與FGF23-相關疾病有關之活性, 諸如年齡相關病狀(選自由下列組成之群: 肌少症、皮膚萎縮、肌肉消瘦、腦萎縮、動脈粥樣硬化、動脈硬化、肺氣腫、骨質疏鬆症、骨關節炎、免疫不全、高血壓、癡呆症、亨廷頓氏症、阿茲海默氏症、白內障、年齡相關之黃斑變性、前列腺癌、中風、減壽、失憶症、起皺、腎功能受損及年齡相關性聽力喪失)、代謝病症(選自由下列組成之群: 第II型糖尿病、代謝症候群、高血糖症及肥胖症)、高磷酸鹽血症(腫瘤樣鈣質沉著症、高磷酸鹽骨肥大症候群)、慢性腎病、慢性腎衰竭、癌症、乳癌及/或肌肉萎縮。Yamashita等人2000 Biochem. Biophys. Res. Comm. 277:494-498; Shimada等人2001 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:6500-6505; Urakawa等人2006 Nature 444: 770-774; Zhang等人2004 Protein Sci. 13: 2819-2824; WO 2013/027191、WO 2011/092234及WO 2009/095372。在一些實施例中, 本發明提供一種含本文所述脂肪酸及FGF23肽之共軛物, 其中該FGF23肽保留FGF23之至少一種活性; 且在一些實施例中, 保留之

FGF23活性係在活體外Egr-1-螢光素酶分析中之功能。

所謂FGF23之「同系物」意指對應人類FGF23但來源不同(諸如，哺乳動物，諸如小鼠、大鼠、石蟹獼猴、母牛、豬、綿羊、馬、狗等)，但保留人類FGF23之至少一種功能之多肽。

所謂FGF23之「變體」意指(例如)相對於SEQ ID NO:8包含一或多種突變(例如，缺失、取代或添加)，但保留人類FGF23之至少一種功能之FGF23。FGF23中之突變包括彼等在位置Y154、Q156、R176、R179、C206及C244上者。先前已描述此等突變。R179處之突變賦予FGF23蛋白水解抗性；在ADHR中，176RXXR179位置之突變防止FGF23裂解及不活化。White等人2000 Nat. Genet. 26: 345-348；Liu等人2003 J. Biol. Chem. 278: 37419-37426。Y154處之突變減少降解；Q156處之突變消除裂解位置；且C206及C244處之突變減少二聚化及聚集。WO 2013/027191及WO 2011/092234。FGF23同系物、變體或修飾形式可另外包含一或多個其他胺基酸(不常見於野生型人類FGF23中)。

此處顯示FGF23變體之一非限制性實例：

10	20	30	40	50
		MYPNASP	LLGSSWGGLI	HLYTATARNs
60	70	80	90	100
YHLQIHKNGH	VDGAPHQTIY	SALMIRSEDA	GFVVITGVMS	RRYLCMDFRG
110	120	130	140	150
NIFGSHYFDP	ENCRFQHQTl	ENGYDVYHSP	QYHFLVSLGR	AKRAFLPGMN
160	170	180	190	200
PPPYSQFLSR	RNEIPLIHFN	TPIPRRHTQS	AEDDSERDPL	NVLKPRARMT
110	220	230	240	250
PAPASCSQEL	PSAEDNSPMA	SDPLGVVRGG	RVNTHAGGTG	PEGCRPFAKF
260				
I (SEQ ID NO: 10)				

SEQ ID NO:10顯示FGF23之變體，其中信號肽(aa 1-24)被刪除，但在位置1上重新引入初始M；且對應R179之胺基酸突變為Q。SEQ ID NO:10亦名為「hFGF23 R 179Q」、「FGF23 R179」、「hFGF23(R179Q)」與類似用語，且代表用於實例28C中之FGF23變體。

作為非限制性實例，其他FGF23變體包括彼等具有序列SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10，而且在以下一或多者處具有突變者：Y154、Q156、R176、R179、C206及C244。作為非限制性實例，其他FGF23變體包括彼等具有序列SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:10，而且在以下一或多者處具有突變者：Y154、Q156、R176、R179、C206及C244，且另外包含一或多個其他胺基酸(不常見於野生型人類FGF23中之)。

所謂FGF23之「片段」意指(例如)相對於SEQ ID NO:8包含一或多個缺失胺基酸，但保留人類FGF23之至少一種功能之FGF23。FGF23之功能片段包括SEQ ID NO:8之胺基酸180-251，Goetz等人2010 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 407-412。FGF23片段亦可(例如)在位置Y154、Q156、R176、R179、C206及C244中之任一者或多者處具有一或多個突變，但可保留人類FGF23之至少一種活性。

所謂FGF23之「修飾形式」意指包含與FGF23序列(例如SEQ ID NO:8)類似或相同之序列，但具有一或多種修飾，且保留人類FGF23之至少一種活性之FGF23。作為非限制性實例，此修飾可包括轉譯後修飾(磷酸化、甲基化或添加碳水化合物)或共軛至不為FGF23之第二部分。作為非限制性實例，此第二部分可為信號肽、 α 或 β 克羅索或其片段(例如，可溶性克羅索或s克羅索)、Fc (例如，FcLALA)或其他修飾。WO 2011/092234及WO 2009/095372。

如本文所使用，術語「AgRP肽或多肽」及類似術語係指Agouti相關肽，亦即一種由132個胺基酸組成，且經轉譯後加工成其活性或成熟形式之傳訊分子AgRP (83-132)，其包含10個半胱胺酸殘基，並形成具有五個二硫鍵網絡。AgRP扮演做為黑皮質素受體MC3R及MC4R之反向促效劑之角色。在所有情形下，術語「AgRP肽」均包括其鹽。在一些實施例中，AgRP可呈醯胺形式，例如C端-CO₂H醯胺化形成C(O)-NH₂。在其他實施例中，AgRP可呈酸形式。

術語「AgRP肽」亦包括AgRP之較短生物活性片段。片段係母體序列之一部分，其序列相同但長度短於母體序列，且保留生物活性(亦即反向促效作用)。AgRP多肽之片段及其變體亦描述在Jackson, P. J.等人，*Biochemistry* 41, 7565-7572中，其以引用的方式併入本文中。例如，AgRP (87-120)及AgRP(87-132)具有大約與AgRP(83-132)相同之MC3R及MC4R親和力，且呈現相等反向促效作用。AgRP多肽之其他片段已描述在Christine G. Joseph等人，*Peptides* 24 (2003), 263-270中，其以引用的方式併入本文中。片段實例為AgRP(86-132)及單環AgRP (109-118)及其在N端及/或C端伸長者。

術語「AgRP多肽」亦涵蓋「AgRP突變體多肽」，其係其中天然AgRP多肽序列經修飾之AgRP多肽。此等修飾已描述在PCT專利案第WO2013/006656號中，其以引用的方式併入本文中。

術語「GDF15肽」、「GDF15多肽」及「GDF15蛋白質」可互換使用，且意指哺乳動物如人類或小鼠中表現之天然野生型多肽。出於本發明之目的，術語「GDF15蛋白質」可互換地用於指代由308個胺基酸殘基組成之任何全長GDF15多肽(NCI Ref. Seq. NP_004855.2)，其包含具有29個胺基酸之信號肽(胺基酸1-29)、具有167個胺基酸之前結構域(胺基酸30-196)及具有112個胺基酸之成熟結構域(胺基酸197-308)(其係藉由弗林(furin)樣蛋白酶自該前結構域切除得到)。具有308個胺基酸之GDF15多肽稱為「全長」GDF15多肽；具有112個胺基酸之GDF15多肽(例如，胺基酸197-308)係「成熟」GDF15多肽。成熟GDF15肽包含七個形成半胱胺酸結基序(cysteine knot motif)所需之保守半胱胺酸殘基(具有三個鏈內二硫鍵)及單個TGF β -超家族成員所特有之鏈間二硫鍵。成熟GDF15肽額外包含兩個形成第四個鏈內二硫鍵之半胱胺酸殘基。因此，生物活性GDF15係成熟肽藉由一個鏈間二硫鍵共價鍵聯之同型二聚體。因此，GDF15蛋白質或多肽亦包括該蛋白質

之多聚體，更特定言之二聚體。各構成同型二聚體GDF15之單體單元可鍵聯至式A1、A2或A3之脂肪酸。

如本文所使用，所謂「GDF15」或「GDF15蛋白質」亦意指人類GDF15或其保留人類GDF15之至少一種活性之同系物、變體、突變體、片段或修飾形式。

術語「GDF15突變體多肽」或「GDF15變體多肽」涵蓋其中天然GDF15多肽序列經修飾之GDF15多肽。此等修飾包括(但不限於)一或多個胺基酸取代，包括經非天然胺基酸、非天然胺基酸類似物及胺基酸擬似物取代。

在一態樣中，術語「GDF15突變體蛋白質」或「GDF15變體多肽」係指其中至少一個常見於天然GDF15多肽之給定位置之殘基缺失或經不常見於該天然GDF15序列之該位置之殘基置換之GDF15蛋白質序列。在一些情形下，宜用超過一個不常見於天然GDF15多肽之給定位置之殘基置換常見於該位置之單個殘基；在其他情形下，宜維持天然GDF15多肽序列，並在該蛋白質之給定位置處插入一或多個殘基；在其他情形下，宜完全刪除給定殘基；術語「GDF15突變體蛋白質」或「GDF15變體蛋白質」涵蓋所有此等構築體。在本發明之一態樣中，GDF15突變體蛋白質或「GDF15變體蛋白質」具有選自SEQ ID NO 1至SEQ ID No 7中任一者之序列。本發明亦涵蓋編碼此等GDF15突變體多肽序列或GDF15變體多肽序列之核酸分子。

所謂GDF15之「同系物」、「變體」、「片段」或「修飾形式」或類似用語意指與人類GDF15類似但不相同，但是保留人類GDF15之至少一種活性之多肽。

所謂GDF15之「修飾形式」意指包含與GDF15類似或相同之序列，但具有一或多種修飾，且保留人類GDF15之至少一種活性之GDF15。作為非限制性實例，此修飾可包括轉譯後修飾(磷酸化、甲

基化或添加碳水化合物)。

所謂GDF15之「同系物」意指對應人類GDF15但來源不同(諸如，哺乳動物，諸如石蟹獼猴、小鼠及大鼠等)，但保留人類GDF15之至少一種功能之多肽。在一些情形下，GDF15同系物可以衍生自與該個體相同之物種之成熟GDF15突變體多肽形式用於治療或改善該個體中之代謝病症。

在各種實施例中，GDF15多肽、同系物、變體、突變體、片段或其修飾形式包括與天然GDF15蛋白質至少約85%相同之胺基酸序列。在其他實施例中，GDF15多肽包括與天然GDF15多肽胺基酸序列至少約90%、或約95、96、97、98或99%相同之胺基酸序列。此GDF15多肽、同系物、變體、突變體、片段或其修飾形式具有野生型GDF15突變體多肽之至少一種活性，諸如降低血糖、胰島素、三酸甘油酯或膽固醇濃度之能力；減輕體重之能力；或改良葡萄糖耐受性、能量消耗或胰島素敏感性之能力。

在各種不同實施例，GDF15多肽或其同系物、變體、突變體、片段或修飾形式具有等於、大於或小於天然成熟GDF15蛋白質形式之生物活性。生物活性之實例包括降低血糖、胰島素、三酸甘油酯或膽固醇濃度之能力；減輕體重之能力；或改良葡萄糖耐受性、脂質耐受性或胰島素敏感性之能力；降低尿糖及蛋白質排洩。

如本文所使用，在多肽或蛋白質結構之範疇內，術語「N端」(或「胺基端」)及C端(或「羧基端」)分別係指多肽之胺基及羧基末端。

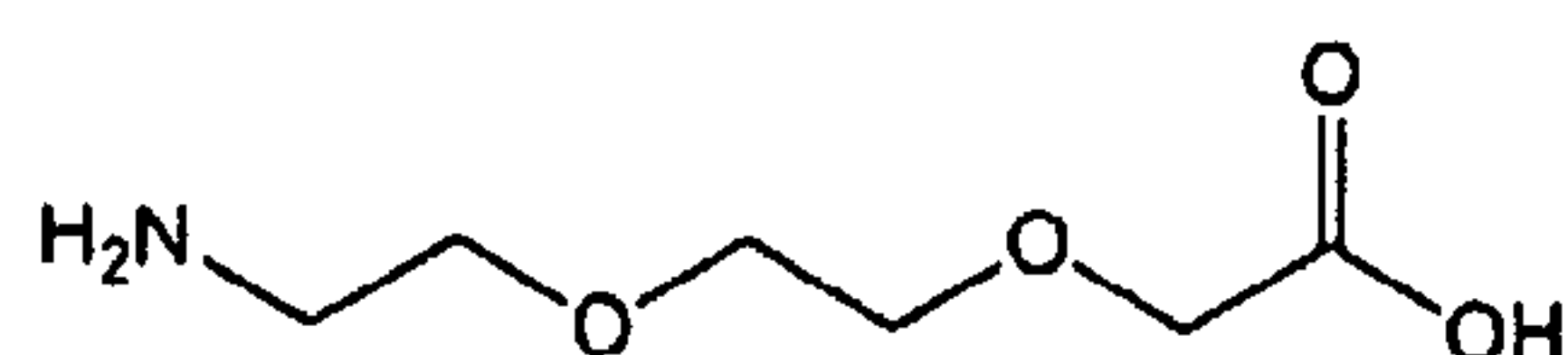
如本文所使用，術語「治療多肽」或「治療蛋白質」意指正開發治療用途或已開發治療用途之多肽或蛋白質。

連接子將生物分子及脂肪酸部分分開。其化學結構並非關鍵，因為其主要充當間隔基。

該連接子係含兩個反應性基團/官能基之化學部分，其中一者可與生物分子反應，且另一者可與脂肪酸部分反應。該連接子之兩個反應性基團/官能基係經由鍵聯部分或間隔基鍵聯，其結構並非關鍵，只要其不干擾該連接子偶合至生物分子及式A1、A2或A3之脂肪酸部分即可。

該連接子可由以肽鍵鍵聯在一起之胺基酸組成。在本發明之一些實施例中，該連接子係由1至20個以肽鍵鍵聯之胺基酸組成，其中該等胺基酸係選自20種天然胺基酸。在各種實施例中，該等1至20個胺基酸係選自胺基酸甘胺酸、絲胺酸、丙胺酸、甲硫胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、半胱胺酸及離胺酸。在一些實施例中，連接子係由大多數無空間位阻之胺基酸(諸如甘胺酸及丙胺酸)組成。在一些實施例中，連接子係聚甘胺酸、聚丙胺酸、甘胺酸與丙胺酸之組合(諸如聚(Gly-Ala))或者甘胺酸與絲胺酸之組合(諸如聚(Gly-Ser))。在一些實施例中，連接子係由大多數選自組胺酸、丙胺酸、甲硫胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺及甘胺酸之胺基酸組成。在一些實施例中，連接子包含聚組胺酸部分。

在一些實施例中，連接子包含1至20個選自非天然胺基酸之胺基酸。雖然就與脂肪酸部分共軛而言以具有1至10個胺基酸殘基之連接子較佳，但本發明涵蓋具有任何長度或組成之連接子。非天然胺基酸連接子之實例係具有下式之8-胺基-3,6-二氧雜辛酸：



或其重複單元。

本文所述連接子係示例性，且本發明涵蓋長度更長且包括其他殘基之連接子。本發明亦涵蓋非肽連接子。

在其他實施例中，該連接子包含一或多個烷基、烯基、環烷

基、芳基、雜芳基、雜環基、聚乙二醇及/或一或多種天然或非天然胺基酸或其組合，其中該烷基、烯基、環烷基、芳基、雜芳基、雜環基、聚乙二醇及/或該等天然或非天然胺基酸各者視情況組合及鍵聯在一起，或者經由選自 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-O-$ 、 $-NH-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-O-$ 、 $=NH-O-$ 、 $=NH-NH-$ 或 $=NH-N(烷基)-$ 之化學基團鍵聯至該生物分子及/或鍵聯至該脂肪酸部分。

可使用含烷基間隔基之連接子，例如 $-NH-(CH_2)_z-C(O)-$ 或 $-S-(CH_2)_z-C(O)-$ 或 $-O-(CH_2)_z-C(O)-$ 、 $-NH-(CH_2)_z-NH-$ 、 $-O-C(O)-(CH_2)_z-C(O)-O-$ 、 $-C(O)-(CH_2)_z-O-$ 、 $-NHC(O)-(CH_2)_z-C(O)-NH-$ 及類似物，其中 z 為 2-20。此等烷基連接子可另外經任何非空間位阻基團取代，該等基團包括(但不限於)低碳數烷基(例如， C_1-C_6)、低碳數鹼基、鹵素(例如， Cl 、 Br)、 CN 、 NH_2 或苯基。

該連接子亦可具有聚合物性質。該連接子可包括具有生物穩定性或可生物降解之聚合物鏈或單元。具有重複鏈結(repeat linkage)之聚合物生理條件下可具有不同程度之穩定性，端視鏈結之不穩定性而定。聚合物可包含聚碳酸酯($-O-C(O)-O-$)、聚酯($-C(O)-O-$)、聚胺基甲酸酯($-NH-C(O)-O-$)、聚鹼胺($-C(O)-NH-$)之鏈結。此等鏈結係以舉例的方式提供，且無意限制可用於本發明聚合物鏈或連接子中之鏈結類型。適宜的聚合物包括(例如)聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯啉酮、聚乙烯醇、聚胺基酸、二乙烯醚馬來酸酐、 N -(2-羥丙基)-甲基丙烯醯胺、葡聚糖、葡聚糖衍生物、聚丙二醇、聚氧乙基化多元醇、肝素、肝素片段、多糖、纖維素及纖維素衍生物、澱粉及澱粉衍生物、聚烷二醇及其衍生物、聚烷二醇共聚物及其衍生物、聚乙烯基乙醚與類似物及其混合物。聚合物連接子係(例如)聚乙二醇(PEG)。PEG連接子可係直鏈或分支鏈。在本發明中，PEG連接子之分子量並不限於任何特

定大小，但某些實施例具有100至5000道爾頓，例如500至1500道爾頓之分子量。

該連接子在兩端包括適宜官能基-反應性基團，其在肽或多肽/蛋白質之胺基與脂肪酸部分上之官能基/反應性基團(例如式A1、A2及A3之脂肪酸部分之羧酸官能性)之間形成橋。

該連接子可包含若干個性質不同之鍵聯部分(或間隔基)(例如胺基酸、雜環基部分、PEG及/或烷基部分之組合)。在此情形下，各鍵聯部分在兩端包含適宜的官能基-反應性基團，其在肽或多肽/蛋白質之胺基與下一性質不同之鍵聯部分間形成橋，及/或包含適宜的官能基-反應性基團，其在先前性質不同之鍵聯部分與脂肪酸部分間形成橋。

經修飾肽或多肽及/或肽-多肽部分(partial)構築體(亦即連接至部分(partial)連接子之肽/多肽)包括可與脂肪酸部分(或經修飾脂肪酸部分：亦即已連接至部分連接子)上之可用反應性官能性反應形成共價鍵之反應性基團。反應性基團係可形成共價鍵之化學基團。反應性基團係位於共軛位置，且通常可為羧基、磷醯基、醯基、酯或混合酸酐、馬來醯亞胺、N-羥基琥珀醯亞胺、四嗪、炔烴、醯亞胺酸酯、吡啶-2-基-二硫基，從而可與另一共軛位置上之官能性如胺基、羥基、烯基、肼基、羥胺基、疊氮基或硫醇基形成共價鍵。

就將生物分子或經修飾生物分子共軛至連接子及/或將連接子共軛至脂肪酸部分及/或將各種性質不同之鍵聯部分共軛在一起而言，特別受到關注之反應性基團為N-羥基琥珀醯亞胺、炔烴(更特定言之環辛炔)。

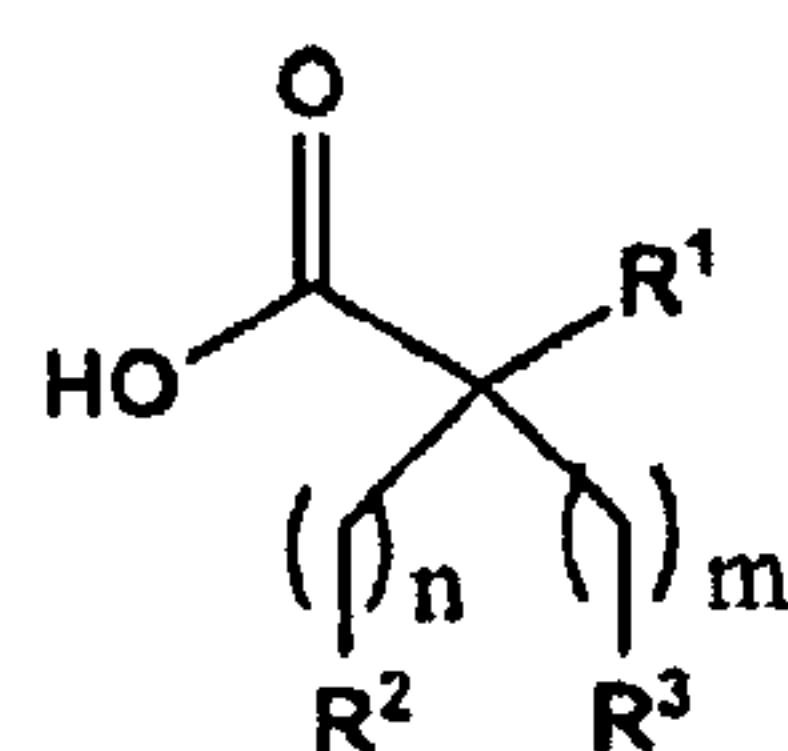
官能性包括：1.與馬來醯亞胺、甲苯磺醯基或吡啶-2-基二硫基反應之硫醇基；2.用於鍵合至羧酸或活化羧酸(例如經由N-羥基琥珀醯胺化學形成醯胺鍵)、磷醯基、醯基或混合酸酐之胺基(例如胺基酸

之胺基官能性)；3.與末端炔烴及更特定言之環辛炔進行Huisgen環化加成之疊氮化物(更通常稱為點擊化學)；4.與羥胺或肼反應分別形成肟或肼之羰基；5.與四嗪以氮雜[4+2]加成型式反應之烯烴及更特定言之應變(strained)烯烴。雖然本文已描述連接子及官能性/反應性基團之幾個實例，但本發明涵蓋具有任意長度及組成之連接子。

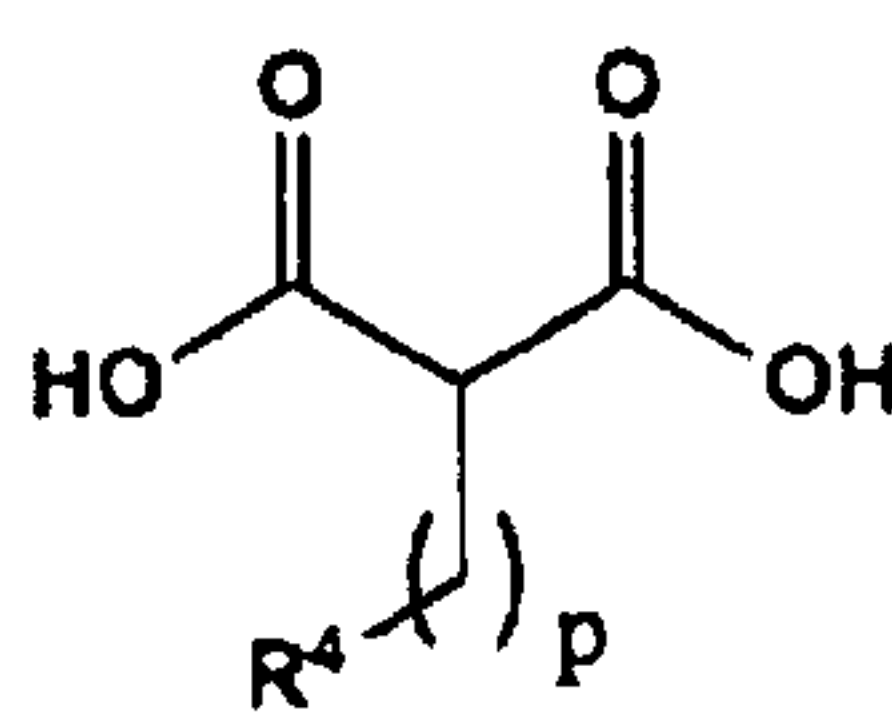
實施例

本文描述本發明之各種實施例。應瞭解，各實施例中所指出之特徵可與指出的其他特徵組合提供其他實施例。

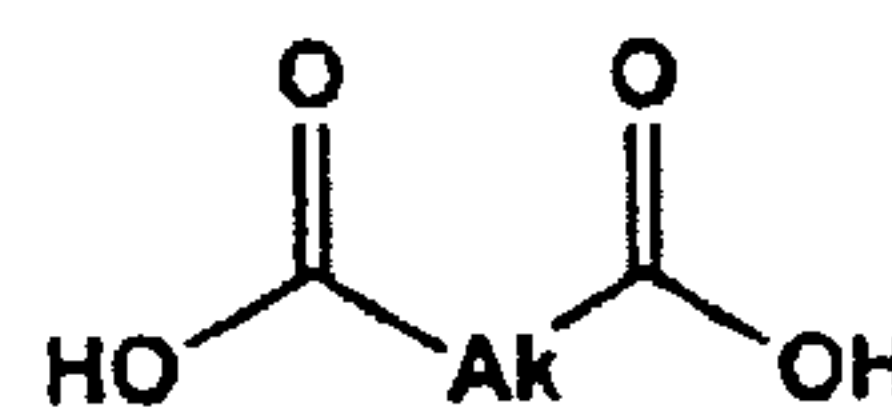
在實施例1中，本發明係關於一種包含經由連接子鍵聯至脂肪酸部分之生物分子之共軛物，其中該脂肪酸部分具有下式A1、A2或A3：



A1



A2



或A3

R^1 係 CO_2H 、 H ；

R^2 、 R^3 及 R^4 彼此獨立地為 H 、 OH 、 CO_2H 、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 或 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ；

Ak 係分支鏈 C_6 - C_{30} 伸烷基；

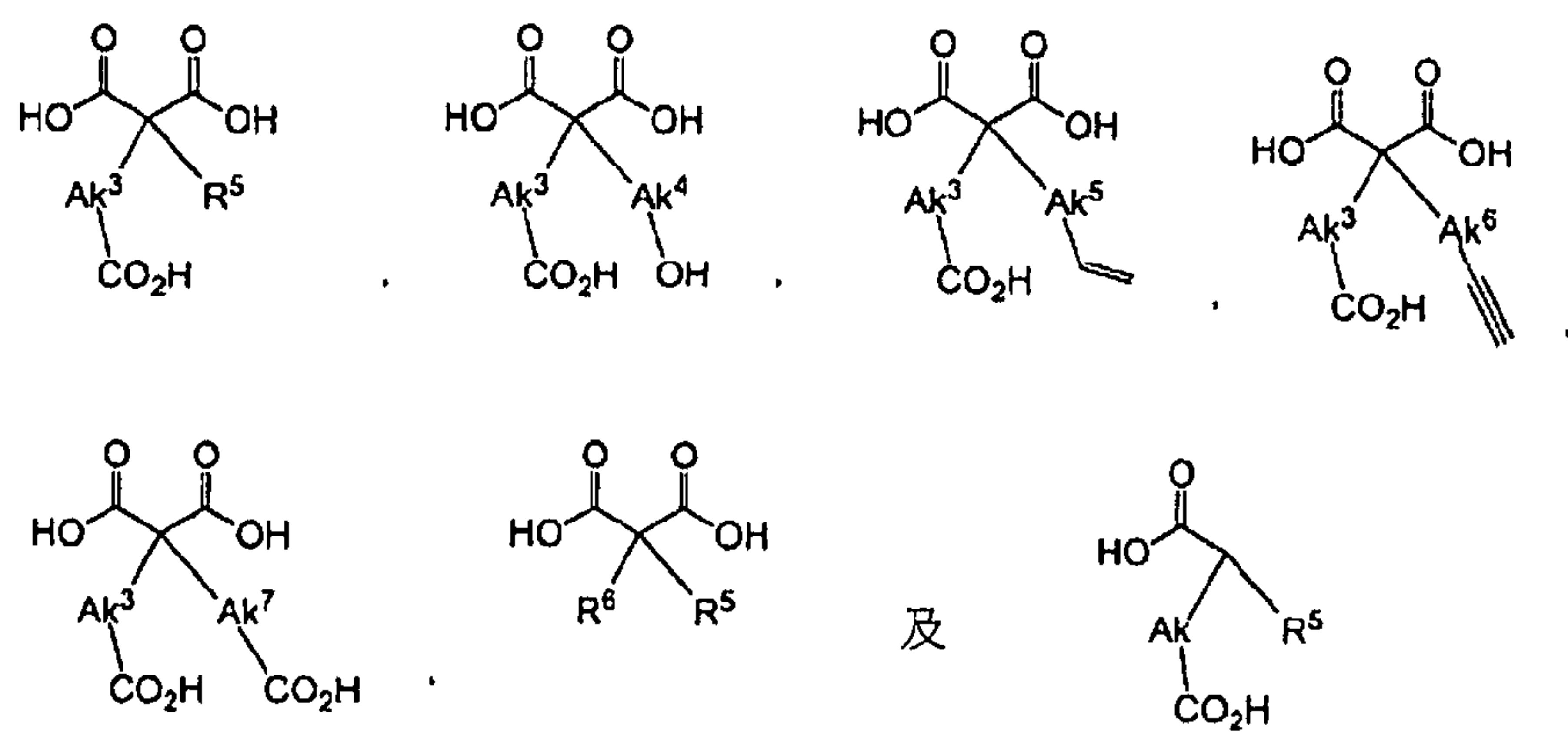
n 、 m 及 p 彼此獨立地為6與30間之整數；或其鹽胺、酯或醫藥上可接受的鹽。

在實施例1之另一態樣中，如實施例1之共軛物可另外包括如上所述之式A1、A2或A3脂肪酸。基於實現選擇性共軛及/或實現脂肪酸至生物分子之單共軛(mono conjugation)之困難性，本發明共軛物可包括鍵聯至一或多個式A1、A2或A3脂肪酸部分之生物分子。此外，基於一些蛋白質之多聚體本質，各構成多聚體蛋白質之單體單元可鍵聯

至脂肪酸部分，但並非所有單體單元均必須鍵聯至脂肪酸部分，只要至少一個單體單元鍵聯至脂肪酸部分即可。在另一態樣中，本發明係關於本發明共軛物之混合物。例如該混合物可包含鍵聯至一個式A1、A2或A3脂肪酸部分之生物分子(例如多聚體生物分子，例如二聚體生物分子)及鍵聯至超過一個式A1、A2或A3脂肪酸部分之生物分子(例如多聚體生物分子，例如二聚體生物分子)。本發明之以下實例進一步強調此將脂肪酸選擇性或非選擇性多共軛(multiconjugation)至蛋白質或多肽之態樣。

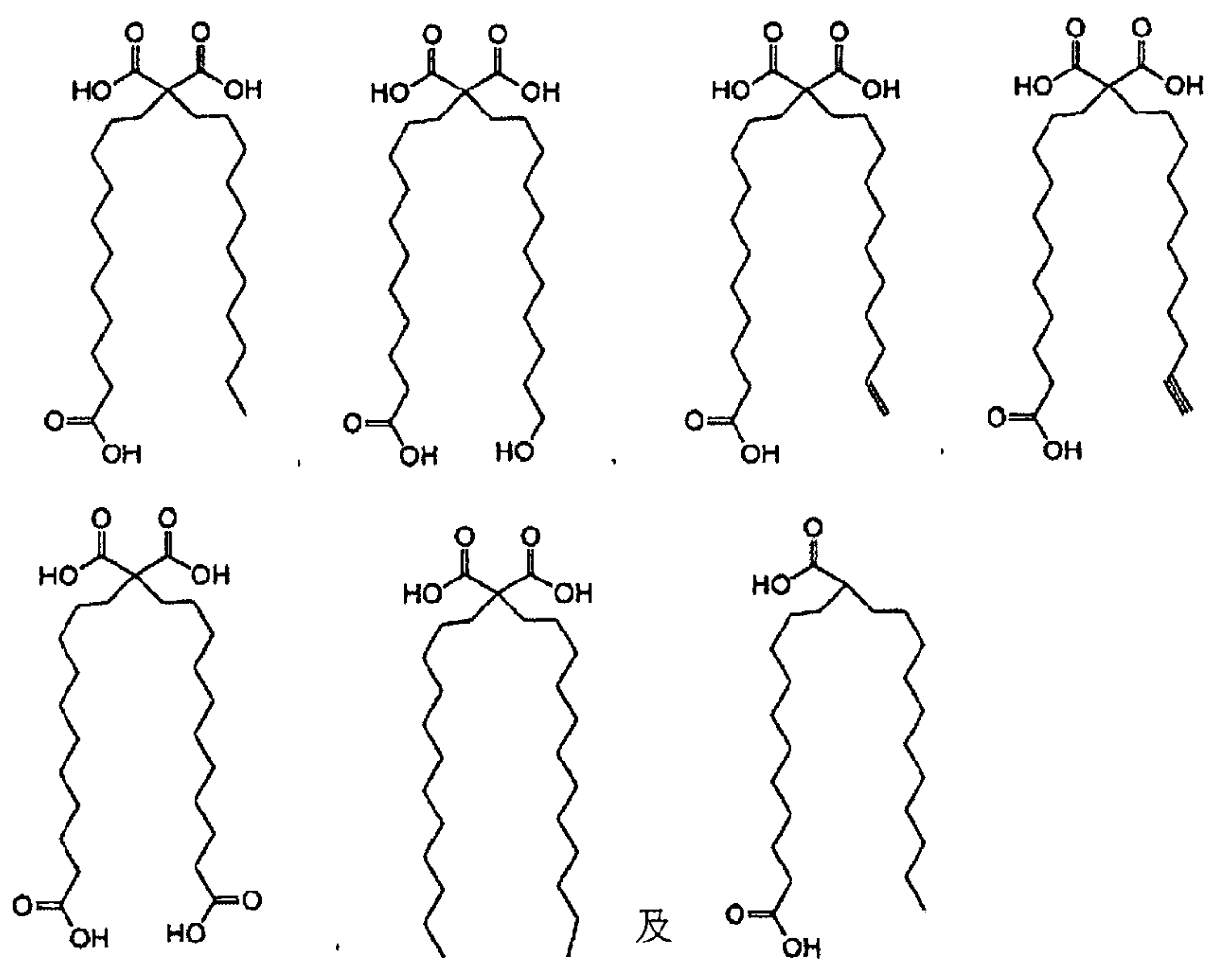
在實施例1A中，本發明係關於一種如實施例1之共軛物，其中該脂肪酸部分具有式A1。在此實施例之一特定態樣中，該共軛物包括式A1脂肪酸部分，其中n及m獨立地為8至20，較佳10至16。在此實施例之另一態樣中，本發明係關於一種如實施例1或1A之共軛物，其中該脂肪酸部分具有式A1，且其中R²及R³中之至少一者係CO₂H。

在實施例2中，本發明係關於一種如實施例1或1A之共軛物，其中該脂肪酸部分係選自下式：

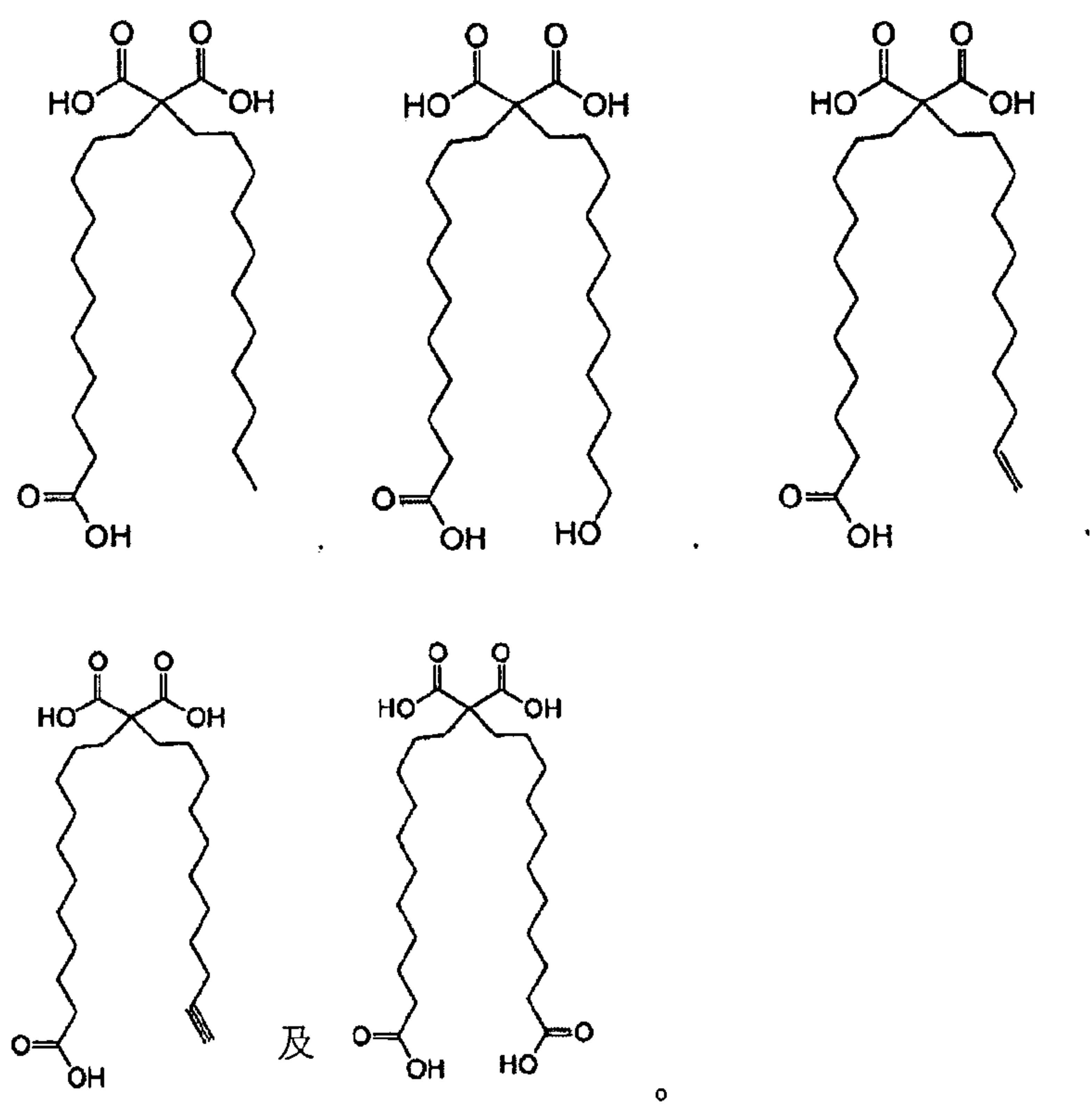


其中Ak³、Ak⁴、Ak⁵、Ak⁶及Ak⁷獨立地為(C₈₋₂₀)伸烷基，R⁵及R⁶獨立地為(C₈₋₂₀)烷基。

在實施例3中，本發明係關於一種如實施例1、1A或2之共軛物，其中該脂肪酸部分係選自下式：

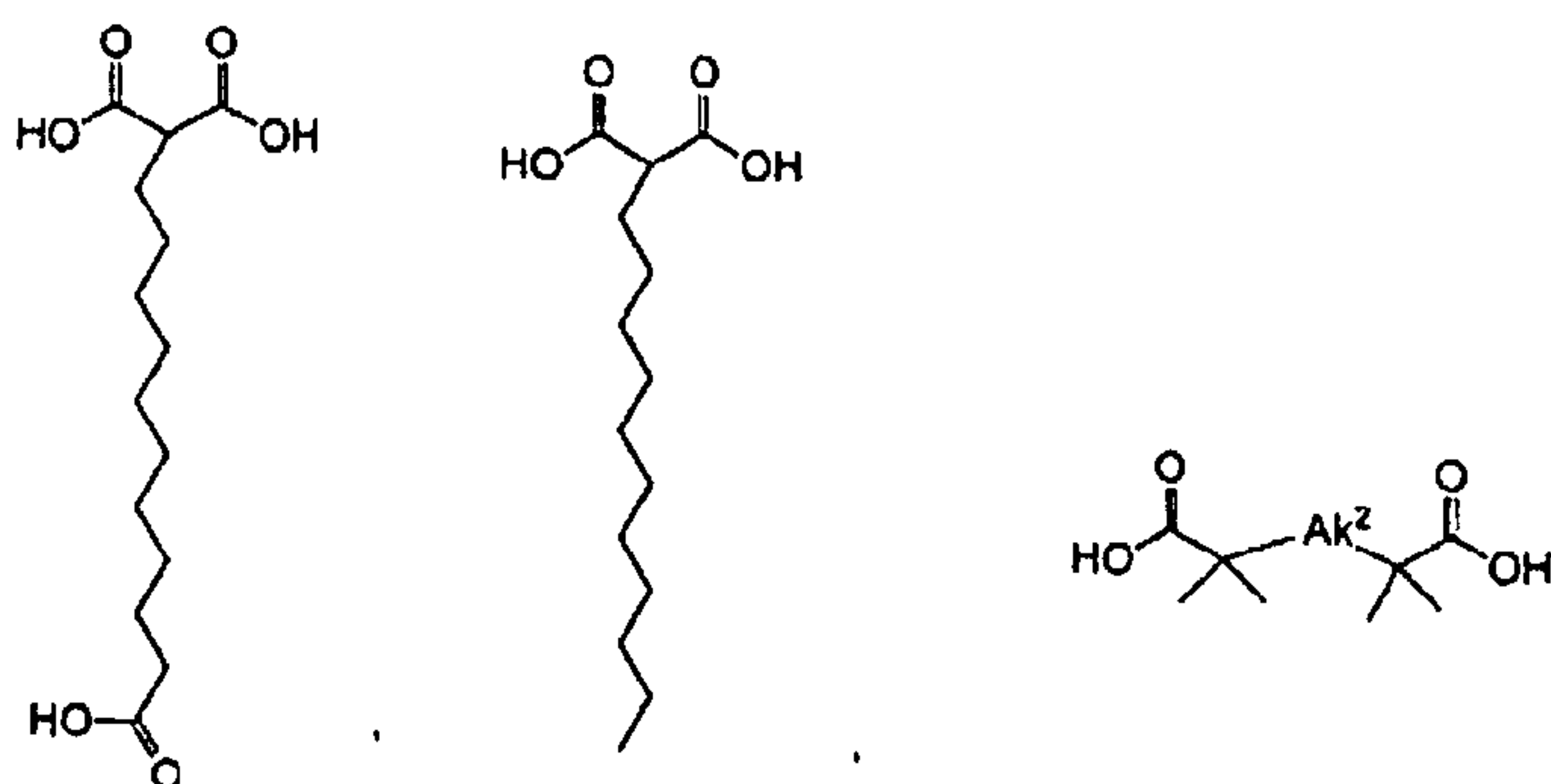


在實施例3A中，本發明係關於一種如實施例1、1A或2之共軛物，其中該脂肪酸部分係選自下式：



在實施例3B中，本發明係關於一種如實施例1之共軛物，其中該脂肪酸部分具有式A2或A3。在此實施例之一特定態樣中，該共軛物包括式A2之脂肪酸部分(其中p係8至20)或式A3之脂肪酸部分(其中Ak係C₈₋₂₀伸烷基)。

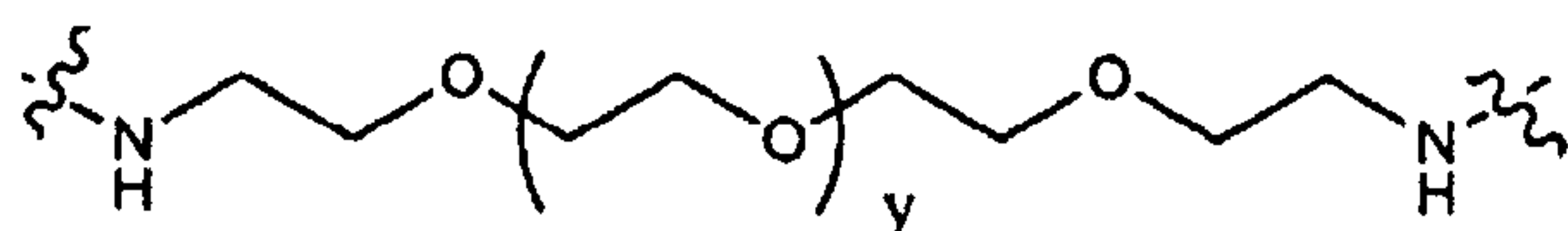
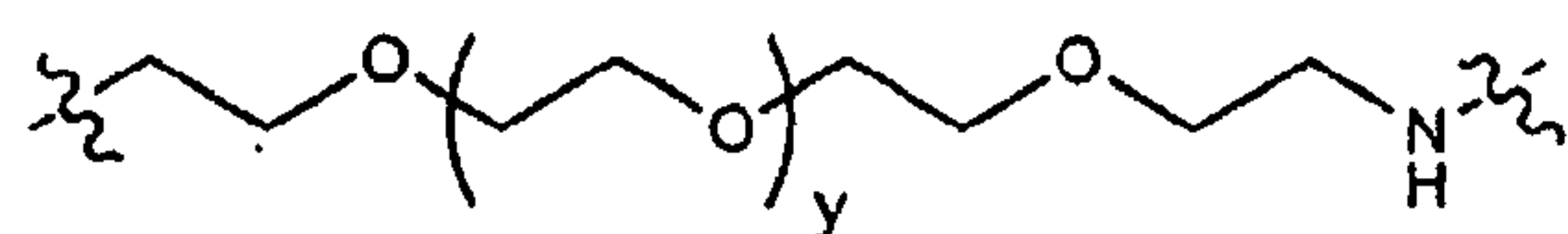
在實施例3C中，本發明係關於一種如實施例1或3B之共軛物，其中該脂肪酸部分係選自下式：



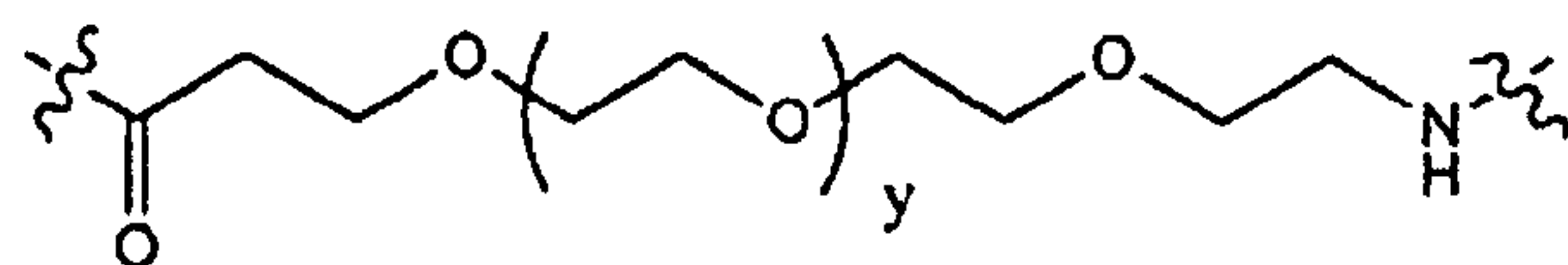
其中 Ak^2 係 C_{8-20} 伸烷基。

在實施例4中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共軛物，其中該連接子包含一或多個烷基、烯基、環烷基、芳基、雜芳基、雜環基、聚乙二醇、一或多種天然或非天然胺基酸或其組合，其中該烷基、烯基、環烷基、芳基、雜芳基、雜環基、聚乙二醇及/或該等天然或非天然胺基酸各者視情況組合及鍵聯在一起，或者經由選自 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-\text{O}-$ 、 $=\text{NH}-\text{O}-$ 、 $=\text{NH}-\text{NH}-$ 或 $=\text{NH}-\text{N}(\text{烷基})-$ 之化學基團鍵聯至該生物分子及/或鍵聯至該脂肪酸部分。

在實施例5中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共軛物，其中該連接子包括下式之未分支寡聚乙二醇部分：



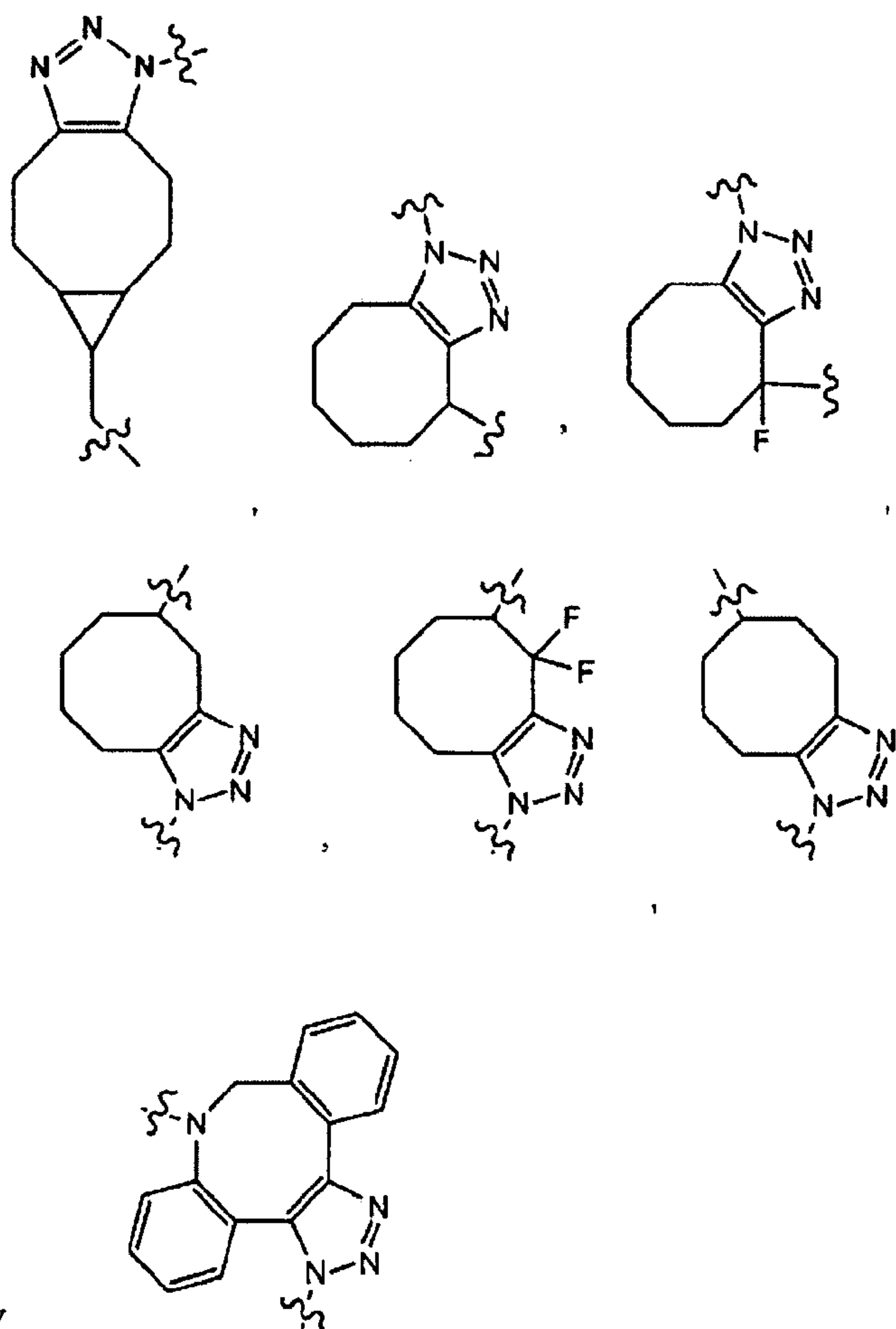
或，



其中 y 為 0 至 34。

在實施例6中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共軛

物，其中該連接子包括(或另外包括)選自下式之雜環部分：

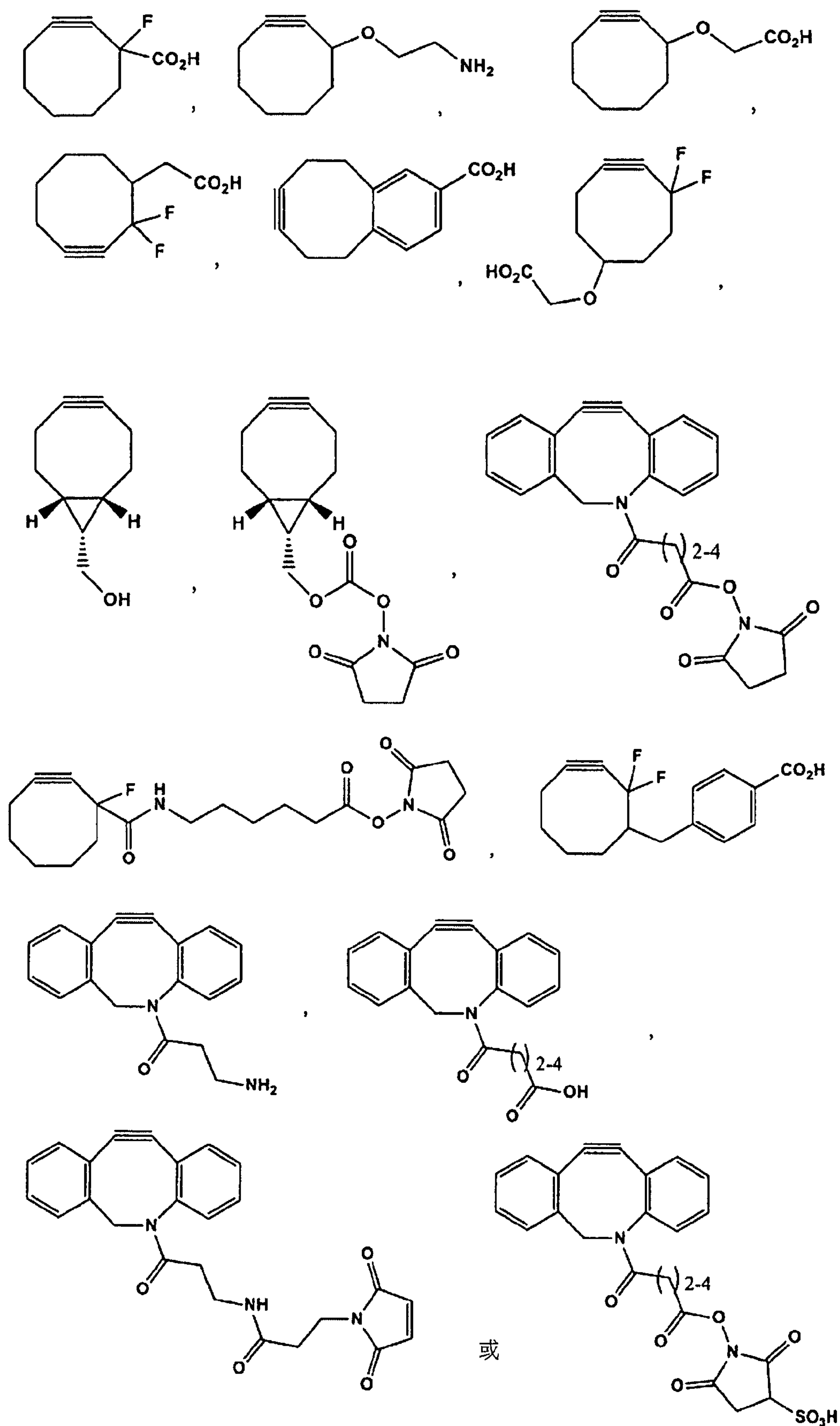


及

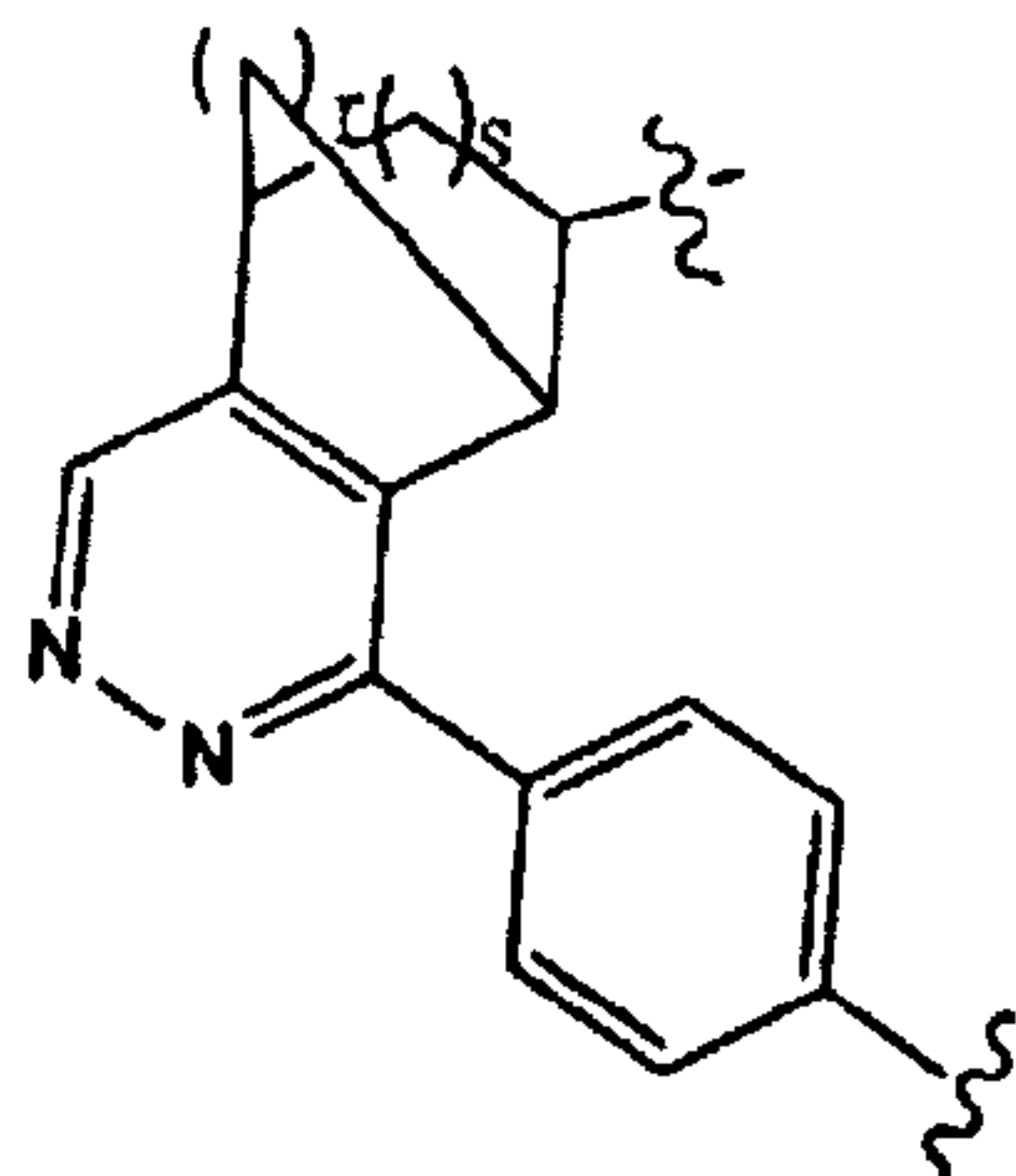
含此等雜環基的連接子係(例如)藉由疊氮化物-炔烴Huisgen環化加成(更通常稱為點擊化學)得到。更特定言之，上文所繪的一些雜環基係由環炔烴與含疊氮化物部分反應所產生。

環炔烴可自商業來源輕易得到，且因此可經由與含疊氮化物官能性之部分(例如含末端疊氮化物官能性之連接子)環化加成而官能化。在蛋白質標記中使用環炔烴點擊化學之實例已描述在US 2009/0068738中，其以引用的方式併入本文中。

可用於Huisgen環化加成中之環炔烴劑之非限制性實例為：

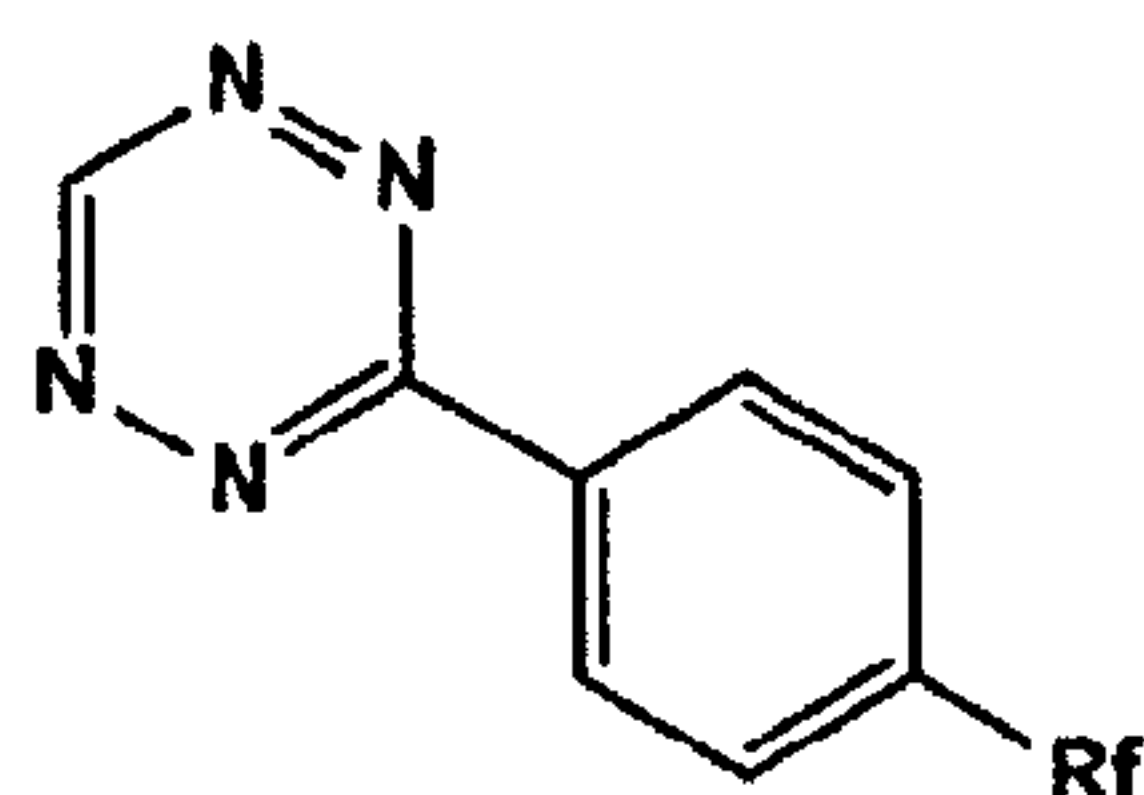


在實施例6A中，本發明係關於一種如實施例1至5中任一項之共軛物，其中該連接子包括(或另外包括)選自下式之雜環基：

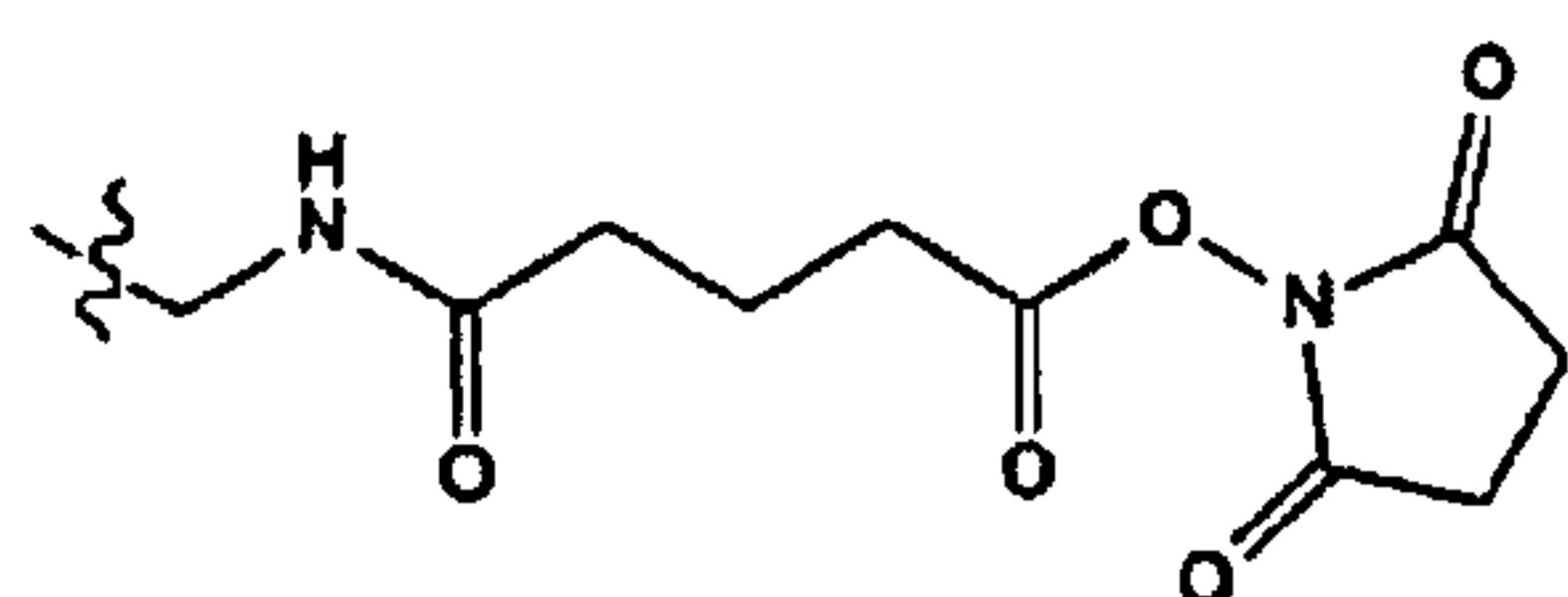


其中 r 係0至2之整數，且 s 係0至3之整數。

此等雜環連接子可經由烯烴或較佳應變烯烴(諸如環烷烴)與以下部分之氮雜[4+2]環化加成反應得到：

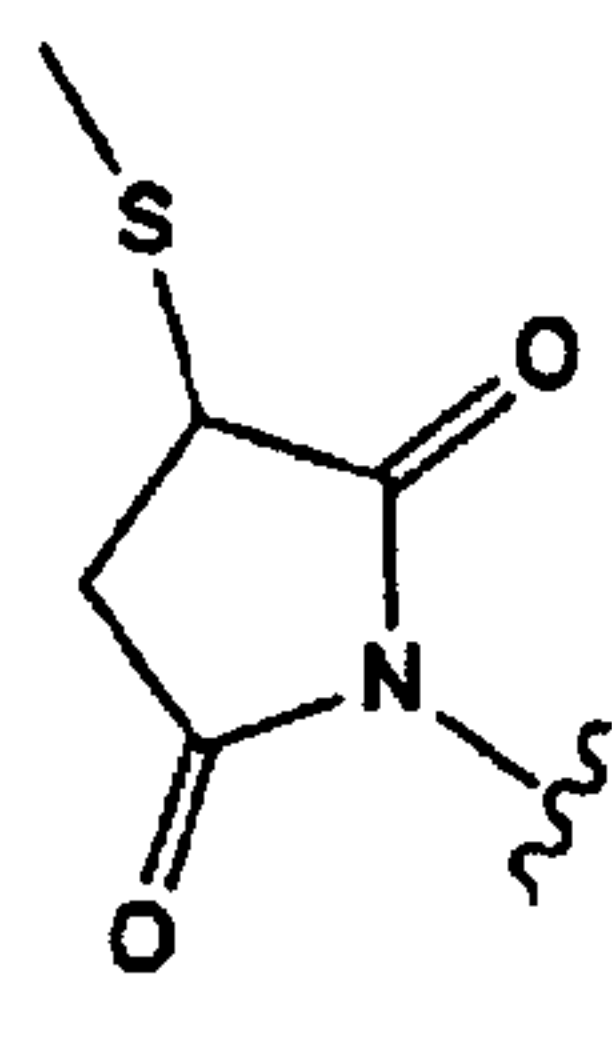


其中 R_f 係(例如)-CH₂NH₂、-OH、-CH₂-CO₂H、-S-CH₂-CO₂H、-(O-CH₂)₄₋₆-C(O)-OH或



此等四嗪部分可自商業來源輕易得到，且可與含烯烴部分(例如含末端烯烴官能性之連接子)反應。

在實施例6B中，本發明係關於一種如實施例1至5中任一項之共軛物，其中該連接子包括(或另外包括)具有下式之雜環基：



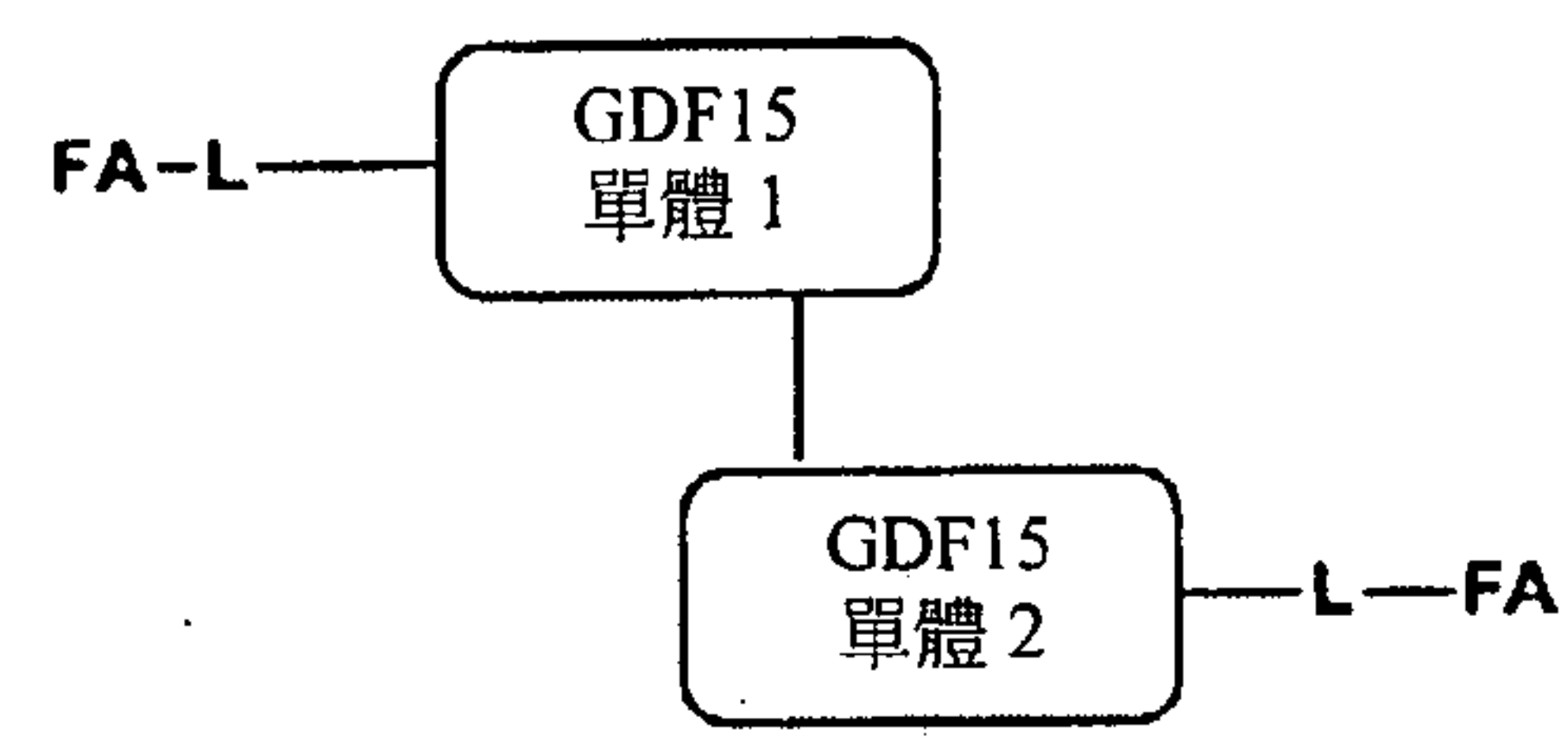
此雜環部分可藉由使馬來醯亞胺與含硫醇部分(諸如含末端硫醇官能性之連接子)反應得到。

此等可輕易得到及/或可在市面上購得之試劑係直接連接或經由如上所述連接子連接至所欲肽或多肽。使炔烴、馬來醯亞胺或四嗪反應性基團與存在於脂肪酸部分或連接子-脂肪酸構築體(諸如例如PEG-脂肪酸構築體)上之官能基(分別為疊氮化物、硫醇及烯烴)反應。

在實施例7中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共軛物，其中該連接子包括或另外包括一或多個獨立地選自組胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺及甘胺酸之胺基酸。在此實施例之一特別態樣中，該連接子包括1至6個選自組胺酸、丙胺酸及甲硫胺酸之胺基酸。

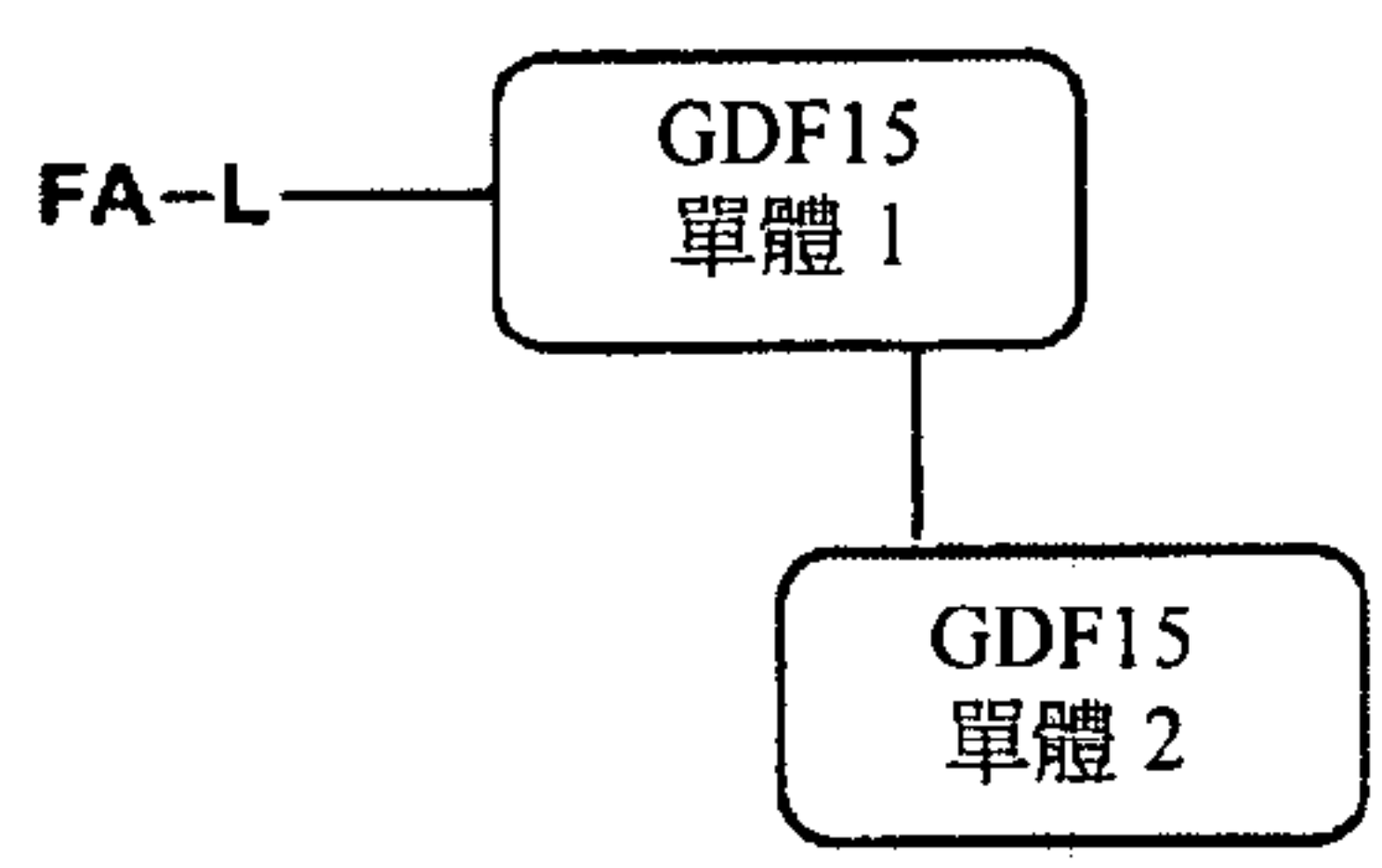
在實施例8中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共軛物，其中該生物分子係肽或多肽。在實施例8之一特別態樣中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共軛物，其中該肽或多肽係1) 人類生長分化因子15 (GDF15)、其同系物、變體、突變體、片段及其他修飾形式，2) APJ 促效劑肽，3) 催產素受體促效劑肽，4) 舒張素 (serelaxin)，5) NPFF，6) PIP 肽，7) FGF23 肽，8) AgRP 肽或9) siRNA。

在實施例8A中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共軛物，其中該生物分子係人類生長分化因子15 (GDF15)、其同系物、變體、突變體、片段及其他修飾形式，或其二聚體。在此實施例之一態樣中，該生物分子係人類生長分化因子15 (GDF15)突變體或變體。在一較佳實施例中，該生物分子係GDF15或其變體或突變體之二聚體。基於GDF15多肽或其突變體或變體之同型二聚體本質，兩條構成該同型二聚體之多肽鏈各自(亦即各單體單元)可經由連接子鍵聯至式A1、A2或A3之脂肪酸分子。因此，GDF15同型二聚體可經由連接子鍵聯至一個或兩個脂肪酸。經由連接子鍵聯至脂肪酸部分之GDF15之結構可如下表示：



結構 A；其中FA表示脂肪酸部分，

且L表示連接子，且GDF15單體單元1及單體單元2均經由連接子鍵聯至脂肪酸部分；或者



結構 B；其中FA係脂肪酸部分，且L係連

接子，且僅有一個單體單元經由連接子鍵聯至脂肪酸部分，且其中2個單體單元間之直線表示二硫鍵。此外，本發明亦係關於一種包含結構A之共軛物與結構B之共軛物之混合物。

在實施例8B中，本發明涵蓋如實施例8A之共軛物，其中人類GDF15突變體係藉由用另一殘基置換成熟多肽之一或多個胺基酸殘基得到。在此實施例之一特別態樣中，人類GDF15 N端之最後兩個胺基酸殘基(亦即精胺酸198及丙胺酸197)經胺基酸序列XH-置換，其中H係組胺酸，且X係選自甲硫胺酸、丙胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺及甘胺酸之胺基酸。在此實施例之一較佳態樣中，hGDF15突變體係MH(199-308)hGDF15或AH(199-308)hGDF15。

在實施例8C中，人類GDF15 N端之最後三個胺基酸殘基(亦即天冬醯胺199、精胺酸198及丙胺酸197)經胺基酸序列XHX'-置換，其中H係組胺酸，且X'及X係獨立地選自甲硫胺酸、丙胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺及甘胺酸之胺基酸。在此實施例之另一態樣中，人類GDF15 N端之最後三個胺基酸殘基(亦即天冬醯胺199、精胺酸198及丙胺酸197)經胺基酸序列AHX'-置換，其中H係組胺酸，且X'係獨立地選自

甲硫胺酸、丙胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺及甘胺酸之胺基酸。在此實施例之一較佳態樣中，經修飾GDF15蛋白質係MHA(200-308)hGDF15或AHA(200-308)hGDF15。

與天然GDF15蛋白質相比，GDF15突變體可選擇性在N端處標記該蛋白質(亦即脂肪酸共軛於GDF15之較佳N端)。選擇性標記肽及蛋白質進一步詳細描述於同時申請之美國申請案第62/015,858號(代理人檔案PAT056275-US-PSP)及第62/082,337號(代理人檔案號PAT056275-US-PSP02)中。

在實施例8D中，本發明係關於一種如實施例1至8中任一項之共軛物，其中該生物分子係APJ促效劑肽。在此實施例之一特別態樣中，該APJ促效劑肽係描述於PCT專利申請案號WO 2013/111110、WO 2014/081702、WO 2015/013168、WO 2015/013165、WO 2015/013167及WO 2015/013169中之肽，該等案以引用的方式併入本文中。

在實施例8E中，本發明係關於一種如實施例1至8中任一項之共軛物，其中該生物分子係催產素受體促效劑肽。在此實施例之一特別態樣中，該催產素受體促效劑肽係描述於PCT專利申請案號WO 2009/122285 (Ferring B.V.)及WO 2014/095773 (Hoffman-La Roche)中之肽，該等案以引用的方式併入本文中。

在實施例8F中，本發明係關於一種如實施例1至8中任一項之共軛物，其中該生物分子係AgRP肽。在此實施例之一特別態樣中，該AgRP肽係AgRP(83-132)，其中C端係呈-游離CO₂H或其醯胺(例如，-C(O)NH₂)形式。

在實施例8G中，本發明係關於一種如實施例1至8中任一項之共軛物，其中該生物分子係FGF23肽。在此實施例之一特別態樣中，該FGF23肽係SEQ ID NO:8之FGF23變體，其在R179處具有突變，且視情況在Y154、Q156、R176、R179、C206及C244處具有一或多個其他

突變。在此實施例之另一特別態樣中，該FGF23肽係SEQ ID NO:8之FGF23變體，其在R179、Q156、C206及C244處具有突變。

在實施例8H中，本發明係關於一種如實施例1至8中任一項之共軛物，其中該生物分子係舒張素(Serelaxin)。

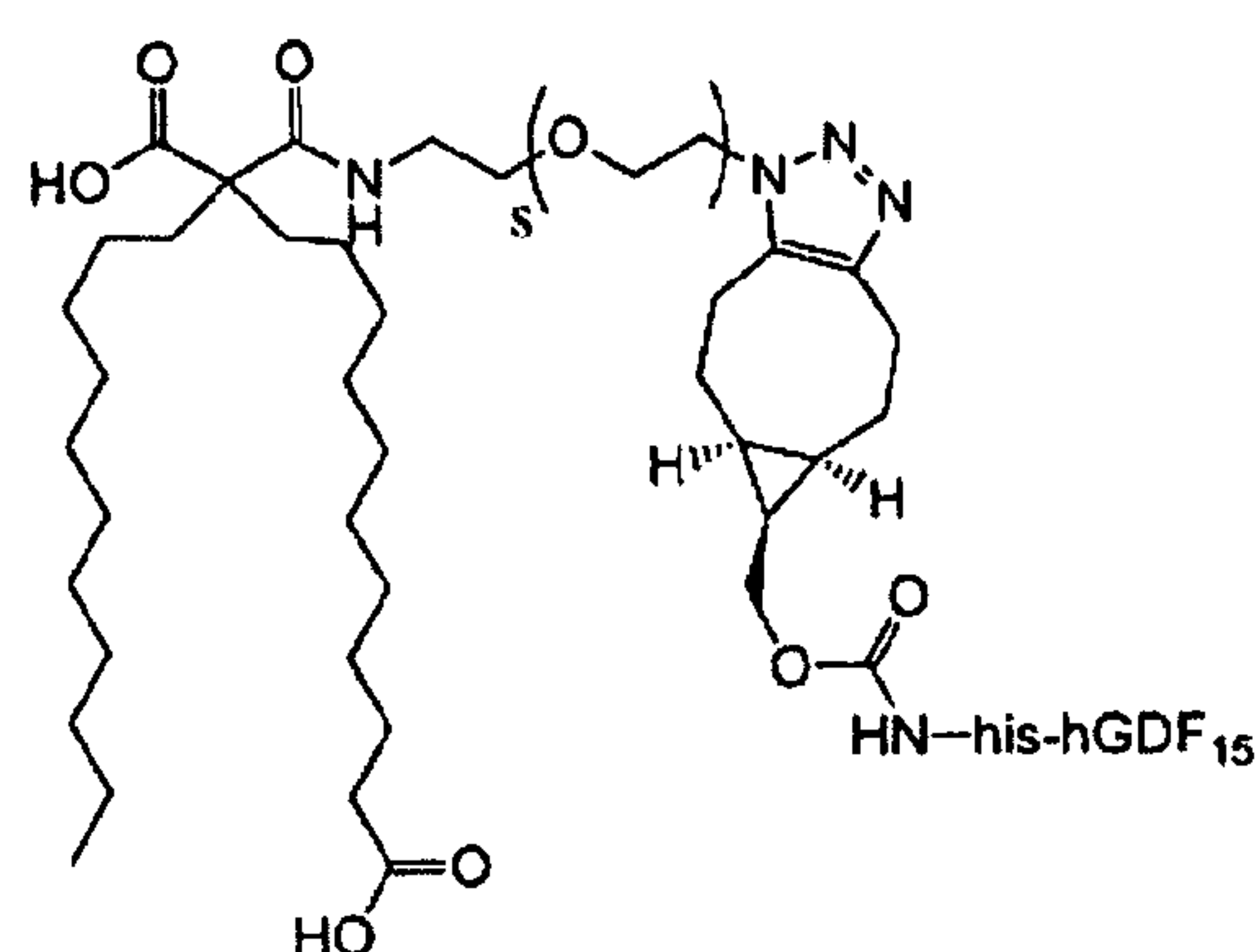
在實施例8I中，本發明係關於一種如實施例1至8中任一項之共軛物，其中該生物分子係NPFF肽。

在實施例8J中，本發明係關於一種如實施例1至8中任一項之共軛物，其中該生物分子係PIP肽。在此實施例之一特別態樣中，該PIP肽係帶有組胺酸標記之蛋白質MHHHHHHH-PIP，其中PIP具有SEQ ID NO:12。

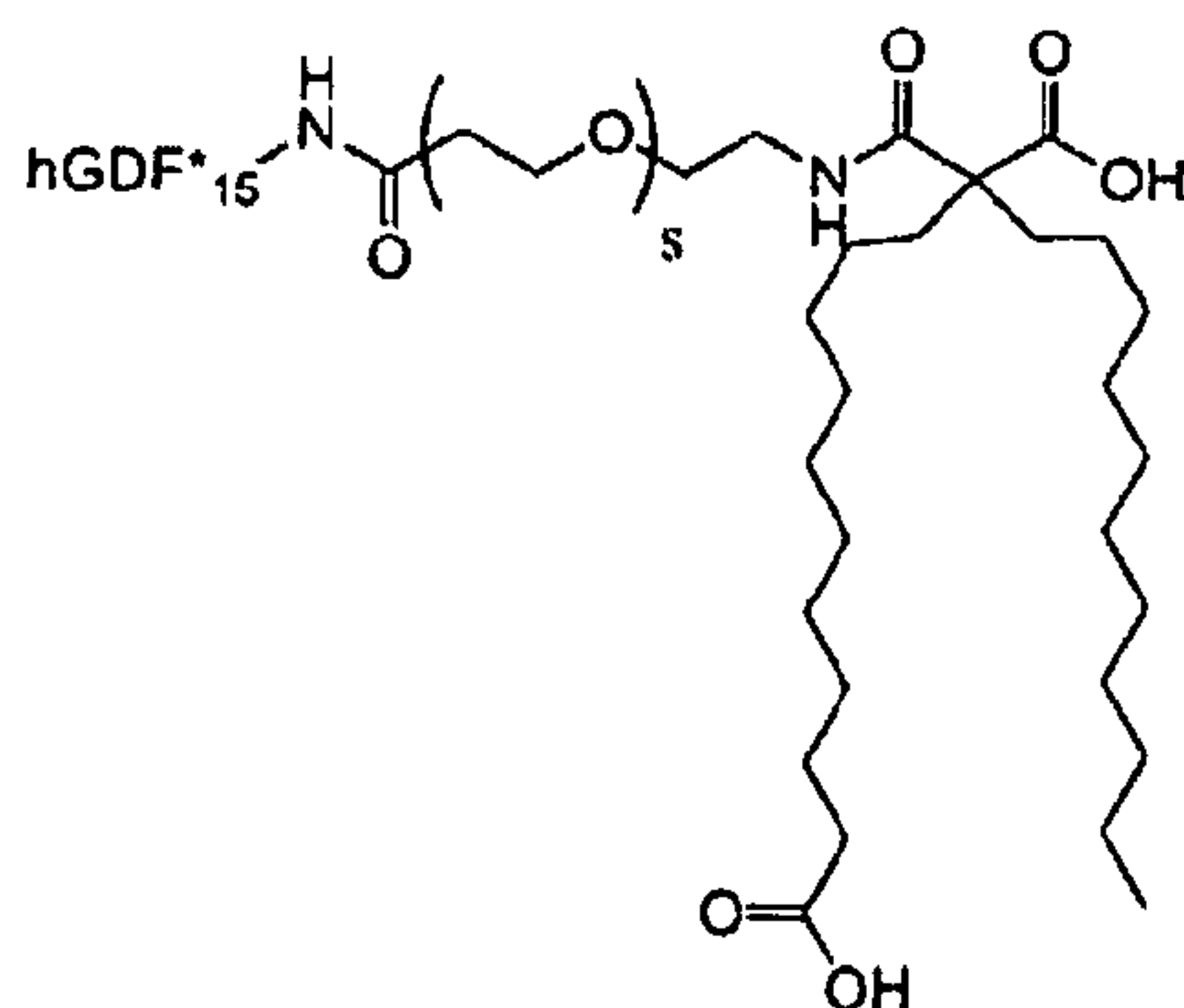
在實施例8K中，本發明係關於一種如實施例1至8中任一項之共軛物，其中該生物分子係siRNA。

在實施例8L中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共軛物，其另外包括經由連接子鍵聯至該生物分子之第二脂肪酸部分。較佳地，兩個脂肪酸-連接子部分具有相同結構。

在實施例9中，本發明係關於一種如實施例1、2、8、8A、8B或8C之共軛物，其具有以下結構：



或



其中hGDF15*係其中N端之2或3個胺基酸分別經胺基酸序列XH-或XHX'-置換之hGDF15，

其中H係組胺酸，且X及X'係獨立地選自M及A；或其二聚體；且

其中his-hGDF15係其中向hGDF15之N端添加包含1至6個組胺酸胺基酸及視情況1或2個甲硫胺酸胺基酸之標記之hGDF15；或其二聚體；且

s係20至30間之整數。

在此實施例之一態樣中，該標記包含組胺酸胺基酸及1或2個非相鄰甲硫胺酸胺基酸。在此實施例之另一態樣中，組胺酸及甲硫胺酸胺基酸之排列使得位置鄰近N端胺基酸之胺基酸係組胺酸。在此實施例之另一態樣中，該標記係選自MHHHHHHM-及MHHHHHHH-。

在實施例9之一特定態樣中，基於hGDF15*及his-hGDF15之同型二聚體本質，構成該同型二聚體之一或兩條多肽鏈(單體單元)可經由連接子鍵聯脂肪酸分子。因此，該同型二聚體之N端可經由連接子鍵聯至一個脂肪酸分子或可鍵聯至兩個脂肪酸分子。此實施例可以經由具有下式之連接子鍵聯至脂肪酸之GDF15生物分子表示：



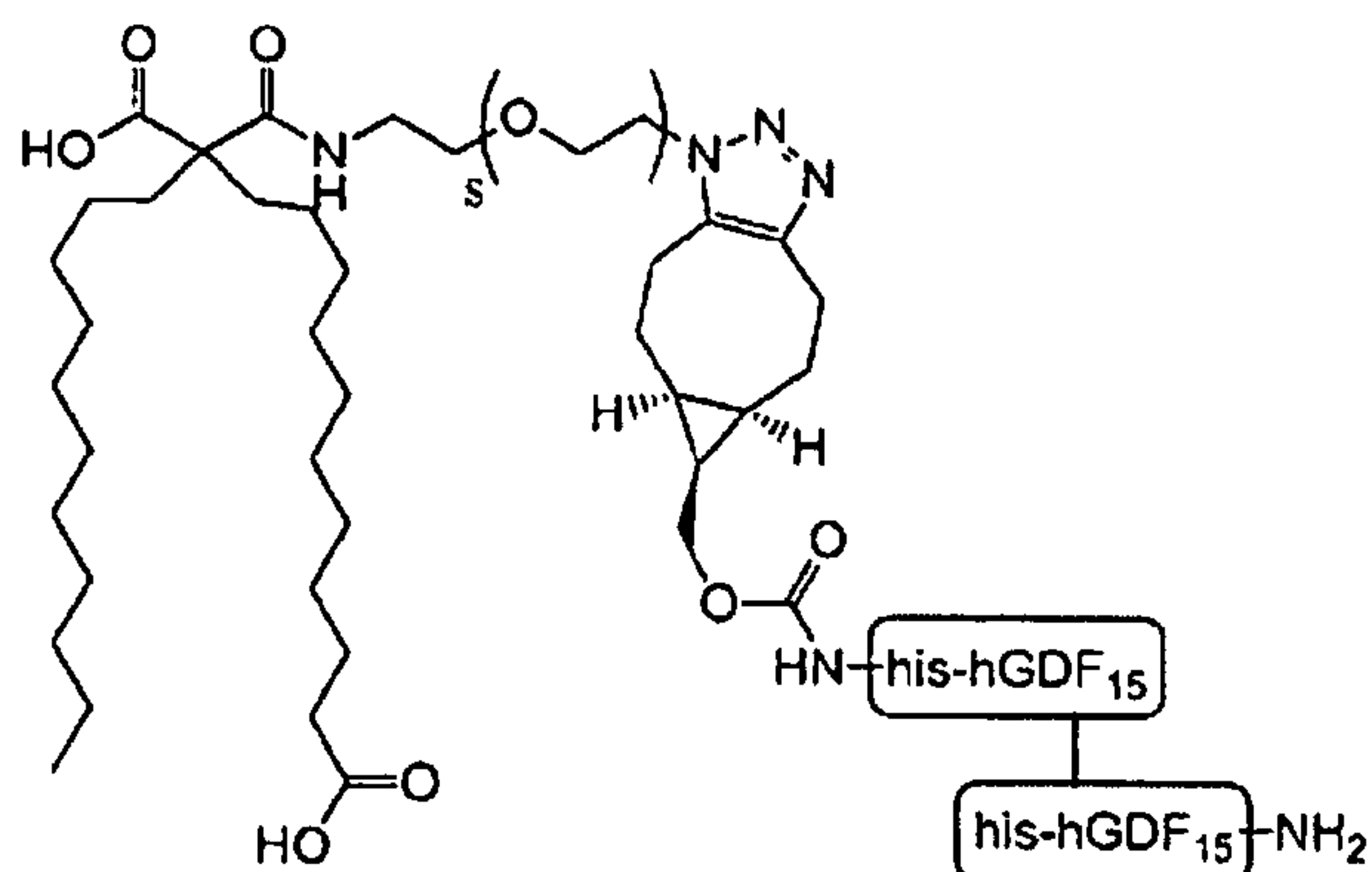
S

S



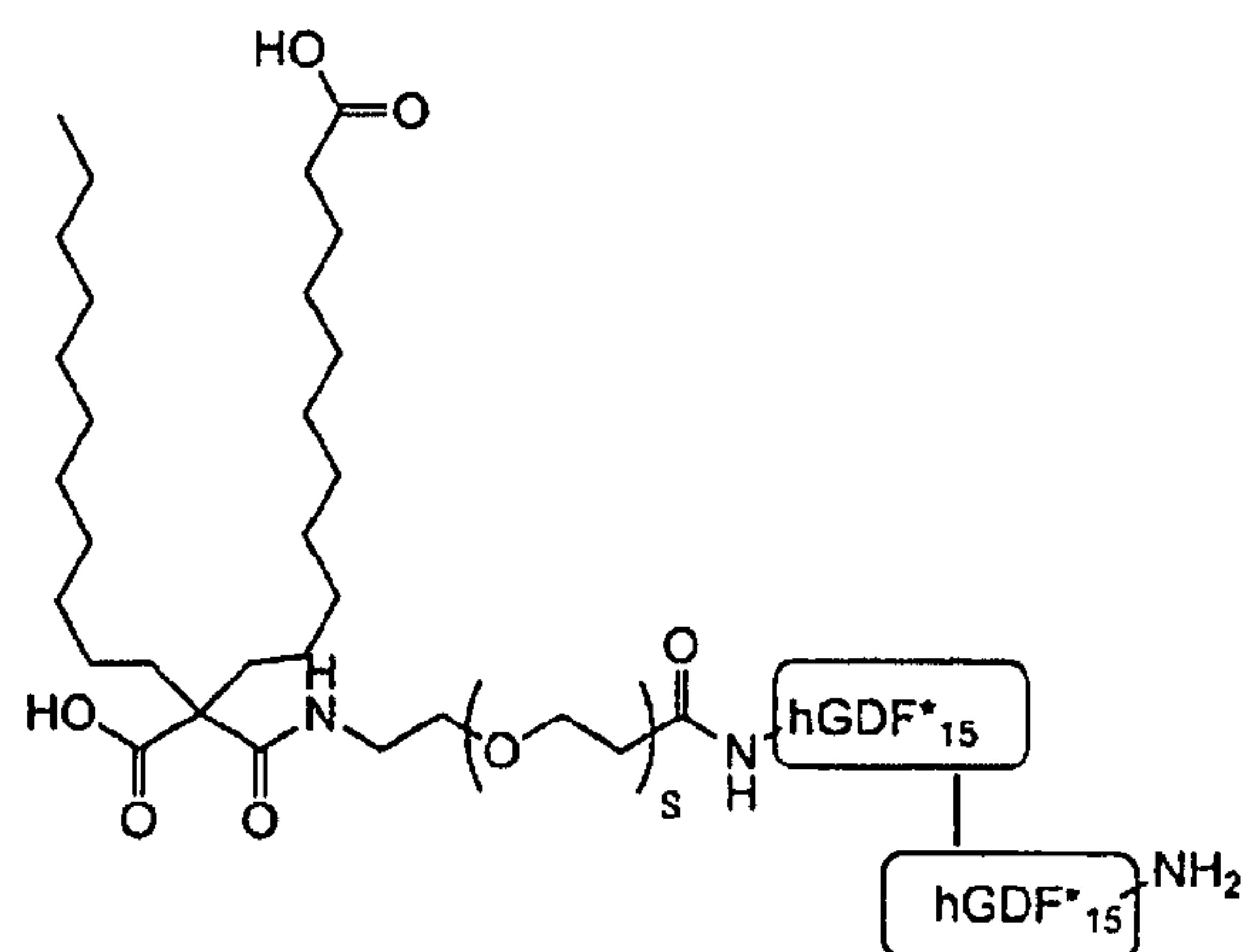
S

S



;

式E；或



式F；

其中his-hGDF15或hGDF15*(如上所定義)之單體單元中僅有一者之N端經由連接子鍵聯至脂肪酸部分。此外，本發明亦涵蓋本發明共軛物之混合物；例如含式C共軛物及式E共軛物之混合物，或者含式D共軛物及式F共軛物之混合物。

在實施例10中，本發明係關於一種組合物，其包含式C共軛物及式E共軛物之混合物。在實施例10A中，本發明係關於一種組合物，其包含式D共軛物及式F共軛物之混合物。

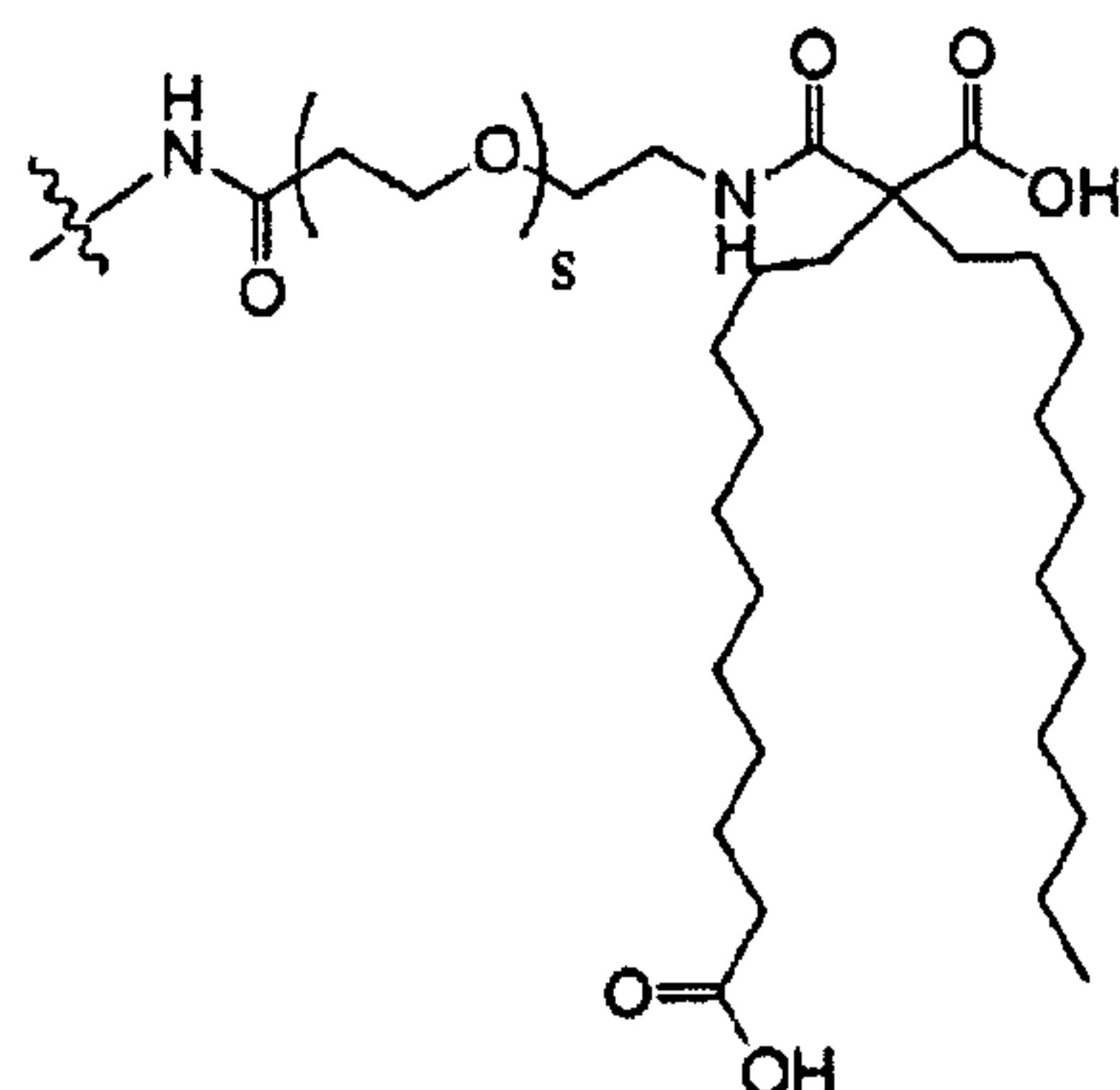
因此，在實施例10B中，本發明係關於一種如技術方案1、2、9或10之共軛物，其包含：

1. 一種同型二聚體hGDF15的變體：其中N端之2或3個胺基酸分別經胺基酸序列XH-或XHX'-置換，其中H係組胺酸，且X及X'係獨立

地選自M及A；或者

其中在hGDF15之N端添加包含1至6個組胺酸胺基酸及視情況1或2個甲硫胺酸胺基酸之標記之同型二聚體hGDF15；及

2. 一或兩個下式脂肪酸：



其中該脂肪酸係經由連接子鍵聯至多肽鏈之N端；或共軛物之混合物。

在實施例10C中，本發明係關於一種如實施例9、10、10A或10B之共軛物，其中hGDF15*係其中N端之2或3個胺基酸分別經胺基酸序列XH-或XHX'-置換之hGDF15，

其中H係組胺酸，且X及X'係獨立地選自M及A；或其二聚體；且

其中his-hGDF15係其中向hGDF15之N端添加包含4至6個組胺酸胺基酸及1或2個甲硫胺酸胺基酸之標記之hGDF15；或其二聚體；

且s係22與28間之整數。在此實施例之一態樣中，該標記包含組胺酸胺基酸及1或2個非相鄰甲硫胺酸胺基酸。在此實施例之另一態樣中，組胺酸及甲硫胺酸胺基酸之排列使得位置鄰近N端胺基酸之胺基酸係組胺酸。在此實施例之另一態樣中，該標記係選自MHHHHHMH-及MHHHHHHH-。

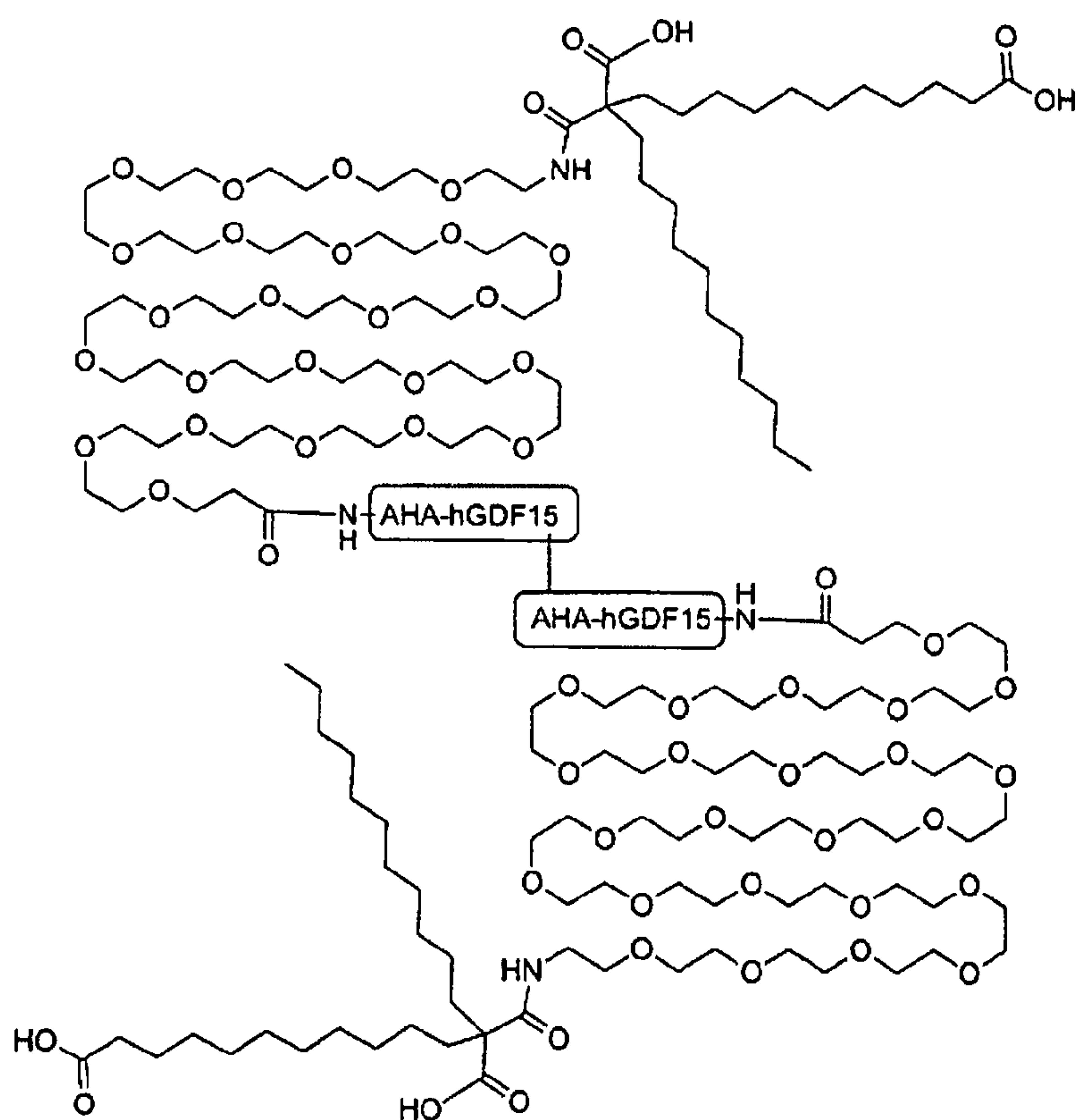
在實施例11中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共軛物，其中該生物分子係選自M-(His)6-hGDF15 (SEQ ID No 1)、M-(his)6-M-hGDF15 (SEQ ID NO:2)、MH(199-308)hGDF15 (SEQ ID

NO:4) 、 MHA(200-308)hGDF15(SEQ ID NO:6) 、 AHA(200-308)hGDF15 (SEQ ID NO:7)及AH(199-308)GDF15 (SEQ ID NO:5)；或其二聚體。

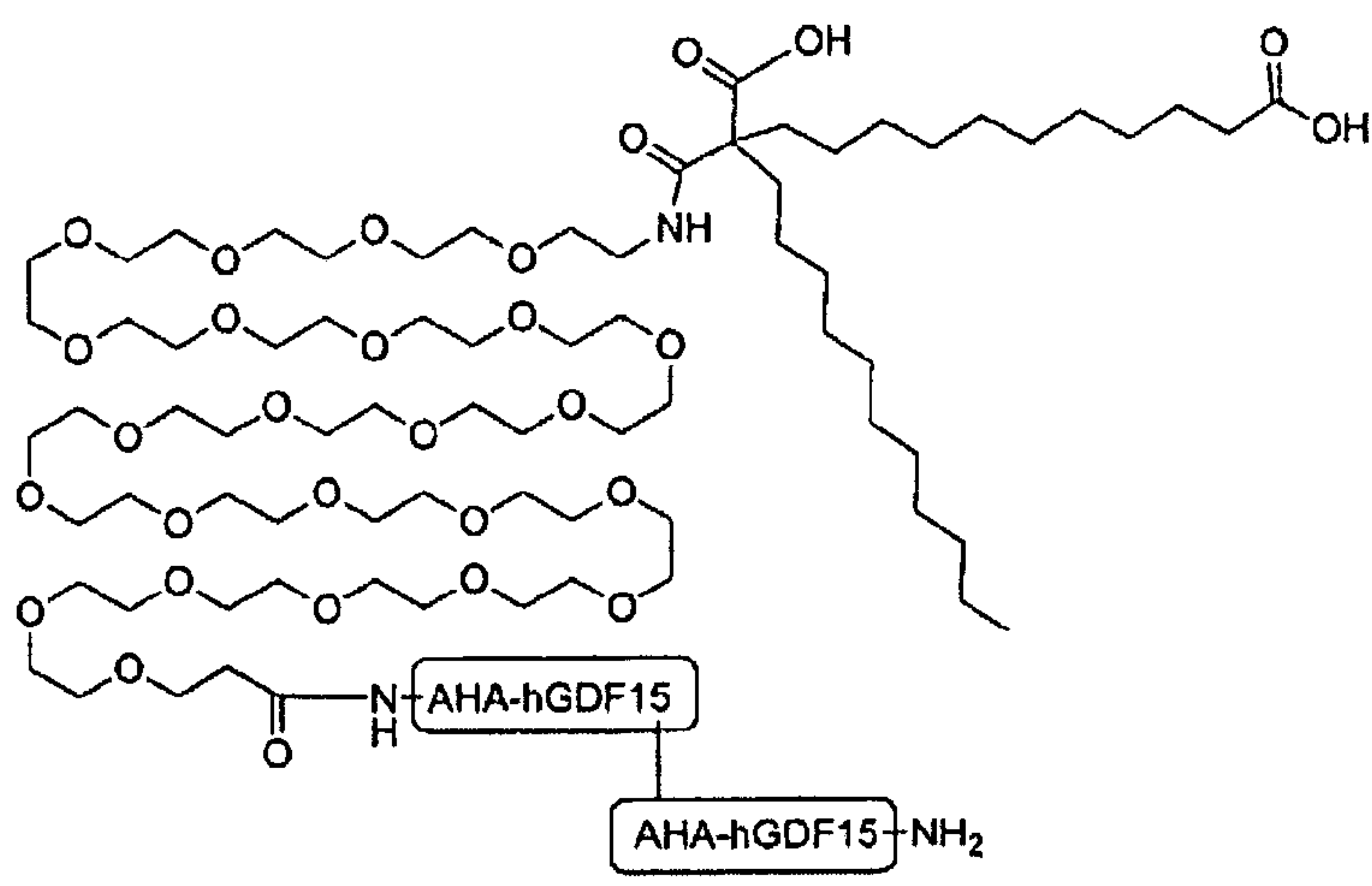
在實施例11A中，本發明係關於一種如實施例11之共軛物，其中該生物分子係選自MH(199-308)hGDF15 (SEQ ID NO:4)、MHA(200-308)hGDF15 (SEQ ID NO:6)、AHA(200-308)hGDF15 (SEQ ID NO:7)及AH(199-308)GDF15 (SEQ ID NO:5)；或其二聚體。

在實施例11B中，本發明係關於一種如實施例11之共軛物，其中該生物分子係選自AHA(200-308)hGDF15 (SEQ ID NO:7)；或其二聚體。

在實施例12中，本發明係關於一種如實施例11B之共軛物，其中該經由連接子鍵聯至脂肪酸之生物分子具有式G或式H：



式G；



式H，

其中AHA-hGDF15係SEQ ID NO:7，且該脂肪酸係鍵聯於一個或兩個單體單元之N端。此外，本發明涵蓋一種包含式G共軛物與式H共軛物之混合物。

在實施例13中，本發明係關於一種組合物，其包含如實施例12之具有式G之共軛物及如實施例12之具有式H之共軛物之混合物。在此實施例之一特別態樣中，該混合物係莫耳比為1:1之式G共軛物及式H共軛物。

AHA-(200-308)-hGDF15 (SEQ ID NO:7)經設計以移除見於天然蛋白質內之切割位點(*clipping site*)，及移除潛在甲硫胺酸(M1)甲醯化位點及N-199脫醯胺位點。AHA之優越品質及均勻性(*homogeneity*)係由材料品質檢查確定，結果顯示沒有見於hGDF15天然序列之切割、脫醯胺作用或甲硫胺酸氧化作用。

	MHHHHHHH-ARN-(200-308)-hGDF15	AHA-(200-308)-hGDF15
切割	R9/N10 (< 1%) N10/G11 (< 1%)	未檢測到
甲硫胺酸氧化作用	M1:12.0%氧化	N/A
N-199脫醯胺作用	N10:50.1%脫醯胺	N/A

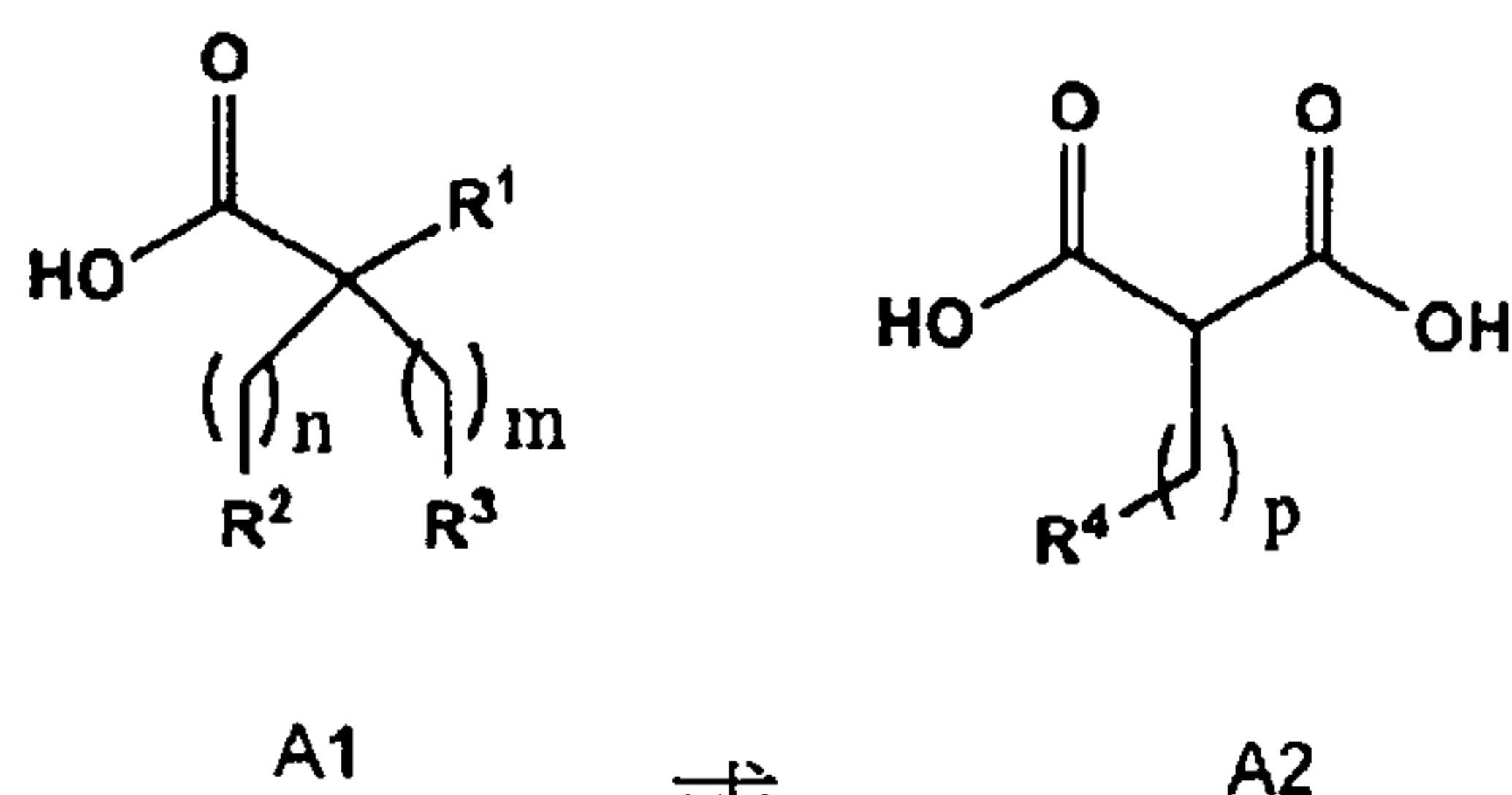
在實施例14中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共

軛物，其中該脂肪酸殘基係經由連接子連接肽或蛋白質之N端。在實施例15中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共軛物，其中該共軛物具有超過5 h之血漿穩定性半衰期。在此實施例之一態樣中，該共軛物具有超過10 h之血漿穩定性半衰期。在此實施例之另一態樣中，該共軛物具有超過20 h或超過30 h之血漿穩定性半衰期。在此實施例之另一態樣中，該共軛物具有超過40 h或超過50 h之血漿穩定性半衰期。

在實施例16中，本發明係關於一種如前述實施例中任一項之共軛物，其中血漿穩定性半衰期相比於非共軛生物分子提高2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍或75倍。

在另一實施例中，該生物分子、該連接子及該脂肪酸部分(R^1 至 R^4 、 n 、 m 、 p 及 A_k)係彼等在下文實例部分中所定義者。

在一實施例中，本發明係關於下式化合物：

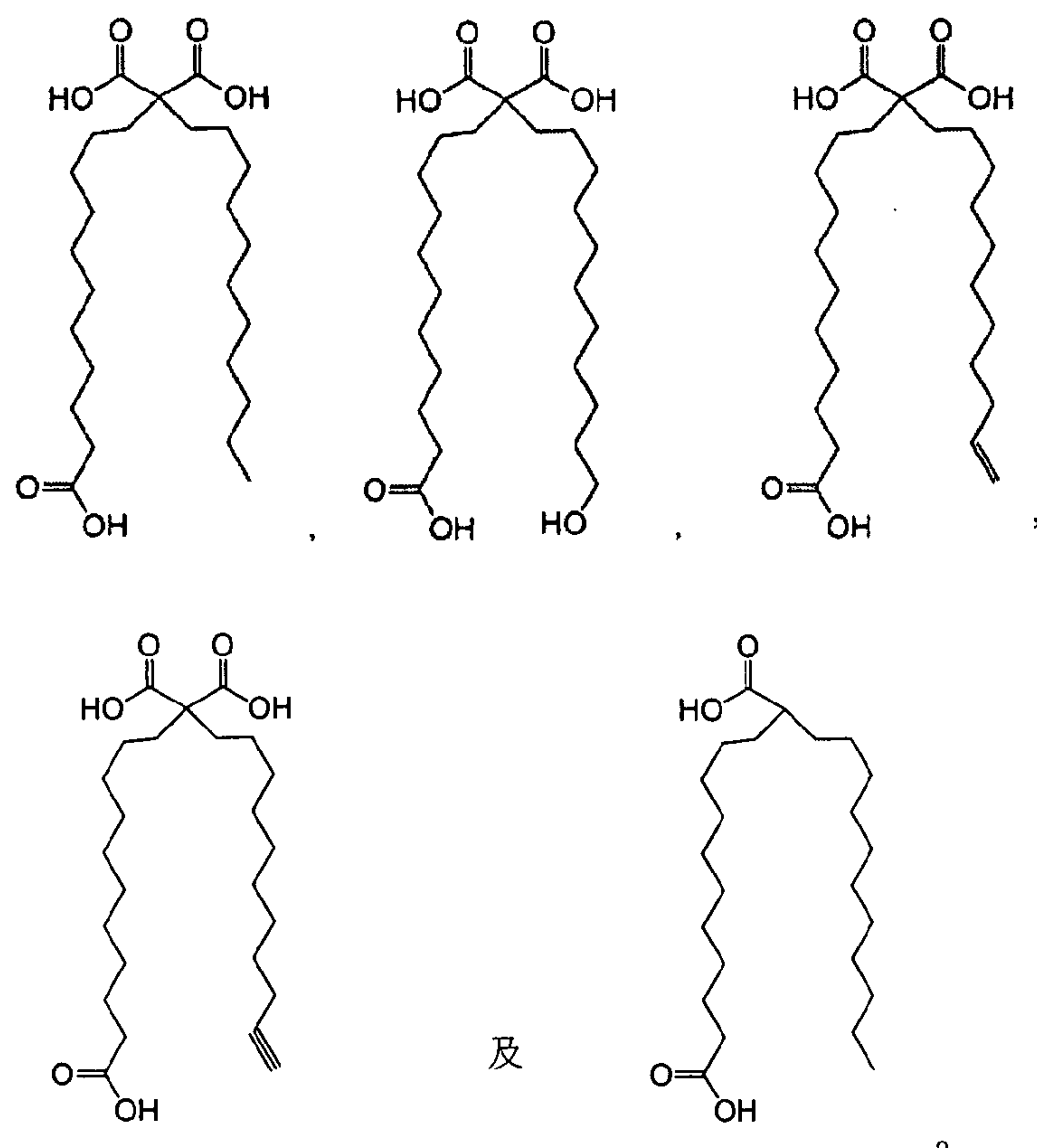


R^1 係 CO_2H 或 H ；

R^2 及 R^3 彼此獨立地為 H 、 OH 、 CO_2H 、 $-CH=CH_2$ 或 $-C\equiv CH$ ；限制條件為 R^2 及 R^3 不相同；

R^4 係 CO_2H ；

n 及 m 彼此獨立地為6與30間之整數；或其鹽胺、酯或醫藥上可接受的鹽。在此實施例之另一態樣中，本發明係關於一種式A1化合物，其中 R^2 及 R^3 中之至少一者係 CO_2H 。在此實施例之另一態樣中，本發明係關於一種選自由下列組成之群之化合物：



合成肽/多肽及/或其修飾形式

本發明肽或多肽可藉由合成化學程序或藉由重組法或兩種方法之組合生產。肽或多肽/蛋白質構築體可以全長製備，或者以非全長片段合成並接合在一起。本發明肽及多肽可藉由原本已知的肽合成程序生產。肽合成方法可為固相合成及液相合成中之任一者。因此，所欲肽及多肽可藉由縮合能夠構成蛋白質之部分肽或胺基酸與其剩餘部分來生產，且當產物具有保護基時，脫除該保護基，由此可製造期望肽。用於縮合及去保護之已知方法包括以下文獻(1)至(5)中所述之程序。

(1) M. Bodanszky and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York, 1966 ,

(2) Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York, 1965 ,

(3) Nobuo Izumiya等人，Fundamentals and Experiments in Peptide

Synthesis, Maruzen, 1975 ,

(4) Haruaki Yajima and Shumpei Sakakibara, Biochemical Experiment Series 1, Protein Chemistry IV, 205, 1977 , 及

(5) Haruaki Yajima (編) , Development of Drugs-Continued, 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten .

在反應後，可藉由習知純化技術(例如溶劑萃取、管柱層析、液相層析、尺寸排阻層析法及離子交換層析及重結晶)之組合來純化並單離肽或多肽。若如上文所單離之肽係游離化合物，則可藉由已知方法將其轉化成適宜鹽。相反，若所單離之產物係鹽，則可藉由已知方法將其轉化成游離肽。

可藉由使用適用於醯胺化之用於肽合成之樹脂來獲得多肽之醯胺。該樹脂包括氯甲基樹脂、羥甲基樹脂、二苯甲胺樹脂、胺基甲基樹脂、4-苄氧基苄醇樹脂、4-甲基二苯甲胺樹脂、PAM樹脂、4-羥基甲基甲基苯基乙醯胺基甲基樹脂、聚丙烯醯胺樹脂、4-(2',4'-二甲氧基苯基-羥甲基)苯氧基樹脂、4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-胺基甲基)苯氧基樹脂、2-氯三苯氯甲烷樹脂等。使用此樹脂，藉由本身已知之各種縮合技術，按照目標肽之序列使側鏈之 α -胺基及官能基團經適宜保護之胺基酸在該樹脂上縮合。在該系列反應結束時，自該樹脂去除肽或經保護之肽並去除保護基，且若需要形成二硫鍵以獲得目標多肽。

對於上述受保護胺基酸之縮合，可使用多種用於肽合成之活化試劑，諸如HATU、HCTU或例如碳二亞胺。碳二亞胺包括DCC、N,N'-二異丙基碳二亞胺及N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺。對於利用此試劑之活化，可使用外消旋化抑制劑添加劑，例如HOBt或Oxyma Pure。經保護之胺基酸可與活化試劑及外消旋化抑制劑一起直接添加至樹脂中或可預先活化為對稱酸酐、HOBt酯或HOObt酯，

然後添加至樹脂中。用於經保護之胺基酸之活化或與樹脂縮合之溶劑可自彼等已知可用於肽縮合反應之溶劑中適當地選擇。例如，可提及者係N,N-二甲基甲醯胺、N-甲基吡咯啉酮、氯仿、三氟乙醇、二甲亞砜、DMF、吡啶、二噁烷、二氯甲烷、四氫呋喃、乙腈、乙酸乙酯或其適宜混合物。反應溫度可選自迄今已知可用於肽鍵形成之範圍且通常係選自約-20℃至-50℃之範圍。活化胺基酸衍生物通常係以過量1.5倍至4倍之比例使用。若藉由測試發現利用茚三酮反應縮合不充分，則可在不去除保護基之情況下重複縮合反應以達成充分縮合。若重複縮合仍無法提供充分縮合度，則可用乙酸酐或乙醯基咪唑使未反應之胺基乙醯化。

用於起始材料胺基酸之胺基之保護基包括Z、Boc、第三戊氧基羰基、異苄基氧基羰基、4-甲氧基苄氧基羰基、CI-Z、Br-Z、金剛烷基氧基羰基、三氟乙醯基、鄰苯二甲醯基、甲醯基、2-硝基苯基亞磺醯基、二苯基硫磷基或Fmoc。可使用之羧基保護基包括(但不限於)上述C₁₋₆烷基、C₃₋₈環烷基及C₆₋₁₀芳基-C₁₋₂烷基以及2-金剛烷基、4-硝基苄基、4-甲氧基苄基、4-氯苄基、苯甲醯甲基、苄氧基羰基醯肼基、第三丁氧基羰基醯肼基及三苯甲基醯肼基。

絲胺酸及蘇胺酸之羥基可藉由酯化或醚化來保護。適用於該酯化之基團包括碳衍生之基團，例如低碳數烷醯基(例如乙醯基等)、芳醯基(例如苯甲醯基等)、苄氧基羰基及乙氧基羰基。適用於該醚化之基團包括苄基、四氫呋喃基及第三丁基。酪胺酸之酚羥基之保護基團包括Bzl、Cl₂-Bzl、2-硝基苄基、Br-Z及第三丁基。

組胺酸之咪唑之保護基團包括Tos、4-甲氧基-2,3,6-三乙基苯磺醯基、DNP、苄氧基甲基、Bum、Boc、Trt及Fmoc。

起始胺基酸之活化羧基包括相應酸酐、疊氮化物及活性酯，例如與諸如五氯苯酚、2,4,5-三氯苯酚、2,4-二硝基苯酚、氰基甲醇、對

-硝基苯酚、HONB、N-羥基琥珀醯亞胺、N-羥基鄰苯二甲醯亞胺、HOBt等醇形成之酯。起始胺基酸之活化胺基包括相應磷醯胺。

消除保護基之方法包括在觸媒(例如鈀黑或碳載鈀)存在下使用氫氣催化還原，用無水氫氟酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、三氟乙酸或該等酸之混合物進行酸處理，用二異丙基乙胺、三乙胺、哌啶、哌嗪進行鹼處理，在液氨中用金屬鈉還原。藉助上述酸處理之消除反應通常係在-20℃至-40℃之溫度下實施且可藉助添加諸如苯甲醚、苯酚、苯基甲基硫醚、間-甲酚、對-甲酚、二甲硫醚、1,4-丁二硫醇、1,2-乙二硫醇等陽離子受體有利地進行。用於保護組胺酸之咪唑基團之2,4-二硝基苯基可藉由用噻吩處理來消除，而用於保護色胺酸之吲哚基團之甲醯基可藉由在1,2-乙二硫醇、1,4-丁二硫醇存在下用稀氫氧化鈉溶液或稀氨水進行鹼處理以及上述酸處理來消除。

不應參與起始材料反應之用於保護官能基之方法、可使用之保護基、去除保護基之方法及活化欲參與反應之官能基之方法可全部自己知基團及方法中有判斷地選擇。

另一獲得多肽之醯胺形式之方法包括首先使C端胺基酸之-羧基醯胺化，然後延長N-側之肽鏈直至期望鏈長度，且然後選擇性地使C端肽之 α -胺基及欲形成目標多肽之剩餘部分之胺基酸或肽之 α -羧基去保護，並在混合溶劑(諸如上文所提及者)中縮合 α -胺基及側鏈官能基經上文所提及之適宜保護基保護之兩個片段。此縮合反應之參數可以與上文所述相同。藉由上述方法自藉由縮合獲得之經保護之肽去除所有保護基，藉此提供期望粗製肽。可藉由已知純化程序來純化此粗製肽並凍乾主要餾份以提供目標醯胺化多肽。為獲得多肽之酯，使C端胺基酸之 α -羧基與期望醇縮合，得到胺基酸酯且然後實施上文所述用於製造醯胺之程序。

或者，重組表現係尤其有用。此項技術中一般使用利用宿主細

胞(經人工設計以包含編碼肽序列之核酸且將轉錄及轉譯該肽及視情況將肽分泌至細胞生長培養基中的細胞)表現重組蛋白質。就重組生產過程而言，編碼肽之胺基酸序列之核酸通常將藉由習知方法合成，並整合至表現載體中。此等方法尤佳用於製造含融合至其他肽序列或其他蛋白質或蛋白質片段或結構域之肽之多肽組合物。宿主細胞視情況可為至少一種選自以下者：大腸桿菌、COS-1、COS-7、HEK293、BHT21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、heLa、骨髓瘤、淋巴瘤、酵母、昆蟲或植物細胞、或其任何衍生物、永生細胞或轉形細胞。

本發明亦涵蓋編碼上述變體之多核苷酸，其可呈RNA形式或呈DNA形式，其中DNA包括cDNA、基因組DNA及合成DNA。DNA可為雙鏈或單鏈。編碼本發明組合物之編碼序列可因遺傳密碼之豐餘性或簡併性而變化。

編碼本發明組合物之多核苷酸可包含以下：僅該變體之編碼序列、該變體之編碼序列及諸如功能多肽、或前導或分泌序列之其他編碼序列或原蛋白序列；該變體之編碼序列及非編碼序列(諸如內含子)或該變體之編碼序列之非編碼序列5'及/或3'。因此，術語「編碼變體之多核苷酸」涵蓋不僅可包括該變體之編碼序列之多核苷酸，而且亦包括含其他編碼及/或非編碼序列之多核苷酸。

本發明另外係關於所述編碼含所示取代之多肽之片段、類似物及衍生物之多核苷酸之變體。該多核苷酸之變體可係人類GDF15序列之天然對偶基因變體、非天然變體或如上所述截短變體。因此，本發明亦包括編碼上述變體之多核苷酸及此等多核苷酸之變體，該等變體編碼所揭示變體之片段、衍生物或類似物。此等核苷酸變體包括缺失變體、取代變體、截短變體及添加或插入變體，只要存在第一或第二實施例中所示胺基酸取代中之至少一者即可。

本發明多核苷酸將會在其序列以操作方式聯結至表現控制序列(經定位以確保其功能)之後在宿主中表現。此等表現載體通常可在宿主生物體中作為離合染色小體(episome)或作為宿主染色體DNA之組成部分複製。通常，表現載體將包含篩選標記(例如，四環素、新黴素及二氫葉酸還原酶)，以准許偵測彼等經期望DNA序列轉形之細胞。GDF15變體可在適宜啟動子控制下表現於哺乳動物細胞、酵母、細菌或其他細胞中。亦可使用無細胞轉譯系統，用衍生自本發明DNA構築體之RNA來生產此等蛋白。

大腸桿菌(*E. coli*)係尤其可用於選殖本發明多核苷酸之原核生物宿主。其他適合使用之微生物宿主包括枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)、鼠傷寒沙氏桿菌(*Salmonella typhimurium*)、及鋸桿菌屬(*Serratia*)、假單胞菌屬(*Pseudomonas*)、鏈球菌屬(*Streptococcus*)及葡萄球菌屬(*Staphylococcus*)之各種物種，但亦可使用其他宿主作為選擇。在此等原核生物中，亦可製造表現載體，其通常將包含與宿主細胞相容之表現控制序列(例如，複製起點)。此外，可存在任何數量眾所周知之啟動子，諸如乳糖啟動子系統、色胺酸(Trp)啟動子系統、 β -內醯胺酶啟動子系統或來自噬菌體 λ 或T7之啟動子系統。該等啟動子通常將控制表現，視情況具有操縱子序列，且具有核糖體結合位點序列與類似者，以起始及完成轉錄及轉譯。

熟習蛋白質表現技術者將瞭解，可在大腸桿菌中用於表現之成熟序列之N端引入甲硫胺酸或甲硫胺酸-精胺酸序列，且其涵蓋在本發明範圍內。因此，除非另有說明，否則表現在大腸桿菌中之本發明組合物在N端引入甲硫胺酸序列。

亦可使用其他微生物諸如酵母或真菌用於表現。畢氏酵母菌(*Pichia pastoris*)、釀酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)及安格斯畢赤酵母(*Pichia angusta*)係

較佳酵母宿主之實例，其中適宜載體具有表現控制序列，諸如啟動子，視需要包括3-磷甘油酸激酶或其他糖解酶及複製起點、終止序列與類似序列。黑麴黴(*Aspergillus niger*)、李氏木黴菌(*Trichoderma reesei*)及裂褶菌(*Schizophyllum commune*)係真菌宿主之實例，但亦可使用其他宿主作為選擇。

亦可使用哺乳動物組織細胞培養物表現及產生本發明多肽。此項技術中已開發出許多可分泌完整變體之適宜宿主細胞系，且包括CHO細胞系、各種COS細胞系、NSO細胞、敘利亞倉鼠卵巢細胞系、HeLa細胞或人類胚腎細胞系(亦即HEK293、HEK293EBNA)。

用於哺乳動物細胞之表現載體可包括表現控制序列(諸如複製起點、啟動子、增強子)及必要資訊處理位點(諸如核糖體結合位點、RNA剪接位點、聚腺苷酸化位點及轉錄終止子序列)。較佳表現控制序列係源自SV40、腺病毒、牛乳頭狀瘤病毒、細胞巨大病毒、勞氏(Raus)肉瘤病毒及類似者之啟動子。較佳的聚腺苷酸化位點包括源自SV40及牛生長激素之序列。

包含受關注的多核苷酸序列(例如，編碼本發明組合物及表現控制序列)之載體可依所熟知方法轉移至宿主細胞中，該等方法係根據細胞宿主之類型而改變。例如，氯化鈣轉染通常係用於原核細胞，然而磷酸鈣處理或電穿孔可用於其他細胞宿主。

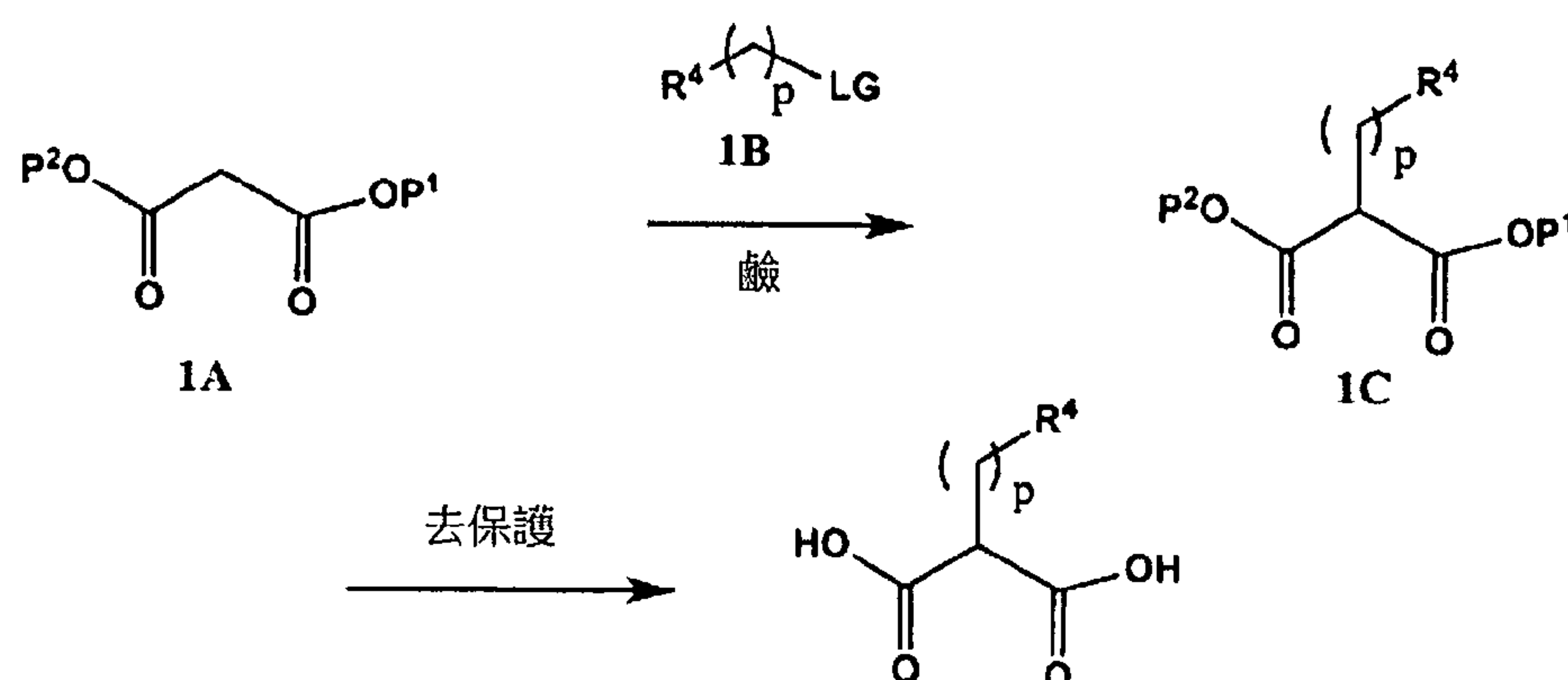
可利用各種不同蛋白純化方法，且此等方法為相關技藝熟知且述於(例如)Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-9 (1990)及Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, NY (1982)中。所選純化步驟將取決於(例如)用於本發明組合物之生產方法之本質。

可以實質上純淨或單離形式(例如，不含其他多肽)製得多肽。該等多肽可以相對於可能存在之其他組分(例如，其他多肽或其他宿主

細胞組分)係富含多肽地存在於組合物中。例如，可提供純化多肽，以使得該等多肽係以以下量存在於實質上不含其他表現蛋白質之組合物中：例如佔由其他表現蛋白質組成之組合物之少於90%、少於60%、少於50%、少於40%、少於30%、少於20%、少於10%、少於5%或少於1%。

合成脂肪酸部分

流程圖1描述式A2之脂肪酸部分之合成。



流程 1

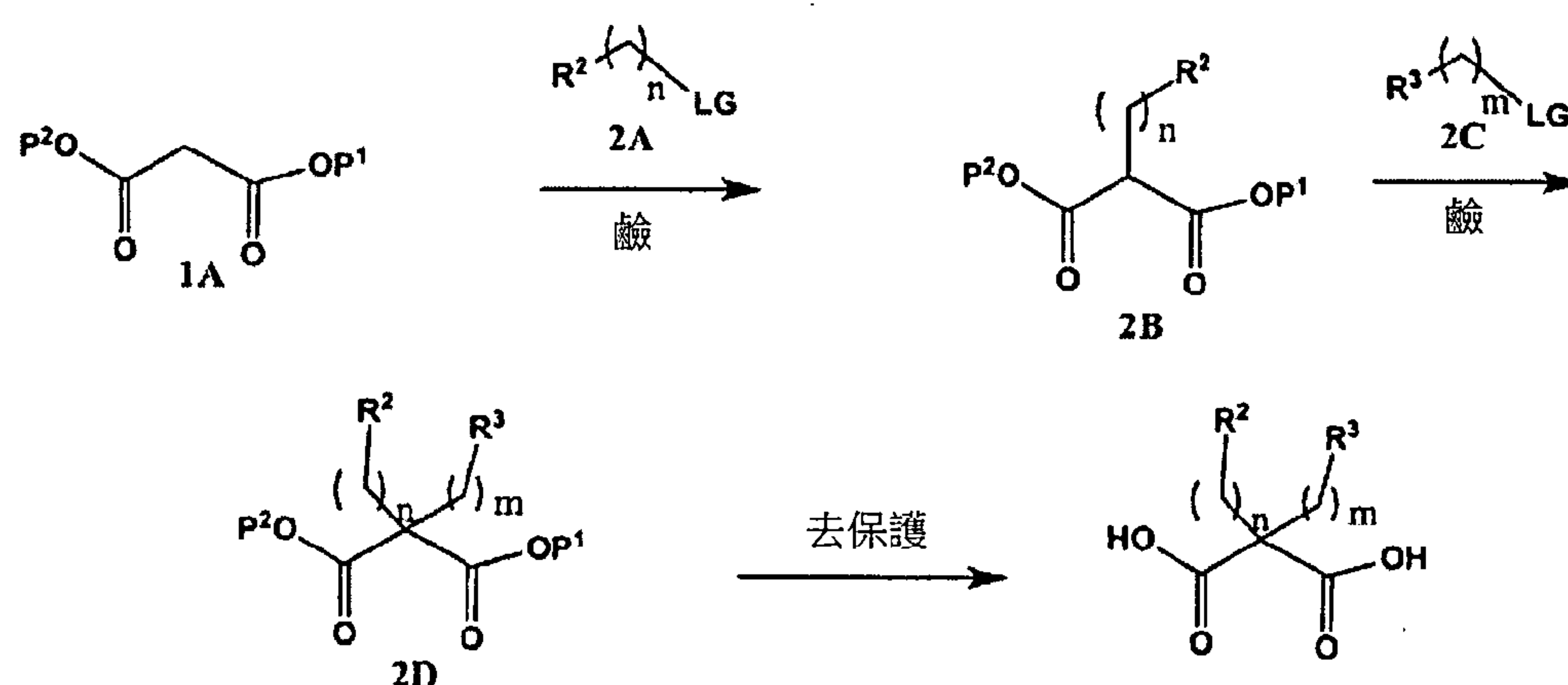
其中 P^1 及 P^2 係羧酸保護基，諸如例如甲基、乙基、第三丁基、甲氧基苄基、苄基、苄氧基、甲氧基甲基、甲基硫代甲基、四氫吡喃基、苯甲醯甲基、N-鄰苯二甲醯亞胺、肉桂基、三苯基甲基、9-蒎基甲基、胡椒基、三甲基矽烷基、第三丁基二甲基矽烷基或2-烷基1,3-噁唑啉；其中LG係離去基團，諸如例如鹵基(例如Br、Cl、I)或三氟甲磺醯氧基，且其中 R^4 及p係如實施例1中所述。

在溶劑(諸如DMF、THF或二甲基乙醯胺)中用烷基化劑(1B)，在鹼(例如氫化鈉、碳酸鉀或碳酸鈉、氫氧化鈉、二異丙基醯胺鋰、雙(三甲基矽烷基)醯胺鈉、雙(三甲基矽烷基)醯胺鉀、四甲基吡啶鋰、1,8-二氮雜環十一碳-7-烯、N,N-二異丙基乙胺或2,6-二第三丁基吡啶(putridine))存在下使經保護之丙二酸(1A)烷基化產生經保護之脂肪酸部分(1C)。當 R^4 係OH或 CO_2H 時，可能需要在烷基化步驟之前保護此

等官能基。此項技術中已知羥基之保護基，且係例如1.醚，諸如甲醚、甲氧基甲醚(MOM)、四氫吡喃基醚(THP)、第三丁醚、烯丙醚、苄基醚、第三丁基二甲基矽烷基醚、第三丁基二苯基矽烷基醚、三苄基矽烷基醚、異丙基二甲基矽烷基醚、三苯基甲基醚、硝基苄基醚，2.酯及碳酸酯，諸如乙酸酯、甲酸酯、三氯乙酸酯、苯氧基乙酸酯、特戊酸酯、苯甲酸酯、碳酸甲酯、碳酸苄酯、碳酸烯丙酯、硝酸酯、金剛烷酯(adamantate ester)、碳酸硝基苯酯(nitrophenyl carbonate)。

式A2之脂肪酸部分係藉由使用適宜去保護方法去保護得到。可應用標準方法，使用選自(但不限於)NaOH、KOH或LiOH之鹼或選自(但不限於)TFA、HCl或BCl₃之酸來使中間物(1C)水解。當P¹或P²係苄基或甲氧基苄基時，較佳去保護方法係在諸如(但不限於)碳載鈀之觸媒存在下氫化。

流程圖2說明式A¹之脂肪酸部分之合成，其中R¹係C(O)₂H。



流程2

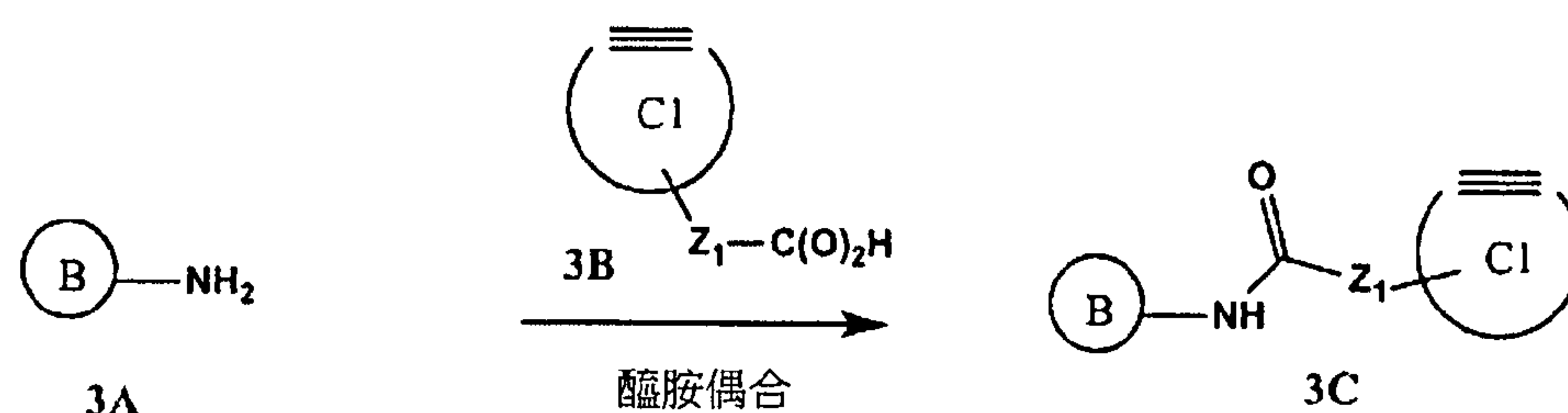
其中P¹及P²、LG係如上文所定義，且R²、R³、n及m係如實施例1中所定義。

在使用如上文在流程圖1中所述之適宜方法進行去保護之前，使用烷基化劑(2A)及(2C)使經保護之丙二酸(1A)經歷2個後續烷基化反應，其順序可顛倒。當R²及R³係OH或CO₂H時，可能需要在烷基化步

驟之前保護此等官能基。

式A¹之脂肪酸部分(其中R¹係H)可藉由使相應式A¹之脂肪酸部分(其中R¹係CO₂H)脫羧基製得。脫羧基條件係此項技術中所熟知，諸如例如在鹼性條件(例如氫氧化銨)下脫羧基。

合成生物分子-連接子構築體



流程3

其中B係生物分子或其修飾形式，Z¹係C₁-C₂₀伸烷基連接子，其中該伸烷基鏈視情況經側氧基(=O)取代，且其中一或多個碳經O或NH置換；且其中C1係視情況經氟取代之單環、二環或三環碳環或雜環系統。

環炔烴(3B)使用標準醯胺偶合方法經由其羧酸反應基連接至生物分子(3A)之胺基殘基(例如連接至N端之胺基官能性或離胺酸之側鏈)。可應用已知之偶合方法，包括(但不限於)用生物分子(3A)在存在或不存在鹼如三級胺(例如三乙胺或*N,N*-二異丙基乙胺)或K₂CO₃下將中間物(3B)轉化為其活化形式[例如轉化為相應吡咯啉-2,5-二酮(使用標準N-羥基琥珀醯胺化學)，或使用試劑如三光氣、羰基二咪唑、氯甲酸4-硝基苯酯或碳酸二琥珀醯亞胺酯使酸(3B)轉化，使用試劑如亞硫醯氯或草醯氯將該酸(3B)轉化至相應酸性鹵化物，或者使用試劑如ClC(O)O-異丁基、2,4,6-三氯苯甲醯氯或丙基膦酸酐環狀三聚物(T3P)將該酸(3B)轉化為相應混合酸酐，然後使噁唑啉-2,5-二酮、酸性鹵化物或混合酸酐反應]。或者，可在存在或不存在試劑如1-羥基苯并三

唑、1-羥基-7-氮雜苯并三唑或二甲基胺基吡啶下使用肽縮合試劑使生物分子**3A**與酸**3B**偶合，該試劑包括(但不限於)二環己基碳二亞胺(DCC)、二異丙基碳二亞胺(DIC)、1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺鹽酸鹽(EDC HCl)、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-叁-吡咯啶基磷(PyBOP)或六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-叁(二甲基胺基)磷(BOP)。較佳地，使用NHS化學使環炔烴/酸中間物(**3B**)轉化為其活性形式，然後與該生物分子上之胺基官能性反應。

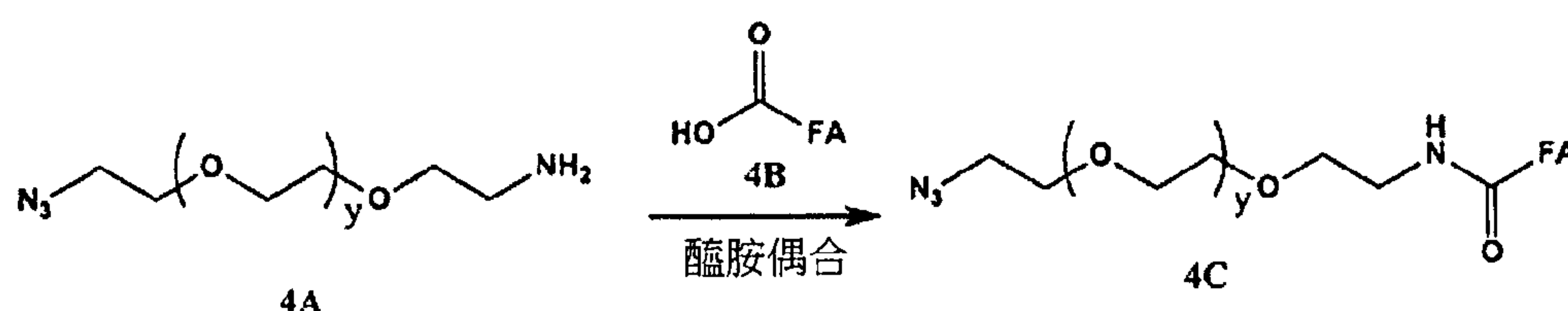
該生物分子之N端之胺基官能性之選擇性醯化已得到發展，並報導於同時申請之美國申請案第62/015,858號(代理人檔案PAT056275-US-PSP)及第62/082,337號(代理人檔案號PAT056275-US-PSP02)中。

該選擇性醯化涉及到經NHS活化之環辛炔類似物(**3B**之NHS衍生物)與其中N端已經修飾以包含鄰近N端胺基酸之組胺酸胺基酸之生物分子反應。當在pH 4下進行時，該反應對N端之胺基官能性具有高度選擇性，因為存在組胺酸胺基酸之鄰近效應(neighboring effect)。

合成脂肪酸殘基連接子構築體

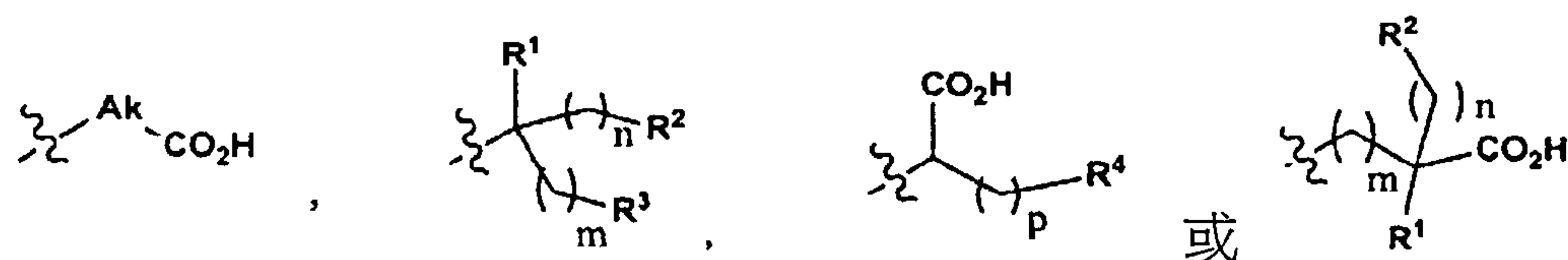
用於點擊化學之脂肪酸-連接子構築體

流程4描述具有末端疊氮基官能基之脂肪酸-PEG連接子構築體之合成。



流程4

其中y係0至34，且FA係如式A1、A2或A3中所述之脂肪酸部分，其係經由其一個羧酸官能性連接至PEG連接子，FA具有下式：

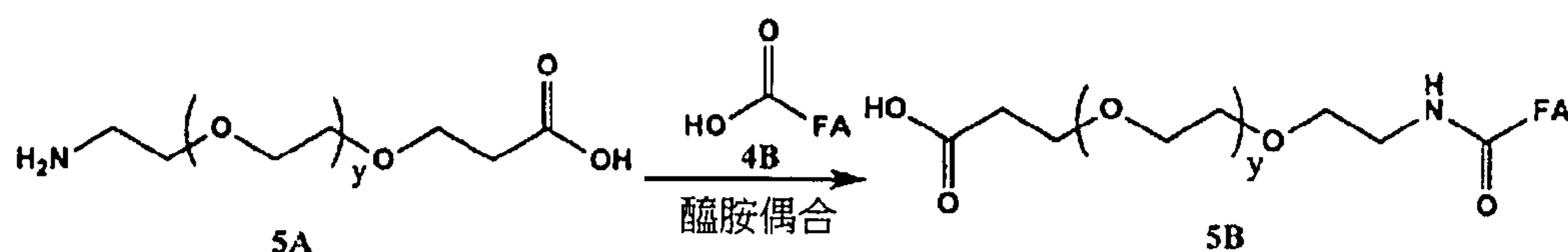


脂肪酸部分(4B)經由醯胺偶合反應連接至含PED連接子(4A)。已知的偶合方法已詳細描述在上文流程3中。較佳地，該脂肪酸部分上之酸官能性係使用NHS化學活化。

其中R¹係CO₂H，R₂、R₃及R₄係CO₂H或OH，保護基可能需在偶合反應之前引入，以控制反應位點。羧酸及羥基之保護基已描述在上文流程1中。或者，可使用NHS化學達成羧酸之選擇性活化。

● 用於直接連接至受關注生物分子之脂肪酸-連接子

流程5描述具有末端CO₂H官能基之脂肪酸-PEG連接子構築體之合成。



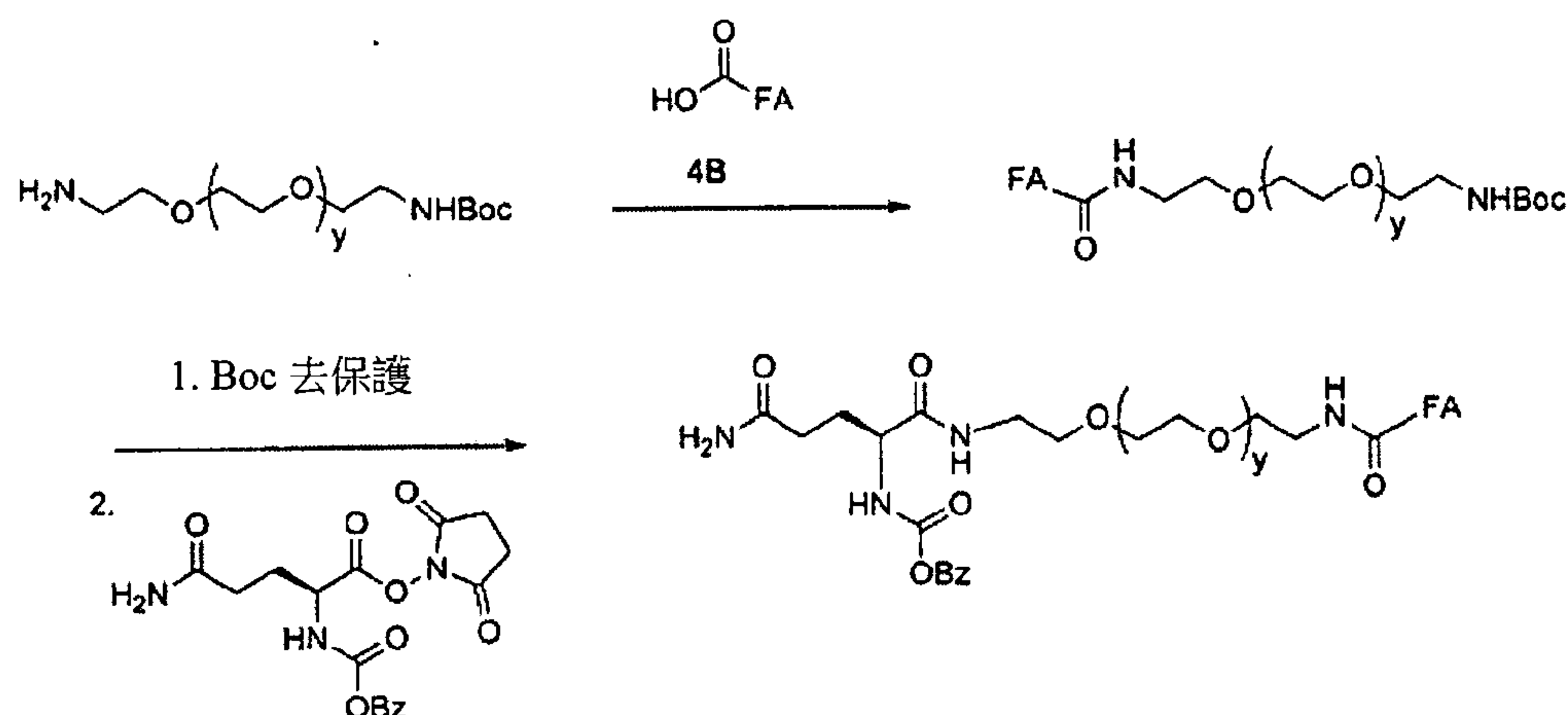
流程5

其中FA係如上文流程4中所定義，且y係0至34。

脂肪酸(4B)可使用上文所述醯胺偶合連接至含PED連接子(5A)。

● 用於使用轉麩醯胺酸酶連接至受關注生物分子之脂肪酸-連接子構築體

流程5A描述含麩胺酸胺基酸之脂肪酸-連接子構築體之製法，其容許在使用轉麩醯胺酸酶時定點選擇性修飾離胺酸。

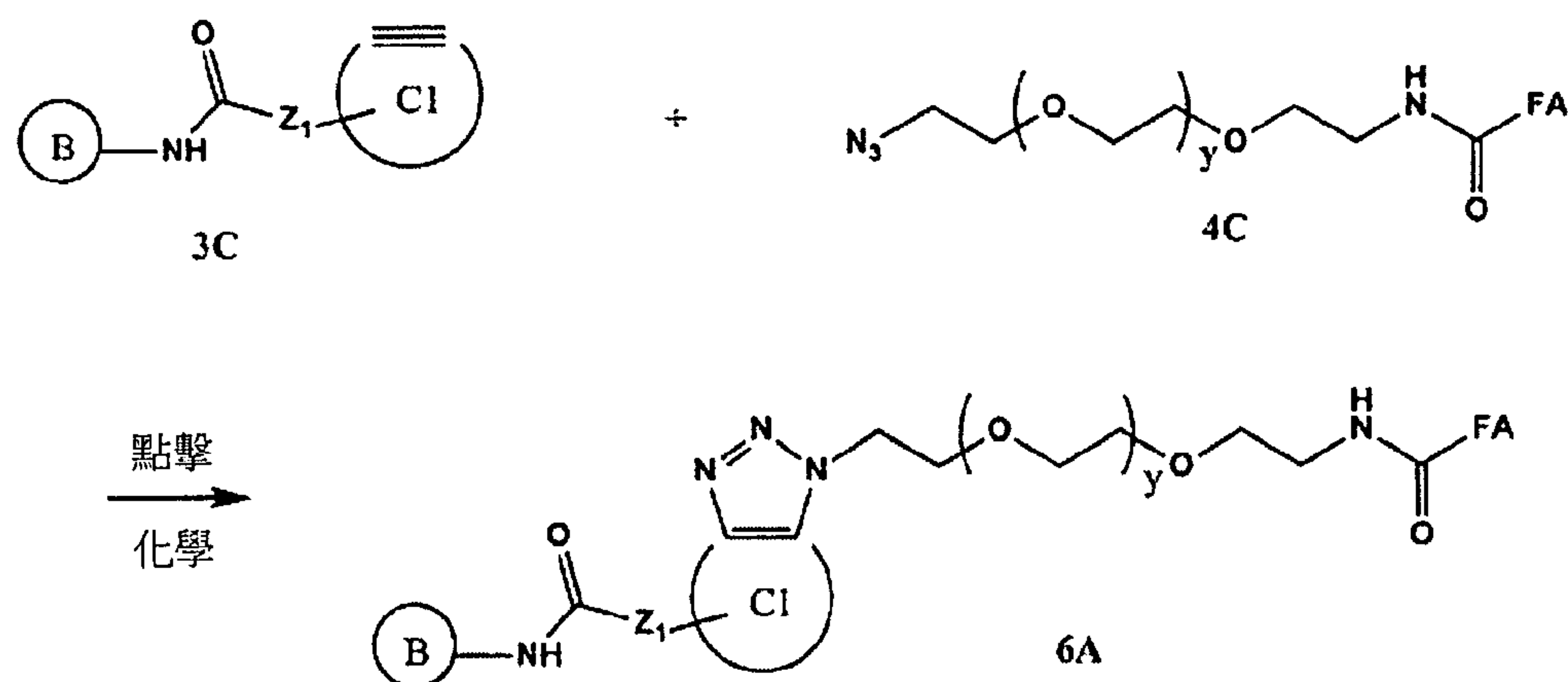


流程5B

其中y及FA係如先前所定義。此等構築體容許選擇性定點修飾離胺酸側鏈上之胺基。此轉麩醯胺酸酶選擇性定點修飾蛋白質已描述在2013年7月11日申請之美國申請案第61/845,273號(代理人檔案號PAT055641-US-PSP)中。

合成本發明共軛物

使用點擊化學進行共軛作用

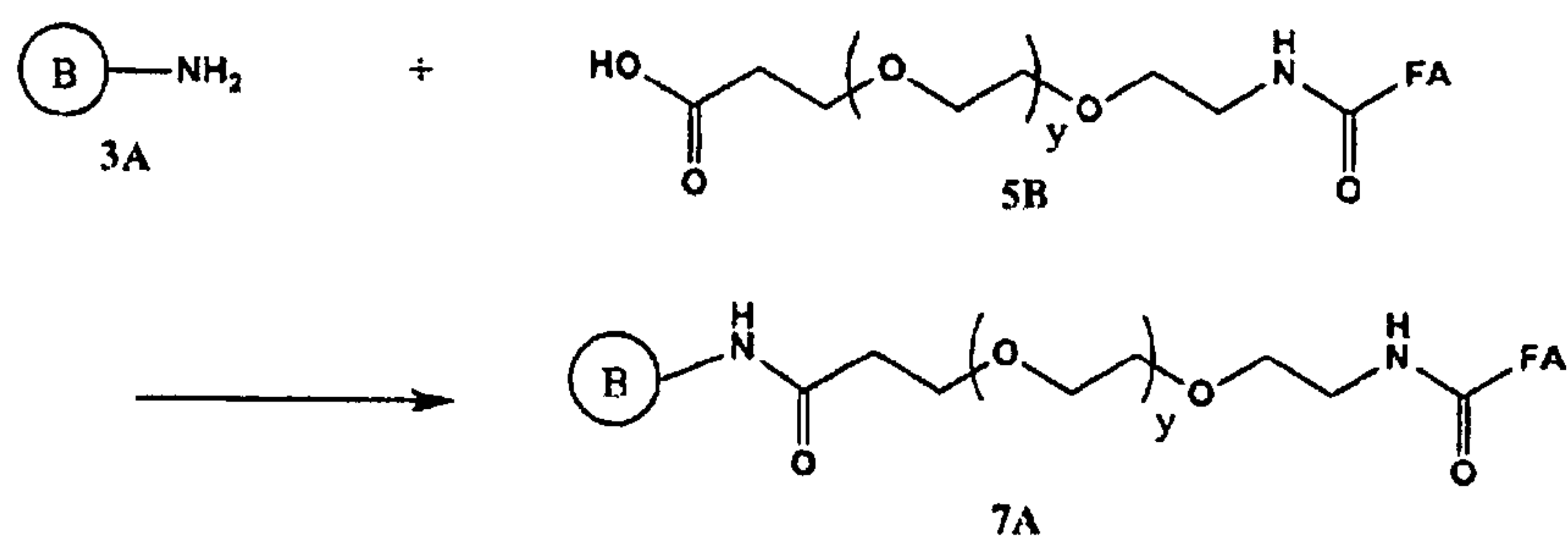


流程6

其中B係受關注之生物分子或其修飾形式(例如，突變體或含組胺酸標記之生物分子)，且y、C1、Z₁、FA及y係如上文所定義。

如點擊化學一樣，環炔烴構築體(3C)與脂肪酸-連接子構築體(4C)之末端疊氮化物進行Huisgen環化加成。點擊化學之實例已描述在US 2009/0068738中。

使用偶合條件經由直接連接進行共軛作用



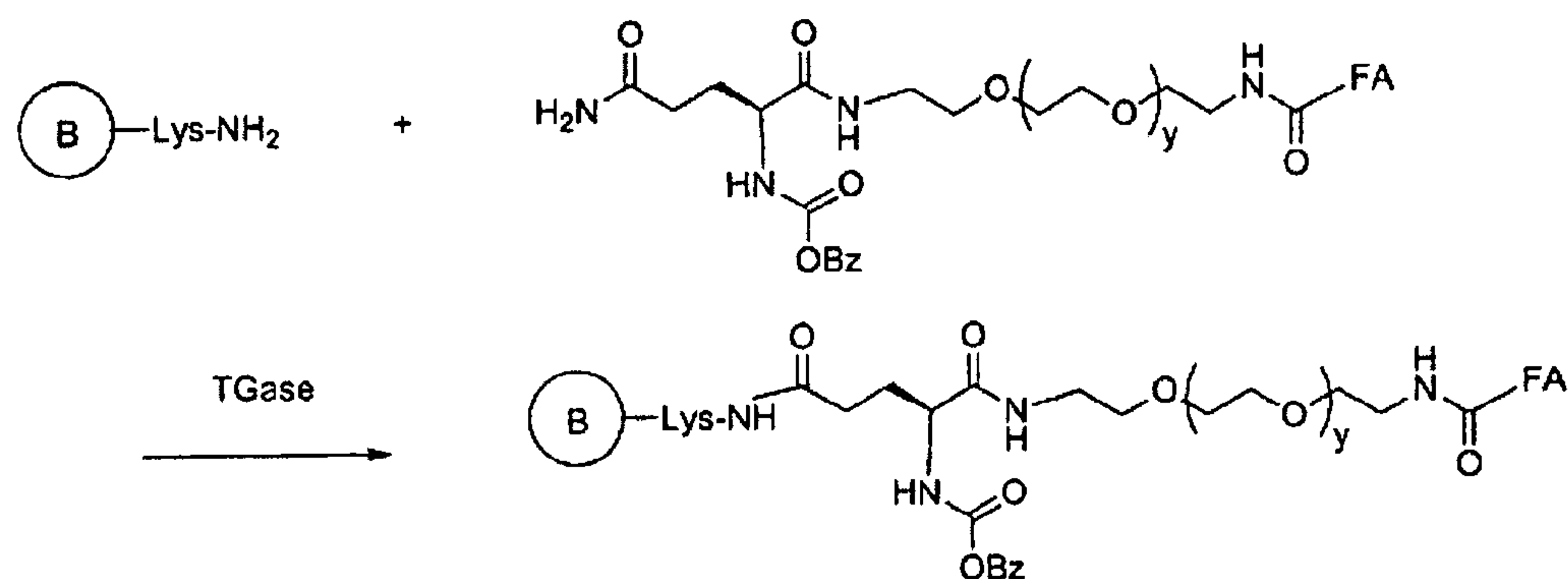
流程7

其中B係受關注之生物分子或其修飾形式(諸如例如，突變體及/或含組胺酸標記之生物分子)，且脂肪酸-連接子構築體係連接至該生物分子之N端。

脂肪酸-連接子構築體(5B)使用標準醯胺偶合方法經由其羧酸反應基連接至生物分子(3A)之胺基殘基(例如連接至N端之胺基官能性或離胺酸之側鏈)。已知的偶合方法已詳細描述在上文流程3中。較佳地，該脂肪酸-連接子構築體上之酸官能性係使用NHS化學活化。

該生物分子之N端之胺基官能性之選擇性醯化已得到發展，並報導於同時申請之美國申請案第62/015,858號(代理人檔案PAT056275-US-PSP)及第62/082,337號(代理人檔案號PAT056275-US-PSP02)中。該選擇性醯化涉及到經NHS活化化合物((5B)之NHS衍生物)與其中N端已經修飾以包含鄰近N端胺基酸之組胺酸胺基酸之生物分子之反應。當在pH 4下進行時，該反應對N端之胺基官能性具有高度選擇性，因為存在組胺酸胺基酸之鄰近效應。

使用轉麩醯胺酸酶進行共軛作用



流程7B

可使用轉麩醯胺酸酶實現對該生物分子之離胺酸側鏈之選擇性修飾。此修飾已報導於2013年7月11日申請之美國申請案第61/845,273號(代理人檔案號PAT055641-US-PSP)或WO 2015/006728 (在該申請案之實例25中)中。

醫藥組合物

本發明共軛物可以包括經皮下、經肌肉內、經靜脈內、經腹膜內、吸入、經鼻內、經口等在內之多種方式中之任一者投與。本發明之尤佳實施例採用連續靜脈內投與本發明共軛物或其醯胺、酯或鹽。本發明共軛物可作為丸藥(bolus)或作為連續輸注在一段時間內投與。可使用可植入式泵。在本發明之某些實施例中，間歇或連續共軛物投與持續一天至數天(例如，2天至3天或更多天)或更長時間段(例如，數週、數月或數年)。在一些實施例中，提供間歇或連續共軛物投與至少約3天，較佳至少約6天。在其他實施例中，提供間歇或連續共軛物投與至少約一週。在其他實施例中，提供間歇或連續共軛物投與至少約兩週。可能需在投與期間或在投與多個劑量之間維持平均血漿共軛物濃度高於特定臨限值。可基於(例如)個體之生理條件、疾病嚴重性等來確定期望濃度。此(等)期望值可藉由實施標準臨床試驗來確定。或者，肽及其共軛物可經由FcRn機制經口遞送。(Nat Rev Immunol. 7(9), 715-25, 2007 ; Nat Commun. 3;3:610, 2012, Am J Physiol

Gastrointest Liver Physiol 304: G262–G270, 2013)。

在另一態樣中，本發明提供包含本發明共軛物或其醯胺、酯或鹽及一或多種醫藥上可接受的載劑之醫藥組合物。可針對投與之特定途徑(諸如經口投與、皮下投與、非經腸投與及直腸投與等)調配該醫藥組合物。此外，可將本發明醫藥組合物製成固體形式(包括(但不限於)膠囊、錠劑、丸劑、粒劑、凍乾物、粉劑或栓劑)或液體形式(包括(但不限於)溶液、懸浮液或乳液)。該等醫藥組合物可經歷習知醫藥操作(諸如無菌製造、滅菌作用)及/或可包含習知惰性稀釋劑、塊狀物形成劑(cake forming agent)、張力劑、潤滑劑或緩衝劑及佐劑(諸如防腐劑、安定劑、潤濕劑、乳化劑及緩衝劑等)。

適合可注射應用之醫藥組合物通常包括無菌水溶液(當可溶於水時)或分散液及用於臨時配製無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。

對於靜脈內投與而言，適宜載劑包括生理鹽水、抑菌水、Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。在所有情形中，該組合物應係無菌，且應是流動程度可很容易藉由注射器注射之流體。較佳的醫藥調配物在製造及儲存之條件下為穩定，且必須抗微生物如細菌及真菌之污染作用而保存。一般而言，相關載劑可為包含(例如)水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液體聚乙二醇與類似物)及其適宜混合物之溶劑或分散介質。適度流動性之維持方法為(例如)藉由使用諸如卵磷脂之包衣、若為分散液則藉由維持所需之粒徑、及藉由使用界面活性劑。預防微生物作用之方法為藉由使用多種抗細菌劑及抗真菌劑，例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗壞血酸、硫柳汞及類似物。在許多情形下，較佳將在組合物中納入等滲劑(例如，糖、多元醇(例如甘露醇)、胺基酸、山梨醇、氯化鈉)。可藉由將可延遲吸收之製劑(例如，單硬脂酸鋁及明膠)納入組合物中來延長可注射組合物的吸收。在一些實施例中，可將多功能賦形

劑(諸如重組白蛋白)併入調配程序中，以促進共軛產品相對於降解或聚集作用穩定，改良溶解度及幫助活性組分之投與及釋放。(BioPharm International, 2012，第23卷，第3期，第40-44頁)。

某些可注射組合物係水性等滲溶液或懸浮液，且栓劑有利地係自脂肪性乳液或懸浮液製備。該等組合物可經滅菌及/或包含佐劑，諸如防腐劑、安定劑、潤濕劑或乳化劑、溶液促進劑、用於調節滲透壓的鹽及/或緩衝劑。另外，其等亦可包含其他具治療價值的物質。可分別根據習知混合、製粒或塗覆方法製備該等組合物，且其包含約0.1-75%或包含約1-50%的活性成分。

藉由將溶於適當溶劑中之所需量活性化合物併入含有上述成分中一種或其組合中，依需要，隨後進行過濾除菌，以製備出無菌可注射溶液。一般而言，分散液係藉由將活性化合物併入至無菌媒劑中製備而成，該載劑含有基本分散介質及上述所需之其他成分。以用於製備無菌可注射溶液之無菌粉劑之情形而言，較佳的製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥，其可產生含有活性成分及來自其先前經無菌過濾溶液中任一額外期望成分之粉劑。

口服組合物通常包括惰性稀釋劑或食用載劑。出於經口治療投與之目的，活性化合物可與賦形劑合併，且以錠劑、片劑或膠囊(例如，明膠膠囊)形式使用。口服組合物亦可使用漱口用流體載劑來製備。醫藥上相容的黏合劑及/或佐劑材料可作為組合物之一部分納入。錠劑、丸劑、膠囊、片劑及類似物可包括以下成分中之任一者或具有類似性質之化合物：黏結劑，諸如微晶纖維素、黃蓍膠或明膠；賦形劑，諸如澱粉或乳糖；崩解劑，諸如海藻酸、羧甲澱粉鈉(Primogel)或玉米澱粉；潤滑劑，諸如硬脂酸鎂或Sterotes；助流劑，諸如膠態二氧化矽；甜味劑，諸如蔗糖或糖精；或調味劑，諸如薄荷、水楊酸甲酯或橙香精。用於經口遞送之調配物可有利地納入各製

劑以改良在胃腸道內之穩定性及/或增強吸收。

對於藉由吸入投與而言，本發明治療劑較佳係自含有適宜推進劑(例如，諸如二氧化碳之氣體)之加壓容器或分配器或噴霧器以氣溶膠噴霧形式遞送。注意，肺為治療劑之全身遞送提供大的表面積。

可將該等製劑囊封於(例如)聚合微粒(諸如彼等於美國公開案20040096403所述者)中，或與業內已知之眾多其他藥物遞送媒劑中之任一者聯合。在本發明之其他實施例中，該等製劑係與如(例如)美國公開案20040062718中所述之帶電脂質聯合遞送。注意，後一系統已用於投與治療性多肽、胰島素，此表明此系統用於投與肽製劑之效用。

亦可藉由經黏膜或經皮方式來實施全身投與。

適用於經皮施用之組合物包括有效量的本發明共軛物及適宜載劑。適用於經皮遞送之載劑包括能協助透過主體皮膚之可吸收藥理上可接受之溶劑。例如，經皮裝置係呈包含襯底構件之繃帶、包含該化合物及視需要之載劑之儲集器、在延長時間段內以可控預定速率將該化合物遞送至主體皮膚之可選控速屏障及使該裝置固定至皮膚之構件的形式。

適用於局部施用(例如施用至皮膚及眼睛)的組合物包括水溶液、懸浮液、軟膏、乳膏、凝膠或可噴灑調配物，例如經氣溶膠或類似物遞送。此等局部遞送系統將尤其適用於真皮施用。因此，其等特別適用於局部用途，包括此項技術中熟知的化妝品、調配物。其等可包含增溶劑、安定劑、滲透增強劑、緩衝劑及防腐劑。

在某些實施例中，該醫藥組合物係用於皮下投與。業內已知適用於皮下投與多肽治療劑(例如，抗體、融合蛋白及類似物)之調配物組分及方法。參見(例如)公開之美國專利申請案第2011/0044977號及美國專利案第8,465,739號及美國專利案第8,476,239號。通常，用於

皮下投與之醫藥組合物包含適宜安定劑(例如，胺基酸如甲硫胺酸及或糖類如蔗糖)、緩衝劑及滲透劑。

如文中所使用，局部施用亦可關於吸入或鼻內施用。其等可在使用或不使用適宜推進劑的情況下自乾粉吸入器以乾粉形式(單獨或呈混合物形式，例如與乳糖之乾摻合料或混合組分顆粒(例如與磷脂))或自加壓式容器、泵、噴霧器(spray)、霧化器或噴霧器(nebulizer)以氣溶膠噴霧呈現形式便利地遞送。

本發明另外提供醫藥組合物及劑型，其包含降低作為活性成分之本發明化合物之分解速率之一或多種試劑。該等試劑(文中稱作「安定劑」)包括(但不限於)抗氧化劑(例如抗壞血酸)、pH緩衝劑或鹽緩衝劑、重組白蛋白。

如本文所使用，術語「醫藥上可接受的鹽」係指保留本發明共軛物之生物有效性及性質且通常在生物學上或其他方面係理想的鹽。在許多情況下，本發明共軛物可藉由存在的胺基及/或羧基或與其類似的基團形成酸式鹽及/或鹼式鹽。

可與無機酸及有機酸形成醫藥上可接受之酸加成鹽，例如乙酸鹽、天冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、溴化物/氫溴化物、碳酸氫鹽/碳酸鹽、硫酸氫鹽/硫酸鹽、樟腦磺酸鹽、氯化物/氫氯化物、氯茶鹼鹽、檸檬酸鹽、乙烷二磺酸鹽、富馬酸鹽、葡庚糖酸鹽、葡萄糖酸鹽、尿甘酸鹽、馬尿酸鹽、氫碘化物/碘化物、羥乙磺酸鹽、乳酸鹽、乳糖酸鹽、月桂硫酸鹽、蘋果酸鹽、馬來酸鹽、丙二酸鹽、杏仁酸鹽、甲磺酸鹽、甲基硫酸鹽、萘酸鹽、萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、十八酸鹽、油酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽、磷酸鹽/磷酸氫鹽/磷酸二氫鹽、聚半乳糖醛酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、琥珀酸鹽、磺基水楊酸鹽、酒石酸鹽、甲苯磺酸鹽及三氟乙酸鹽。

可衍生鹽之無機酸包括(例如)鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸

及類似物。

可衍生鹽之有機酸包括(例如)乙酸、丙酸、乙醇酸、草酸、馬來酸、丙二酸、琥珀酸、富馬酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、杏仁酸、甲磺酸、乙磺酸、甲苯磺酸、磺基水楊酸及類似物。可與無機鹼及有機鹼形成醫藥上可接受之鹼加成鹽。

可衍生鹽之無機鹼包括(例如)銨鹽及週期表之第I至XII列的金屬。在某些實施例中，該等鹽係衍生自鈉、鉀、銨、鈣、鎂、鐵、銀、鋅及銅；特別適宜的鹽包括銨鹽、鉀鹽、鈉鹽、鈣鹽及鎂鹽。

可衍生鹽之有機鹼包括(例如)一級胺、二級胺及三級胺、經取代之胺(包括天然生成型經取代之胺)、環狀胺、鹼離子交換樹脂及類似物。某些有機胺包括異丙胺、苜星、膽鹼鹽(choline)、二乙醇胺、二乙胺、離胺酸、葡甲胺、哌嗪及緩血酸胺。

可藉由習知化學方法自母體化合物、鹼性或酸性部分合成本發明之醫藥上可接受的鹽。通常，可藉由使此等化合物之游離酸形式與化學計量量的適當鹼(諸如Na、Ca、Mg或K之氫氧化物、碳酸鹽、碳酸氫鹽或類似物)反應或藉由使此等化合物之游離鹼形式與化學計量量的適當酸反應來製備該等鹽。該等反應通常係於水中或有機溶劑中或兩者之混合物中進行。通常，若可行，則希望使用非水性介質，例如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、異丙醇或乙腈。其他適宜鹽之清單可見(例如)於「Remington's Pharmaceutical Sciences」，第20版，Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985)；及Stahl及Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)之「Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use」中。

如文中所使用，術語「醫藥上可接受之載劑」包括任何及所有溶劑、分散介質、塗料、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗細菌劑、抗真菌劑)、等滲劑、吸收延緩劑、鹽、防腐劑、藥物、藥物

安定劑、黏結劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、染料、多功能賦形劑(諸如重組白蛋白)及類似物及其組合，如熟習此項技術者將已知(參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 Mack Printing Company, 1990, 第1289-1329頁)。除任何習知載劑與該活性成分不相容以外，考慮其於治療或醫藥組合物中之用途。

本發明方法

據報導，GDF15循環濃度在多種病理及生理條件中升高，最顯著地係妊娠(Moore AG 2000. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4781-4788)、 β -地中海貧血症(Tanno T 2007, *Nat Med* 13:1096-101) (Zimmermann MB, 2008 *Am J Clin Nutr* 88:1026-31)及先天性紅細胞生成障礙性貧血(Tamary H 2008, *Blood*. 112:5241-4)。在文獻報告中，亦已將GDF15與多種生物活性聯繫在一起。GDF15剔除及轉基因小鼠之研究表明，GDF15可防護缺血/再灌注或超負荷誘導之心臟損傷(Kempf T, 2006, *Circ Res*.98:351-60) (Xu J, 2006, *Circ Res*. 98:342-50)、防護衰老相關性運動神經元及感覺神經元喪失(Strelau J, 2009, *J Neurosci*. 29: 13640-8)、輕微地防護腎臟代謝性酸血症，且可在癌症患者中導致惡病質(Johnen H 2007 *Nat Med*. 11: 1333-40)。許多小組亦研究GDF15在細胞凋亡及增殖中之作用，且使用不同細胞培養物及異種移植模型報導爭議性結果。對轉基因小鼠之研究顯示，GDF15可防護腸及肺中之致癌物或Ape突變誘導之細胞增生(Baek SJ 2006, *Gastroenterology*. 131: 1553-60；Cekanova M 2009, *Cancer Prev Res* 2:450-8)。

亦據報導，GDF15在炎症、癌症及代謝中起作用(Samule Breit等人Growth Factors, 2011年10月；29(5): 187-195)。GDF15另外與生理食慾及體重之調節有關(Vicky Wang-Wei Tsai等人Public Library of Science: PLOS ONE 2013, 第8卷, 第2期, e55174)。

本發明提供治療或預防有此需求之個體中之以下疾病之方法：

代謝病症或疾病、糖尿病、第2型糖尿病、肥胖症、胰臟炎、異常血脂症、酒精性及非酒精性脂肪肝病/脂肪肝炎及其他進行性肝病、胰島素抗性、高胰島素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、動脈粥樣硬化、周邊動脈疾病、中風、心臟衰竭、冠心病、糖尿病併發症(包括(但不限於)慢性腎病)、神經病、胃輕癱及其他代謝病症；其包括：向該個體投與治療有效量之本發明共軛物或其醯胺、酯或鹽或者共軛物混合物，其中該生物分子係人類生長分化因子15 (GDF15)、其同系物、變體、突變體、片段及其他修飾形式。

此等方法可具有有利效果，諸如例如降低投與頻率。

因此，作為另一實施例，本發明提供如本文所述共軛物、或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽或者本文所述共軛物混合物之用途，其中該生物分子係人類生長分化因子15 (GDF15)、其同系物、變體、突變體、片段及其他修飾形式，其係用於治療代謝病症或疾病、第2型糖尿病、肥胖症、胰臟炎、異常血脂症、酒精性及非酒精性脂肪肝病/脂肪肝炎及其他進行性肝病、胰島素抗性、高胰島素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、動脈粥樣硬化、周邊動脈疾病、中風、心臟衰竭、冠心病、糖尿病併發症(包括(但不限於)慢性腎病)、神經病、胃輕癱及其他代謝病症。

因此，作為另一實施例，本發明提供共軛物或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽、或共軛物混合物在療法中之用途。

欲在治療上採用之本發明醫藥組合物或組合之有效量將取決於(例如)治療範疇及目標。熟習此項技術者將瞭解，適宜之治療劑量水平因此將部分取決於所遞送分子、所使用共軛物之適應症、投與途徑、患者之身材(體重、體表面或器官大小)及狀況(年齡及一般健康)。因此，臨床醫師滴定劑量並修改投與途徑來得到最佳治療效

果。典型劑量可介於約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 上至約100 mg/kg 或更多之範圍內，端視上述因素而定。在其他實施例中，該劑量可介於0.1 $\mu\text{g/kg}$ 上至約100 mg/kg ；或1 $\mu\text{g/kg}$ 上至約100 mg/kg 之範圍內。在此實施例之另一態樣中，該劑量可介於5 $\mu\text{g/kg}$ 至25 $\mu\text{g/kg}$ 之範圍內。在此實施例之另一態樣中，該劑量可介於10 $\mu\text{g/kg}$ 至20 $\mu\text{g/kg}$ 之範圍內。

用藥頻率將取決於所用調配物中雙功能蛋白質之藥物動力學參數。通常，臨床醫師將投與該組合物，直至達到實現期望效果之劑量。因此，該組合物可以單一劑量、以兩個或更多個經時劑量(其可包含或不包含相同量之期望分子)或經由植入裝置或導管以連續輸注投與。適宜劑量之其他精修一般係由一般技術者進行，且係在其日常任務範圍內。適宜劑量可透過使用適宜劑量-反應數據確定。

如本文所使用，術語「治療有效劑量」及「治療有效量」意指共軛物在組織系統、動物或人類中引起研究者、內科醫生或其他臨床醫師所尋求之生物或醫學反應之量，該反應包括減輕或改善所治療疾病或病症之症狀，亦即GDF15 (或GDF15突變體)多肽共軛物支持一或多種期望生物或醫學反應(例如降低血糖、胰島素、三酸甘油酯或膽固醇濃度；減輕體重；減少食物攝入或改良葡萄糖耐受性、能量消耗或胰島素敏感性)之可觀測水平之量。

術語「患者」或「個體」可互換地指人類或非人類動物(例如，哺乳動物)。

如文中所使用，在一實施例中，術語「治療(treat)」、「治療(treating)」或「治療(treatment)」任何疾病或病症係指改善該疾病或病症(即減緩或阻止或減少該疾病或其臨床症狀中之至少一者的發展)。在另一實施例中，「治療(treat)」、「治療(treating)」或「治療(treatment)」係指緩解或改善至少一種物理參數(包括彼等無法被患者識別的參數)。在又一實施例中，「治療(treat)」、「治療(treating)」或

「治療(treatment)」係指以物理方式(例如穩定可識別症狀)、生理方式(例如穩定物理參數)或兩者調節該疾病或病症。因此，治療包括抑制(亦即阻止該疾病、病症或病狀或與之相關之臨床症狀之發展或進一步發展)活性疾病(例如，在GDF15共軛物之情形下，為了減輕體重、減少食物攝入、降低血流中胰島素及/或葡萄糖之濃度、增加葡萄糖耐受性以最大限度減小葡萄糖濃度波動及/或防護由葡萄糖穩態干擾所引起之疾病)。

在另一實施例中，「治療(treat)」、「治療(treating)」或「治療(treatment)」係指預防或延緩該疾病或病症的出現或發展或進展。

如本文所使用之術語「需要治療」係指由內科醫生或其他護理者判斷個體需要治療或將由此受益。此判斷係基於內科醫生或護理者專業領域內之各種因素作出。

術語「預防(prevent)」、「預防(preventing)」、「預防(prevention)」及類似用語係指以某一方式(例如，在出現疾病、病症、病狀或其症狀之前)起始，以暫時或永久性預防、壓制、抑制或減少患者發展疾病、病症、病狀或類似者之風險(其係由(例如)不存在臨床症狀判斷)或延遲其出現(一般係在個體易患上特定疾病、病症或病狀之情境中)之作用過程(諸如投與本發明共軛物或包含共軛物之醫藥組合物)。在某些情形下，該等術語亦係指減緩該疾病、病症或病狀之進展或者抑制其進展為有害或要不然非期望狀態。

術語「代謝疾病或病症」係指相關特徵集群，包括(但不限於)高胰島素血症、葡萄糖耐受異常、肥胖症、脂肪重新分佈至腹部或上身間室、高血壓、特徵為高三酸甘油酯、低高密度脂蛋白(HDL)-膽固醇、高小密低密度脂蛋白(LDL)顆粒之異常血脂症。患有代謝疾病或病症之個體具有發展第2型糖尿病及例如動脈粥樣硬化之風險。

片語「葡萄糖代謝障礙」涵蓋具有以下特徵之任何病症：與個

體中相對於健康個體之高葡萄糖濃度及/或高胰島素濃度有關之臨床症狀或臨床症狀組合。高葡萄糖及/或胰島素濃度尤其可表現為如下疾病、病症及病狀：高血糖症、第II型糖尿病、妊娠糖尿病、第I型糖尿病、胰島素抗性、葡萄糖耐受不良、高胰島素血症、葡萄糖代謝受損、前期糖尿病、代謝病症(諸如代謝疾病或病症，亦稱其為症候群X)及肥胖症。本發明GDF15共軛物及其組合物可用於(例如)實現及/或維持葡萄糖穩態，例如降低血流中之葡萄糖濃度及/或將胰島素濃度降低至見於健康個體之範圍。

如本文所使用之術語「胰島素抗性」係指正常胰島素量無法產生正常生理或分子反應之狀態。在某些情形下，高生理學量之胰島素(無論內源產生或外源投與)可完全或部分克服胰島素抗性，並產生生物反應。

如本文所使用，片語「葡萄糖耐受性」係指個體在葡萄糖攝入波動時控制血漿葡萄糖及/或血漿胰島素濃度之能力。例如，葡萄糖耐受性包括個體在約120分鐘內將血漿葡萄糖濃度降回至攝入葡萄糖前測定之濃度之能力。

術語「葡萄糖不耐症」或「葡萄糖耐受性不良(IGT)」係與心血管病理風險增加有關之血糖代謝障礙之糖尿病前期狀態。糖尿病前期狀況防止個體有效將葡萄糖移至細胞中，並將其用作有效燃料源，從而導致血液中之葡萄糖濃度增加及一定程度胰島素抗性。

術語「第2型糖尿病」係特徵為產生過量葡萄糖且循環葡萄糖濃度由於葡萄糖清除不充分及胰臟不能產生足夠胰島素而維持過高狀態。

如本文所使用之術語「高血糖症」係指個體血漿中相對於健康個體葡萄糖之循環量升高之狀態。高血糖症可利用此項技術中已知之方法診斷，包括測量如上所述禁食血糖濃度。

術語「低血糖症」(亦稱為低血糖)出現在血糖濃度下降過快而無法為身體活動提供足夠能量之時。

如本文所使用之術語「高胰島素血症」係指在血糖濃度升高或正常的同時循環胰島素濃度升高之狀態。高胰島素血症可由胰島素抗性所引起，胰島素抗性與以下有關：異常血脂症，諸如高三酸甘油酯、高膽固醇、高低密度脂蛋白(LDL)及低高密度脂蛋白(HDL)；高尿酸濃度；多囊卵巢症候群；第II型糖尿病及肥胖症。高胰島素血症可診斷為血漿胰島素濃度高於約2 pU/mL。

術語「胰臟炎」係胰臟炎症。

術語「異常血脂症」係脂蛋白代謝之失調(包括脂蛋白過度產生或缺乏)。異常血脂症可表現為血液中總膽固醇、低密度脂蛋白(LDL)膽固醇及三酸甘油酯濃度之增加、及高密度脂蛋白(HDL)膽固醇濃度之降低。

術語「脂肪肝病(FLD)」(亦稱為脂肪肝)是三酸甘油酯脂肪大液泡經由脂肪變性過程累積在肝細胞中(亦即，脂質不正常滯留在細胞中)之狀況。儘管具有多種病因，但脂肪肝可視為全世界範圍內發生在彼等酒精攝入過量及肥胖者(存在或不存在胰島素抗性胰島素效應)中之單一疾病。當此脂肪代謝過程受到干擾時，脂肪可在肝臟中過量累積，從而導致脂肪肝。脂肪累積亦可伴隨肝臟之進行性炎症(肝炎)，稱為脂肪肝炎。藉由考量酒精之貢獻，脂肪肝可稱為酒精性脂肪變性或非酒精性脂肪肝病(NAFLD)，且更嚴重形式稱為酒精性脂肪肝炎及非酒精性脂肪肝炎(NASH)。

術語「脂肪肝炎」係一類特徵為肝細胞脂肪變化伴隨著小葉內炎症及纖維化之肝病。當與過量酒精攝入無關時，稱為非酒精性脂肪肝炎(NASH)。

術語「進行性肝病」係由廣泛自相對良性狀態如肝脂肪變性進

行至較嚴重狀態(包括肝炎、纖維化、硬化及肝細胞癌)之肝病理所引起之肝病。PNPLA3已明確與進行性肝病如NAFLD/NASH、AFLD/ASH、病毒性肝炎、威爾遜氏(Wilson's)病、遺傳性血色素沉著病及原發性硬化性膽管炎聯繫在一起(Paola Dongiovanni等人 World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(41), 6969-6978)。

就人類個體而言，術語「肥胖症」可定義為身體質量指數(BMI)為30或更大之成年人(Centers for Disease Control and Prevention)。「代謝症候群」可定義為一群增加心臟病及其他疾病(如糖尿病及中風)之風險之風險因子。此等風險因子包括：高血糖--禁食後至少110毫克/分升(mg/dl)；高三酸甘油酯--血流中至少150 mg/dL；低HDL--小於40 mg/dl；及130/85 mmHg或更高之血壓(World Health Organization)。

術語「心血管疾病」係與心臟或血管相關之疾病。

術語「動脈粥樣硬化」係特徵為不規則分佈之脂質沉積物於大型及中型動脈之血管內膜中，有時導致動脈管腔狹窄並最終發展為纖維化及鈣化之血管疾病。病灶通常係局部，且緩慢及間歇地進展。血流之限制導致大多數臨床表現，其隨著病灶之分佈及嚴重性而不同。

術語「冠心病」(亦稱為冠狀動脈疾病)係供應血液及氧氣至心臟之小血管變窄。

「糖尿病併發症」係由高血糖濃度所引起其他身體功能之問題，如腎臟、神經(神經病)、足(足潰瘍及血液循環不良)及眼睛(例如視網膜病變)。糖尿病亦增加心臟病及骨頭及關節病症之風險。糖尿病之其他長期併發症包括皮膚問題、消化問題、性功能障礙以及牙齒及齒齦問題。

如本文所使用，片語「體重病症」係指與體重過量及/或食慾增強有關之狀況。使用各種參數來確定個體是否相較於參考健康個體超重：包括個體之年齡、身高、性別及健康狀態。例如，可藉由評估個

體之身體質量指數(BMI)判斷個體超重或肥胖，身體質量指數係由個體重量(公斤)除以個體身高(米)平方計算。BMI在約18.5至約24.9 kg/m之成年人視為具有正常體重；BMI在約25與約29.9 kg/m之間之成年人可視為超重(肥胖前期)；BMI為約30 kg/m或更高之成年人可視為肥胖。食慾增強常常促進體重過量。有幾種與食慾增強有關之狀況：包括例如夜食症候群，其特徵為早晨食慾不振且夜晚貪食，常與失眠有關，但可能與下丘腦損傷相關。

除非本文另有指明或者與上下文明顯矛盾，否則本文中所述之所有方法均可以任何適宜順序進行。文中所提供的任何及所有實例或示例性語言(例如「諸如」)的使用係僅意欲更充分地闡述本發明且不限制原本主張之本發明之範圍。

本發明共軛物之活性及血漿穩定性可藉由下文所述以下方法評估。

分析及數據

可藉由下文所述以下活體外及活體內方法評估本發明實例1及19B之GDF15共軛物之活性及血漿穩定性。

動物研究方法

此文件中所述所有動物研究均按照地方及聯邦法規及指南，得到 Novartis 的生物醫藥研究所動物管理委員會 (Institutes for Biomedical Research Animal Care and Use Committee)機構批准。自 Taconic購得食源性肥胖雄性小鼠(C57BL/6NTac)，並自6週齡開始餵食60%脂肪飲食(Research Diets D12492i)。到達後，將小鼠圈養在12h:12h逆光暗循環下，每個籠子一隻動物。所有小鼠在任何使用前接受最少1週適應。通常在3至4個月大之間研究小鼠。在研究前一天，基於體重將小鼠隨機分組，以使得各組具有類似平均體重。在研究當天，將小鼠置於新籠子中，並移除先前食物。大約1 h後及黑暗

循環之前，小鼠立即接受單一皮下劑量之媒劑(30 mM乙酸鈉，pH 4)或脂質共軛GDF15類似物(0.5 mg/kg)。所有注射完成後，重新秤量小鼠體重，並恢復預定量之食物(約50 g/小鼠)。在約2週過程中，在圖式中所示時間測量食物攝入及體重。在如上所述處理之替代動物中，在所示時間收集血漿，並藉由ELISA，按照製造商說明書測量GDF15濃度(R&D系統Quantikine人類GDF15免疫分析；DGD150)。

DIO小鼠單一0.5 mg/kg sc劑量

在上述分析中測試本發明共軛物之活性及半衰期。

表1

共軛物 (實例)	PK (半衰期) (hr)	作用時間	
		食物攝入(FI)減少(天數)	體重(BW)下降(天數)
1	36	6	8
2		8	8
4	15.1	3	3
5	33.1	8	8
6		3	3
7	21.8	6	6
12		6-8	6-8
13	45.8	8-10	10
15*		2	6
16		6	6
18	55	8-10	10
19A		8	10
19B粗物質	86.4	8	14
19B1	56.9 (實驗1)	14 (實驗1)	14 (實驗1)
	50.9 (實驗2)	14 (實驗2)	14 (實驗2)
19B2	97.68 (實驗1)	8 (實驗1)	10 (實驗1)
	74.2 (實驗2)	14 (實驗2)	14 (實驗2)
19B3	98.9	8	10
19Bm	65.04	14	17
參考實例2		3	3
參考實例1		1	1
hGDF15	1	1	1

*精瘦小鼠

實驗1：活體內實驗1；實驗2：活體內實驗2。

表1中的數據證實，與非共軛hGDF15相比及/或與聚乙二醇化hGDF15相比，本發明共軛物具有顯著更長作用時間。

GDF15-共軛物在飼料餵養狗中之療效：GDF15-脂肪酸共軛物

研究目標：為評估在急性設定(6小時)及96小時期間皮下投與0.05 mg/kg本發明GDF15-脂肪酸部分共軛物或媒劑對照在小獵犬中對食物攝入之影響。在14天給藥後期間之各個時間點收集血漿樣本，以評估此化合物之PK曲線。在整個研究過程中測定體重。

動物：基線體重及處理

狗ID	重量(kg)	處理
50	12.65	媒劑
62	8.85	媒劑
77	10.15	媒劑
67	8.85	GDF15
73	9.95	GDF15
75	12.25	GDF15

表2

給藥程序：在收集基線體重及血液樣本後，給予媒劑或GDF15。GDF15-脂肪酸部分共軛物以0.97 mg/ml溶液提供，並未經稀釋以0.05 mg/kg皮下注射給予。藉由皮下注射對媒劑動物給予等體積30 mmol/l 乙酸鈉pH 4媒劑(52 µl/kg)。

採血：自頭部或頸部靜脈採集血液樣本(3 ml，在含EDTA及蛋白酶抑制劑抑二肽素A及抑肽酶的管中)，並置於冰上，直至在4℃下以3,000 rpm離心20 min。將血漿分成等分式樣，並儲存在-70℃下直至分析。收集以下時間點：0、6.75、24.75、48.75、72.75及96.75小時。在第7、10及14天收集其他樣本。

食物攝入測量：在給藥後45分鐘開始測量隨意食物攝入。此食物攝入測量包括兩個階段：急性測量(0至6小時)及亞慢性測量(0至96小時)。

自0至2小時，給予狗500 g常規飼料(Hill's J/D飲食)。在2小時時，移除剩餘食物，秤重，並為2至4小時期間提供另外500 g飼料。在4小時時，移除剩餘食物，秤重，並為4至6小時期間提供300 g飼料。在6小時時，移除剩餘食物並秤重。在此時(6.75小時)採集血液樣本。然後給狗提供500 g飼料過夜。在第1至4天早晨時，移除剩餘食物，秤重並採集各動物之血液樣本。在第1至3天時，然後為24小時期間提供500 g飼料。在第4天，使狗恢復其正常分配之飼料(260 g)。

額外食物攝入測量：在第7、14及28天時，給研究動物6小時食用日常飼料(260 g)。在此時間段結束時，收集任何剩餘食物並秤重。

體重測量：在基線及第2、4、7、10、14、18及28天時測量體重。在禁食狀態下收集基線體重。第2及4天所收集之體重並未禁食。就媒劑處理動物而言，在禁食狀態下收集所有其他體重。就GDF15處理動物而言，第7至28天測得之體重並未禁食，因為連續給動物供食，以刺激食慾及恢復體重。

本發明GDF15-脂肪酸分析共軛物在飼料餵養狗中之療效

研究目標：為評估在急性設定(6小時)及96小時期間皮下投與媒劑對照及0.015 mg/kg或0.005 mg/kg本發明GDF15-脂肪酸部分共軛物在小獵犬中對食物攝入之影響(在本研究中，在所有狗中，媒劑組將先於治療組進行)。將在14天給藥後期間之各個時間點收集血漿樣本，以評估此化合物之PK曲線。在整個研究過程中測定體重。

動物：基線體重及處理

狗ID	重量(kg)	處理	重量(kg)	處理
29	12.75	媒劑	12.85	5 µg/kg hGDF15
57	13.35	媒劑	13.80	5 µg/kg hGDF15
61	9.30	媒劑	9.45	5 µg/kg hGDF15
77	10.70	媒劑	11.15	5 µg/kg hGDF15
45	11.90	媒劑	12.20	15 µg/kg hGDF15
50	13.00	媒劑	13.05	15 µg/kg hGDF15

59	14.20	媒劑	14.65	15 µg/kg hGDF15
72	8.80	媒劑	9.05	15 µg/kg hGDF15

表3

給藥程序：在收集基線體重及血液樣本後，給予媒劑。藉由皮下注射給媒劑動物注射52 µl/kg 30 mmol/l乙酸鈉pH 4媒劑(52 µl/kg)。在收集基線體重及血液樣本後，給予GDF15。GDF15-脂肪酸部分共軛物以1.20 mg/ml溶液提供，並在稀釋後以0.015 mg/kg及0.005 mg/kg皮下注射給予。稀釋GDF15原料，以維持先前研究中遞送之52 µl/kg。

採血：採集本研究之媒劑組及處理組之血液樣本。自頭部或頸部靜脈採集樣本(3 ml，在含EDTA及蛋白酶抑制劑抑二肽素A及抑肽酶的管中)，並置於冰上，直至在4°C下以3,000 rpm離心20 min。將血漿分成等分式樣，並儲存在-70°C下直至分析。收集以下時間點：0、6.75、24.75、48.75、72.75及96.75小時。在第7、10及14天收集其他樣本。

食物攝入測量：在本研究之媒劑組及處理組期間測量食物攝入。在給藥後45分鐘開始測量隨意食物攝入。此食物攝入測量包括兩個階段：急性測量(0至6小時)及亞慢性測量(0至96小時)。

自0至2小時開始，給予狗500 g常規飼料(Hill's J/D飲食)。在2小時時，移除剩餘食物，秤重，並為2至4小時期間提供另外500 g飼料。在4小時時，移除剩餘食物，秤重，並為4至6小時期間提供300 g飼料。在6小時時，移除剩餘食物並秤重。在此時(6.75小時)採集血液樣本。然後給狗提供500 g飼料過夜。在第1至4天早晨時，移除剩餘食物，秤重並採集各動物之血液樣本。在第1至3天時，然後為24小時期間提供500 g飼料。在第4天，使狗恢復其正常分配之飼料(260 g)。

額外食物攝入測量：在媒劑組之第7與14天間及處理組之第7與

28天間之多天時，給研究動物6小時食用日常飼料(225 g)。在此時間段結束時，收集任何剩餘食物並秤重。一週一次，定時測量食物消耗。在餵食1、2、4及6小時後測量225 g飼料之消耗，以確定各狗的餵食方式是否恢復正常。

體重測量：在本研究之媒劑組及處理組期間測量體重。在媒劑組期間，在基線及第2、4、7、10及14天時測量體重。在處理組期間，在基線及第2、4、7、10、14、17、21、24及28天時測量體重。第2及4天所收集之體重並未禁食。在禁食狀態下測定所有其他體重。

在上文分析中測定實例2之共軛物

狗單一sc劑量

劑量 (ug/kg)	體重變化(%) (在14天時)	食物攝入變化 (佔媒劑組之%) (0-6 hr)	作用時間		
			(0-96 hr)	食物攝入(FI) 減少(天數)	體重(BW) 下降(天數)
5	-5	55	45	7	14
15	-5	60	38	9	14
50	-13	50	26	7	18
dGDF15 (50 ug/kg)	----	31			

表4

GDF15-共軛物改良肥胖小鼠中之代謝疾病(包括糖尿病及脂肪肝病)之程度

每週一次給食源性肥胖小鼠服用媒劑或實例19Bm (0.5 mg/kg/s.c.)，持續4週。在第一次給藥後2週測量非禁食葡萄糖及胰島素，並在第一次給藥後4週測量過夜禁食血糖及胰島素。實例19Bm使非禁食葡萄糖下降23% (207.1 mg/dl媒劑處理對160.4 mg/dl實例19Bm；p<0.05)。與媒劑處理小鼠相比，實例19Bm使非禁食胰島素濃度減少75% (2.1對8.7 ng/ml；p<0.05)。在初始給藥後四週，實例19Bm使禁食血糖減少28% (142.7對199.5 mg/dl；p<0.05)及使禁食胰島素減少78% (0.77對3.5 ng/ml；p<0.05)。每週一次實例19Bm之給藥，脂肪肝

病之標記物亦提高四倍。實例19Bm使肝脂肪變性減少57.5% (11.36對26.73%肝臟脂肪； $p<0.05$)及使肝細胞損傷之標記物丙胺酸轉胺酶(ALT)之血清濃度減少58% (46.2對110.5 U/L； $p<0.05$)。此外，實例19Bm使PNPLA3(一種進行性肝病中之致病基因)之肝臟表現減少77% ($p<0.05$)。

可藉由下文所述以下活體外及活體內方法評估本發明實例20及21之APJ-促效劑共軛物之活性及血漿穩定性。

hAPJ鈣流動分析：

以384-孔形式，10,000個細胞/孔將Chem-5 APJ穩定細胞(Millipore # HTS068C)接種於25 uL生長培養基中，然後在37°C組織培養培養箱中生長24小時。在該分析前一小時，添加25 uL/孔具有2.5 mM丙磺舒之FLIPR鈣4染料(Molecular Devices R8142)，並在37°C組織培養培養箱中培育細胞一小時。將肽溶解於HBSS、HEPES & 0.1% BSA緩衝液，並連續稀釋10倍，自50 uM稀釋至5 pM，三重複。使用FLIPR Tetra將肽添加至具有染料之細胞(1:5，最終肽濃度介於10 uM至1 pM之範圍內)。細胞內之FLIPR染料在結合至鈣後發射螢光，而細胞外之螢光被屏蔽。在FLIPR Tetra上使用470-495激發波長及515-575發射波長測量螢光。總共3分鐘完成讀取，在添加肽前10秒開始。計算最大-最小值，並針對各肽濃度繪圖，並使用GraphPad prism軟體計算曲線拐點處由肽引起之鈣通量刺激之 EC_{50} 值。

活體內分析：

將共軛物溶解於PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)中，至濃度為1 mg/ml，以形成給藥溶液。以1 ml/kg體重(相當於1 mg/kg之劑量)之體積經由側尾靜脈向雄性史-道二氏(Sprague-Dawley)大鼠靜脈內投與給藥溶液。給藥後在規定時間自頸靜脈導管採集靜脈血液樣本，並立即置於濕冰上。在4°C下使此等樣本離心，將上清液血漿轉移至新的試管中

進行分析。

生物分析：

製備標準曲線：藉由將肽共軛物溶解於水中至1 mg/ml製備原液。將10 uL原液與990 uL大鼠血漿混合在一起形成含於血漿之10,000 ng/ml之工作原液。將此工作原液連續稀釋於血漿中，以形成5000、1000、500、100、50、10、5及1 ng/ml之標準品。

樣本及標準製劑：將25 uL血漿樣本或標準品轉移至清潔板上。將含100 ng/ml格列本脲(glyburide)作為內標準品之150 uL乙腈:MeOH (1:1)添加至各小瓶中，並渦旋混合該板以混合內容物。在4℃下以4000 rpm對該板離心。將125 uL上清液轉移至清潔板上，與50 uL水混合，並藉由LC/MS分析。

LC/MS分析：

HPLC：具有自動取樣器之Agilent 1290 HPLC

管柱：MAC-MOD ACE C18，3 μm，30 mm x 2.1 mm內徑

流動相A：0.1%甲酸於乙腈中

流動相B：0.1%甲酸於水中

梯度方案：

時間 (min)	流量 (mL)	流動相A(%)	流動相B(%)
0	0.7	98	2
0.5	0.7	98	2
1.5	0.7	5	95
2.5	0.7	5	95
2.6	0.7	98	2
3.1	0.7	98	2

質譜儀：AB Sciex 6500

MS條件：Q1 (m/z+) 809.3；Q3 (m/z+) 923.7；DP：60；CE：25

數據分析：捕獲MS數據並用WatsonLIMS v7.4軟體分析。

使用上述分析之本發明APJ促效劑-共軛物之活性及穩定性

肽	hAPJ Ca ²⁺ 通量 EC ₅₀ [nM]	活體內血漿穩定性 t _{1/2} [h]
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基) (二硫鍵C ⁴ -C ⁷)	3	0.9
pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH(二硫鍵C ⁶ -C ¹²)	1.04	0.7
實例20A	2479	—
實例21A	65	7.4
實例21B	839	—

表5

可藉由下文所述以下活體外及活體內方法評估本發明實例26A及26B之催產素共軛物之活性及血漿穩定性。

活體外分析說明：

材料及方法

製備化合物板

在DMSO中製備所提供化合物，並最終在Eurofins Discovery Services GPCRProfiler®分析緩衝液中製備，至濃度比最終分析濃度高三倍。類似地，製備媒劑對照及陽性對照，以確保所有分析受到適當控制。

參考對照		
GPCR靶	參考促效劑	E _{max}
OT	催產素	1.25 μM

使用Eurofins Discovery Services GPCRProfiler®分析緩衝液準備所有孔。GPCRProfiler®分析緩衝液係改質翰克司(Hanks)平衡鹽溶液(HBSS)，其中HBSS經補充以包含20 mM HEPES及2.5 mM丙磺舒(Probenecid) (pH 7.4)。

鈣流動分析

促效劑分析

就各分析濃度而言，以二重複接種所提供化合物。

以類似方式製備參考促效劑催產素，以充當分析對照。納入在 E_{max} (參考促效劑引起最大反應之濃度)下之參考促效劑催產素。

在FLIPRTETRA儀器上進行促效劑分析，其中在建立螢光/發光基線後，將測試化合物、媒劑對照及參考促效劑添加至分析板。促效劑分析總共180秒，並用於評估各化合物活化各待分析GPCR之能力。

完成三分鐘促效劑分析後，另外在25°C下培育該分析板七(7)分鐘。

數據處理

所有板接受適當基線校正。處理基線校正後，輸出最大螢光/發光值，並處理數據，以計算活化百分比及抑制百分比。0至-30%之負值可能係生物差異所造成之結果。數據處理計算方法如下： $((\text{最大RLU}) - (\text{基線平均值})) / ((\text{正平均值}) - (\text{基線平均值}))$ 。

活體內分析說明：

將共軛物溶解於PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)中，至濃度為3 mg/ml，以形成給藥溶液。以1 ml/kg體重(相當於3 mg/kg之劑量)之體積經由側尾靜脈向雄性史-道二氏(Sprague-Dawley)大鼠靜脈內投與給藥溶液。給藥後在規定時間自頸靜脈導管採集靜脈血液樣本，並立即置於濕冰上。在4°C下使此等樣本離心，將上清液血漿轉移至新的試管中進行分析。

生物分析：

製備標準曲線：藉由將肽共軛物及肽溶解於兩個獨立小瓶之二甲基亞砷中至1 mg/ml製備原液。將10 uL各原液與980 uL大鼠血漿混合在一起形成含於血漿之10,000 ng/ml之工作原液。將此工作原液連續稀釋於血漿中，以形成5000、1000、500、100、50、10、5、1、0.5及0.1 ng/ml之標準品。

樣本及標準製劑：將25 uL血漿樣本或標準品轉移至清潔板上。將含100 ng/ml格列本脲作為內標準品之150 uL乙腈添加至各小瓶中，並渦旋混合該板以混合內容物。在4℃下以4000 rpm對該板離心。將125 uL上清液轉移至清潔板上，與150 uL水混合，並藉由LC/MS分析。

LC/MS分析：

HPLC：具有自動取樣器之Agilent 1290 HPLC

管柱：MAC-MOD ACE C18，3 μm，30 mm x 2.1 mm內徑

流動相A：0.1%甲酸於乙腈中

流動相B：0.1%甲酸於水中

梯度方案：

時間 (min)	流量 (mL)	流動相A(%) 流動相B(%)	
0	0.7	98	2
0.5	0.7	98	2
2.0	0.7	2	98
2.5	0.7	2	98
2.6	0.7	98	2
3.0	0.7	98	2

質譜儀：AB Sciex 6500

肽MS條件：Q1 (m/z+) 945.20；Q3 (m/z+) 687.27；DP：140；CE：39

肽共軛物MS條件：Q1 (m/z+) 1270.85；Q3 (m/z+) 468.30；DP：140；CE：77

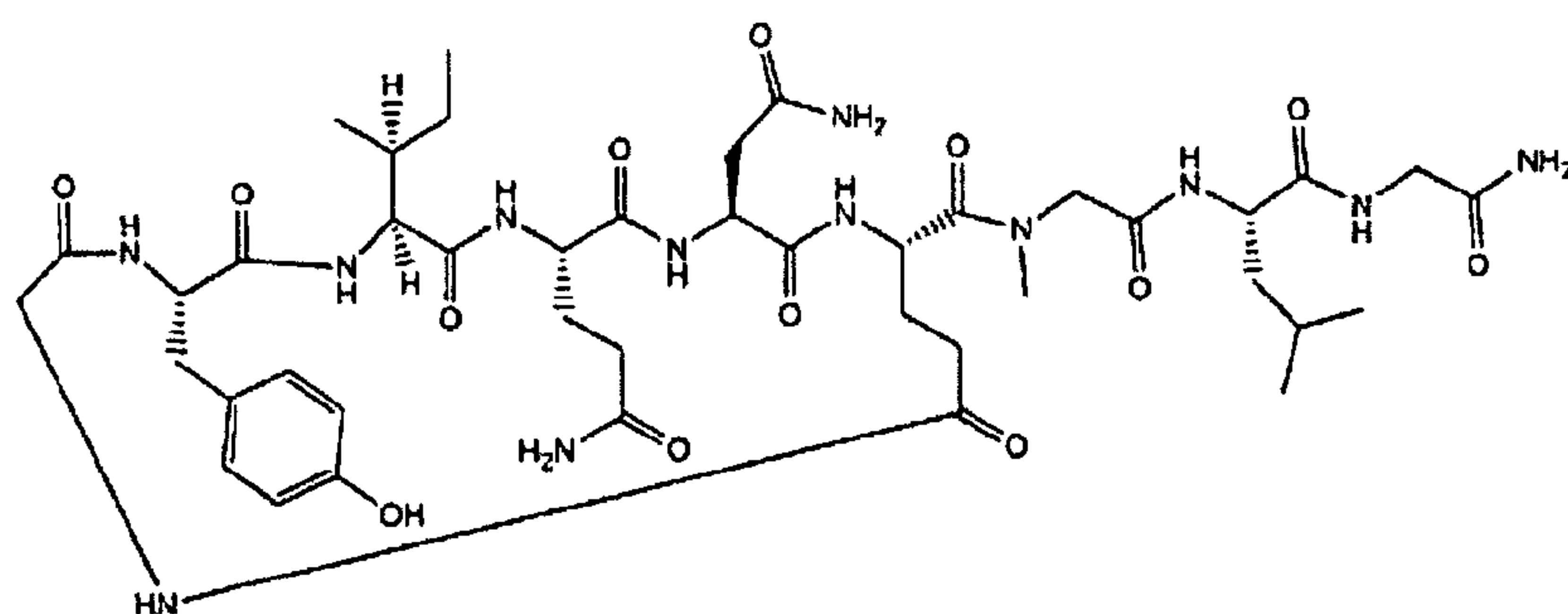
數據分析：捕獲MS數據並用WatsonLIMS v7.4軟體分析。

根據上述分析之本發明催產素脂肪酸共軛物之活性及穩定性

肽	OT Ca ²⁺ 通量 EC ₅₀ [nM]	活體內血漿穩定性 t _{1/2} [h]
實例26A	8.4	46
未共軛催產素類似物 WO2014/095773之實例13	7.8	0.6

表6

下文呈現WO2014/095773之實例13：



本發明催產素-脂肪酸共軛物證實半衰期與未共軛催產素類似物相比增加75倍。

可藉由下文所述以下活體外及活體內方法評估本發明實例27A及27B之AgRP共軛物之活性及血漿穩定性。

A) HTRF cAMP分析方案：

HEK293/MC4R細胞通道

細胞：HEK293/MC4R穩定細胞系

完全培養基： DMEM/F12 1:1 (Gibco目錄號11039，就分析而言，無酚紅培養基目錄號21041)

10% FBS (加熱不活化，Gibco，目錄號10082)

200 μ g/mL遺傳黴素(Geneticin) (Gibco，目錄號10131)

15 mM HEPES (GIBCO，目錄號15630)

2 mM L-麩胺鹽胺(GIBCO，目錄號25030)

燒瓶：150 cm²經組織培養物處理之燒瓶(Corning，目錄號430825)

- 吸氣調理培養基
- 用25 ml DPBS (Gibco，目錄號14190)清洗，然後將其吸出
- *FBS抑制胰蛋白酶-EDTA處理。
- 添加2.5 ml 0.05%胰蛋白酶-EDTA (Gibco，目錄號25300)
- 靜置幾分鐘，然後輕叩燒瓶幾分鐘，以使細胞脫落

- 添加25 ml完全培養基，以終止胰蛋白酶-EDTA處理

**用於分析之細胞製備物，必須使用無酚紅完全培養基。*

- 輕輕移液數次，使凝集細胞再懸浮

- 將懸浮液轉移至50 ml離心管中

- 以1200 rpm快速離心3 min

- 抽出上清液

- 藉由輕輕敲擊底部使細胞分散

- 添加5-10 ml完全培養基，然後藉由輕輕移液再懸浮

**用於分析之細胞製備物，必須使用無酚紅完全培養基。*

- 將0.5 ml懸浮液轉移至Vi-cell之樣本瓶中

- 藉由使用Vi-cell計算細胞數*每次記錄細胞密度及存活率

- 將 $1-3 \times 10^6$ 個細胞轉移至新的150 cm燒瓶中

就3天而言： 3×10^6 個細胞/燒瓶

就4天而言： 1×10^6 個細胞/燒瓶

- 在37°C 及5% CO₂下培育

接種細胞以進行HTRF cAMP分析(分析前一天)

- 當在通流部分中時製備細胞懸浮液

- 將懸浮液稀釋至 2.34×10^5 個細胞/mL

**13mL對一塊384孔板而言足矣。*

- 將30 μL細胞懸浮液分配至聚-D-離胺酸BIOCOAT 384-孔透明

板(Becton Dickinson，目錄號354660)之各孔中： 7000 個細胞/孔

**經聚-D-離胺酸塗佈之板在此分析中至關重要。*

**沒有對應cAMP標準品之孔的細胞*

- 在37°C 及5% CO₂下培育過夜

HTRF cAMP分析

1. 製備試劑

• **1M IBMX**

IBMX (MW 222.25 g/mol , ACROS目錄號228420010) 111 mg

DMSO (Sigma Aldrich , 目錄號D2650) 500 uL

儲存在4°C 下

• **40 mg/mL BSA溶液**

牛血清白蛋白(Sigma A7030-50G) 200 mg

dH₂O 5 ml

儲存在4°C 下

• **1 mg/mL (176 uM) AgRP母液(於HBSS中/ 2 mg/mL BSA)**

R&D人類AgRP C端(目錄號3726-AG-100) 100 ug/瓶

1x翰克司緩衝鹽溶液(HBSS) (Gibco , 目錄號14065 , w/Ca及Mg)

95 uL

40 mg/mL BSA溶液 5 uL

儲存在4°C 下

• **2 mM NDP-aMSH母液**

NDP-aMSH (MW 1646.9 , Bachem , 目錄號H1100) 1 mg/瓶

dH₂O 304 uL

*溶解後 , 將10 uL等分式樣分配至200 uL管中 , 然後儲存在-20 °C 下

• **分析緩衝液1**

HBSS 10 ml

1M Hepes (Gibco, 目錄號15630) 0.2 ml

1M IBMX 20 uL

*為避免IBMX沈澱 , 請使緩衝液渦旋直至完全溶解。

• **分析緩衝液2**

HBSS 20 ml

1M Hepes (Gibco, 目錄號15630) 0.4 ml

1M IBMX 40 uL

40 mg/mL BSA溶液 0.25 ml

*為避免IBMX沈澱，請使緩衝液渦旋直至完全溶解。

• 用於IgG滴定及AgRP滴定之**6 nM NDP-aMSH**

2 uM NDP-aMSH (母液之1000-倍稀釋液) 10.8 uL

分析緩衝液1 3600 uL

*一個384孔分析之實例

• 用於IgG滴定之**120 nM AgRP**

稀釋10倍之母液(17.6 uM) 26 uL

分析緩衝液2 3800 uL

*一個384孔板之實例

• 滴定用NDP-aMSH工作溶液(參見試劑)

• 滴定用AgRP工作溶液(參見試劑)

• 滴定用IgG工作溶液(參見試劑)

• cAMP標準溶液(參見試劑)

2.分析(2步驟方案)

分析套組：Cisbio cAMP HiRange HTRF 套組 (目錄號 62AM6PEB)

- 製備IgG/AgRP混合物(1:1)

• 將15 uL IgG工作溶液及15 uL 120 nM AgRP混合在一起，然後在環境溫度下培育1 hr

- 準備分析板

• 藉由在Wipeall上倒轉含細胞之384-孔分析板，然後敲擊以移除培養基以棄去培養基。

• 向各孔添加100 µL DPBS，並以相同方式棄去



- S

S

S

S

S

S

S

S

- S

S

S

S

S

S

S

S

- S

S

- S

S

- S

溶解緩衝液)

- 以1200 RPM快速離心。
- 在環境溫度下培育分析板45至60分鐘。
- 將30 μL各樣本轉移至經組織培養物處理之聚苯乙烯384-孔分析板(Corning，目錄號3572)
- 以1200 RPM快速離心。
- 用具有以下設定之分子設備M5或M5e測量螢光。

分子設備M5/M5e設置

分析類型	時差式螢光
整數延遲	50 us
積分	400 us
讀數	頂置式讀數
波長	Ex314 nm/Em668 nm截止630 nm
	Ex318 nm/Em570 nm截止570 nm
自動混合	關閉
自動校準	開啟
靈敏性	Reading 75
PMT	開啟
板	384孔標準不透明
設定時間	關閉
管柱波長優先	管柱優先
支架速度	正常
自動讀數	關閉

B. MC3 cAMP分析

材料：

細胞：HEK293/MC3R穩定細胞系

完全培養基：DMEM/F12 1:1 (Gibco，目錄號11039)

10% FBS (加熱不活化，Gibco，目錄號10082) x

200μg/mL遺傳黴素(Gibco，目錄號10131)

2 mM L-麩醯胺酸(GIBCO，目錄號25030)

燒瓶：150 cm²經組織培養物處理之燒瓶(Corning，目錄號430825)。

分析緩衝液

HBSS (Gibco – 14175-095) 10 mL

1M Hepes (Fisher，目錄號BP299-1) 0.2 mL

500mM IBMX (MW 222.25 g/mol，ACROS目錄號228420010)

40 uL

BSA 0.25%

板

384孔固體底，Greiner bio-one (目錄號-781080)

分析方案(拮抗劑方案)：

I. 吸氣調理培養基

II. 用2.5 ml DPBS (Gibco，目錄號14190)清洗

III. 添加2 ml 0.25%胰蛋白酶-EDTA (Gibco，目錄號25200-056)

IV. 燒瓶在培養箱靜置幾分鐘，然後輕叩燒瓶幾分鐘，以使細胞脫落。

V.添加10 ml完全培養基，以終止胰蛋白酶-EDTA處理，並藉由輕輕移液數次，使凝集細胞再懸浮而充分混合

VI. 將1.5 ml細胞轉移至含20 ml完全培養基之新的150 cm燒瓶中。

VII. 將剩餘的懸浮液轉移至50 ml離心管中

VIII. 以1200 rpm快速離心4 min。抽出上清液

IX. 向管中添加6 ml分析緩衝液，並藉由輕輕移液使細胞再懸浮

X. 將0.5 ml懸浮液轉移至Vi-cell之樣本瓶中並另外添加0.5 ml PBS

XI. 藉由使用Vi-cell計算細胞數*每次記錄細胞密度及存活率

- i. 以4K/孔將細胞接種於10 uL/孔之含IBMX之分析緩衝液中。
- ii. 使該板在培養箱中靜置約30 min，然後開始對懸浮細胞進行分析。

按照兩步驟cAMP方案測定cAMP。

程序

I. 向10 uL/孔之細胞添加5 uL以3x於分析緩衝液中製備之AgRP，僅向拮抗劑孔添加。

II. 向陽性對照孔(將含有NDP- α -MSH之孔)添加5 uL緩衝液。

III. 板在37°C下培育約20 min。

IV. 向含AgRP DRC之孔中添加5 uL/孔之以4X製備之促效劑EC80 (NDP- α -MSH)。

V. 添加5 uL/孔之以4X製備之促效劑(NDP- α -MSH) DRC (板中最高終最高濃度為100 nM)，以計算NDP- α -MSH EC50。

VI. 僅向陰性對照添加緩衝液。

VII. 對384孔板脈衝離心，並在培養箱中培育細胞30分鐘。

VIII. 將10 μ L以下試劑添加至各孔中：

a. 10 μ L cAMP-d2

b. **重要!!就陰性對照而言，不添加cAMP-d2，僅添加溶解緩衝液及10 uL/孔之Tb-穴狀化合物*

c. 10 μ L抗-cAMP穴狀化合物

d. 對板脈衝離心，並在室溫下培育60 min。

C. 活體內分析說明：

將10奈莫耳共軛物溶解於300 μ L PBS (磷酸鹽緩衝鹽水)中以形成給藥溶液。經由側尾靜脈向雄性史-道二氏大鼠靜脈內投與給藥溶液(300 μ M) (相當於10奈莫耳/大鼠之劑量)。給藥後在規定時間經由剪斷尾巴(tail snip)採集血液，並立即置於濕冰上。在4°C下使此等樣本離

心，將上清液血漿轉移至新的試管中進行分析。

生物分析：

製備標準曲線：使用實例27A及27B之兩種脂肪酸共軛物及一種成熟人類AgRP肽製備標準品。藉由將經原料標記之肽稀釋於具有酪蛋白之ELISA樣本稀釋劑中至100 ug/ml製備各AgRP之中間物原液。為分析，在具有牛血清白蛋白(BSA)之ELISA樣本稀釋劑中將中間物稀釋至最高標準品濃度2500 pg/mL，然後以2倍連續稀釋至16點，包括零劑量標準品。

樣本稀釋：在具有BSA之ELISA樣本稀釋劑中將血漿樣本稀釋10倍，然後以5倍連續稀釋至31,250倍。

5B1人類AgRP ELISA方法：在室溫(RT)下，以30 uL/孔用含於1x PBS之抗人類AgRP系5B1塗佈384孔微板過夜。抽吸板，並在RT下用牛奶基阻斷劑以90 uL/孔阻斷2小時。所有其他培育均係以30 uL/孔進行。再次抽吸板，並在RT下向孔添加樣本及標準品，持續2小時。然後用具有tween-20之磷酸鹽基洗滌緩衝液清洗板三次，並在RT下向孔添加生物素化山羊抗-人類AgRP多株抗體，以檢測結合AgRP，持續2小時。再次清洗板，並在RT下向孔添加經HRP標記之鏈黴抗生物素試劑，持續30分鐘。最後一次清洗板，並向所有孔添加化學發光受質，並立即在Spectramx M5上讀取板之光輸出。

數據分析：整理原始數據並分析得到基本PK參數。

根據上述分析之本發明AgRP脂肪酸共軛物之活性及穩定性：

肽	MC4R EC ₅₀ [nM]	MC3R EC ₅₀ [nM]	活體內血漿穩定性 t½ [h]
實例27A(單脂肪酸共軛物)	18	7	20
實例27B(二脂肪酸共軛物)	167	65	52
AgRP	1.7	12	4.4

表7

可藉由下文所述以下活體外方法評估實例28A、28B及28C之

FGF23共軛物之活性及血漿穩定性。

活體外活性分析

Egr-1-螢光素酶：在 Egr-1-螢光素酶報導子分析中測試純化 hFGF23-FA共軛物之生物活性。hFGF23-FA共軛物結合至FGF23受體導致下游活化Egr-1，且 Egr-1啟動子調節螢光素酶報導子之表現。Egr-1-螢光素酶報導子基因係基於Urakawa等人(Nature, 2006，第444卷，770-774)之報告構建。用Egr-1-螢光素酶報導子基因、克羅索之全長跨膜形式及轉染標準化報導子基因(Renilla螢光素酶)轉染接種於48-孔聚-D-離胺酸板中之HEK293T細胞。轉染後五小時，用含梯度濃度之測試蛋白質之3 ml DMEM及1% FBS置換轉染混合物。細胞在被動溶解緩衝液(Promega, Cat #E194A)中20小時後溶解，並用雙-Glo螢光素酶分析系統(Promega, Cat #E2940)測定螢光素酶活性。

結果

實例	EC ₅₀ (nM)
實例28B	1.195
實例28C	0.258

表8

可藉由下文所述以下活體外及活體內方法評估本發明實例29A及29B之舒張素(serelaxin)脂肪酸共軛物之活性及血漿穩定性。

活體外活性分析# 1：

材料：

- DMEM：F12培養基(Gibco, cat#11320)
- IBMX (Sigma, cat#I5879)
- 384固體底白色板(Greiner bio-one, cat #781945)
- 20,000動態-2 cAMP套組(Cisbio, cat#62AM4PEC)
- 3',5'-環腺苷單磷酸(Sigma, cat#A9501)

Matrix-plate mate plus (用於添加5 µl分析試劑)

PBS-Gibco (cat#10010-023)

縮寫	定義或解釋說明
cAMP	單磷酸環腺苷
RXFP1	鬆弛素/胰島素相關受體
DMSO	二甲亞砜
HTRF	均相時差式螢光
8k	八千
cAMP-d2	帶有染料d2標記之cAMP
PDL	聚-d-離胺酸
ul	微升
@	at
o/N	過夜
uM	微莫耳
Min	分鐘
37c	37攝氏度
3x	三次
hr	小時
DMEM:F12	杜貝卡氏改良依格培養基：營養混合物F-12 (DMEM/F-12)
rhRLX	重組人類鬆弛素
RPMI	洛斯維帕克紀念研究所(RPMI) 1640培養基
FRET	螢光共振能量轉移
HEK293	人類胚腎293細胞
IBMX	3-異丁基-1-甲基黃嘌呤
nM	奈莫耳
std	標準品
con	濃度
PBS	磷酸鹽緩衝鹽水
cpd	化合物
HS	人類血清
HBSS	翰克司緩衝鹽水溶液

方案：

第1天：將RXFP1-HEK293 /親代HEK293細胞8k接種於固體底塗佈PDL之白色板之10 μ l DMEM:F12培養基中

第2天：用化合物進行分析

促效劑模式(概述)：

- 在37°C下，細胞在10 μ l DMEM:F12培養基中O/N
- 在37°C下向細胞添加5 μ l 2000 μ M(4x) IBMX，持續30 min
- 在37°C下向上述物質添加5 μ l 4x化合物/舒張素(Serelaxin)，持

續30 min

(自化合物稀釋之步驟3開始，400 nM-最終係最多100 nM)

- 10 μ l cAMP-d2共軛物
- 10 μ l抗-cAMP-d2穴狀化合物共軛物
- 在RT下培育1 hr
- 讀取FRET信號-Envision 665 nm/620 nm

化合物製備

舒張素(Serelaxin)：

1)稀釋原液683.3 μ M，亦即11.7 μ l在188.3 PBS pH 7.4中，藉由轉移15 μ l化合物於PBS中稀釋3x次至30 μ l (最終係40 μ M)-用手

2)以1:10稀釋，亦即6 μ l上述物質在54 μ l DMEM:F12中(最終係4 μ M)-用手

3)以1:10稀釋，亦即10 μ l上述物質在90 μ l DMEM:F12中(最終係400 nM)-用手

舒張素-FA共軛物

1)在PBS pH 7.4中將原液稀釋至40 μ M，藉由轉移15 μ l化合物於PBS中稀釋3x次至30 μ l

2)以1:10稀釋，亦即6 μ l上述物質在54 μ l DMEM:F12中-用手

3)以1:10稀釋，亦即10 µl上述物質在90 µl DMEM:F12中(1：100稀釋)-用手

脂肪酸

1)在PBS pH 7.4中將原液稀釋至40 µM，藉由轉移15 µl化合物於PBS中稀釋3x次至30 µl

2)以1:10稀釋，亦即6 µl上述物質在54 µl DMEM:F12中-用手

3)以1:10稀釋，亦即10 µl上述物質在90 µl DMEM:F12中(1：100稀釋)-用手

cAMP標準曲線稀釋液：

- 1. 150 µl cAMP標準品稀釋於DMEM:F12培養基中，至第一列 (2800 nM)
- 2. 向後續列添加100 µl DMEM:F12培養基，直至10 (1-11)
- 3. 3x稀釋液，藉由轉移50 µl至100 µl
- 4. 將步驟3之20 µl添加至標準曲面板之適宜孔
- 5. 10 µl抗- d2 &抗-cAMP穴狀化合物共軛物
- 6. 在室溫下培育1 h
- 7. 讀取FRET信號-Envision 665 nm/620 nm

分析：

cAMP nM濃度係用Graph pad prism轉換得到之Log (x)

cAMP量係使用4參數非線性回歸自標準曲線內插得到。

用10^Y變換將內插值轉化為nM。

使用4參數非線性回歸，繪製cAMP計算量對化合物濃度之曲線。

結果：

化合物	EC ₅₀ (nM)
舒張素	1.12
舒張素-FA共軛物實例29B	4.51

表9

在牛血清白蛋白及人類血清# 2存在下之活體外活性：

材料：

DMEM：F12培養基(Gibco, cat#11320)

IBMX (Sigma, cat#I5879)

384固體底白色板(Greiner bio-one, cat #781945)

20,000動態-2 cAMP套組(Cisbio, cat#62AM4PEC)

3',5'-環腺苷單磷酸(Sigma, cat#A9501)

Matrix-plate mate plus (用於添加5 μ l分析試劑)

PBS-Gibco (cat#10010-023)

1M HEPES Gibco (cat-15630-080)

1X HBSS Gibco (cat-14175-095)

分析緩衝液-1xHBSS + 10 mM HEPES

牛血清白蛋白 cat# A2153 (Sigma-Aldrich)

Sigma Aldrich –H4522 (人類血清)

條件：

- 600 μ M BSA
- 4%人類血清
- 10%人類血清(Sigma aldrich–H4522)
- 分析緩衝液

測試化合物：

- 舒張素(Serelaxin)
- 舒張素-FA(實例29A)

化合物處理：

舒張素-：原液係(796.57 μ M)，亦即4.75 mg/ml，MW係5963道爾頓
將舒張素10 μ L原液溶解於190 μ L PBS中，最終濃度為40 μ M，藉

由轉移30 uL至60 uL分析緩衝液稀釋3x倍，11點曲線，(A2-A12) 12th係零。

舒張素-FA共軛物：原液係(287.79 uM)，亦即2.61 mg/ml，MW係9069道爾頓

將舒張素27.798 uL原液溶解於172.2 uL PBS中，最終濃度為40 μM，藉由轉移30 uL至60 uL分析緩衝液稀釋3x倍，11點曲線，(A2-A12) 12th係零。

BSA原液製備：

就666.66 uM BSA而言：藉由溶解1.32 g BSA製得分析緩衝液30 ml

就600 uM BSA而言：藉由溶解1.18 g BSA製得分析緩衝液30 ml

無BSA，僅有分析緩衝液

人類血清

就4.44% HS而言：1.34 ml在28.66 ml分析緩衝液中

就4% HS而言：1.2 ml在28.8 ml分析緩衝液中

就11.11% HS而言：3.33 ml在26.67 ml分析緩衝液中

就10% HS而言：3 ml在27 ml分析緩衝液中

程序：

第1天：以10 μl/孔體積將8,000個細胞/孔之RXFP1-HEK293及HEK293 (親代)細胞接種於固體底板上之基底DMEM:F12培養基中。在37°C /5% CO₂下培育細胞過夜。

第2天：

1. 用50 uL分析緩衝液清洗細胞2x次，並輕輕敲到紙巾上，以在第一次及第二次清洗後去除分析緩衝液。

2. 在37°C 下用15 uL具有IBMX (666.66 uM)且含各別培養基(僅有600 uM BSA、4% BSA、10%人類血清及分析緩衝液)預處理細胞30分鐘。

3. 連續稀釋化合物3x次，11點曲線-將15 uL先前孔之化合物轉移至隨後具有30 uL PBS之孔中，孔11僅有PBS。

4. 自步驟3稀釋(1:10)於分析緩衝液(亦即係10 uL至90 uL分析緩衝液)中。

5. 自步驟4再稀釋(1:10)於各別培養基(666.66 μ M BSA & 4.44% & 11.11%人類血清及分析緩衝液)中，BSA之最終濃度為600 μ M，且人類血清為4 & 10%

6. (*化合物在RT下於其各別培養基中培育1 hr，然後添加至細胞中)

7. 在37°C下將步驟6之5 uL(亦即4x 舒張素/舒張素-FA)添加至15 uL細胞中，又持續30分鐘(舒張素之最高濃度為100 nM)

8. 添加10 uL cAMP d2共軛物

9. 添加10 uL抗-cAMP-穴狀化合物

10. 在室溫下培育1 hr

11. 在Envision上讀取FRET

12. 在其各別培養基中製備cAMP標準曲線。

cAMP標準曲線稀釋液：

cAMP標準品初始原液係1120000 nM

1. 藉由將20 uL cAMP原液溶解於60 uL分析緩衝液中稀釋(1:4)初始原液

2. 步驟1之(1:10)稀釋於分析緩衝液(亦即係20 uL含於180 uL分析緩衝液中)

3. 步驟2之(1:10)稀釋於各別濃度：4.44% & 11.11% HS、666.66 μ M BSA或不含BSA-最終濃度最後將為：HS為4%、10%，且BSA為600 μ M。

cAMP標準曲線

- 1.將150 µl各別cAMP標準品添加至第一列(2800 nM)
- 2.將100 µl具有各別濃度(600 uM BSA、4% & 10% HS及0%)之分析緩衝液添加至後續11列，亦即係(2-12)
- 3.3x稀釋，藉由將50 µl轉移至後續孔之100 µl，第12孔為零，無cAMP
- 4.將步驟3之20 µl添加至標準曲面板之適宜孔
- 5.添加10 µl d2共軛物
- 6.在室溫下培育1 hr
- 7.讀取HTRF-Envision

分析：

cAMP nM濃度係用Graph pad prism轉換得到之Log (x)

cAMP量係使用4參數非線性回歸自標準曲線內插得到。

用10^Y變換將內插值轉化為nM。

使用4參數非線性回歸，繪製cAMP計算量對化合物濃度之曲線。

結果：

	Ec ₅₀ (nM)			600 uL BSA
	0%血漿	4%血漿	10%血漿	
舒張素	8	0.3	0.4	0.7
FA-舒張素 (實例29a)	100	11	15	15

表10

活體內分析：

可在各種齧齒類模型中測試化合物(舒張素(serelaxin)及舒張素共軛物)，以評估短期及長期心血管反應。

短期模型-使小鼠(任何品系，但DBA/2較佳)或大鼠(任何品系，但Sprague-Dawley較佳)吸入異氟烷將其麻醉，用約2%異氟烷/100%氧氣維持在穩定手術麻醉平面，且直腸溫度維持在正常水平。通過壓在

皮膚切口上露出頸動脈及頸靜脈(小鼠)或股動脈及靜脈(大鼠)，並插入導管。將動脈導管連接至壓力傳感器，並將信號導至數位數據採集系統(例如，Ponemah)，以連續測量動脈血壓並觸發心率。或者藉由經由皮下插入的針狀電極記錄之心電圖信號觸發心率。在使動脈血壓及心率穩定後，在約3至4分鐘內經靜脈內投與自主阻斷劑混合劑(例如，各自為2 mg/kg之阿托品(atropine)及心得安(propranolol))。當心血管參數再次穩定時，在約3秒內注射作為靜脈內大丸劑之舒張素或舒張素共軛物。鬆弛素引起心率增加，特徵係發作緩慢(峰值響應在約6分鐘內)及作用時間長(小時)。在相同的動物製品中，心室心功能(例如，搏出分率、縮短分率、心輸出量)係藉由收集連續心臟超音波圖測量，此等圖係離線分析。

長期模型-使小鼠(任何品系，但DBA/2較佳)或大鼠(任何品系，但Sprague-Dawley較佳)吸入異氟烷將其麻醉，並用約2%異氟烷/100%氧氣維持在穩定手術麻醉平面。在圍手術期及手術後投與鎮痛藥。如上所述給動脈及靜脈插管，但導管透過背側皮膚區外置，用肝素化鹽水沖洗，並用不鏽鋼銷塞住。皮下導管亦可經皮下植入小鼠中，並以類似方式外置。在大鼠中，導管直接通過彈簧繫鏈/旋轉系統。在研究當天，將動脈導管連接至壓力傳感器，如上所述實現自主阻斷，但阻斷劑亦可經由皮下導管投與至小鼠，且兩個物種中之阻斷隨後係藉由連續靜脈內或皮下輸注自主藥劑維持。用數位數據採集系統連續監測動脈血壓及心率。在使動脈血壓及心率穩定後，在約3至4分鐘內經靜脈內或皮下投與自主阻斷劑。當心血管參數再次穩定時，在約3秒內注射作為靜脈內大丸劑之舒張素或舒張素共軛物。為評估小鼠或大鼠在幾週時間內之心室心功能及心率，每週皮下注射舒張素共軛物1至3次，並在基線及此後每週收集連續心臟超音波圖。

舒張素來源：

舒張素 (重組1-鏈人類鬆弛素)

Connetics corporation, lot # 00L605

1.0 mg/mL (5 ml小瓶)含於20 nM乙酸鈉緩衝液(pH 5.0)

將原液稀釋於媒劑中，至對應各劑量之期望舒張素濃度。

可藉由下文所述以下活體外及活體內方法評估實例30之PIP共軛物之活性及血漿穩定性。

葡萄糖刺激性胰島素分泌(GSIS)分析：

重組人類催乳素誘導蛋白(hPIP)後進行GSIS測試，作為在高脂肪食源性肥胖(DIO)小鼠中之定活體內胰島β細胞功能的一個度量。簡而言之，小鼠(m=5-7隻/組)禁食整夜(5:00PM-8:00AM)，並在測試當天測量體重及血糖(BG；用Embrace血糖儀測定)，將其指定為基線時間點。下一步，經靜脈(IV)給小鼠投與hPIP (天然及FA-共軛之PIP；溶液含於PBS；以4 ml/kg體重投與)或媒劑對照(PBS)一次。投與hPIP後四十五分鐘，給所有小鼠服用口服葡萄糖(3g/kg葡萄糖；溶液含於PBS；以4 ml/kg體重投與)。在緊接著葡萄糖負荷(指定為0 min時間點)之前及葡萄糖負荷15及30分鐘時測量血糖。收集血液樣本以分離血漿，並在葡萄糖後0、15及30分鐘時測量血漿胰島素。

藥物動力學(PK)分析：

在單次IV投與後，在DIO小鼠中測量hPIP之血漿曝露。簡而言之，經靜脈內(IV)給自由飼養的DIO小鼠(n=2)投與hPIP (天然及FA-共軛之PIP；溶液含於PBS；以4 ml/kg體重投與)一次。收集血液樣本，並在給藥後0.25、0.5、1、3、7、24及48小時之時及內部ELISA分析(下文所示方案)時分離血漿。

藉由以下步驟測量分析：

- 板在室溫下經30 uL hPIP抗體(命名為PIP-8-AB；內部生產；NBC系# 87.19G9A11，在8 ug/ml下，含於PBS)塗佈過夜。

- 抽吸後，用100 uL阻斷試劑阻斷2 hr。
- 抽吸並添加30 uL樣本，培育2 hr，將樣本及標準品稀釋於酪蛋白緩衝液(1%酪蛋白，1.7 mM磷酸二氫鈉，8.1 mM磷酸氫二鈉七水合物，0.15 M氯化鈉，0.7% Triton X-100及0.1%疊氮化鈉)。
- 用3x 100 uL Teknova清洗緩衝液(0.05% Tween含於PBS)清洗板。
- 30 uL生物素化PIP抗體(命名為PIP-6 Ab；內部生產，MBC系# 87.8C6B3，在10 ug/ml下，含於酪蛋白緩衝液中)，並培育1 hr
- 如上進行清洗
- 添加30 uL鏈黴抗生物素-HRP (Pierce cat # 21140，在0.4 ug/ml下，含於HRP緩衝液)、HRP緩衝液(0.4%酪蛋白，1.7 mM磷酸二氫鈉，8.1 mM磷酸氫二鈉七水合物，0.15 M氯化鈉及0.1%氯乙醯胺)，培育30 min。
- 如上進行清洗
- 添加30毫微微化學發光受質(Thermo cat #34096)，並立即讀取

根據上述分析之本發明PIP脂肪酸共軛物之活性及穩定性

肽	血漿胰島素AUCB (ng/mL*min)**	活體內血漿穩定性 t½ [h]	C _{max} (nM)	MRT (hr)
實例30	+75%	---13.8-	497.1	18.1
未共軛PIP	+29%	--18.0-	219.8	12.0

**與媒劑相比

表11

本發明PIP脂肪酸共軛物具有長曝露時間，造成療效增進。
可藉由下文所述以下活體外方法評估實例31之NPFF共軛物之活性及血漿穩定性。

cAMP分析方案及Cisbio cAMP套組

在下文所述分析中，在佛司可林(Forskolin)存在下測試本發明

NPFF-FA共軛物

試劑/材料

	供應商	Cat#	位置(貯存)
經聚離胺酸預先塗佈之Greiner 384透明底板	Greiner Bio-One	781944	
cAMP套組	Cisbio	62AM4PEJ	4°C/-20°C
DMSO	Sigma	D2650	
cAMP標準品(1.12 mM含於分析溶液+IBMX)	Sigma	A9501	-80°C
佛司可林 5 mM原液(DMSO)	Sigma	F6886	-20°C
IBMX 250 mM原液(DMSO)	Sigma	I5879	-20°C
HBSS	Invitrogen	14175-095	R.T
HEPES	invitrogen	15630-080	R.T
PTX(百日咳毒素)	Sigma	P2880	-20°C
BSA游離脂肪酸(0%)	Sigma	A9205	4°C

第1天：將細胞接種至384孔板中。

按照「繼代培養方案」。

- 1.製造不含抗生素之生長培養基(若有必要)。
- 2.在噴灑70%乙醇後，在37°C水浴中使不含抗生素之生長培養基瓶平衡。
- 3.用乙二醇四乙酸四鈉(3 ml/T.75燒瓶)使細胞脫落
- 4.轉移至含17 ml生長培養基之50 ml Falcon管中。
- 5.以150 g離心4 min。
- 6.再將細胞顆粒懸浮於10 ml刺激緩衝液中。計數細胞。
- 7.在含有抗生素之生長培養基中製備5,000個細胞/50 uL之細胞懸浮液。
- 8.用Viaflow 384-125 uL吸量管接種50 uL細胞懸浮液。
- 9.讓板在TC罩下靜置15 min。
- 10.在37°C、5% CO₂及90%濕度下培育。

第2天：

製備試劑溶液：

- 1.分析緩衝液：

500 ml HBSS + 10 ml HEPES。儲存在室溫下

分析緩衝液：250 ml HBSS/HEPES + 250 uL IBMX 1000X溶液 + 0.1 % BSA (825 uL)。每天新製。

2.佛司可林2X溶液：在分析中最終為1 uM：

就化合物稀釋而言：40 uL FSK/100 ml分析緩衝液。

就NPFF稀釋而言：10 uL **DMSO**/ 10 ml 2X FSK。

3.NPFF稀釋：1 mM原液含於dH₂O-在分析中最終為1 uM

a. 5 uL原液/625 uL FSK 2X/DMSO。

b. 100 uL溶液a + 300 uL FSK 2x/DMSO。在分析中最終為1 uM。

c. 實施10個稀釋步驟1/4：100 uL + 300 uL含於FSK 2X/DMSO。

4.化合物稀釋：10 mM原液含於DMSO-在分析中最終為40 uM

a. 5 uL原液/625 uL FSK 2X。

b. 實施11個稀釋步驟1/4：100 uL + 300 uL FSK 2X。

5.cAMP標準品：

a. 10 uL cAMP標準原液(1.12 mM) + 90 uL分析緩衝液。

b. 10 uL稀釋液a + 90 uL刺激緩衝液。

c. 20 uL稀釋液b + 428 uL刺激緩衝液：500 nM。

d. 自稀釋液c開始，實施11次稀釋½：100 uL稀釋液c + 100 uL刺激緩衝液。

6.cAMP檢測試劑：

a. d2-cAMP：1000 uL/ 20 ml溶解緩衝液。(250 uL/ 5 ml用於一塊384-孔板)。

b. 穴狀化合物共軛物：1000 uL/ 20 ml溶解緩衝液。(250 uL/ 5 ml用於一塊384-孔板)。

分析程序

步驟一：

1. 製備刺激緩衝液。
2. 在室溫下放入 Cisbio 溶解緩衝液。
3. 製備 WellMate (先後用 70% 乙醇及 dH₂O 及 HBSS/HEPES 清洗)。
4. 製備佛司可林及化合物稀釋液。

步驟二：用佛司可林刺激

1. 用 50 uL 刺激緩衝液清洗細胞：
 - a. 輕輕拍打板，以移除 O/N 培養基。
 - b. 將白色紙巾置於板頂部，並用 VWR Symphony 4417 離心機以 300 RPM 對倒置板離心 20 秒。
 - c. 用 WellMate 添加 50 uL 刺激緩衝液。
 - d. 輕輕拍打板，以移除 O/N 培養基。
 - e. 將白色紙巾置於板頂部，並用 VWR Symphony 4417 離心機以 300 RPM 對倒置板離心 20 秒。
 - f. 在顯微鏡下檢查細胞。
2. 用 Viaflow 384 添加 10 uL 含 IBMX 之刺激緩衝液。
3. 用 Viaflow 384 (在第 7 層上) 添加 10 uL 含化合物之 2x 佛司可林溶液。在添加至細胞前混合溶液。
4. 在室溫下培育 30 min (將板置於抽屜中，以避免溫度變化)。
5. 製備 cAMP 標準曲線及 cAMP 檢測試劑。
6. 將 20 uL/孔 cAMP 標準曲線添加至標準曲線板 (與分析板相同之板)。

步驟三：LANCER cAMP 分析

1. 用 Combi 384 將 10 uL d2 cAMP /孔添加至分析板中。
2. 手動將 10 uL/孔穴狀化合物共軛物添加至分析板中。
3. 密封板。
4. 在室溫下至少培育 1 小時 (在 24 小時內讀取板)。

- 5.將膠帶置於板底部。
- 6.在Envision program「*Cisbio 384 full plate*」上讀數
- 7.將原始數據做成附件文件。
- 8.用GraphPad分析數據(參見附件文件中之文件)。

結果：

人類R2	0.1% BSA (FFA)	3% BSA (FFA)	0.1% HSA	3% HSA
化合物	IC50(nM) n=4	IC50(nM) n=4	IC50(nM) n=2	IC50(nM) n=2
NPFF	0.43 (+/-0.11)	0.36 (+/-0.17)	0.63 (+/-0.25)	1.9 (+/-1.7)
實例31	53.9 (+/-26)	133 (+/-47)	33.5 (+/-3.11)	98.5 (+/-19)
人類R1	0.1% BSA (FFA)	3% BSA (FFA)	0.1% HSA	3% HSA
化合物	IC50(nM) n=4	IC50(nM) n=4	IC50(nM) n=2	IC50(nM) n=2
NPFF	6.23 (+/-3.3)	7.2 (+/-6.0)	8.4 (+/-0.6)	33.4 (+/-29)
實例31	>1000	>4000	620 (+/-142)	>4uM

表12

可藉由下文所述以下活體內方法評估本發明共軛物(其中生物分子係siRNA)之活性及血漿穩定性。

方法

實例24之共軛物係與GalNAc (參考實例3)及脂肪酸共軛之APOC3 siRNA化合物。自Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)購得人類APOC3轉基因小鼠(B6;CBA-Tg(APOC3)3707Bres/J)。給小鼠隨意飼養標準啮齒動物飼料及水，12小時光照/黑暗週期。在此條件下，APOC3轉基因小鼠自發發展出高三酸甘油脂血症，血漿TG含量顯著升高(Aalto-Setala K, J Clin Invest 1992)。給各組四隻小鼠皮下注射參考實例3 (APOC3 siRNA-GalNAc)或實例24之共軛物，劑量為25 mg/Kg體重。在注射前之基線時以及注射後2、4、7及14天收集血液。藉助Cisbio之HTRF分析，用血漿測量人類APOC3蛋白質濃度。用單因子ANOVA比較組間統計差異。

結果

參考實例3及共軛物24組中之基線血漿APOC3濃度分別為 176 ± 21 mg/dL及 178 ± 9 mg/dL。在用藥後五天，與基線濃度相比，參考實例3以時間相依方式使血漿APOC3濃度下降56%。相比之下，用藥後五天，實例24之共軛物更有效地使血漿APOC3減少，減少80%(圖1)。如圖1所示，參考實例3及實例24之作用時間類似。

本發明共軛物具有至少5 h、至少10 h、至少20 h、至少30 h、至少40 h或至少50 h之血漿穩定性。在一實施例中，與非共軛生物分子相比，血漿穩定性提高至少2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍或50倍或75倍。

組合療法

本發明共軛物與一或多種其他治療劑同時投與、或在後者之前或之後投與。本發明共軛物可藉由與其他製劑相同或不同之投與途徑分開投與，或者一起在與其他製劑相同之醫藥組合物中投與。

在一實施例中，本發明提供一種產品，其包含如先前實施例中任一者之共軛物或如實施例10及13中所述之共軛物混合物、及至少一種在療法中作為組合製劑同時、分開或依次使用之其他治療劑。在一實施例中，該療法係治療有此需求之個體中之代謝病症或疾病、第2型糖尿病、肥胖症、異常血脂症、葡萄糖濃度升高、胰島素濃度升高及糖尿病性腎病，其包括：向該個體投與治療有效量之本發明共軛物或其醯胺、酯或鹽，其中該生物分子係人類生長分化因子15 (GDF15)、其同系物、變體、突變體、片段及其他修飾形式。

作為組合製劑提供之產品包括一種組合物，其包含如前述實施例中任一項之共軛物及一起在相同醫藥組合物中之其他治療劑，或如前述實施例中任一項之共軛物及呈單獨形式(例如呈套組形式)之其他治療劑。

在一實施例中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含如前述實施例中任一項之共軛物或如實施例10或13之共軛物混合物及另一治療劑。視情況地，該醫藥組合物可包含如上所述醫藥上可接受的賦形劑。

在一實施例中，本發明提供一種套組，其包含兩種或更多種獨立醫藥組合物，其中至少一者包含如前述實施例中任一項之共軛物。在一實施例中，該套組包含用於分別容納該等組合物之工具，諸如容器、分隔瓶或分隔箔包裝。此套組之一實例係通常用於包裝錠劑、膠囊及類似物之泡罩包裝。

本發明套組可用於投與不同劑型，例如口服、皮下及非經腸劑型；用於以不同給藥間隔投與獨立組合物；或用於彼此滴定獨立組合物。為促進順從性，本發明套組通常包括投與說明書。

在本發明之組合療法中，本發明共軛物及其他治療劑可藉由相同或不同製造商製造及/或調配。此外，本發明共軛物及其他治療劑可一起進入組合療法：(i)在向內科醫生發佈組合產品之前(例如，在包含本發明共軛物及其他治療劑之套組之情形下)；(ii)在投與不久前藉由內科醫生自己(或在內科醫生指導下)；(iii)在患者自己中，例如在連續投與本發明共軛物及其他治療劑期間。

本發明亦提供如前述實施例中任一項之共軛物之用途，其係用於治療本文所列疾病或病狀，其中患者先前(例如，在24小時內)已經另一治療劑治療。本發明亦提供另一治療劑之用途，其係用於治療本文所列疾病或病狀，其中患者先前(例如，在24小時內)已經如前述實施例中任一項之共軛物治療。

術語與第二製劑或治療「組合」包括共同投與本發明共軛物(例如，如前述實施例中任一項之共軛物或本文所述共軛物)與第二製劑或治療；先投與本發明化合物，接著投與第二製劑或治療；及先投與

第二製劑或治療，接著投與本發明共軛物。

術語「第二製劑」及「助劑(co-agent)」可互換使用，且包括此項技術中已知治療、預防或減少本文所述疾病或病症的症狀之任何製劑，例如選自以下之病症或疾病：代謝病症或疾病、第2型糖尿病、肥胖症、胰臟炎、異常血脂症、酒精性及非酒精性脂肪肝病/脂肪肝炎及其他進行性肝病、胰島素抗性、高胰島素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、動脈粥樣硬化、周邊動脈疾病、中風、心臟衰竭、冠心病、糖尿病併發症(包括(但不限於)慢性腎病)、神經病、胃輕癱及其他代謝病症。

在一實施例中，該療法係治療有此需求之個體中之以下疾病：代謝病症或疾病、第2型糖尿病、肥胖症、胰臟炎、異常血脂症、酒精性及非酒精性脂肪肝病/脂肪肝炎及其他進行性肝病、胰島素抗性、高胰島素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、動脈粥樣硬化、周邊動脈疾病、中風、心臟衰竭、冠心病、糖尿病併發症(包括(但不限於)慢性腎病)、神經病、胃輕癱及其他代謝病症；其包括：向該個體投與治療有效量之本發明共軛物或其醯胺、酯或鹽，其中該生物分子係人類生長分化因子15(GDF15)、其同系物、變體、突變體、片段及其他修飾形式。

欲與本發明共軛物(其中該生物分子係人類生長分化因子15(GDF15)、其同系物、變體、突變體、片段及其他修飾形式)組合之第二製劑之實例包括：

1. 抗糖尿病劑，諸如胰島素、胰島素衍生物及擬似物；胰島素促泌素，諸如磺醯基脲(例如，氯磺丙脲(chlorpropamide)、妥拉磺脲(tolazamide)、乙醯苯磺醯環己脲(acetohexamide)、甲苯磺丁脲(tolbutamide)、格列本脲、格列美脲(glimepiride)、格列吡嗪(glipizide))；格列本脲及瑪爾胰(Amaryl)；促胰島素磺醯基脲受體配

體，諸如美格列奈類，例如那格列奈(nateglinide)及瑞格列奈(repaglinide)；增強胰島素作用(例如，藉由胰島素敏化)，從而促進周圍組織利用葡萄糖之噻唑烷二酮類(例如，羅格列酮(rosiglitazone)(AVANDIA)、曲格列酮(troglitazone)(REZULIN)、吡格列酮(pioglitazone)(ACTOS)、巴格列酮(balaglitazone)、來格列酮(rivoglitazone)、萘格列酮(netoglitazone)、曲格列酮、恩格列酮(englitazone)、環格列酮(ciglitazone)、阿達格列酮(adaglitazone)、達格列酮(darglitazone))；蛋白質酪胺酸磷酸酶-1B (PTP-1B)抑制劑，諸如 PTP-112；膽固醇酯轉移蛋白(CETP)抑制劑，諸如托徹普(torcetrapib)、GSK3 (肝糖合成酶激酶-3)抑制劑，諸如SB-517955、SB-4195052、SB-216763、NN-57-05441及NN-57-05445；RXR配體，諸如GW-0791及AGN-194204；鈉依賴性葡萄糖共運送體抑制劑，諸如T-1095；肝糖磷酸化酶A抑制劑，諸如BAY R3401；雙胍類，諸如二甲雙胍(metformin)及藉由促進利用葡萄糖、減少肝臟產生葡萄糖及/或減少小腸葡萄糖產量其作用之其他製劑； α -葡萄糖苷酶抑制劑，諸如醣祿(acarbose)及migiitoi)及減慢碳水化合物消化及因此自腸吸收及降低餐後高血糖症之其他製劑；GLP-1 (升糖素樣肽-1)、GLP-1類似物，諸如艾塞丁(Exendin)-4及GLP-1擬似物及DPPIV (二肽基肽酶IV)抑制劑，諸如維格列汀(vildagliptin)；

2.降血脂劑，諸如3-羥基-3-甲基-戊二醯基輔酶A (HMG-CoA)還原酶抑制劑，例如洛伐他汀(lovastatin)、皮塔伐他汀(pitavastatin)、辛伐他汀(simvastatin)、普伐他汀(pravastatin)、西立伐他汀(cerivastatin)、美伐他汀(mevastatin)、維羅他汀(velostatin)、氟伐他汀(fluvastatin)、達伐他汀(dalvastatin)、阿托伐他汀(atorvastatin)、羅舒伐他汀(rosuvastatin)及立伐他汀(rivastatin)；角鯊烯合成酶抑制劑；FXR (類法尼醇X受體)及LXR (肝X受體)配體；膽汁酸螯合劑，

諸如考來烯胺及考來維侖(colesevelam)；纖維酸酯類；菸鹼酸及阿司匹林(aspirin)；

3. 抗肥胖劑，諸如奧利司他(orlistat)或利莫那班(rimonabant)、芬特明(phentermine)、托吡酯(topiramate)、qunexa及氯卡色林(locaserin)；

4. 抗高血壓劑，例如亨氏環利尿劑，諸如依他尼酸、呋塞米(furosemide)及托拉塞米(torsemide)；血管收縮素轉化酶(ACE)抑制劑，諸如苯那普利(benazepril)、卡托普利(captopril)、依那普利(enalapril)、福辛普利(fosinopril)、賴諾普利(lisinopril)、莫西普利(moexipril)、培哚普利(perinodopril)、喹那普利(quinapril)、雷米普利(ramipril)及群多普利(trandolapril)；Na-K-ATP酶膜泵之抑制劑，諸如地高辛(digoxin)；中性內肽酶(NEP)抑制劑；ACE/NEP抑制劑，諸如奧帕曲拉(omapatrilat)、山帕曲拉(sampatrilat)及法西多曲(fasidotril)；第II型血管收縮素拮抗劑，諸如坎地沙坦(candesartan)、依普沙坦(eprosartan)、依貝沙坦(irbesartan)、洛沙坦(losartan)、替米沙坦(telmisartan)及縵沙坦(valsartan)，尤其縵沙坦；腎素抑制劑，諸如地替吉侖(ditekiren)、占吉侖(zankiren)、特拉吉侖(terlakiren)、阿利吉侖(aliskiren)、RO 66-1132及RO-66-1168； β -腎上腺髓素受體阻斷劑，諸如醋丁洛爾(acebutolol)、阿替洛爾(atenolol)、倍他洛爾(betaxolol)、比索洛爾(bisoprolol)、美托洛爾(metoprolol)、納多洛爾(nadolol)、普萘洛爾(propranolol)、索他洛爾(sotalol)及噻嗎洛爾(timolol)；強心劑，諸如地高辛、多巴酚丁胺(dobutamine)及甲氰吡酮(milrinone)；鈣離子通道阻斷劑，諸如胺氯地平(amlodipine)、苧普地爾(bepridil)、地爾硫卓(diltiazem)、非洛地平(felodipine)、尼卡地平(nicardipine)、尼莫地平(nimodipine)、硝苯地平(nifedipine)、尼索地平(nisoldipine)及維拉帕米(verapamil)；醛固酮受體拮抗劑；及醛固

酮合成酶抑制劑；

5.過氧化體增殖劑-活化劑受體之促效劑，諸如非諾貝特(fenofibrate)、吡格列酮、羅格列酮、替格列扎(tesaglitazar)、BMS-298585、L-796449、具體描述在專利申請案WO 2004/103995中之化合物(亦即實例1至35之化合物或具體列在請求項21中之化合物)，或具體描述在專利申請案WO 03/043985之化合物(實例1至7之化合物或具體列在請求項19中之化合物)及特別係(R)-1-{4-[5-甲基-2-(4-三氟甲基-苯基)-噁唑-4-基甲氧基]-苯磺醯基}-2,3-二氫-1H-吡啶-2-羧酸或其鹽；及

6.*Expert Opin Investig Drugs* 2003, 12(4): 623-633，圖1至7中描述之具體抗糖尿病化合物。

此外，本揭示內容涵蓋具有與用於促進體重減輕之製劑及方法之組合療法，諸如刺激代謝或降低食慾之製劑及促進體重減輕之改良飲食及/或運動方案。

本發明實例

縮寫

ACN	乙腈
BEH	伸乙基橋雜化
BOC	第三丁氧基羰基
BSA	牛血清白蛋白
DCM	二氯甲烷
DCC	N,N'-二環己基碳二亞胺
DIC	N,N'-二異丙基碳二亞胺
DIPEA	N,N'-二異丙基乙胺
DMAP	二甲胺基吡啶
DMF	N,N'-二甲基甲醯胺

DTT	二硫蘇糖醇
DOT	3,6-二氧雜-1,8-辛二硫醇
EDC	1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳二亞胺
EDTA	乙二胺四乙酸
ESI	電噴霧電離
FFA	螢光灶試驗
Fmoc	苄甲氧碳醯氯
HCTU :	六氟磷酸O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四
甲錄	
HEP	庚烷
HFIP	六氟異丙醇
HPLC	高效液相層析
HRMS	高解析度質譜法
HOBT	羥基苯并三唑
HS	人類血清
LC/MS	液相層析/質譜法
MS	質譜法
MW	分子量
MRT	平均滯留時間
NHS	N-羥基琥珀醯亞胺
NMM	N-甲基嗎啉
NMR	核磁共振
PEG	聚乙二醇
<i>pE</i>	焦麩胺酸
pbf	2,2,4,6,7-五甲基二氫苯并呋喃-5-磺醯基
PG :	保護基

- PK

藥物動力學
- Pol

聚合物載體
- QTOF：

四極飛行時間質譜儀
- Rt：

滯留時間
- Rt或RT：

室溫
- Rpm：

轉/分鐘
- Sc

皮下
- SFC

超臨界流體
- SPPS

固相肽合成
- TBME

甲基第三丁基醚
- Trt

三苯甲基
- THF

四氫呋喃
- TEA

三甲胺
- TIS

三乙基矽烷
- t、s、quin、br、m、d (三重態、單態、五重態、寬態、多重態)
- UPLC

超高效液相層析
- 合成：

所述LCMS方法

方法A	管柱	Acquity BEH 1.7μm 2.1x50mm
	管柱溫度	50℃
	溶離液	A：水(0.1%甲酸)；B：ACN (0.1%甲酸)
	流速	1 ml/min
	梯度	0 min 2% B；2%至98% B，在1.7 min內；2.06 min 98% B；2.16 min 2% B
	質譜儀	單四極ESI掃描範圍120-1600
	UPLC	Waters Acquity
方法B		

	管柱	Acquity BEH 1.7 μm 2.1x50 mm
	管柱溫度	50°C
	溶離液	A：水(0.1%甲酸)；B：ACN (0.1%甲酸)
	流速	1 ml/min
	梯度	0 min 40% B；40%至98% B，在1.40 min內；2.05 min 98% B；2.1 min 40% B
	質譜儀	單四極ESI掃描範圍120-1600
	UPLC	Waters Acquity
方法C		
	管柱	XBridge C18管柱，3.5 μm，3.0 x 30 mm
	管柱溫度	40°C
	溶離液	A：水(0.1%甲酸)；B：ACN
	流速	2 ml/min
	梯度	0 min 40% B；40%至95% B，在1.70 min內；2.0 min 95% B；2.1 min 40% B
	質譜儀	單四極ESI掃描範圍150-1600
	HPLC	Agilent 1100系列
方法D		
	管柱	Hilic 2.1 x 100 mm
	管柱溫度	55°C
	溶離液	A：CO ₂ B：MeOH
	流速	2 ml/min
	梯度	0.15 min 2% B；2%至50% B，在1.5 min內；2.1 min 50% B；2.25 min 2% B；2.5 min 2% B
	質譜儀	單四極ESI
	SCF	Waters Acquity
方法E		
	管柱	Proswift Monolith 4.6x50 mm
	管柱溫度	50°C
	溶離液	A：水(0.1%甲酸)；B：ACN (0.1%甲酸)
	流速	1 ml/min
	梯度	0.7 min 2% B；2%至60% B，在12.8 min內；14 min 60% B；14.2 min 2% B

	質譜儀	Qtof ESI掃描範圍600-3500；由Mass Lynx軟體套件中之Max Ent 1解迴旋
	UPLC	Waters Acquity

HPLC-分析方法F

- 管柱：XBridge BEH300 C18 (100x4.6 mm)，3 μm；部件號：186003612
- 溶離液A：0.1% TFA含於水中/溶離液B：0.1% TFA含於ACN中
- 流速：1.0 ml/min
- 溫度：40℃

梯度：

時間[min]	A [%]	B [%]
0.0	98	2
18	2	98
20	2	98
22	98	2

UPLC-HRMS-分析方法G

- Waters Acquity UPLC® BEH C18，1.7 μm，2.1x50 mm；部件號：186002350
- 溶離液A：0.05% FA +3.75 mM乙酸銨含於水中；溶離液B：0.04% FA含於ACN中
- 流速：1.0 ml/min
- 溫度：50℃
- 梯度：2至98%，在4.4 min內

方法H：LC-MS方法

- HPLC：流動相A：2% HFIP+0.1% TEA；流動相B：甲醇；
- 梯度：0 min 95% A，4 min：75% A，8 min 10% A，8.1 min

95% A，10 min 95% A；

- 流速：250 ml/min
- 管柱：Acquity UPLC BEH C18，1.7 μ m，2.1x50 mm(waters)；
- 管柱溫度：75°C
- MS：QTOF(waters)負模式；
- ESI：2.9 kv；毛細管溫度350°C；噴霧氣體：600 ml/min；源

溫度：150°C

方法I：LC-MS方法：

- 流動相A：WATER+0.1%甲酸；
- 流動相B：乙腈+0.1%甲酸；
- 梯度：0 min 98% A，0.06 min 98% A，1.76 min 2% A，2.06 min 2% A，2.16 min 98%；流速：1 ml/min；

• 管柱：ACQUITY UPLC BEH C18，130Å，1.7 μ m，2.1 mm X 50 mm；

- 管柱溫度：50°C；
- 檢測器：UV/Vis/CAD (電霧式檢測器)

UPLC HRMS方法J：

- 管柱：Acquity BEH300 C4 1.7 μ m，2.1x50 mm
- 溶離液A：水(0.1% TFA)
- 溶離液B：ACN (0.1% TFA)
- 流速：0.5 ml/min
- 溫度：40°C
- 梯度：20%維持0.5 min，在10 min內斜升至80% ACN

方法K：

- 管柱：Waters Protein BEH C4管柱，300埃，3.5 μ m，4.6x100 mm
- 流動相：A：水(0.05% TFA) B：ACN (0.05% TFA)

- 流速：2 ml/min
- 溫度：40℃
- 梯度：25% B維持1 min，在10 min時自25-60% ACN斜升，在10.50 min時斜升至95% B，並維持2 min，然後在25%下平衡2 min。總運行時間為15 min。

- 質譜儀：Waters ZQ質譜儀
- UPLC：管柱：BEH C4，300埃，1.7 um，2.1x50 mm

方法L：

- 管柱：Proswift Monolith 4.6 x 50 mm
- 流動相：A：水(0.1%甲酸)B：ACN (0.1%甲酸)
- 流速：1 ml/min
- 溫度：50℃
- 梯度：0 min 3% B；3%至80% B，在2 min內；2.1 min 10% B；2.8 min 95% B；2.9 min 3% B
- 質譜儀：Qtof ESI掃描範圍100-1900；由Mass Lynx軟體套件中之Max Ent 1解迴旋

UPLC：Waters Acquity

方法M	管柱	Acquity BEH 1.7 μm 2.1x50 mm
	管柱溫度	50℃
	溶離液	A：水(0.1%甲酸)；B：ACN (0.1%甲酸)
	流速	1 ml/min
	梯度	0 min 2% B；2%至98% B，在4.40 min內；5.15min 98% B；5.19min 2% B
	質譜儀	單四極ESI掃描範圍120-1600
	UPLC	Waters Acquity
方法N		
	管柱	Sunfire 30x50 mm 5 um

	溶離液	A：水(0.1% TFA)；B：ACN (0.1% TFA)
	流速	75 ml/min
	梯度	5-20% ACN在3.2 min內
方法O		
	管柱	Acquity BEH 1.7 μm 2.1x50 mm
	管柱溫度	50°C
	溶離液	A：水(0.1%甲酸)；B：ACN (0.1%甲酸)
	流速	1 ml/min
	梯度	0 min 40% B；40%至98% B，在3.40 min內；5.15 min 98% B；5.19 min 40% B
	質譜儀	單四極ESI掃描範圍120-1600
	UPLC	Waters Acquity
方法P		
	管柱	Proswift Monolith 4.6 x 50 mm
	管柱溫度	50°C
	溶離液	A：水(0.1%甲酸)B：ACN (0.1%甲酸)
	流速	1 ml/min
	梯度	0 min 2% B；2%至98% B，在2 min內；2.1 min 98% B；2.3 min 2% B；3.3 min 2% B
	質譜儀	Qtof ESI掃描範圍100-1900；由Mass Lynx軟體套件中之Max Ent 1解迴旋
	UPLC	Waters Acquity
方法Q		
	管柱	Proswift Monolith 4.6x50 mm
	管柱溫度	50°C
	溶離液	A：水(0.1%甲酸)；B：ACN (0.1%甲酸)
	流速	1 ml/min
	梯度	0.7 min 2% B；2%至60% B，在12.8 min內；14 min 60% B；14.2 min 2% B
	質譜儀	Qtof ESI掃描範圍600-3500；由Mass Lynx軟體套件中之Max Ent 1解迴旋
	UPLC	Waters Acquity

方法R	管柱	Proswift Monolith 4.6 x 50 mm
	管柱溫度	50℃
	溶離液	A：水(0.1%甲酸)B：ACN (0.1%甲酸)
	流速	1 ml/min
	梯度	0 min 3% B；3%至90% B，在7 min內；7.1 min 15% B；7.70 min 95% B；7.8 min 3% B
	質譜儀	Qtof ESI掃描範圍100-1900；由Mass Lynx軟體套件中之Max Ent 1解迴旋
	UPLC	Waters Acquity

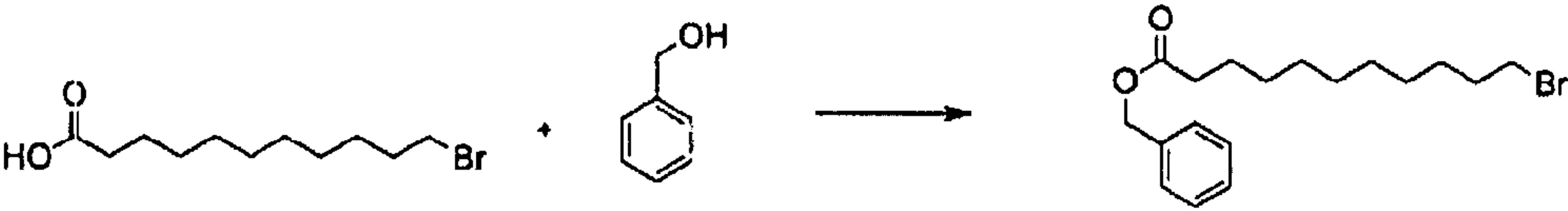
分析方法S：

- Xbridge C18管柱，3.5 μM，3.0 x 3.0 mm
- 溶離劑：A：水+ 5 mM氫氧化銨B：ACN
- 流速：2 ml/min
- 梯度：0.0 min 2% B；2%至95% B，在1.70 min內；2.00 min 95% B；2.10 min 5% B；
- 質譜儀：單四極ESI
- HPLC：Agilent 1100系列
- 溫度：40℃

分析方法T：

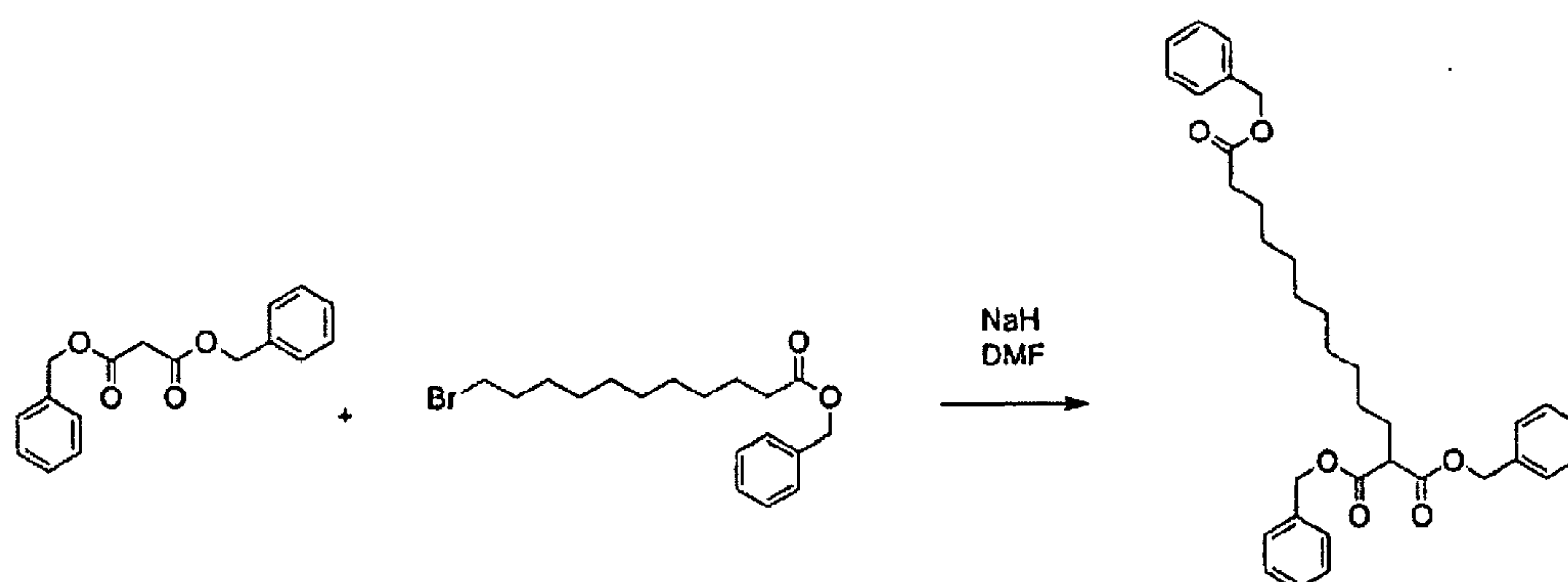
管柱	Acquity BEH 1.7 μm 2.1x50 mm
管柱溫度	50℃
溶離液	A：水(0.1%甲酸)B：ACN (0.1%甲酸)
流速	1 ml/min
梯度	0 min 5% B；5%至60% B，在4 min內；7.2 min 98% B；4.5 min 95% B；4.6 min 5% B
質譜儀	Acquity G2 Xevo QToF-Rs(FWHM) > 20000 精確度< 5 ppm
UPLC	Waters Acquity

中間物1：11-溴十一酸苄酯



在N₂及室溫下，將11-溴十一酸(4 g, 15.08 mmol)、苄醇(1.875 ml, 18.10 mmol)及DMAP (92 mg, 0.754 mmol)溶解於DCM中。添加EDC-HCl (4.34 g, 22.63 mmol)，並攪拌該反應17 hr。濃縮反應，然後用Et₂O (150 ml)稀釋。用水(30 ml)萃取該混合物，並用Et₂O (150 ml)萃取水相。用鹽水(20 ml)清洗合併有機物，並在Na₂SO₄上乾燥。移除溶劑，並藉由急驟管柱(矽膠120 g, 0-10% Et₂O /石油醚)純化殘餘物，得到呈無色液體之中間物1(6.75 g, 定量)：LCMS法之方法A Rt = 1.79 min, M+H 355.2；¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 1.18-1.36 (m, 10 H) 1.37-1.47 (m, 2 H) 1.64 (quin, *J*=7.33 Hz, 2 H) 1.85 (dt, *J*=14.56, 7.06 Hz, 2 H) 2.35 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 3.40 (t, *J*=6.88 Hz, 2 H) 5.11 (s, 2 H) 7.28-7.45 (m, 5 H)。

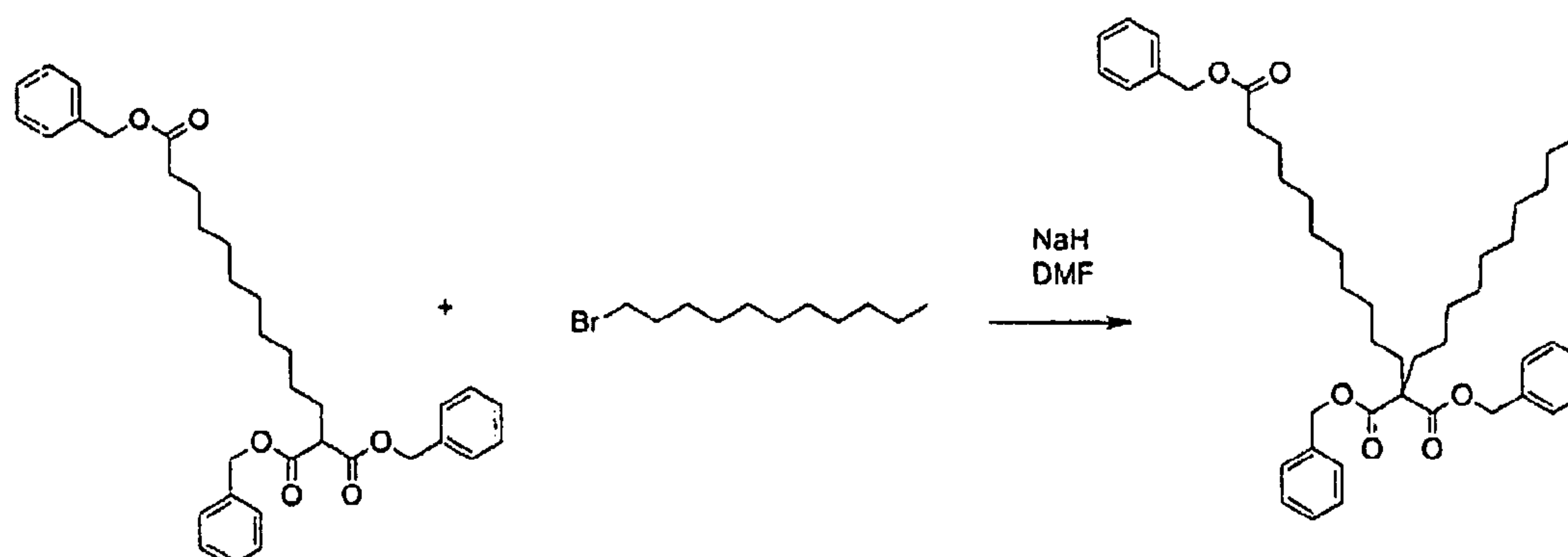
中間物2：十一烷-1,1,11-三羧酸三苄酯。



在N₂及0℃下將NaH (113 mg, 2.83 mmol)懸浮於DMF (6 ml)中。在30 min內將丙二酸二苄酯(0.704 ml, 2.82 mmol)緩慢添加至攪拌懸浮液中。添加溶解於DMF (3 ml)之中間物1 (903 mg, 2.54 mmol)，並在0℃下攪拌該反應2.75 hr，然後使之升溫至室溫並攪拌過夜。用Et₂O (75 ml)稀釋反應，並用水(20 ml)萃取。用Et₂O (75 ml)萃取水相，並用鹽水(30 ml)清洗合併有機物。在Na₂SO₄上乾燥有機物並濃縮。藉由急驟管柱(矽膠80 g, 0-10% EtOAc / HEP)純化濃縮物，得到純度70%之無色油(770 mg, 1.38 mmol, 34%)：LCMS方法B Rt = 1.41

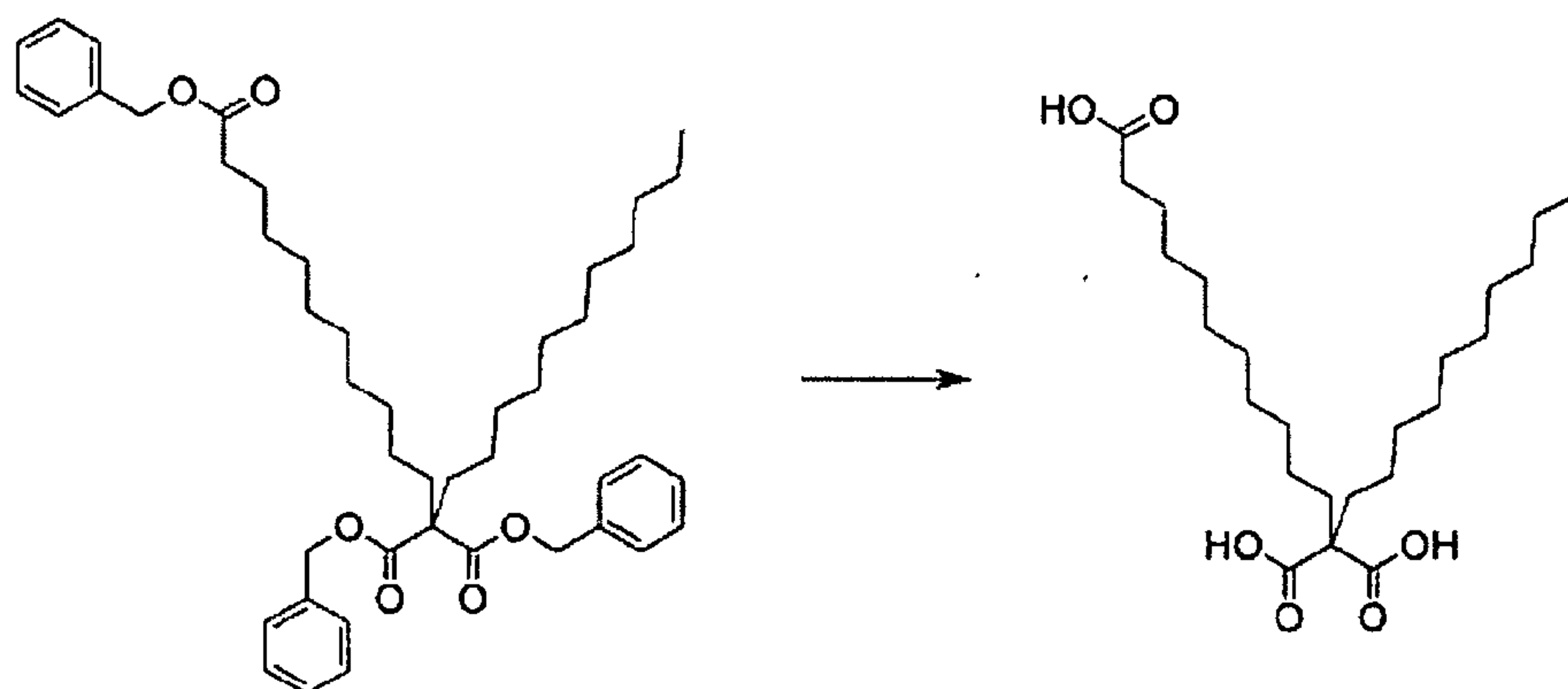
min, M+H 559.6。

中間物3：二十二烷-1,11,11-三羧酸三苄酯



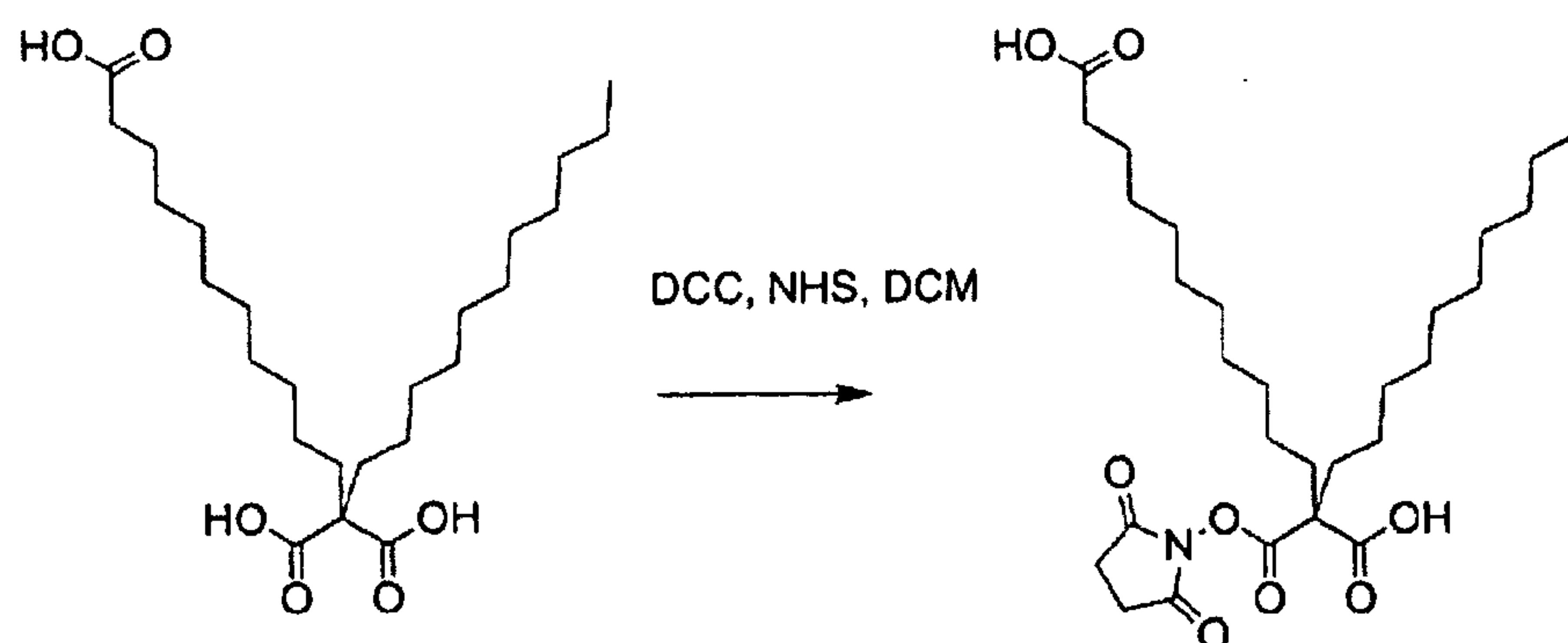
在0℃及N₂下向NaH (66.1 mg, 1.65 mmol)含於DMF (2 ml)之懸浮液添加含於DMF(4 ml)之中間物2 (770 mg, 1.38 mmol)。35 min後，向該反應添加1-溴十一烷 (0.338 ml, 1.52 mmol)含於DMF (2 ml)之溶液，在攪拌25 min後使之升溫至室溫。攪拌該反應2天。用Et₂O (75 ml)稀釋反應，並用10% LiCl (25 ml)萃取。用Et₂O (75 ml)萃取水相。用鹽水清洗合併有機物，在Na₂SO₄上乾燥並蒸發溶劑。藉由急驟管柱(矽膠80 g, 0-10% EtOAc/HEP)純化殘餘物，得到呈無色油之中間物3 (590 mg, 0.827 mmol, 33%)：LCMS法之方法B Rt= 1.89 min, M+Na 735.5；¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.87-0.95 (m, 3 H) 1.07 (br. s., 4 H) 1.14-1.36 (m, 28 H) 1.66 (quin, *J*=7.43 Hz, 2 H) 1.85-1.95 (m, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 5.12 (s, 4 H) 5.14 (s, 2 H) 7.27 (d, *J*=2.32 Hz, 1 H) 7.28-7.43 (m, 14 H)。

中間物4：二十二烷-1,11,11-三羧酸



將溶解於THF (12 ml)中之中間物3 (590 mg, 0.827 mmol)與10% 碳載鈀含於THF (8 ml)之懸浮液合併在一起。攪拌該懸浮液，並經由氣球置於氫氣氛下。1 hr後，使該反應通過薄膜過濾器，並用EtOAc沖洗固體。蒸發濾液，得到呈無色油之標題化合物(353 mg, 0.798 mmol, 96%)：LCMS法之方法B Rt = 1.16 min, M+H 443.5；¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.77-0.84 (m, 3 H) 1.06-1.33 (m, 32 H) 1.59 (quin, *J*=7.18 Hz, 2 H) 1.83-1.92 (m, 4 H) 2.32 (t, *J*=7.03 Hz, 2 H)。

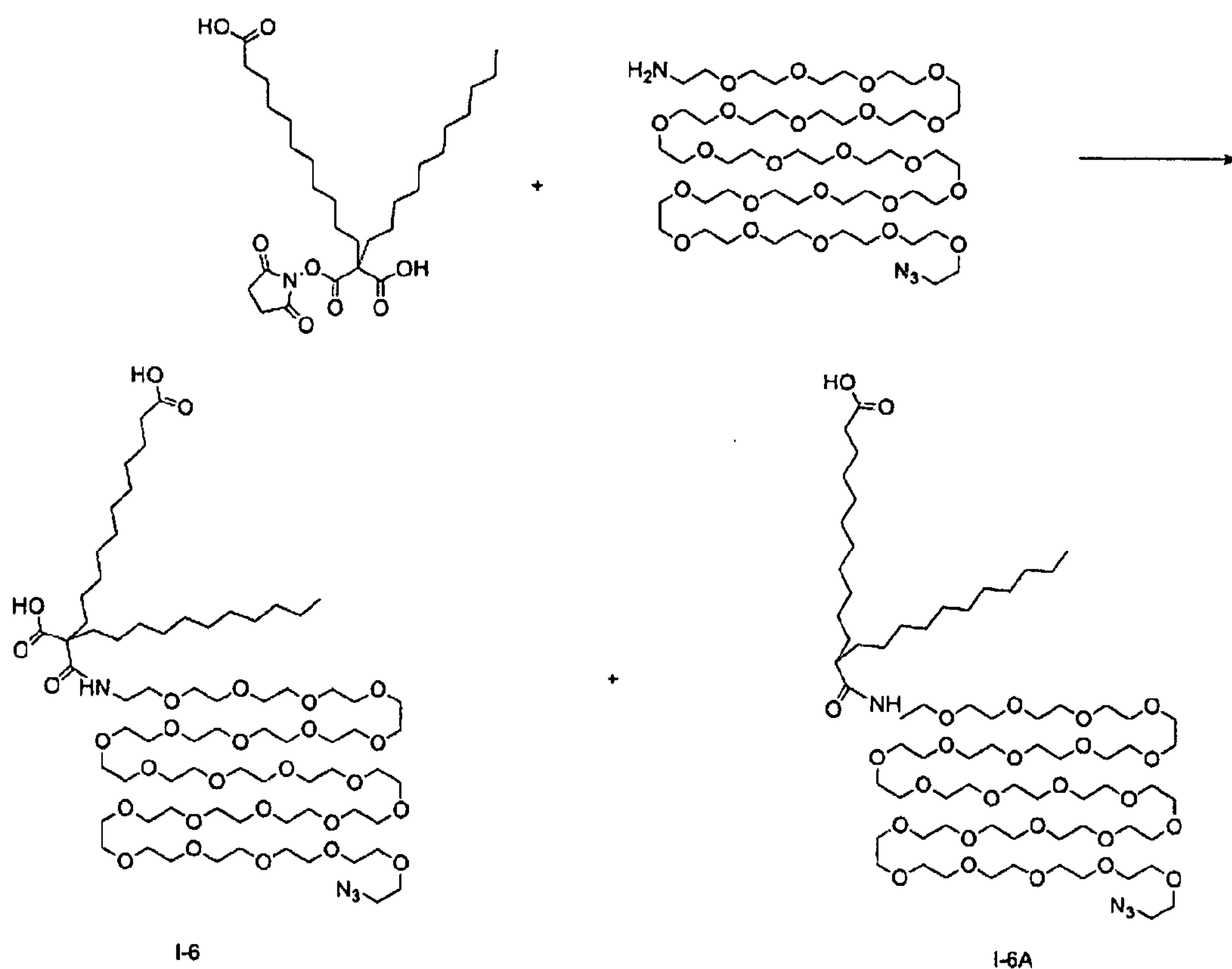
中間物5：2-(((2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基)羰基)-2-十一基十三烷二酸



在N₂下將DCC (126 mg, 0.610 mmol)含於DCM (1.57 mL)之溶液添加至中間物4及N-羥基琥珀醯亞胺含於DCM (5 ml)及THF (5 ml)之溶液。3.5 hr後，蒸發溶劑，並藉由超臨界流體層析(SFC；Princeton 2-乙基-吡啶，20x150 mm, 20-30% MeOH / CO₂)純化殘餘物，得到呈無色油之標題化合物(138 mg, 0.256 mmol, 50%)：LCMS方法B Rt =

1.21 min, $M+H$ 540.5; ^1H NMR (600 MHz, 乙腈- d_3) δ ppm 0.91 (t, $J=7.20$ Hz, 3 H) 1.22-1.42 (m, 34 H) 1.57 (quin, $J=7.34$ Hz, 2 H) 1.93-1.96 (m, 2 H) 2.28 (t, $J=7.47$ Hz, 2 H) 2.79 (br. d, $J=6.30$ Hz, 4 H)。

中間物6及6A：2-(疊氮基-PEG23-胺甲醯基)-2-十一基十三烷二酸構築體(6)及12-(疊氮基-PEG23-胺甲醯基)二十三酸構築體(6A)

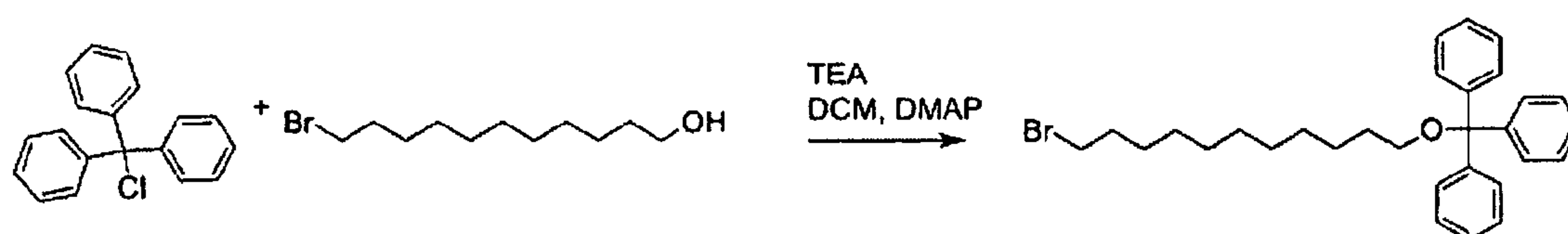


將中間物5 (36 mg, 0.066 mmol)及疊氮基-dPEG23-NH₂ (Quanta Biodesign:73 mg, 0.066 mmol)合併於THF (1.5 ml)中，並在振盪器板上混合15 min，然後添加DIPEA (17 μ L, 0.10 mmol)。使該反應在該振盪器板上過夜。蒸發溶劑，並藉由HPLC (Sunfire C18 30x50 mm, 55-80% ACN/水+ 0.1% TFA)純化殘餘物，得到中間物6 (39 mg, 0.025 mmol, 38%)及中間物6a (20 mg, 0.013 mmol, 20%)：LCMS方法B R_t = 1.11 min, $[M+2H]^{+2}$ 763.4; ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.86-0.93 (m, 3 H) 1.10-1.19 (m, 2 H) 1.20-1.29 (m, 23 H) 1.32 (br. s., 7 H) 1.58-1.69 (m, 2 H) 1.69-1.79 (m, 2 H) 1.96-2.10 (m, 2 H) 2.35 (t,

$J=7.15$ Hz, 2 H) 3.41 (t, $J=5.07$ Hz, 2 H) 3.51-3.57 (m, 2 H) 3.58-3.62 (m, 2 H) 3.62-3.73 (m, 90 H) 7.46 (br. s., 1 H); LCMS方法B $R_t = 1.23$ min, $[M+2]^{+2}$ 740.9; ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.83-0.96 (m, 3 H) 1.27 (br. s., 25 H) 1.29-1.37 (m, 7 H) 1.37-1.46 (m, 2 H) 1.53-1.73 (m, 4 H) 2.34 (t, $J=7.21$ Hz, 2 H) 3.41 (t, $J=5.07$ Hz, 2 H) 3.44-3.52 (m, 2 H) 3.55-3.60 (m, 2 H) 3.60-3.74 (m, 90 H) 6.19-6.30 (m, 1 H)。

或者，根據以下程序得到構築體6A：將中間物5 (48 mg, 0.042 mmol) 含於THF (1 ml)之溶液添加至裝有疊氮基-PEG23-胺(Quanta Biodesign cat # 10525) (46 mg, 0.042 mmol)之小瓶中。攪動該反應20 min，然後添加DIPEA (11 μL , 0.063 mmol)，然後保持過夜。添加疊氮基-PEG23-胺(23 mg, 0.021 mmol)及DIPEA (5 μL , 0.029 mmol)，並又攪動該反應一天。蒸發溶劑，並藉由HPLC (Xbridge C18 30x50 mm, 10-30% ACN / 5 mM NH_4OH)純化殘餘物。凍乾溶離份得到產物混合物。藉由HPLC (Sunfire C18 30x50 mm, 45-70% ACN / 水 +0.1% TFA)純化物質，得到標題中間物6A (30 mg, 0.020 mmol, 48%)：LCMS方法B $R_t = 0.81$ min, $[M+H+H_3O]^{+2}$ 764.5; ^1H NMR (400 MHz, 乙腈- d_3) δ ppm 1.30 (br. s., 28 H) 1.40-1.50 (m, 2 H) 1.50-1.62 (m, 6 H) 2.14 (t, $J=7.52$ Hz, 2 H) 2.23-2.35 (m, 3 H) 3.32 (q, $J=5.58$ Hz, 2 H) 3.37-3.43 (m, 2 H) 3.47-3.52 (m, 2 H) 3.53-3.68 (m, 90 H) 6.54 (br. s., 1 H)。

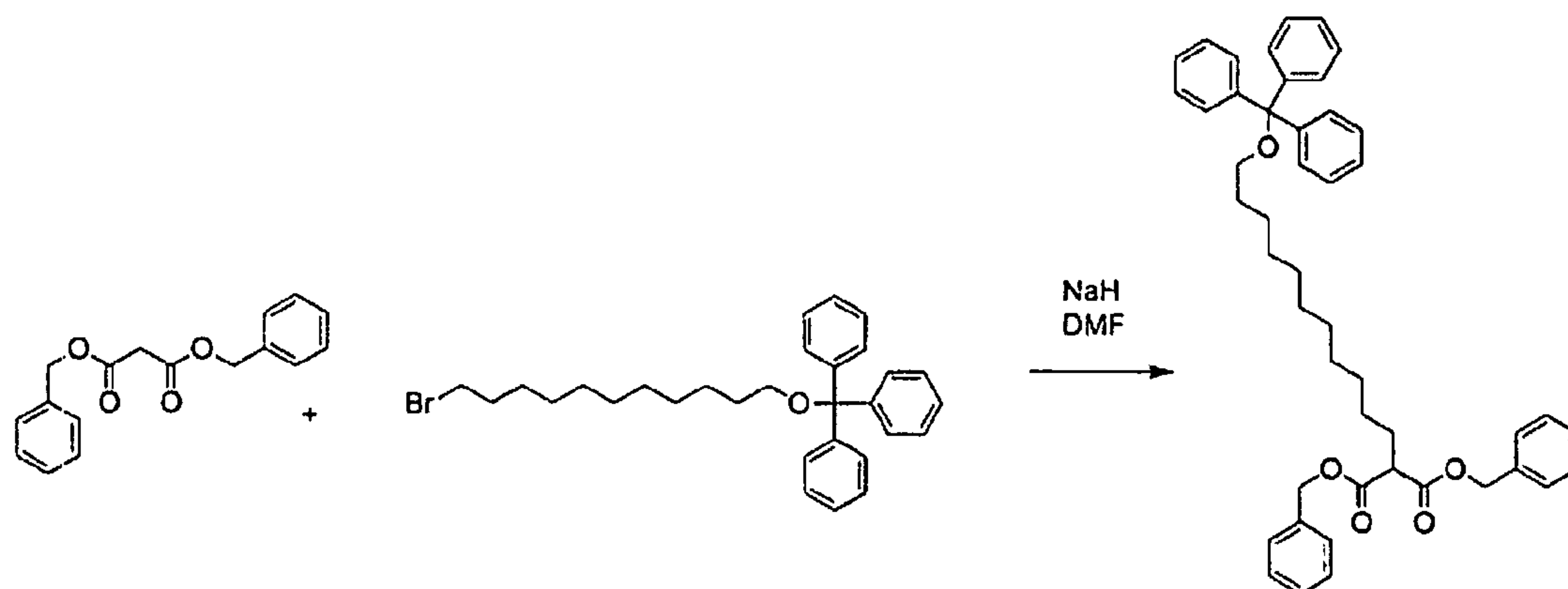
中間物7：(((11-溴十一基)氧基)甲烷三基)三苯



在 N_2 下將三苯甲基氯(2.49 g, 8.92 mmol)、11-溴十一烷-1-醇(2.00 g, 7.96 mmol)及DMAP (10 mg, 0.080 mmol)溶解於DCM (16

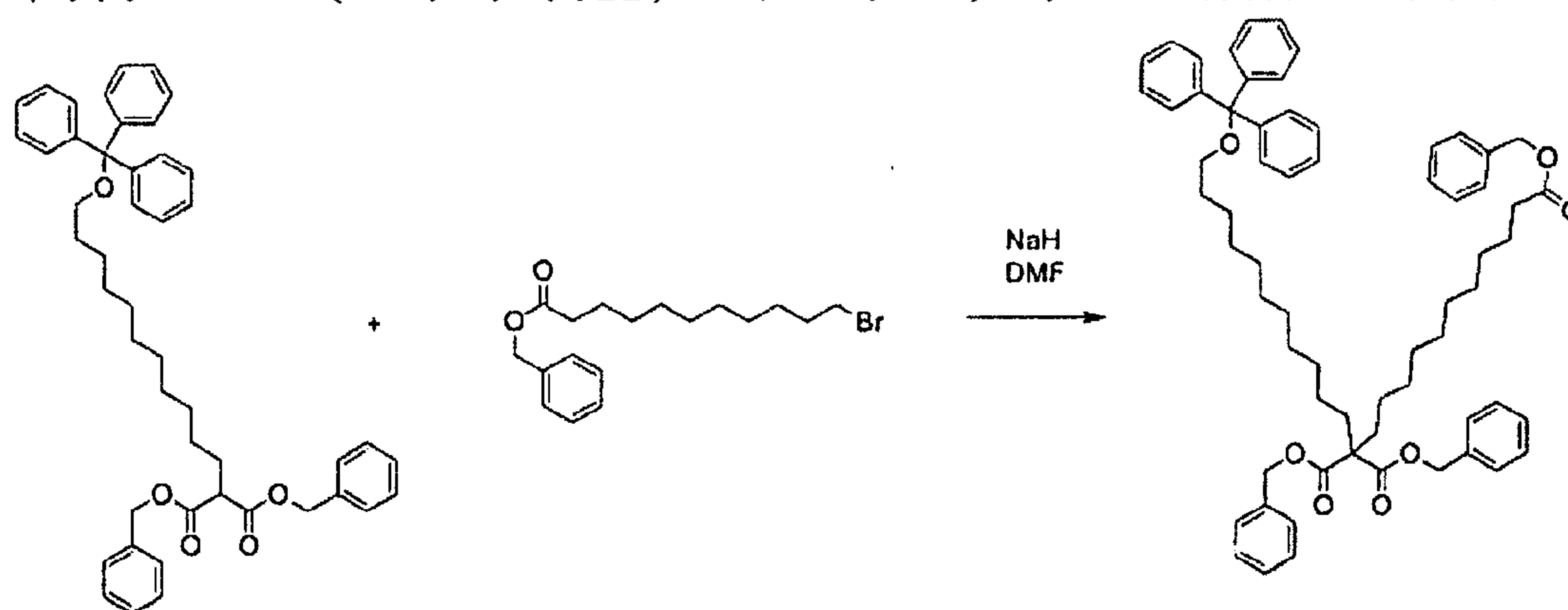
ml)中。在攪拌下，添加DIPEA (1.39 ml, 7.96 mmol)，並維持該反應7天。將反應分配於DCM (20 ml)及水(10 ml)。用水(20 ml)萃取有機相，在MgSO₄上乾燥並濃縮。藉由急驟管柱(矽膠120 g, 0-6% EtOAc / HEP)純化濃縮物，得到呈無色油之中間物7 (2.50 g, 5.07 mmol, 64%)：¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 1.19-1.49 (m, 14 H) 1.58-1.69 (m, 2 H) 1.79 (dt, *J*=14.50, 7.00 Hz, 1 H) 1.87 (dt, *J*=14.55, 7.03 Hz, 1 H) 3.07 (t, *J*=6.66 Hz, 2 H) 3.43 (t, *J*=6.85 Hz, 1 H) 3.55 (t, *J*=6.79 Hz, 1 H) 7.18-7.36 (m, 10 H) 7.42-7.52 (m, 5 H)。

中間物8：2-(11-(三苯甲氧基)十一基)丙二酸二苄酯



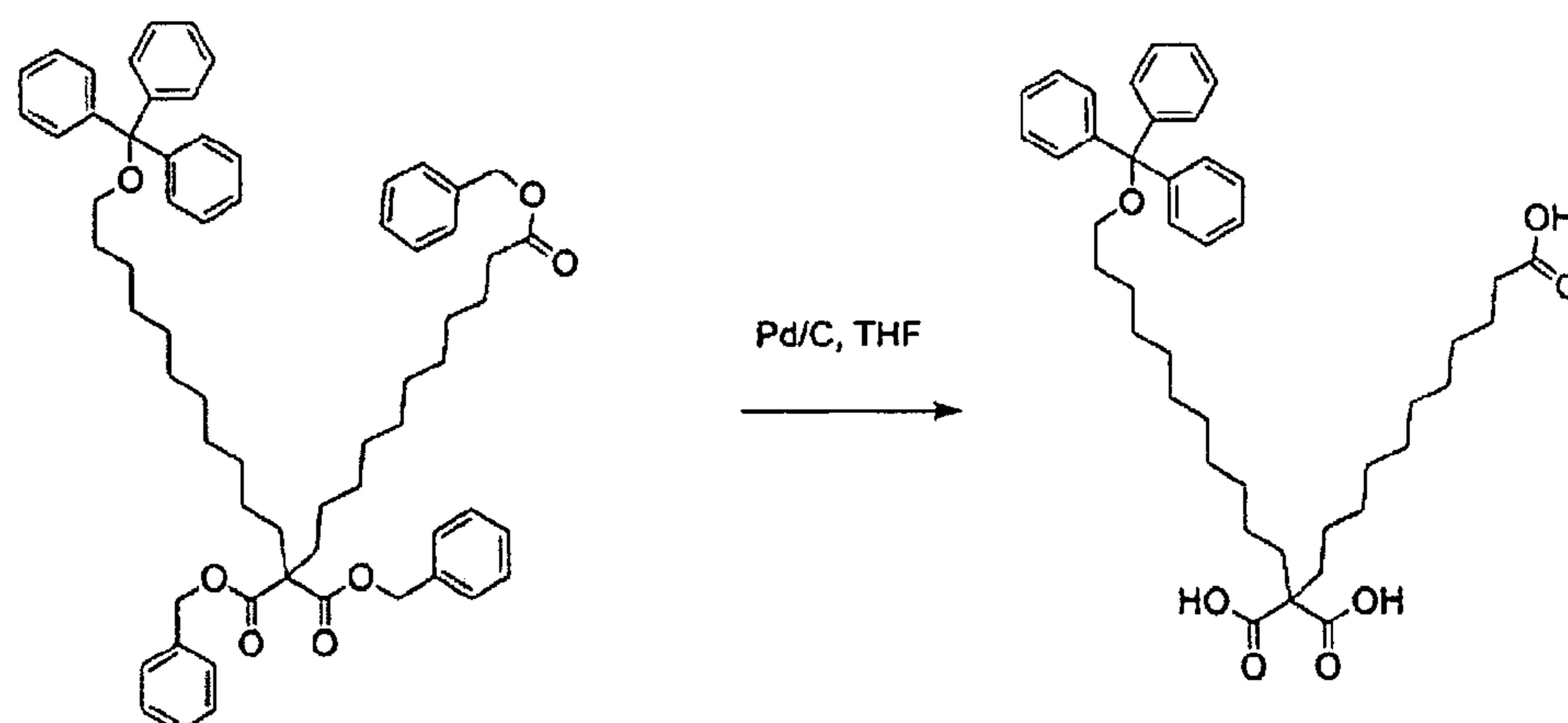
在N₂及0°C下將NaH (113 mg, 2.83 mmol)懸浮於DMF (6 ml)中。向經攪拌懸浮液緩慢添加丙二酸二苄酯。30 min後，添加中間物7 (1.26 g, 2.54 mmol)含於DMF (3 ml)之溶液。攪拌15 min後，使所得混合物升溫至室溫。3天後，用Et₂O (75 ml)稀釋反應，並用水(40 ml)萃取。用Et₂O (75 ml)萃取水相。在Na₂SO₄上乾燥合併有機物並濃縮。藉由急驟管柱(矽膠80 g, 0-10% EtOAc / HEP)純化濃縮物，得到呈無色油之標題化合物(815 mg, 1.17 mmol, 41%)：HPLC方法B *R*_t = 1.68 min；¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 1.16-1.40 (m, 16 H) 1.58-1.69 (m, 2 H) 1.94 (q, *J*=7.38 Hz, 2 H) 3.06 (t, *J*=6.66 Hz, 2 H) 3.45 (t, *J*=7.52 Hz, 1 H) 5.16 (s, 4 H) 7.21-7.28 (m, 3 H) 7.28-7.39 (m, 16 H) 7.42-7.51 (m, 6 H)。

中間物9：22-(三苯甲氧基)二十二烷-1,11,11-三羧酸三苄酯



在N₂及0℃下將中間物8 (815 mg, 1.17 mmol)含於DMF (2 ml)之溶液添加至NaH (56 mg, 1.40 mmol)含於DMF (2 ml)之懸浮液中。攪拌該混合物1 hr。向該反應添加含於DMF (2 ml)之11-溴十一酸苄酯 (457 mg, 1.29 mmol)。添加20 min後，使該反應升溫至室溫並攪拌過夜。用Et₂O (75 ml)稀釋反應，並用水(25 ml)萃取。用Et₂O (75 ml)萃取水相，並合併有機物。在Na₂SO₄上乾燥合併有機物並蒸發。藉由急驟管柱(矽膠40 g, 0-10% EtOAc / HEP)純化殘餘物，得到呈無色油之標題化合物(780 mg, 0.803 mmol, 69%)：¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.99-1.14 (m, 4 H) 1.15-1.41 (m, 26 H) 1.58-1.71 (m, 4 H) 1.82-1.96 (m, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.52 Hz, 2 H) 3.06 (t, *J*=6.66 Hz, 2 H) 5.12 (s, 4 H) 5.14 (s, 2 H) 7.28 (s, 24 H) 7.42-7.52 (m, 6 H)。

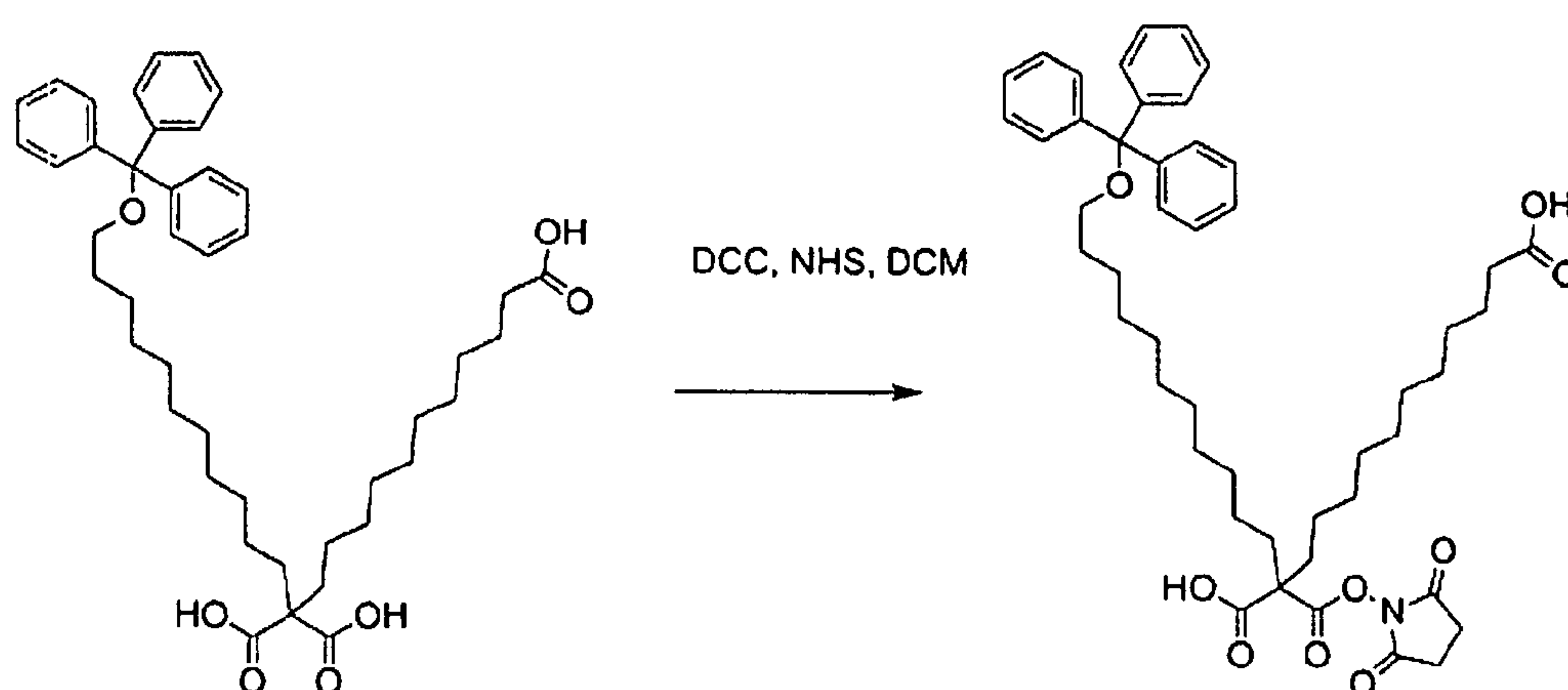
中間物10：22-(三苯甲氧基)二十二烷-1,11,11-三羧酸



將10%碳載鈀(11 mg, 0.010 mmol)含於THF (2.5 ml)之懸浮液添

加至中間物**9** (200 mg, 0.206 mmol)含於THF (2.5 mL)之溶液中。經由氣球將經攪拌懸浮液置於氫氣下。2.25 hr後，使該反應通過薄膜過濾器，並用EtOAc沖洗固體。蒸發濾液得到中間物**10** (150 mg, 定量)：
¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 1.04-1.33 (m, 30 H) 1.45-1.62 (m, 4 H) 1.76-1.91 (m, 4 H) 2.21-2.36 (m, 2 H) 2.97 (t, *J*=6.60 Hz, 2 H) 7.06-7.18 (m, 4 H) 7.19-7.24 (m, 5 H) 7.33-7.50 (m, 6 H)。

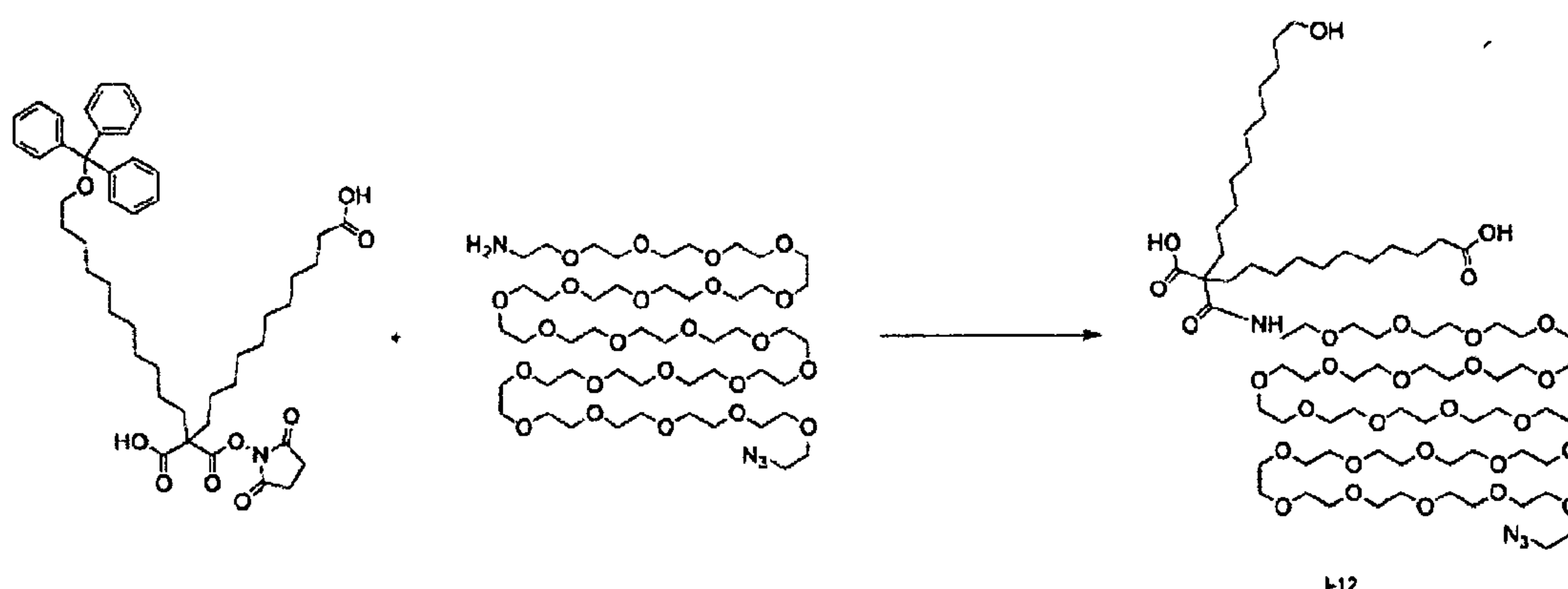
中間物**11**：2-(((2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基)羰基)-2-(11-(三苯甲氧基)十一基)十三烷二酸(**11**)。



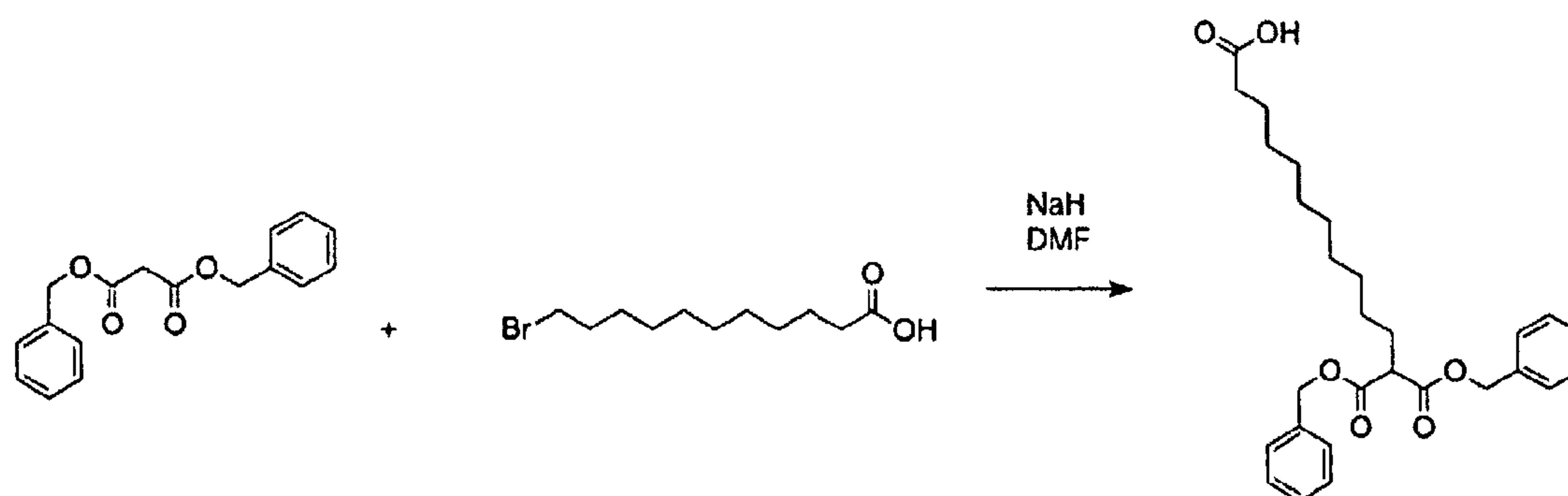
將中間物**10** (150 mg, 0.214 mmol)及N-羥基琥珀醯亞胺(25 mg, 0.214 mmol)合併於DCM (4 mL)中。添加溶解於DCM (0.61 mL)中之DCC (49 mg, 0.235 mmol)，並在室溫下攪拌該反應7 hr。蒸發溶劑，並先後藉由HPLC (Sunfire C18 30x50 mm; 65-95% ACN /水 + 0.1% TFA)及SFC (Princeton 2-乙基吡啶管柱20x100 mm, 25-35% MeOH / CO₂)純化殘餘物，得到呈無色油之中間物**11** (34 mg, 0.043 mmol, 20%)：LCMS方法B *R*_t = 1.47 min, *M*-CO₂H 752.7；¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 1.13-1.42 (m, 30 H) 1.56-1.73 (m, 4 H) 1.94-2.14 (m, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.21 Hz, 2 H) 2.83 (br. s., 4 H) 3.06 (t, *J*=6.66 Hz, 2 H) 7.15-7.28 (m, 3 H) 7.29-7.36 (m, 6 H) 7.41-7.50 (m, 6 H)。

中間物**12**：2-((疊氮基-PEG23)胺甲醯基)-2-(11-羥基十一基)十三

烷二酸構築體



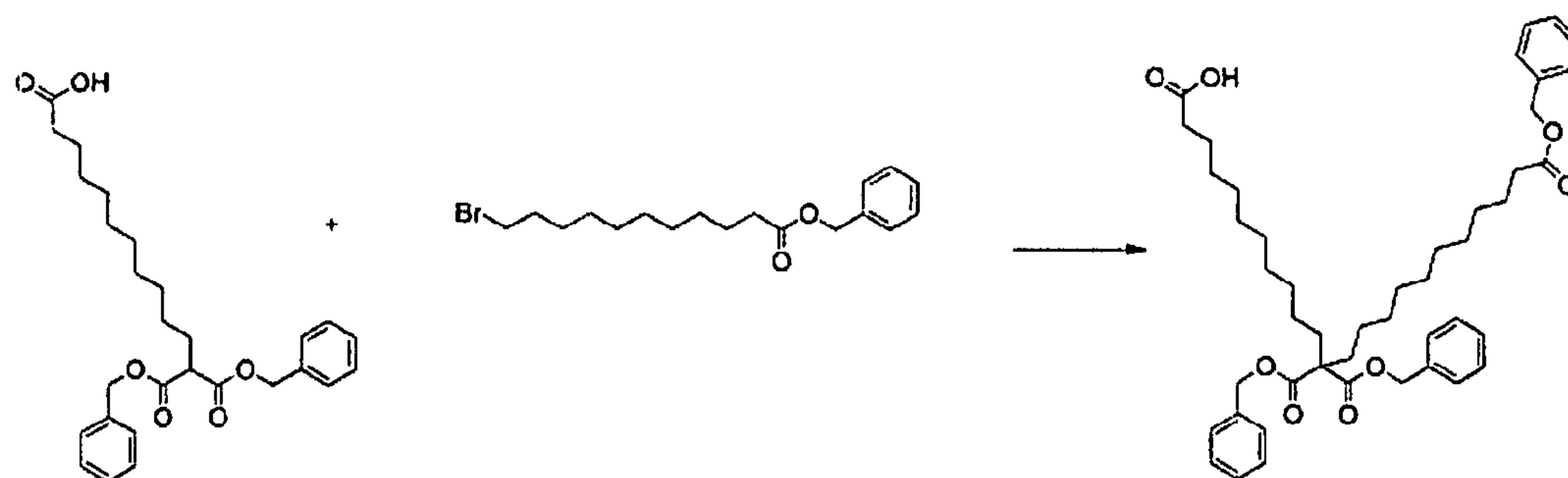
在 N_2 下將含於 THF (1.5 mL) 之疊氮基 -dPEG23- 胺 (Quanta Biodesign) 42 mg, 0.038 mmol) 與中間物 **11** (34 mg, 0.043 mmol) 合併在一起。將該反應置於振盪器板上，並攪動 20 min。添加 DIPEA (7.44 μ L, 0.043 mmol) 並攪動該反應 2 hr。添加 DIPEA (4 μ L, 0.023 mmol) 並維持該反應過夜。蒸發溶劑，並將殘餘物溶解於 DCM (3 ml) 及 TFA (0.5 ml) 中。攪動該溶液 1 hr，在此時汽提溶劑。藉由 HPLC (sunfire C18 30x50 mm, 45-70% ACN/水+0.1% TFA) 純化殘餘物，得到中間物 **12** (4 mg, 1.8 μ mol, 4.2%)：LCMS 方法 B R_t = 0.75 min, $[M+2H]^{+2}$ 771.4； ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) δ ppm 1.05-1.39 (m, 30 H) 1.52-1.82 (m, 6 H) 1.97-2.09 (m, 2 H) 2.35 (t, J =7.21 Hz, 2 H) 3.41 (t, J =5.07 Hz, 2 H) 3.51-3.63 (m, 6 H) 3.63-3.75 (m, 90 H) 4.36 (t, J =6.72 Hz, 1 H) 7.49-7.65 (m, 1 H)。

中間物 **13**：13-(苄氧基)-12-((苄氧基)羰基)-13-側氧基十三酸

在 N_2 及 $0^\circ C$ 下將含於 DMF (3 ml) 之丙二酸二苄酯 (0.88 ml, 3.52

mmol)緩慢添加至NaH (274 mg, 6.86 mmol)之懸浮液中。攪拌該混合物1.5 hr, 然後使之升溫至室溫。添加含於DMF (3 ml)之11-溴十一酸 (933 mg, 3.52 mmol), 並使反應過夜。將該反應加熱至80°C, 持續3 hr, 然後使之冷卻。用EtOAc (50 mL)及Et₂O (50 ml)稀釋反應, 並用1M HCl (25 ml)萃取。用EtOAc / Et₂O (100 ml)萃取水相。在Na₂SO₄上乾燥合併有機物並蒸發溶劑。藉由急驟管柱(C18 50 g 30-100% ACN / 水 + 0.1 TFA)純化殘餘物, 得到呈白色粉末之中間物**13** (315 mg, 0.672 mmol, 19%): LCMS方法B Rt = 1.05 min, M+H 469.5。

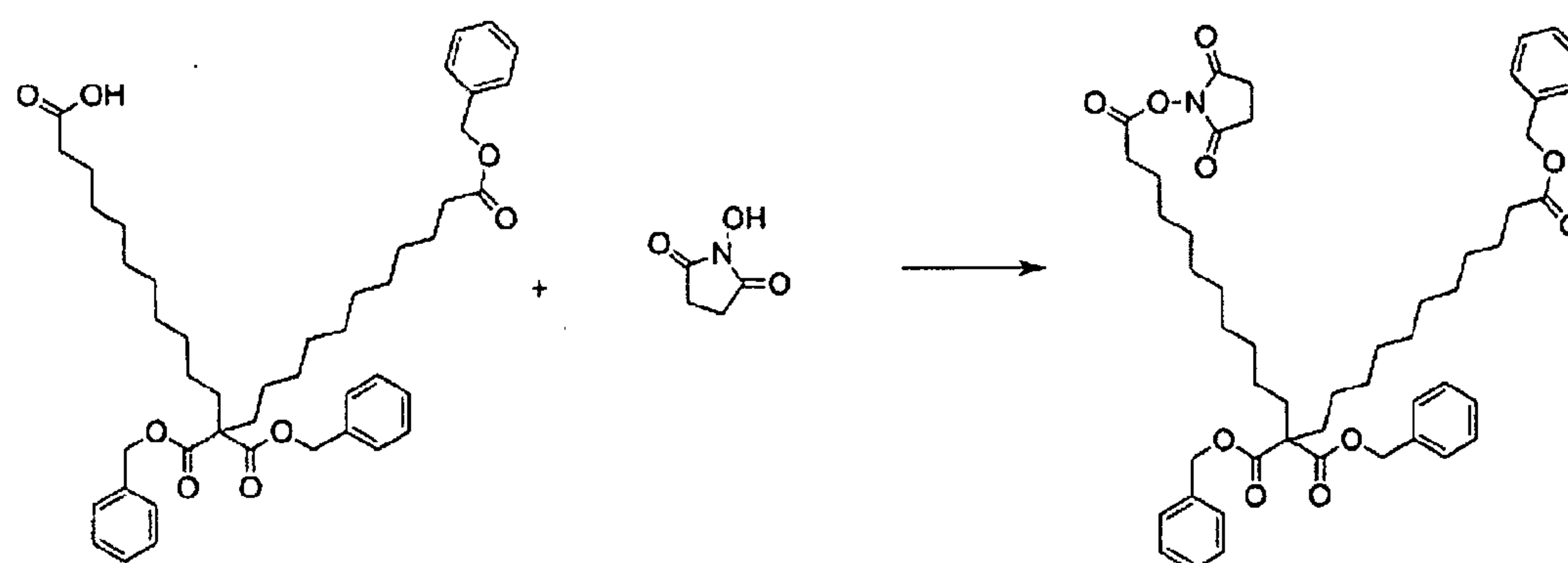
中間物**14**: 23-(苄氧基)-12,12-雙((苄氧基)羰基)-23-側氧基二十三酸



在N₂及0°C下將NaH (54 mg, 1.34 mmol)懸浮於DMF (1 ml)中。以逐滴方式向該混合物添加含於DMF (3 mL)之中間物**13** (315 mg, 0.672 mmol)。攪拌該反應1 hr, 然後添加含於DMF (1 mL)之中間物**1** (239 mg, 0.672 mmol)。使該反應維持在0°C下另外保持45 min, 然後使之升溫至室溫。攪拌該反應過夜。用1:1 Et₂O及EtOAc (75 ml)稀釋反應, 並用1M HCl (20 ml)萃取。用1:1 Et₂O及EtOAc (75 ml)萃取水相。在Na₂SO₄上乾燥合併有機物並蒸發。藉由HPLC (Xbridge C18 30x50 mm, 45-70% ACN / 水 + 5 mM NH₄OH)純化所得殘餘物, 得到標題化合物 (132 mg, 0.178 mmol, 26%): LCMS方法B; Rt= 1.53 min, M-H 741.8。

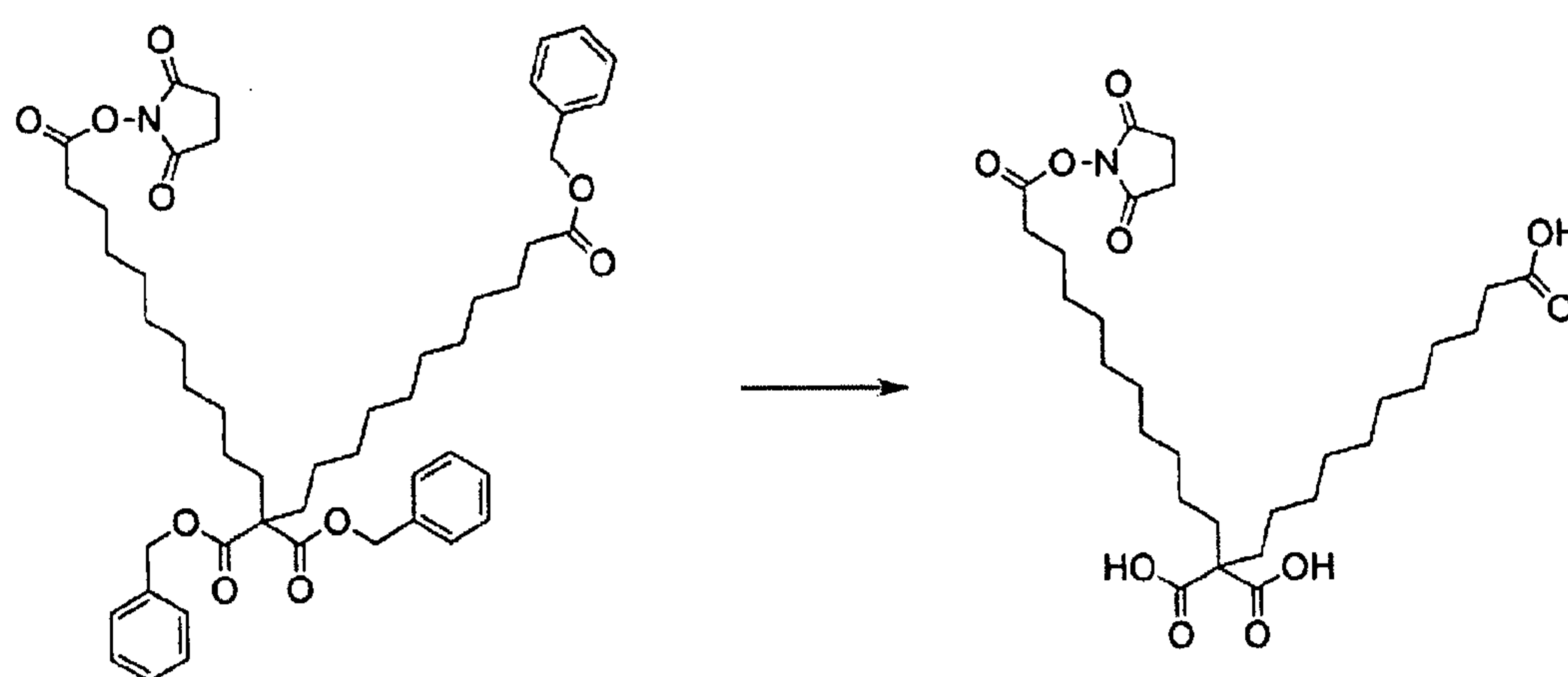
中間物**15**: 二十一烷-1,11,11,21-四羧酸1,11,11-三苄酯21-(2,5-二

側氧基吡咯啉-1-酯)



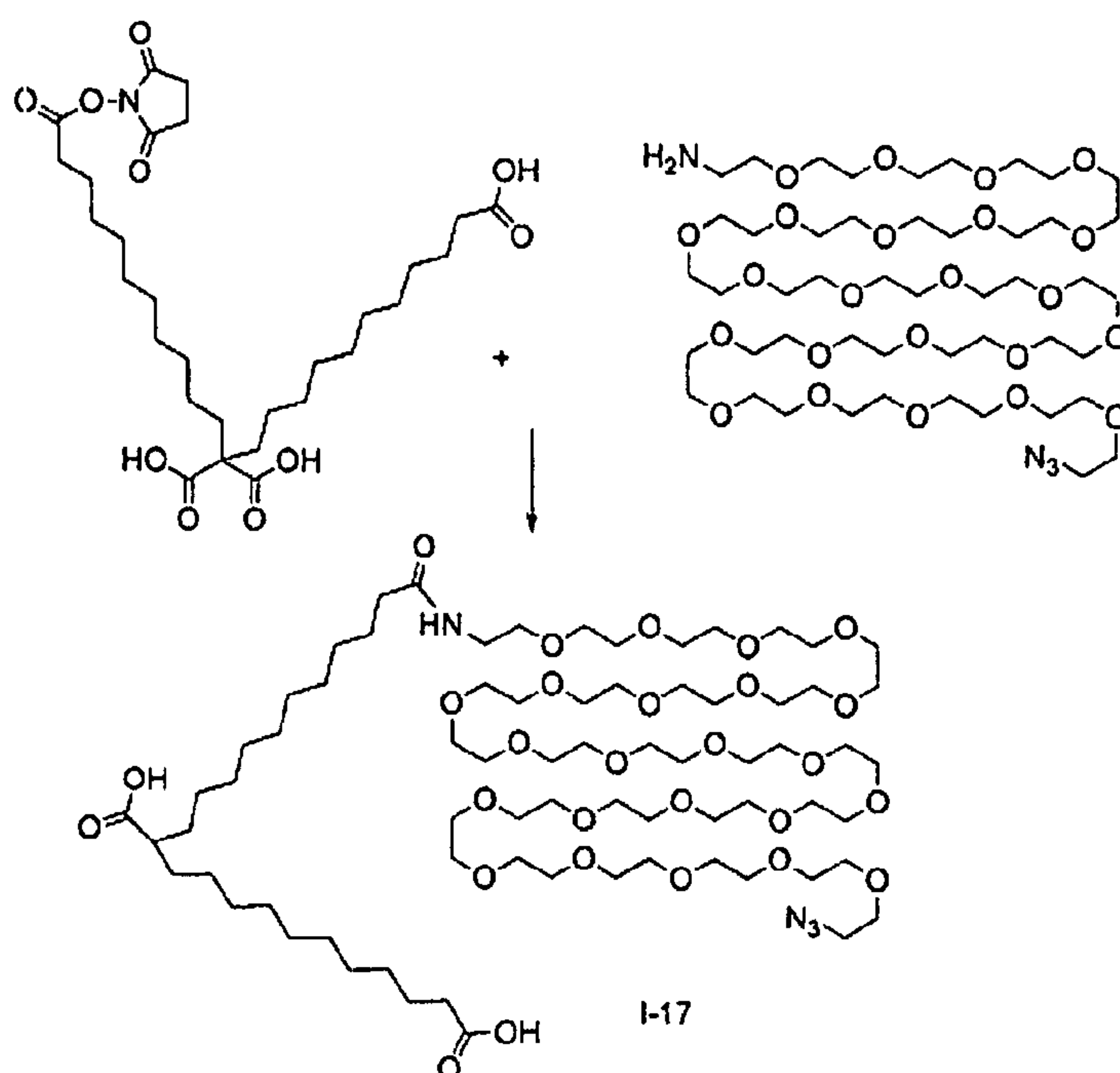
將含於DCM (1 mL)之DCC (44 mg, 0.213 mmol)添加至中間物14 (132 mg, 0.178 mmol)及N-羥基琥珀醯亞胺(20 mg, 0.178 mmol)含於DCM (2.5 mL)之溶液中。在振盪器板上攪動該反應17 hr。過濾該反應，並用DCM沖洗固體。濃縮並藉由急驟管柱(矽膠12 g, 0-40% EtOAc / HEP)純化濾液，得到中間物15 (107 mg, 0.127 mmol, 72%)：LCMS方法B Rt = 1.53 min, M+Na 862.8。

中間物16：22-((2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基)-22-側氧基二十二烷-1,11,11-三羧酸



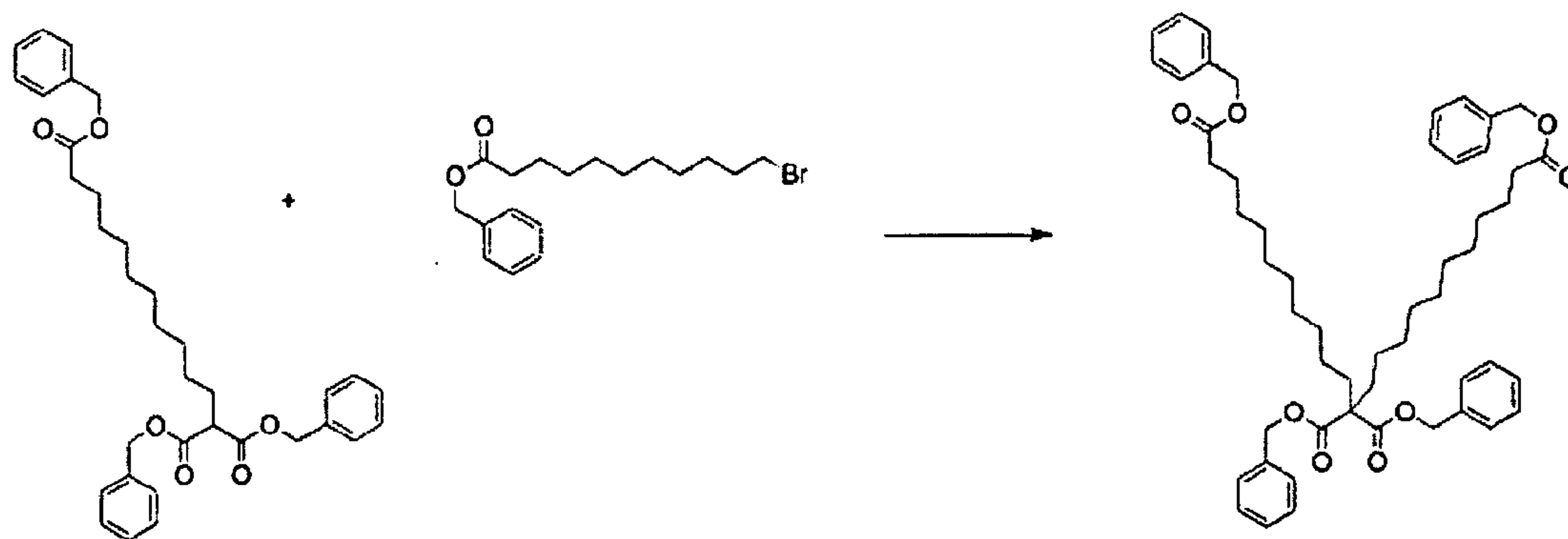
向中間物15 (107 mg, 0.127 mmol)含於THF (2.5 ml)之溶液添加10%碳載鈀含於THF (2.5 ml)之懸浮液。將混合物置於氫氣氛下1.5 hr。使該反應通過薄膜過濾器，並用DCM及THF清洗固體。蒸發濾液，得到含標題化合物之無色油(95 mg, 定量)：LCMS方法B Rt = 0.65 min, M+H 570.5。

中間物17：2-(11-(疊氮基-PEG23-胺基)-11-側氧基十一基)十三烷
二酸構築體



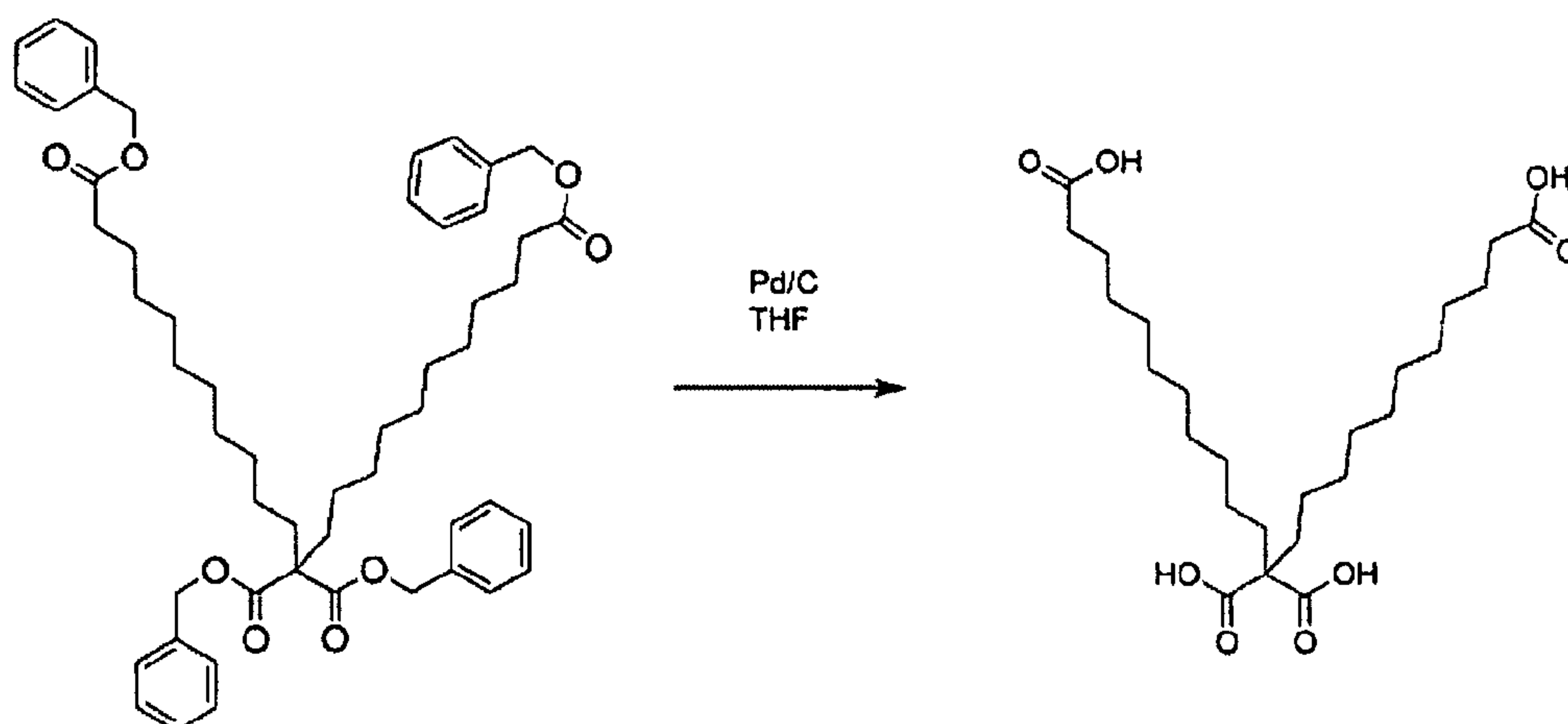
將中間物16 (48 mg, 0.042 mmol)含於THF (1 ml)之溶液添加至裝有疊氮基-dPEG23-胺(Quanta Biodesign: 46 mg, 0.042 mmol)之小瓶中。攪動該反應20 min, 然後添加DIPEA (11 μ L, 0.063 mmol), 然後保持過夜。添加疊氮基-PEG23-胺(23 mg, 0.021 mmol)及DIPEA (5 μ L, 0.029 mmol), 並又攪動該反應一天。蒸發溶劑, 並藉由HPLC (Xbridge C18 30x50 mm, 10-30% ACN / 5 mM NH_4OH)純化殘餘物。凍乾溶離份得到產物混合物。藉由HPLC (Sunfire C18 30x50 mm, 45-70% ACN / 水 +0.1% TFA)純化物質, 得到標題中間物17 (30 mg, 0.020 mmol, 48%): LCMS SQ4 R_t = 0.81min, $[\text{M}+\text{H}+\text{H}_3\text{O}]^{+2}$ 764.5; ^1H NMR (400 MHz, 乙腈- d_3) δ ppm 1.30 (br. s., 28 H) 1.40-1.50 (m, 2 H) 1.50-1.62 (m, 6 H) 2.14 (t, J =7.52 Hz, 2 H) 2.23-2.35 (m, 3 H) 3.32 (q, J =5.58 Hz, 2 H) 3.37-3.43 (m, 2 H) 3.47-3.52 (m, 2 H) 3.53-3.68 (m, 90 H) 6.54 (br. s., 1 H)。

中間物18：二十一烷-1,11,11,21-四羧酸四苄酯



在0℃及N₂下向NaH (48 mg, 1.21 mmol)含於DMF (2 ml)之懸浮液緩慢添加含於DMF(2 ml)之中間物**2** (337 mg, 0.603 mmol)。攪拌該混合物15 min, 然後添加含於DMF (2 mL)之中間物**1** (429 mg, 1.21 mmol)。在0℃下攪拌該反應20 min, 然後使之升溫至室溫。在攪拌下, 使該反應維持在室溫下3天。用Et₂O (75 ml)稀釋反應, 並用水(20 ml)萃取。用Et₂O (75 ml)萃取水相。在Na₂SO₄上乾燥合併有機物並蒸發。藉由急驟管柱(矽膠24 g, 0-15% EtOAc / HEP)純化殘餘物, 得到標題化合物(315 mg, 0.378 mmol, 63%): LCMS方法B Rt = 1.70 min, M+Na 855.8; ¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.95-1.13 (m, 4 H) 1.13-1.40 (m, 24 H) 1.59-1.72 (m, 4 H) 1.82-1.95 (m, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.52 Hz, 4 H) 5.12 (s, 4 H) 5.14 (s, 4 H) 7.14-7.44 (m, 20 H)。

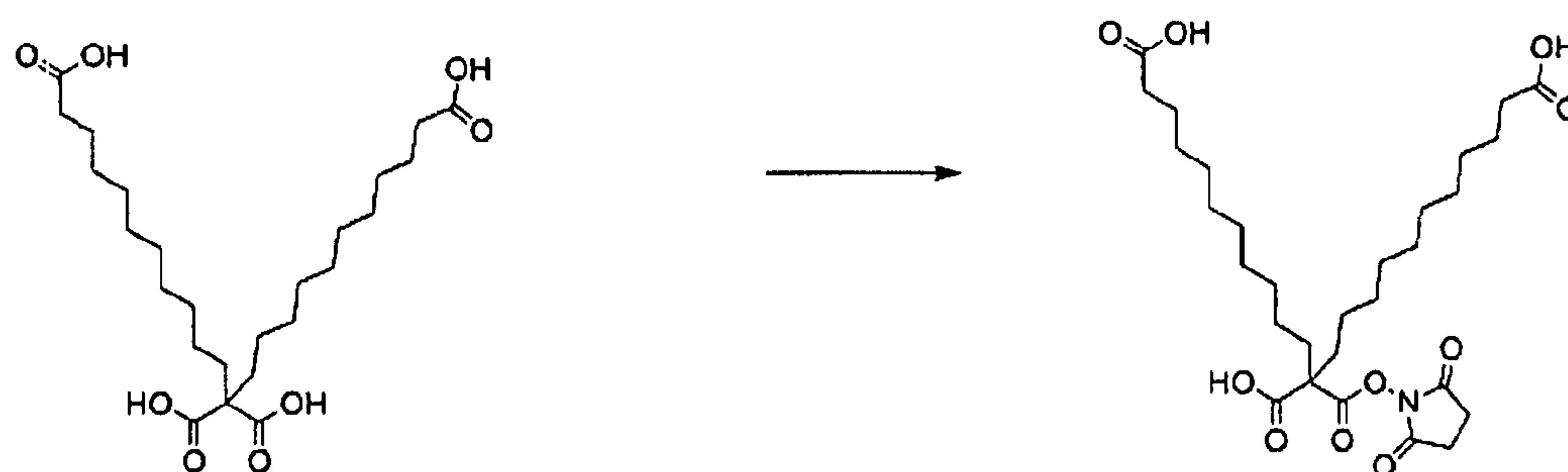
中間物19: 二十一烷-1,11,11,21-四羧酸



將10%碳載鈀(20 mg, 0.019 mmol)含於THF (4 ml)之懸浮液添加至中間物**18** (315 mg, 0.378 mmol)含於THF (6 ml)之溶液中, 並將該

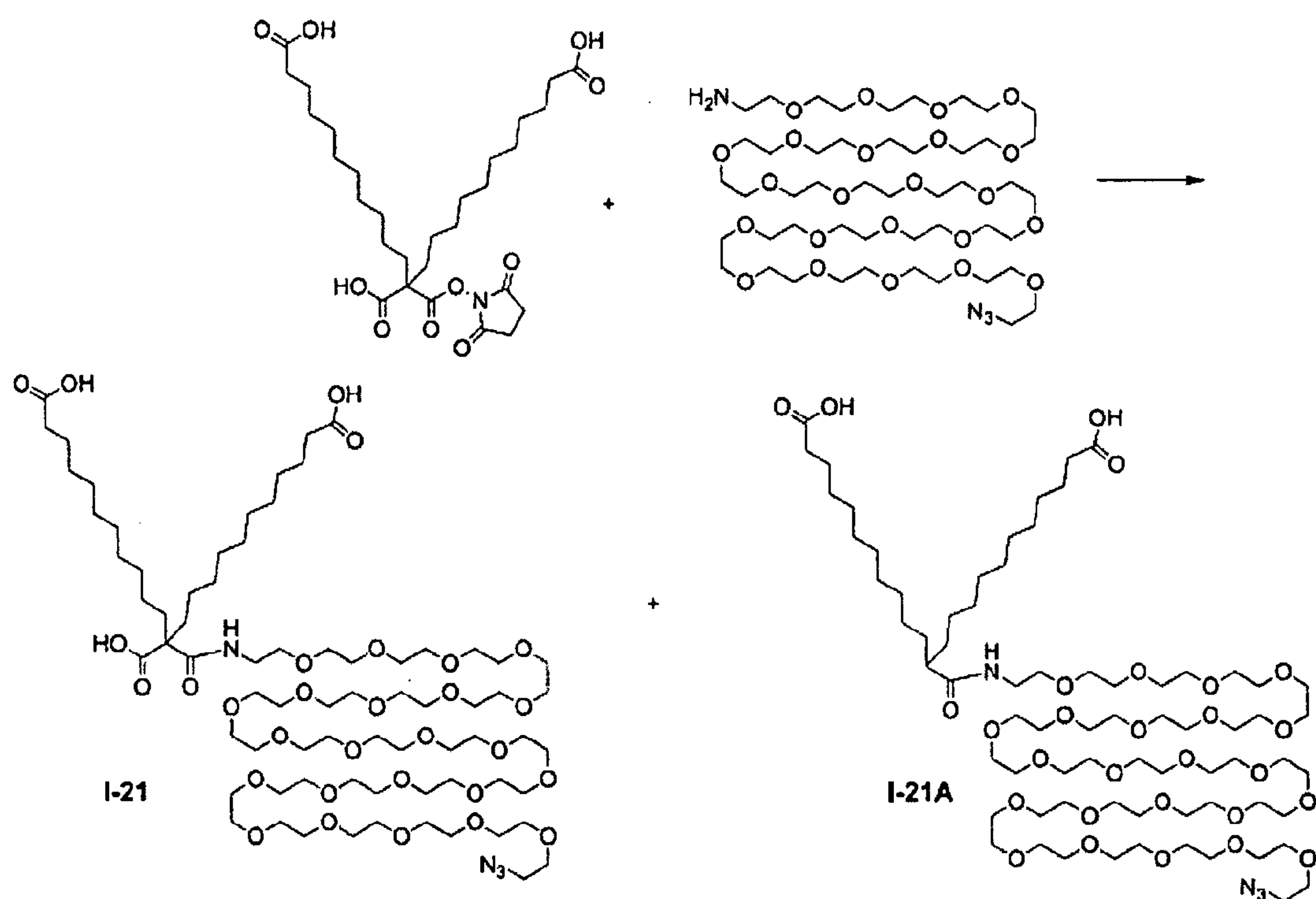
反應置於氫氣氛下2 hr。使用薄膜過濾器移除固體，用EtOAc清洗。蒸發濾液得到呈白色固體之中間物**19** (179 mg，定量)：LCMS方法A $R_t = 1.24$ min， $M+H$ 473.4； ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.99-1.15 (m, 4 H) 1.24 (br. s., 24 H) 1.48 (quin, $J=6.94$ Hz, 4 H) 1.62-1.76 (m, 4 H) 2.18 (t, $J=7.34$ Hz, 4 H) 12.23 (br. s., 4 H)。

中間物**20**：11-(((2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基)羰基)二十一烷-1,11,21-三羧酸



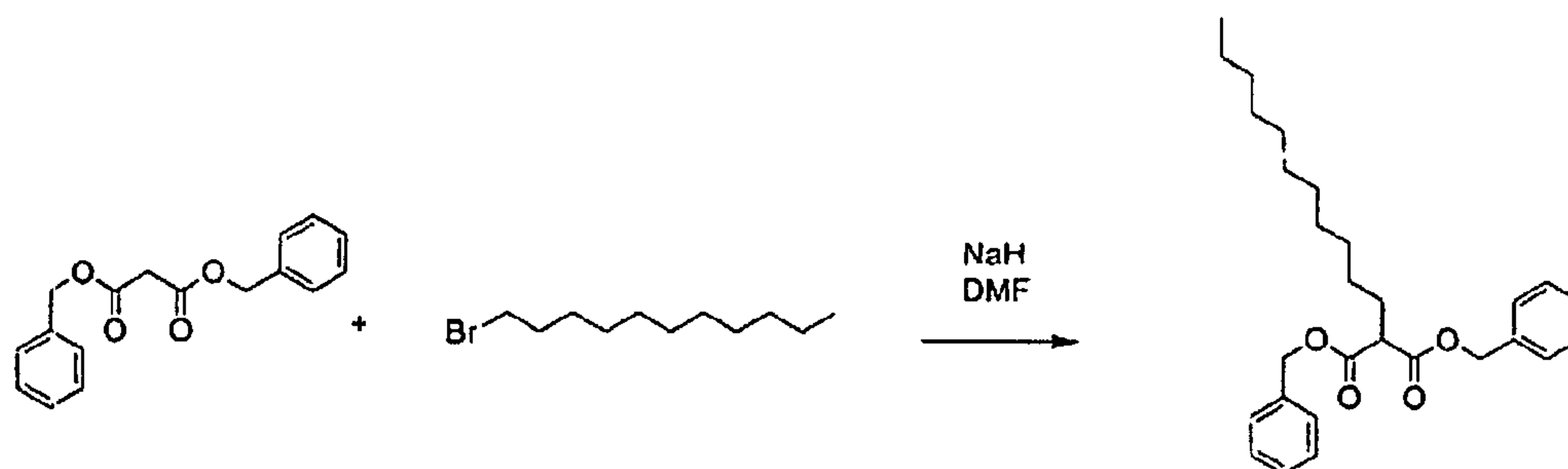
將N-羥基琥珀醯亞胺(20 mg，0.170 mmol)及中間物**19** (90 mg，0.190 mmol)溶解於DCM (3 ml)及THF (0.3 ml)中。添加DCC (39 mg，0.190 mmol)含於DCM (0.5 ml)之溶液，並攪動該反應過夜。蒸發溶劑，並藉由HPLC (Sunfire C18 30x50 mm，35-60% ACN/水+ +0.1% TFA)純化殘餘物，得到呈白色粉末之標題化合物(21 mg，0.037 mmol，19%)：LCMS (方法C $R_t = 1.01$ min， $M+H$ 570.3)。

中間物**21**及**21a**：11-((疊氮基-PEG23)胺甲醯基)二十一烷-1,11,21-三羧酸(**21**)及12-((疊氮基-PEG23)胺甲醯基)二十三烷二酸(**21a**)



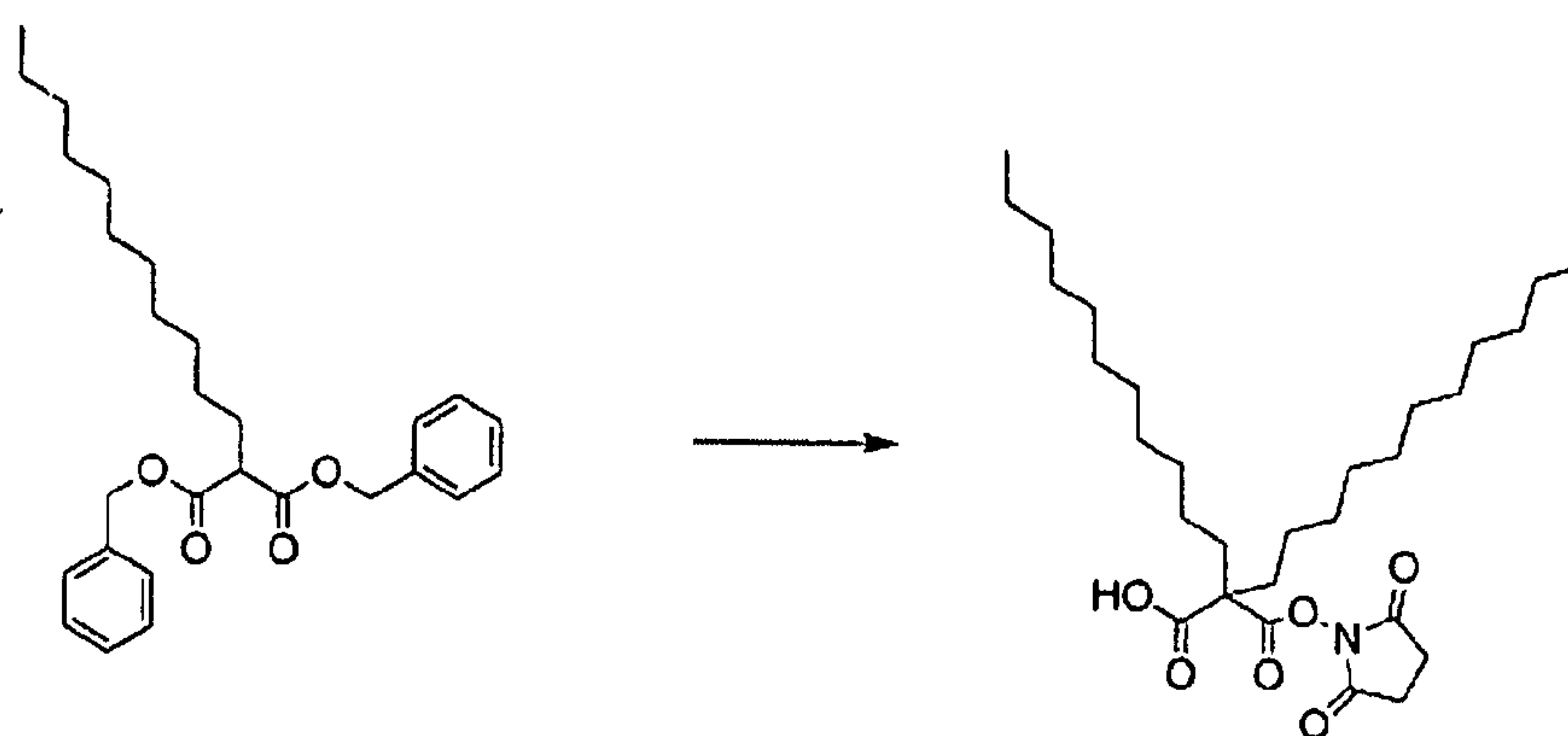
將疊氨基-PEG23-胺(41 mg, 0.037 mmol)及中間物**20** (21 mg, 0.037 mmol)合併於THF (1 ml)中，並攪動10 min。添加DIPEA (9.66 μ L, 0.055 mmol)並攪動該反應過夜。蒸發溶劑，並藉由HPLC (Sunfire C18 30x50 mm, 35-60% ACN/水+ 0.1% TFA)純化殘餘物，得到中間物**21** (22 mg, 0.014 mmol, 38%)及**21a** (4 mg, 2.6 μ mol, 7%)：LCMS方法B R_t = 0.69 min, $M+H$ 1555.3； ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 1.27 (br. s., 19 H) 1.29-1.41 (m, 9 H) 1.65 (quin, J =7.12 Hz, 4 H) 1.78 (td, J =12.13, 4.22 Hz, 2 H) 1.95-2.08 (m, 2 H) 2.35 (t, J =7.21 Hz, 4 H) 3.41 (t, J =5.07 Hz, 2 H) 3.54 (q, J =5.05 Hz, 2 H) 3.58-3.77 (m, 92 H) 7.60 (t, J =4.95 Hz, 1 H)；LCMS方法B R_t = 0.78 min, $M-H$ 1509.3； ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 1.18 (br. s., 19 H) 1.21-1.38 (m, 11 H) 1.43-1.63 (m, 6 H) 1.91-2.04 (m, 1 H) 2.26 (t, J =7.15 Hz, 4 H) 3.31 (t, J =5.07 Hz, 2 H) 3.40 (q, J =5.14 Hz, 2 H) 3.46-3.50 (m, 2 H) 3.51-3.69 (m, 90 H) 6.23 (t, J =5.01 Hz, 1 H)。

中間物**22**：2-十一基丙二酸二苄酯



在N₂及0℃下將含於DMF (1.5 mL)之丙二酸二苄酯(0.88 ml, 3.52 mmol)逐滴添加至NaH (155 mg, 3.87 mmol)含於DMF (6 ml)之懸浮液中。攪拌該混合物30min, 然後向該反應添加含於DMF (1.5 ml)之1-溴十一烷(0.785 ml, 3.52 mmol)。使該反應升溫至室溫並攪拌5天。用Et₂O (75 ml)稀釋反應, 並用水(20 ml)萃取。用Et₂O (75 ml)萃取水相。在Na₂SO₄上乾燥合併有機物並蒸發。藉由急驟管柱(矽膠80 g, 0-10% EtOAc / HEP)純化殘餘物, 得到呈無色油之標題化合物(974 mg, 2.22 mmol, 63%): LCMS方法B Rt = 1.55 min, M+H 439.5。

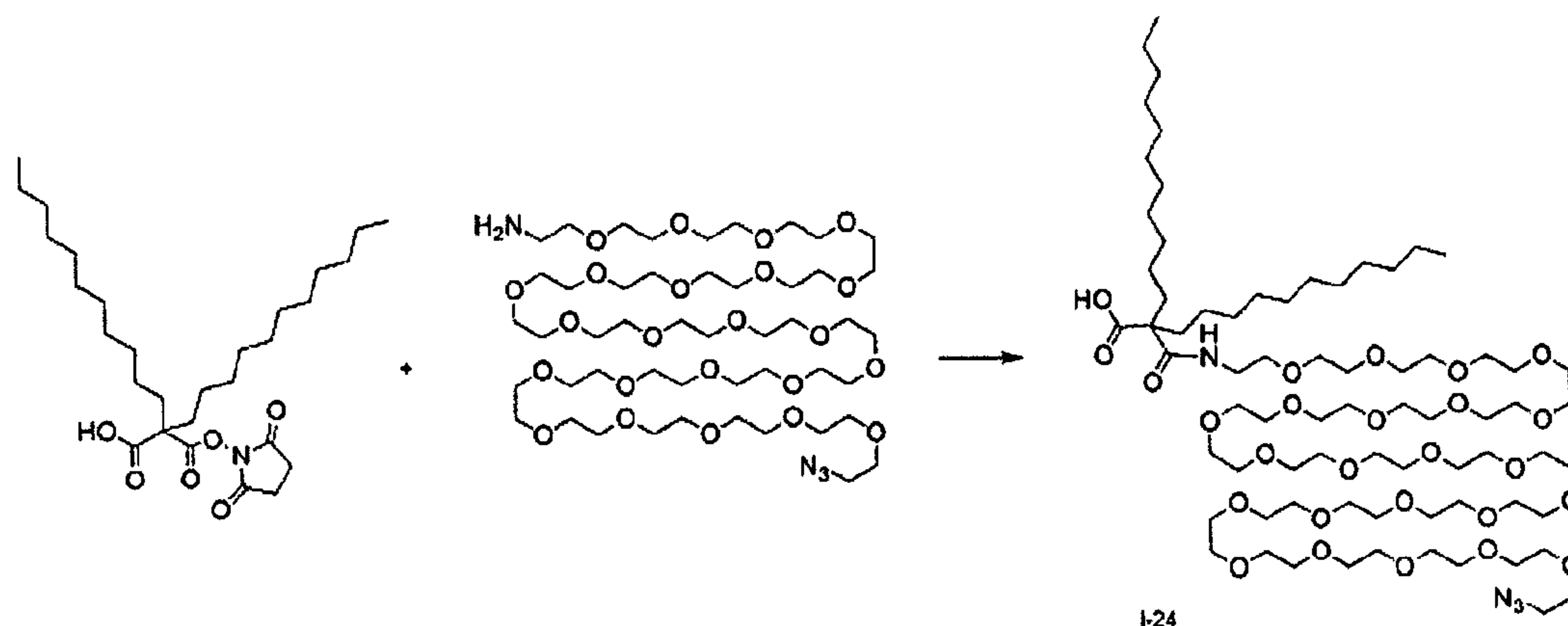
中間物 23: 2-(((2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基)羰基)-2-十一基十三酸



在N₂及0℃下將含於DMF (1 mL)之2-十一基丙二酸二苄酯(中間物 22: 400 mg, 0.912 mmol)逐滴添加至NaH (44 mg, 1.09 mmol)含於DMF (2 ml)之懸浮液中。攪拌該混合物45 min, 然後向該反應添加含於DMF (1 ml)之1-溴十一烷(0.285 ml, 1.28 mmol)。使該反應升溫至室溫並攪拌1天。用Et₂O (75 ml)稀釋反應, 並用水(20 ml)萃取。用

Et₂O (75 ml)萃取水相。在Na₂SO₄上乾燥合併有機物並蒸發。藉由急驟管柱(矽膠40 g, 0-5% EtOAc / HEP)純化殘餘物, 得到無色油(412 mg)。將該油溶解於THF/MeOH中, 並通過具有10% Pd/C濾筒之Thales Nano H-Cube (1 ml/min, 2 bar H₂, 22C)。收集流出物, 並蒸發得到蠟狀固體(272 mg)。將該蠟狀固體溶解於3:1 DCM / THF中, 並濃縮成油。在N₂下再將該油溶解於DCM (6 mL)中, 並先後添加N-羥基琥珀醯亞胺(68 mg)及含於DCM (3 ml)之DCC (136 mg)。攪拌該反應一天。過濾該反應, 並濃縮濾液。藉由急驟管柱(C18 12 g, 25-100% ACN / 水+0.1%甲酸)純化濃縮物。另外藉由超臨界流體層析(Princeton 2-乙基吡啶 20x150 mm; 5-15% MeOH / CO₂)純化所得物質, 得到中間物**23** (37 mg, 0.073 mmol, 8%): LCMS方法B Rt = 1.67 min, M+NH₄ 527.6; ¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.80-0.94 (m, 6 H) 1.18-1.42 (m, 36 H) 1.97-2.14 (m, 4 H) 2.87 (br. s., 4 H)。

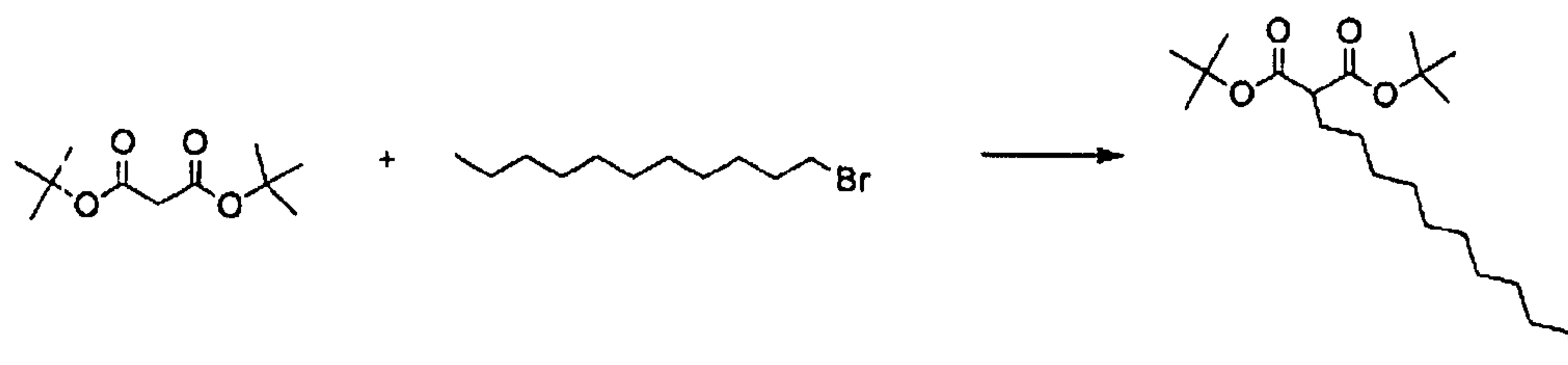
中間物24：2-((疊氮基-PEG23)胺甲醯基)-2-十一基十三酸



將中間物**23** (37 mg, 0.073 mmol)含於THF (1 ml)之溶液添加至裝有疊氮基-dPEG23-胺(Quanta Biodesign: 80 mg, 0.073 mmol)之小瓶中。在振盪器板上攪動該溶液, 並添加DIPEA (11 μL, 0.065 mmol)。攪動該反應過夜, 然後添加另一份DIPEA (12 μL, 0.071 mmol), 並使該反應過夜。蒸發溶劑, 並藉由超臨界流體層析(Princeton Amino 21x150 mm; 20-30% MeOH / CO₂)純化殘餘物, 得到標題化合物(45

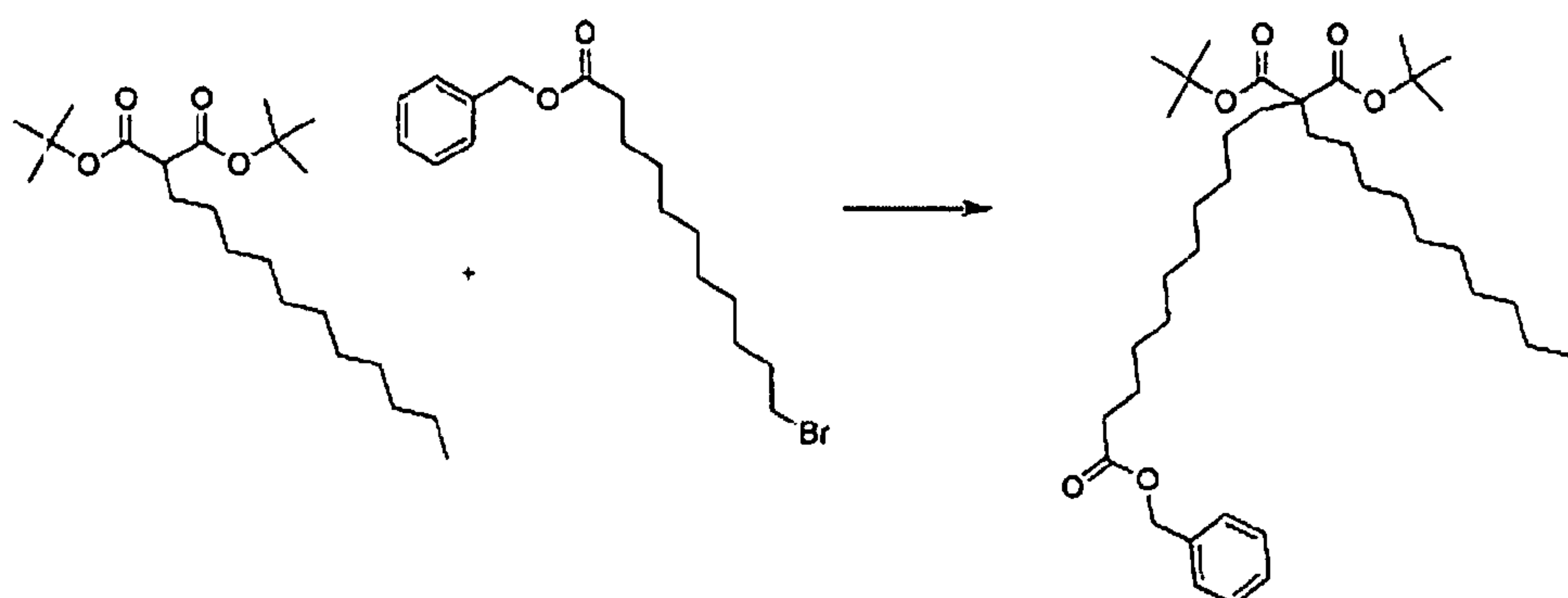
mg, 0.030 mmol, 41%): LCMS方法B Rt = 1.50 min, $[M+2H]^{+2}$ 748.1; ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.90 (t, $J=6.85$ Hz, 6 H) 1.09-1.38 (m, 30 H) 1.58 (br. s., 12 H) 1.64-1.76 (m, 2 H) 1.98-2.16 (m, 2 H) 3.41 (t, $J=5.14$ Hz, 2 H) 3.46-3.64 (m, 5 H) 3.64-3.91 (m, 83 H)。

中間物25: 2-十一基丙二酸二第三丁酯



在 N_2 及 0°C 下將含於DMF (2 ml)之丙二酸二第三丁酯(1.0 g, 4.62 mmol)添加至NaH (213 mg, 5.32 mmol)含於DMF (5 ml)之懸浮液中。攪拌該反應30 min, 然後添加含於DMF (2 ml)之1-溴十一烷。添加後, 使該反應升溫至室溫並攪拌2天。用 Et_2O (75 ml)稀釋反應, 並用水(25 ml)萃取。用 Et_2O (75 ml)萃取水相。在 Na_2SO_4 上乾燥合併有機物並蒸發溶劑。藉由急驟管柱(矽膠120 g, 0-40% Et_2O /石油醚)純化濃縮物, 得到中間物25 (0.998 g, 2.69 mmol, 58%): LCMS方法B Rt = 1.64 min, $M+\text{Na}$ 393.5; ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.85-0.94 (m, 3 H) 1.24-1.36 (m, 18 H) 1.41-1.52 (m, 18 H) 1.74-1.86 (m, 2 H) 3.13 (t, $J=7.58$ Hz, 1 H)。

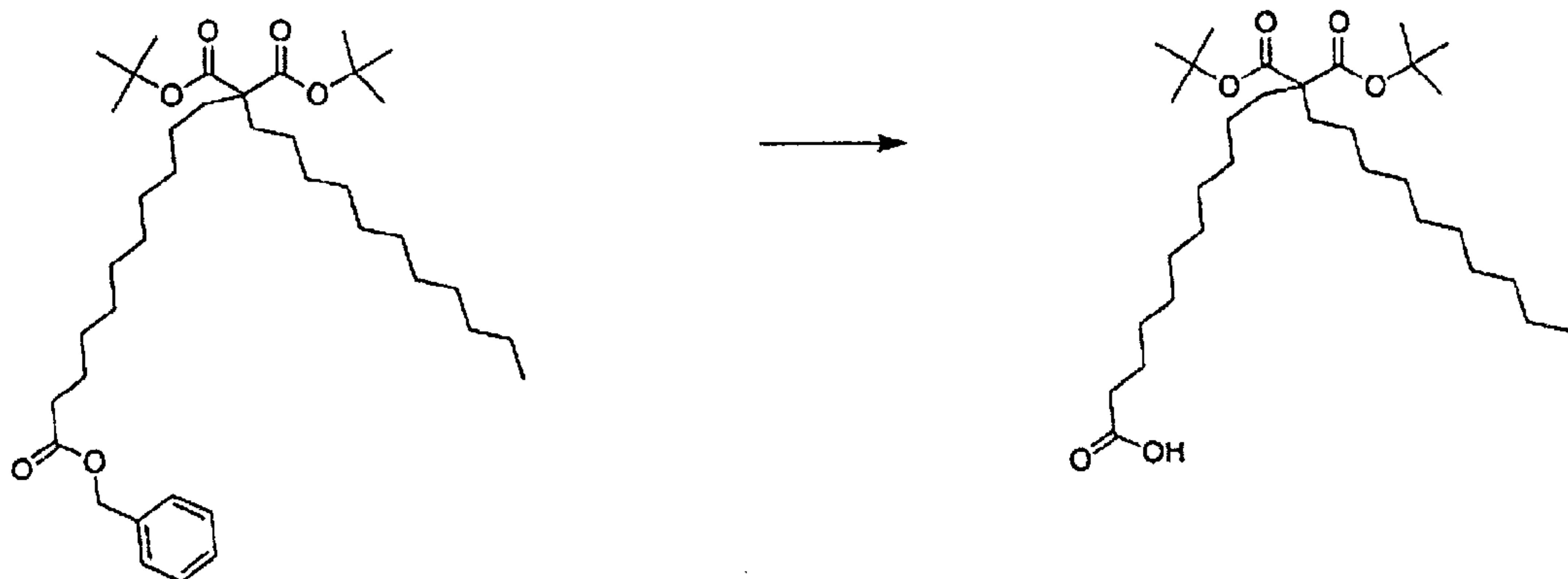
中間物26: 二十二烷-1,11,11-三羧酸1-苄酯11,11-二第三丁酯



以與中間物9類似之方式, 使用中間物25作為起始材料合成標題

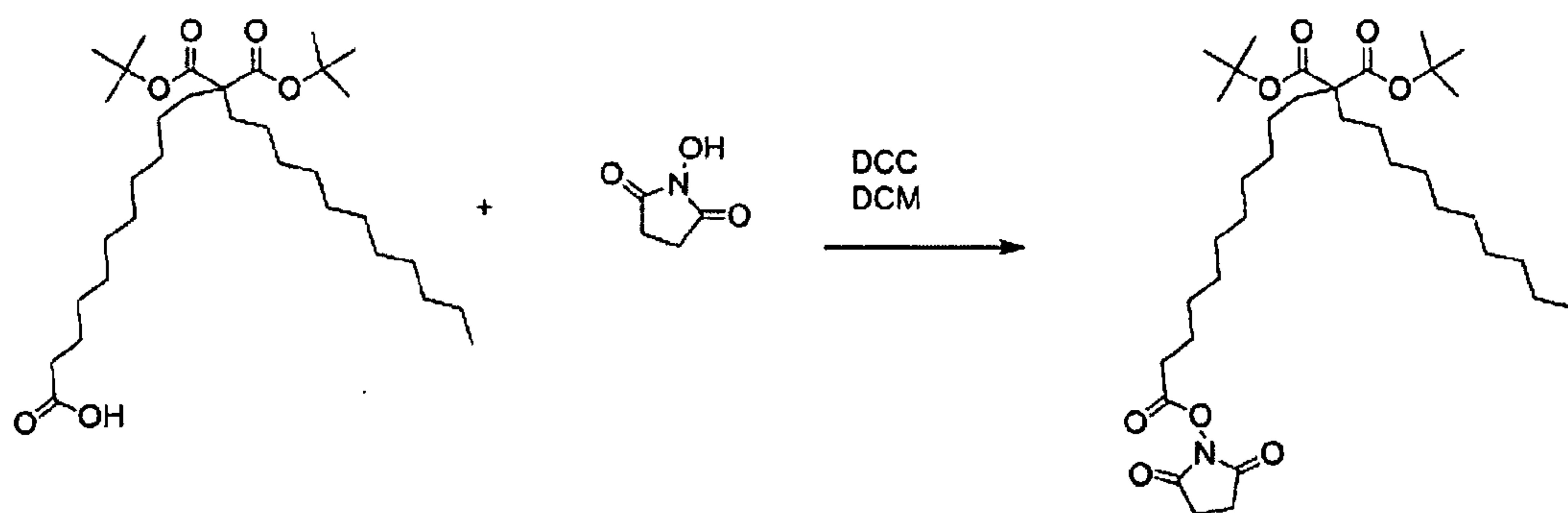
化合物，得到無色油(980 mg，1.52 mmol，66%)：¹H NMR (400 MHz，氯仿-*d*) δ ppm 0.89 (t, $J=6.91$ Hz, 3 H) 1.06-1.20 (m, 4 H) 1.20-1.35 (m, 28 H) 1.45 (s, 18 H) 1.58-1.70 (m, 2 H) 1.72-1.83 (m, 4 H) 2.36 (t, $J=7.52$ Hz, 2 H) 5.12 (s, 2 H) 7.30-7.45 (m, 5 H)。

中間物**27**：12,12-雙(第三丁氧基羰基)二十三酸



使用中間物**26**，以與中間物**19**類似之方式合成標題化合物(472 mg，0.851 mmol，100%)：LCMS方法B $R_t = 1.76$ min，M-H 553.6；¹H NMR (400 MHz，氯仿-*d*) δ ppm 0.84-0.95 (m, 3 H) 1.07-1.21 (m, 4 H) 1.21-1.40 (m, 28 H) 1.46 (s, 18 H) 1.58-1.70 (m, 2 H) 1.72-1.84 (m, 4 H) 2.37 (t, $J=7.46$ Hz, 2 H)。

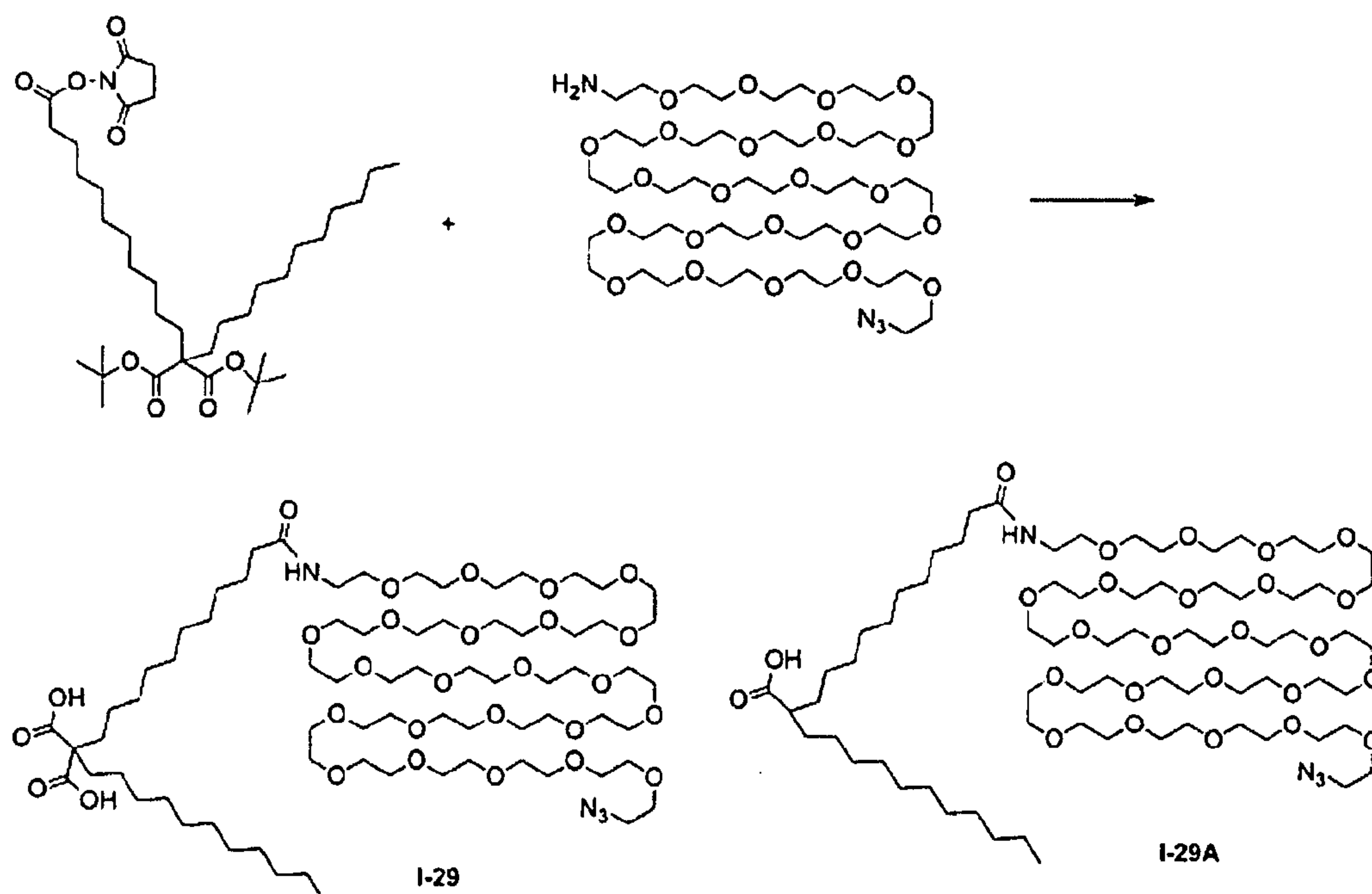
中間物**28**：二十二烷-1,11,11-三羧酸11,11-二第三丁酯1-(2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯)



將中間物**27** (200 mg，0.360 mmol)及N-羥基琥珀醯亞胺(42 mg，0.360 mmol)溶解於DCM (3 ml)中。添加DCC (89 mg，0.433 mmol)含於DCM (1.6 ml)之溶液，並攪動該反應4.5 hr。過濾該反應，並濃縮

濾液。藉由急驟管柱(矽膠24 g, 0-40% EtOAc / HEP)純化濃縮物, 得到呈無色油之標題化合物(70 mg, 0.107 mmol, 30%): LCMS方法B $R_t = 1.74$ min, $M+Na$ 674.7。

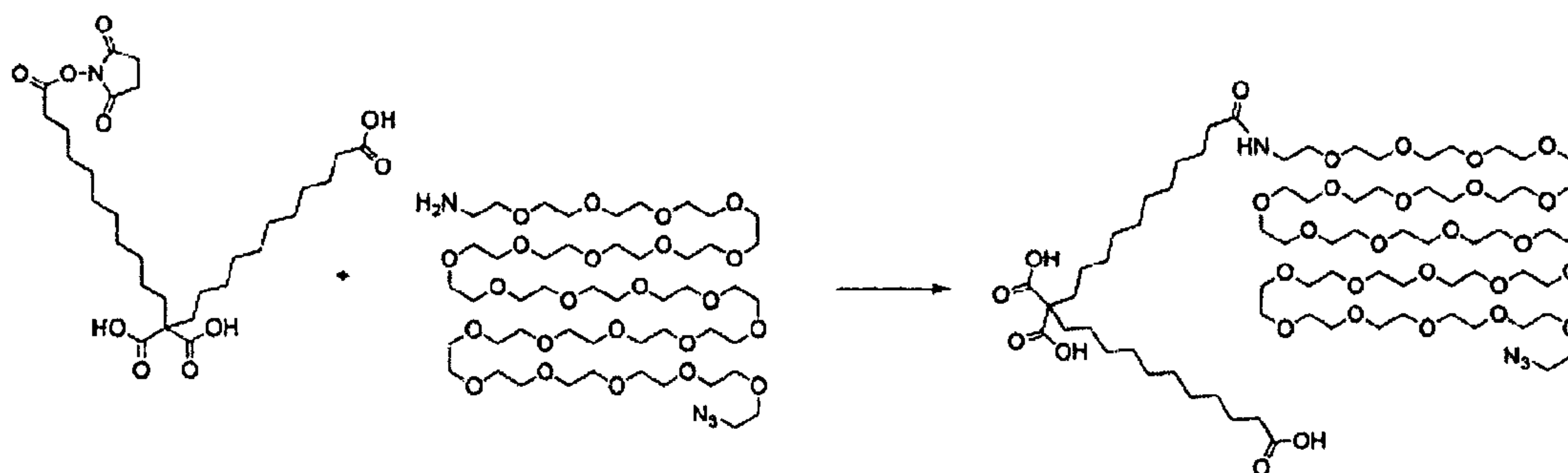
中間物**29**及**29A**: 2-(11-((疊氮基-PEG23)-胺基)-11-側氧基十一基)-2-十一基丙二酸(**29**)及13-((疊氮基-PEG23)-胺基)-13-側氧基-2-十一基十三酸(**29A**)



將中間物**28** (35 mg, 0.054 mmol)含於THF (1 ml)之溶液添加至裝有疊氮基-PEG23-胺(59 mg, 0.054 mmol)之小瓶中。添加DIPEA (14 μ L, 0.081 mmol)並攪動該反應過夜。蒸發溶劑, 並再將殘餘物溶解於DCM (1 ml)及TFA (0.2 ml)中。攪動該反應1.25 hr, 然後蒸發溶劑。藉由HPLC (Sunfire 30x50 mm C18, 55-80% ACN /水 +0.1% TFA)純化殘餘物, 並再將所得物質溶解於DCM (4 ml)及TFA (2 mL)中, 並攪動1.5 hr。蒸發溶劑, 並藉由HPLC (Sunfire 30x50 mm C18, 55-80% ACN /水 +0.1% TFA)純化殘餘物, 得到中間物**29** (28 mg, 0.016 mmol, 29%)及中間物**29A** (1 mg, 0.6 μ mol, 1%): LCMS方法B $R_t = 1.08$ min, $[M+H+H_3O]^{+2}$ 771.5; ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm

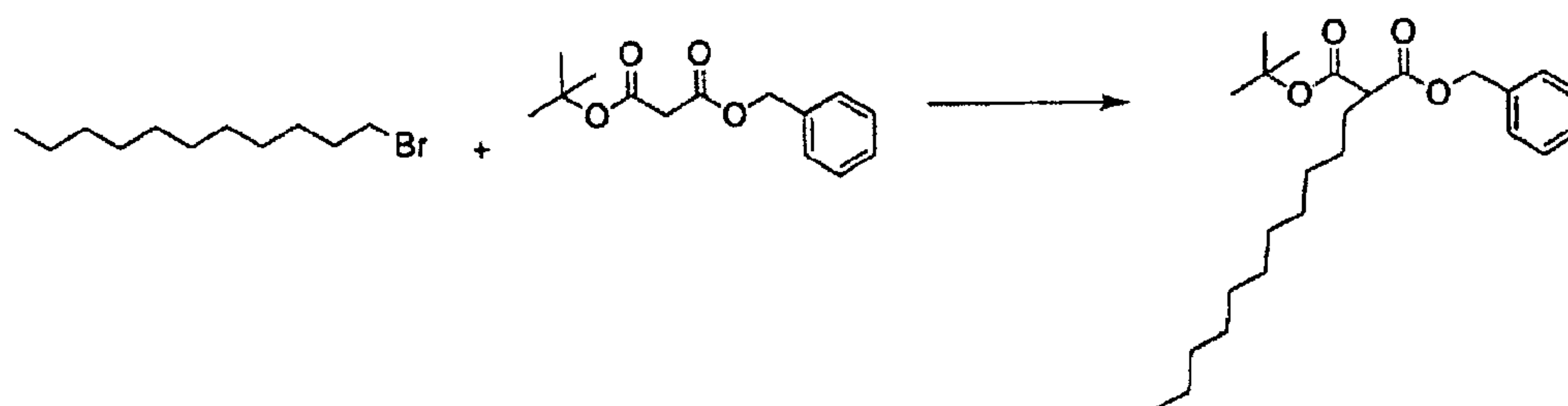
0.90 (t, $J=6.72$ Hz, 3 H) 1.26 (br. s., 24 H) 1.32-1.41 (m, 8 H) 1.62 (quin, $J=7.64$ Hz, 2 H) 1.88-2.01 (m, 4 H) 2.31 (t, $J=7.70$ Hz, 2 H) 3.41 (t, $J=5.07$ Hz, 2 H) 3.46-3.56 (m, 3 H) 3.57-3.90 (m, 91 H); LCMS方法 B Rt = 1.29min, $[M+2H]^{+2}$ 741.1。

中間物 30：22-((疊氮基-PEG23)胺基)-22-側氧基二十二烷-1,11,11-三羧酸



將中間物 16 (58 mg, 0.063 mmol) 含於 THF (1 ml) 之溶液添加至裝有疊氮基-PEG23-胺 (70 mg, 0.063 mmol) 之小瓶中。添加 DIPEA (17 μ L, 0.095 mmol) 並在振盪器板上攪動該反應過夜。濃縮該反應，並藉由 HPLC (Sunfire C18 30x50 mm, 35-60% ACN/水 + 0.1% TFA) 純化，得到呈蠟狀白色固體之中間物 30 (57 mg, 0.036 mmol, 57%)：LCMS方法 B Rt = 0.62 min, $M+H$ 1555.4; ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) δ ppm 1.28 (br. s., 18 H) 1.30-1.40 (m, 10 H) 1.63 (m, $J=7.10, 7.10, 7.10, 7.10, 7.10$ Hz, 4 H) 1.88-2.02 (m, 4 H) 2.28 (t, $J=8.10$ Hz, 2 H) 2.35 (t, $J=7.40$ Hz, 2 H) 3.41 (t, $J=5.07$ Hz, 2 H) 3.50 (dt, $J=9.20, 4.39$ Hz, 2 H) 3.57-3.63 (m, 2 H) 3.63-3.73 (m, 90 H)。

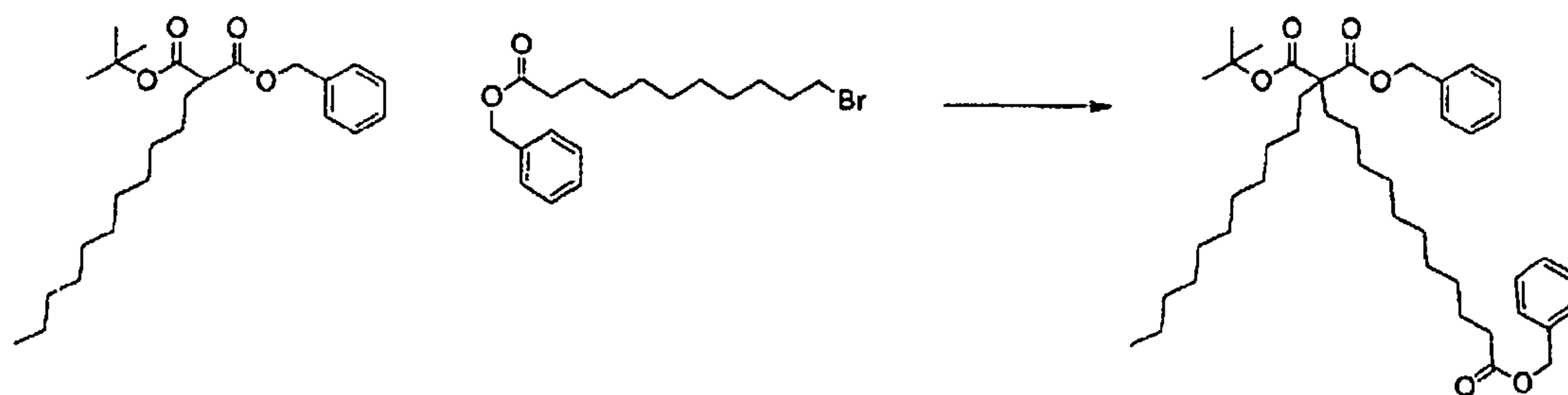
中間物 31：2-十一基丙二酸 1-苄酯 3-第三丁酯



在0℃及N₂下向NaH (160 mg, 4.0 mmol)含於DMF (8 ml)之懸浮液添加含於DMF(2 ml)之丙二酸苄酯第三丁酯(1.0 g, 4.0 mmol)。攪拌該混合物50 min, 此後添加含於DMF (2 mL)之1-溴十一烷。另外攪拌一小時後, 使該反應升溫至室溫。維持該反應過夜。添加Et₂O (100 ml)及水(20 ml), 以使該反應分配。用Et₂O (100 ml)萃取水相, 並在Na₂SO₄上乾燥合併有機物。蒸發溶劑, 並藉由急驟管柱(C18 12 g, 40-100% ACN /水 +0.1% TFA)純化殘餘物, 得到呈無色油之標題化合物(1.14 g, 2.82 mmol, 71%): LCMS方法A Rt = 1.58 min, M+Na 427.4; ¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.84-0.96 (m, 3 H) 1.28 (br. s, 12 H) 1.31 (m, *J*=3.90 Hz, 6 H) 1.41 (s, 9 H) 1.88 (q, *J*=7.38 Hz, 2 H) 3.29 (t, *J*=7.58 Hz, 1 H) 5.19 (q, *J*=12.27 Hz, 2 H) 7.30-7.42 (m, 5 H)。

或者, 在DMF中使用1-碘十一烷 (1.2 eq)在碳酸鉀(2 eq)存在下使丙二酸第三丁酯烷基化。

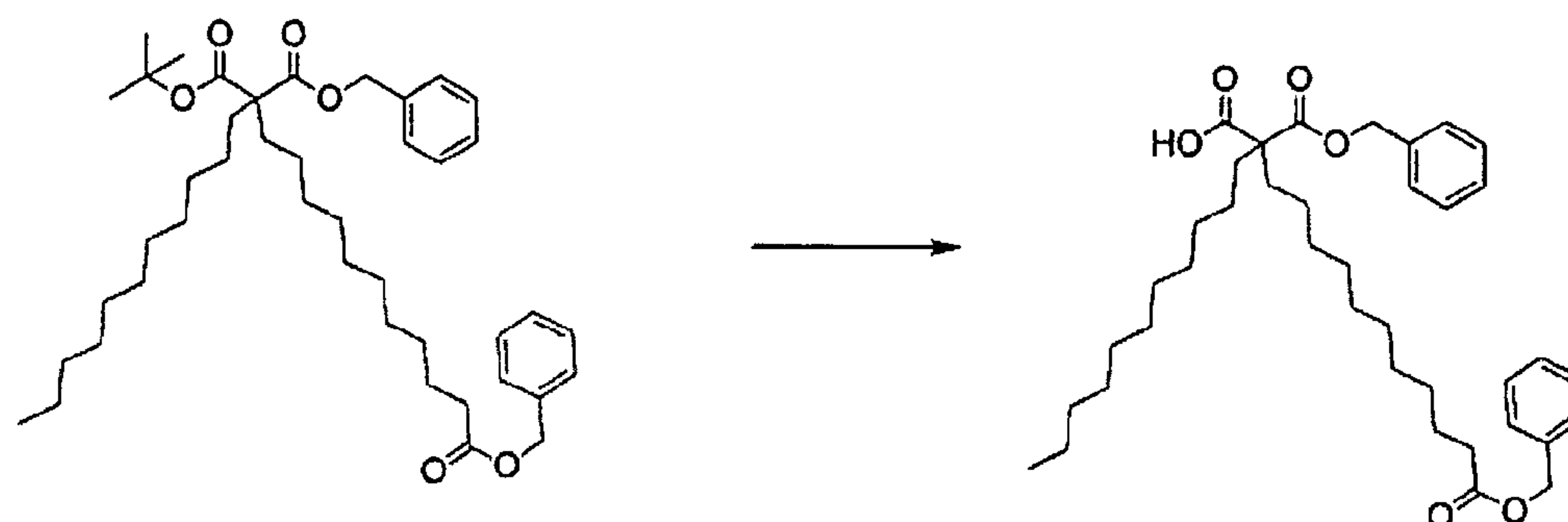
中間物32: 二十二烷-1,11,11-三羧酸1,11-二苄酯11-第三丁酯



以與中間物9類似之方式, 使用中間物31 (650 mg, 1.61 mmol)作為起始材料合成標題化合物, 得到無色油(823 mg, 1.21 mmol, 75%): ¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.84-0.94 (m, 3 H) 1.12 (m, *J*=6.60 Hz, 4 H) 1.19-1.33 (m, 28 H) 1.35 (s, 9 H) 1.66 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.85 (t, *J*=8.44 Hz, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.52 Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.16 (s, 2 H) 7.30-7.42 (m, 10 H)。

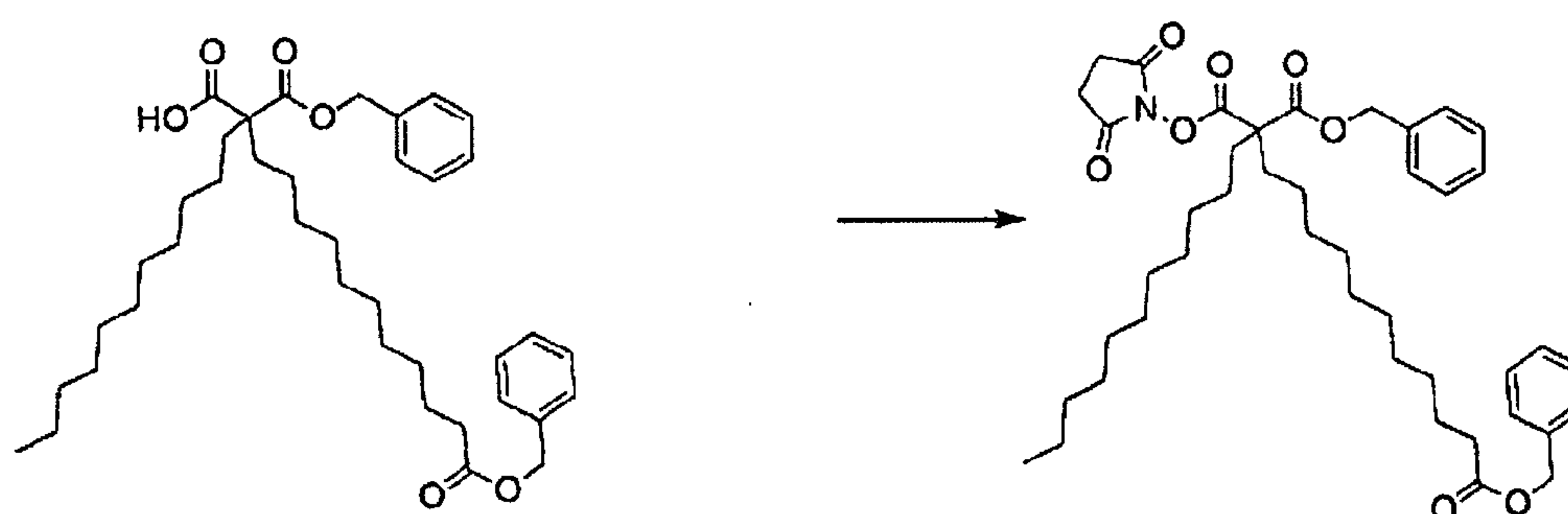
中間物33: 13-(苄氧基)-2-((苄氧基)羰基)-13-側氧基-2-十一基十

三酸



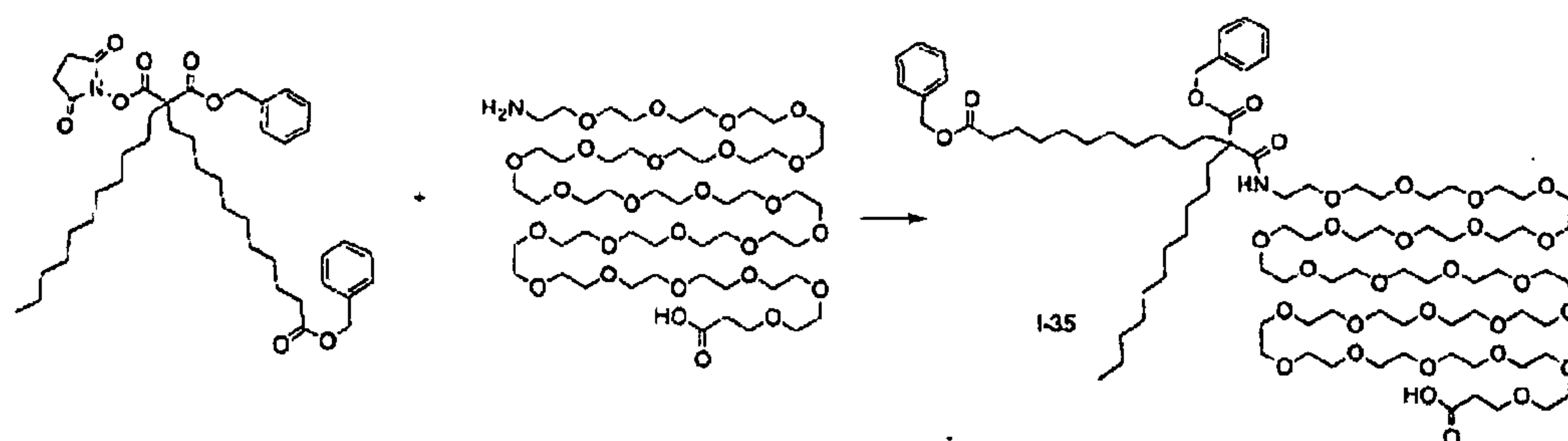
向中間物**32** (200 mg, 0.295 mmol)含於DCM (3 mL)之溶液添加TFA (0.6 ml), 並在室溫下攪拌該反應3 hr。蒸發溶劑, 藉由急驟管柱(矽膠12 g, 0-15% EtOAc / HEP)純化殘餘物, 得到標題化合物(177 mg, 0.284 mmol, 96%): ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.87-0.94 (m, 3 H) 0.94-1.05 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 14 H) 1.23-1.37 (m, 16 H) 1.65 (quin, $J=7.40$ Hz, 2 H) 1.78-1.91 (m, 2 H) 1.93-2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, $J=7.52$ Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.27 (s, 2 H) 7.31-7.44 (m, 10 H)。

中間物**34**: 二十二烷-1,11,11-三羧酸1,11-二苄酯11-(2,5-二側氧基環戊酯)



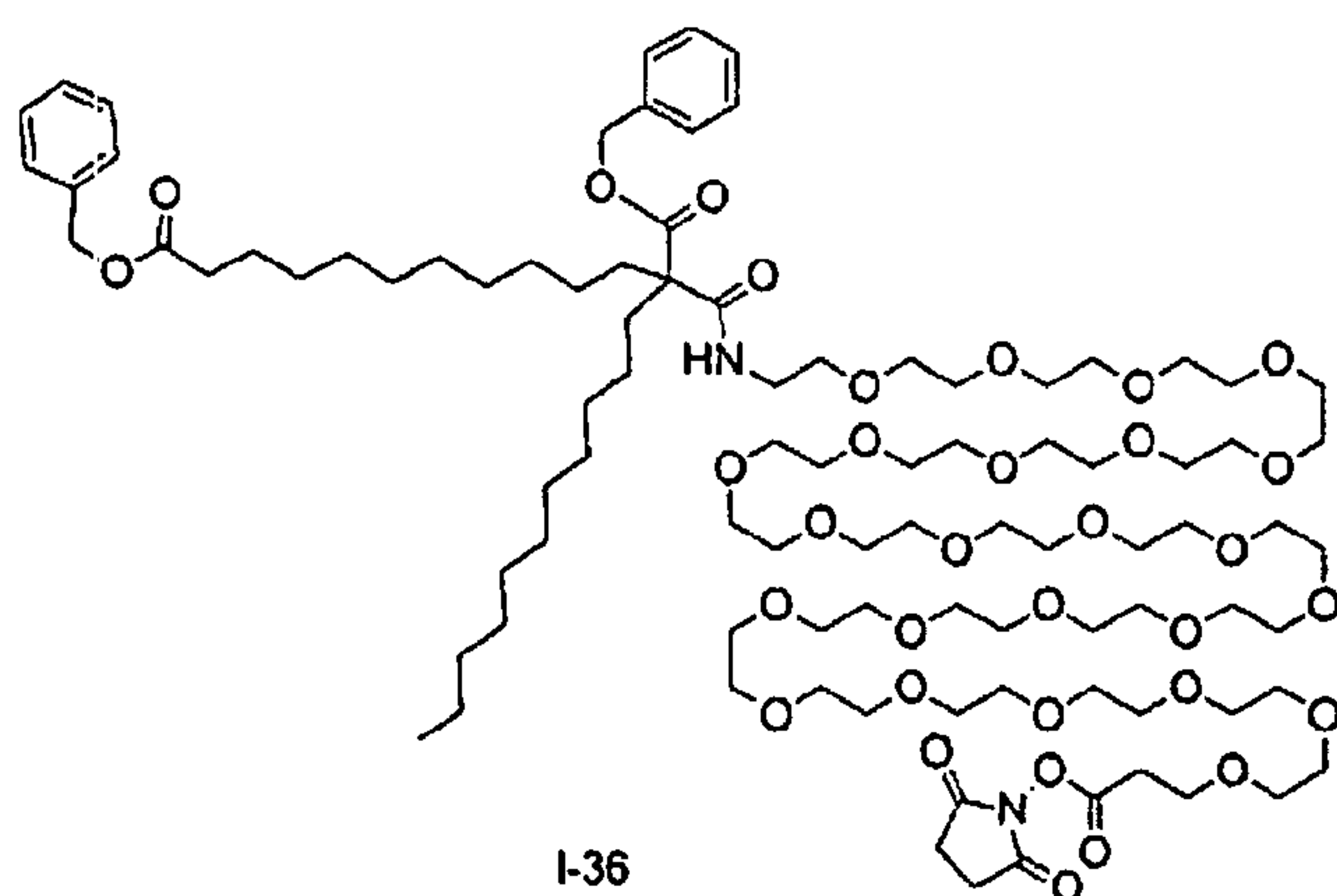
以與中間物**15**類似之方式, 使用中間物**33** (177 mg, 0.284 mmol) 作為起始材料合成標題化合物, 得到無色油(153 mg, 0.213 mmol, 75%): ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.86-0.93 (m, 3 H) 1.12-1.21 (m, 2 H) 1.21-1.37 (m, 30 H) 1.66 (quin, $J=7.40$ Hz, 2 H) 1.89-2.07 (m, 4 H) 2.37 (t, $J=7.58$ Hz, 2 H) 2.84 (br. s., 4 H) 5.13 (s, 2 H) 5.25 (s, 2 H) 7.30-7.47 (m, 10 H)。

中間物35：



將中間物34 (145 mg, 0.201 mmol)含於THF (1.5 ml)及DCM (1.5 ml)之溶液添加至裝有胺基-PEG24-酸之小瓶中。添加DIPEA (88 μ L, 0.504 mmol)並在振盪器板上攪動該反應15 hr。蒸發溶劑，並藉由超臨界流體層析(Waters HILIC 20x150 mm; 15-25% MeOH / CO₂)純化殘餘物，得到中間物35(151 mg, 0.086 mmol, 43%)：LCMS方法D Rt = 1.30min, [M+2H]⁺ 876.4；¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.86-0.93 (m, 3 H) 0.93-1.04 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 15 H) 1.23-1.37 (m, 15 H) 1.61-1.68 (m, 2 H) 1.78 (td, *J*=12.44, 4.34 Hz, 2 H) 1.92-2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.62 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 3.49 (dd, *J*=6.72, 2.32 Hz, 2 H) 3.52-3.59 (m, 2 H) 3.59-3.73 (m, 92 H) 3.80 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 5.13 (s, 2 H) 5.18 (s, 2 H) 7.31-7.42 (m, 10 H) 8.09 (t, *J*=5.26 Hz, 1 H)。

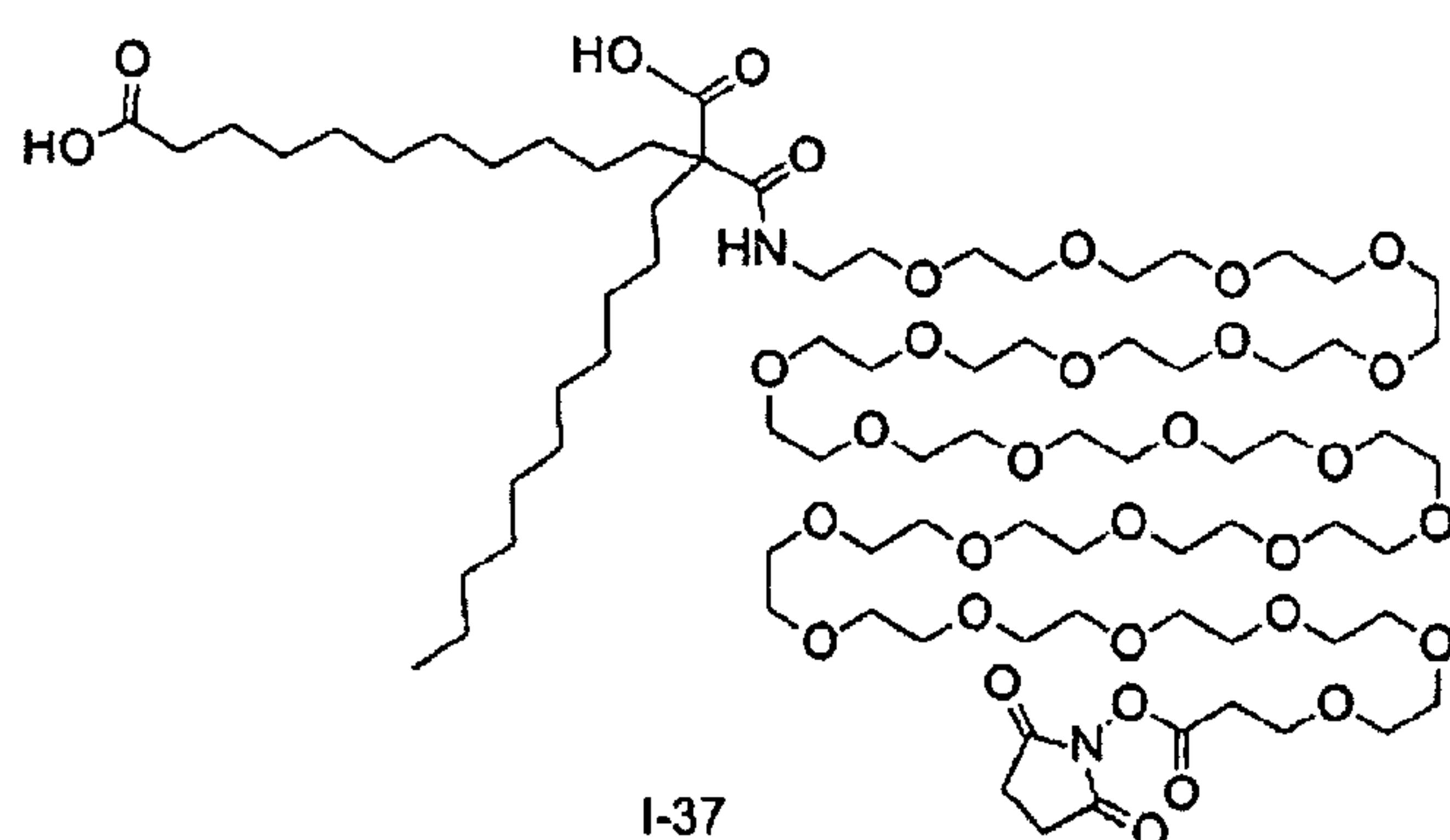
中間物36：



將含於DCM (0.265 mL)之DCC (22 mg, 0.103 mmol)添加至中間

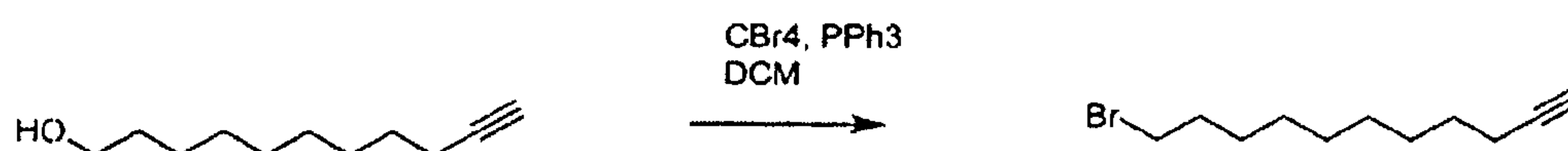
物**35** (150 mg, 0.086 mmol)及N-羥基琥珀醯亞胺含於DCM (1.5 ml)之溶液中。攪拌該反應1.5 hr。另外添加含於THF (0.5 ml)之N-羥基琥珀醯亞胺(10 mg)及含於DCM (0.265 ml)之DCC (22 mg)，並攪拌該反應過夜。蒸發溶劑，並藉由急驟管柱(矽膠12, 0-5% MeOH / DCM)純化殘餘物，得到呈白色固體之中間物**35**(159 mg, 定量)：LCMS方法B Rt = 1.55 min, $[M+H_3O+H]^{+2}$ 933.9。

中間物**37**：



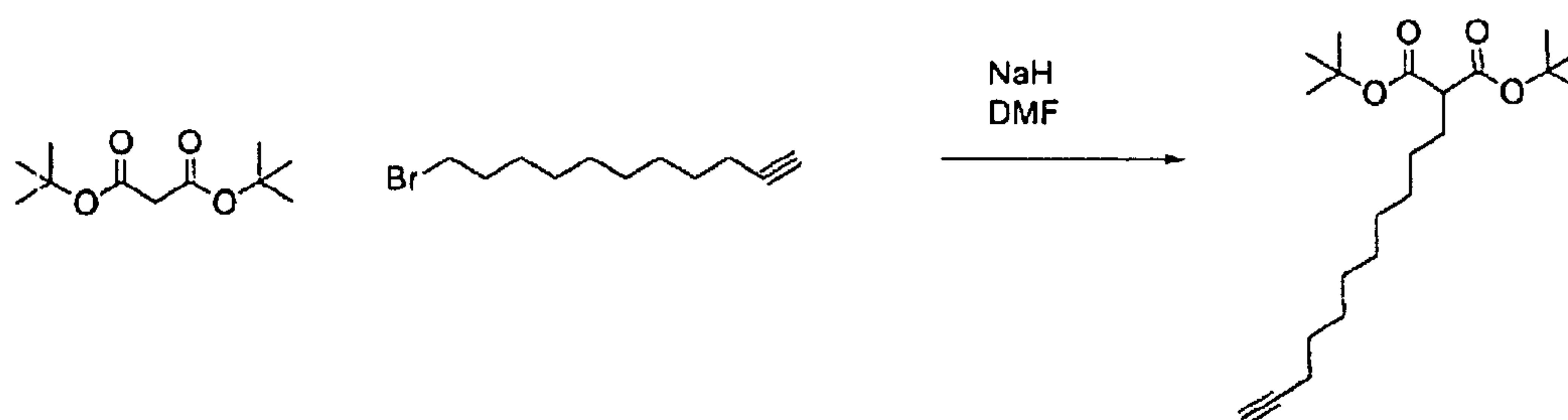
向中間物**36** (159 mg, 0.086 mmol)含於THF (5 ml)之溶液添加10%碳載鈀(4.6 mg, 4.3 μ mol)含於THF (1 ml)之懸浮液。將該反應置於氫氣下，並攪拌40 min。添加更多碳載鈀(7 mg, 6.5 μ mol)，並在氫氣下另外攪拌1 hr。使該反應通過薄膜過濾器，並蒸發濾液。藉由HPLC (Sunfire C18 30x50 mm, 45-70% ACN / 水 + 0.1% TFA)純化殘餘物，得到標題化合物(83 mg, 0.047 mmol, 54%)：LCMS方法B Rt = 1.03 min, $[M+2H]^{+2}$ 835.2； ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.84-0.94 (m, 3 H) 1.17 (br. s., 2 H) 1.21-1.39 (m, 30 H) 1.57-1.68 (m, 2 H) 1.69-1.80 (m, 2 H) 1.97-2.10 (m, 2 H) 2.34 (t, $J=7.21$ Hz, 2 H) 2.86 (s, 4 H) 2.92 (t, $J=6.48$ Hz, 2 H) 3.51-3.73 (m, 96 H) 3.87 (t, $J=6.48$ Hz, 2 H) 7.45 (t, $J=4.46$ Hz, 1 H)。

中間物**38**：11-溴十一-1-炔



在N₂及0℃下，在30min內向10-十一炔-1-醇(2.29 ml, 11.9 mmol)及四溴化碳(4.34 g, 13.1 mmol)含於DCM (10 mL)之溶液逐份添加三苯基膦(3.43 g, 13.1 mmol)。添加完成後，使該反應升溫至室溫。1.5 hr後，將該反應傾倒於攪拌環己烷(75 mL)中，並收集沉澱物。用環己烷清洗固體，並蒸發合併濾液。藉由急驟管柱(矽膠80 g, 0-10% EtOAc/HEP)純化殘餘物，得到標題化合物(1.75 g, 7.57 mmol, 64%)：¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 1.21-1.35 (m, 6 H) 1.35-1.48 (m, 4 H) 1.48-1.59 (m, 2 H) 1.80-1.91 (m, 2 H) 1.94 (t, *J*=2.63 Hz, 1 H) 2.19 (td, *J*=7.09, 2.69 Hz, 2 H) 3.41 (t, *J*=6.85 Hz, 2 H)。

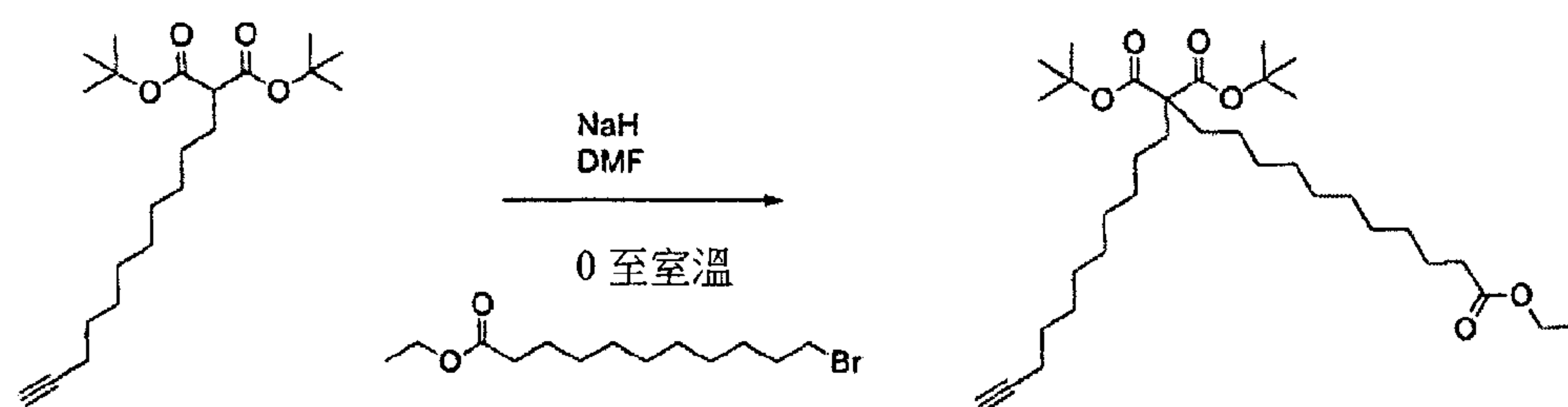
中間物39：2-(十一-10-炔-1-基)丙二酸二第三丁酯



在N₂及0℃下，將丙二酸二第三丁酯(800 mg, 3.70 mmol)溶解於DMF(9 ml)中，並添加NaH (148 mg, 3.70 mmol)。在0℃下攪拌該反應30分鐘，並緩慢逐滴添加中間物38 (770 mg, 3.33 mmol)，得到黃色溶液。在0℃下攪拌該反應2小時，然後升溫至室溫，並攪拌16小時。該混合物溶解於EtOAc(75 ml)中，並用H₂O(25 ml)清洗。用EtOAc (75 ml)萃取水層，並在Na₂SO₄上乾燥合併有機層，過濾並濃縮。經由急驟管柱(12 g矽膠濾筒, 0-20% EtOAc/庚烷)純化該混合物兩次，並濃縮溶離份，得到162.1 mg呈無色油之期望產物(12%)。LCMS (Waters Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm x 50

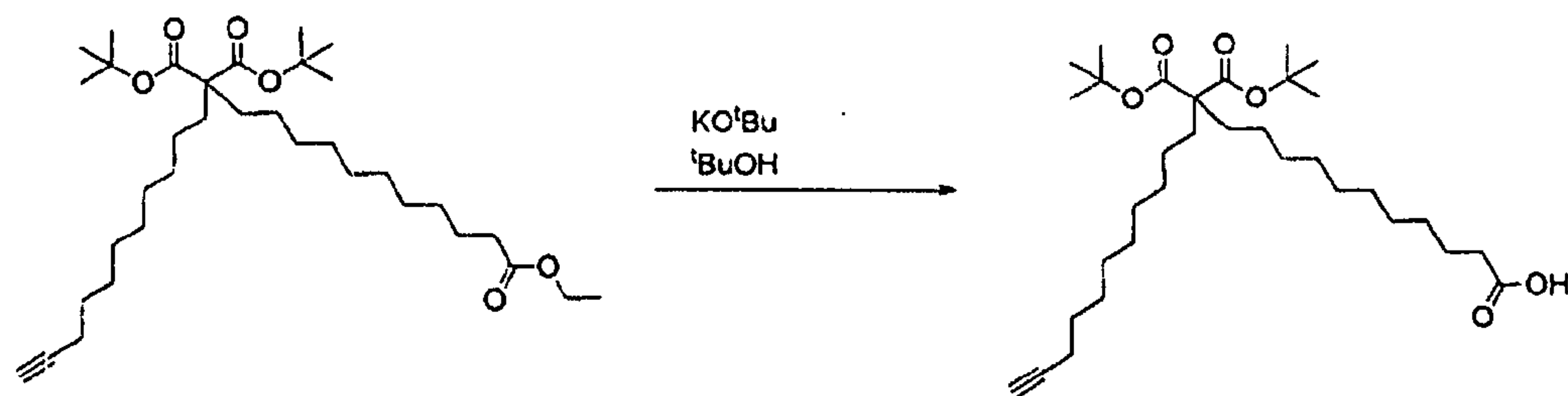
mm, 50°C, 溶劑名稱A: 水+0.1%甲酸, 溶劑名稱B: 乙腈+0.1%甲酸, 98% B, 在2.20 min內): $R_t = 1.37$ min, MS $[M+H]$ 觀測值: 366.0, 計算值: 366.535. ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) δ ppm 1.29 (s, 10 H) 1.47 (s, 18 H) 1.52 (dd, $J=14.78$, 7.20 Hz, 3 H) 1.48 (d, $J=1.26$ Hz, 1 H) 1.75-1.83 (m, 2 H) 1.94 (t, $J=2.65$ Hz, 1 H) 2.18 (td, $J=7.14$, 2.65 Hz, 2 H) 3.11 (t, $J=7.58$ Hz, 1 H)。

中間物40: 二十二-21-炔-1,11,11-三羧酸11,11-二第三丁酯1-乙酯



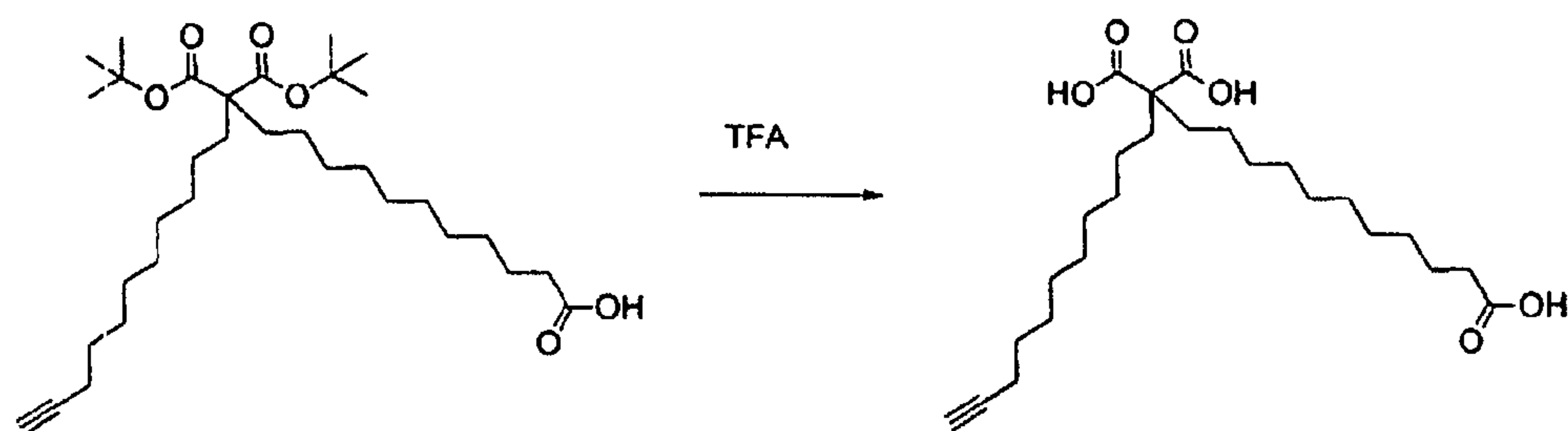
在0°C下, 將中間物39(162.1 mg, 0.442 mmol)溶解於DMF(2 ml)中, 並添加NaH (21.23 mg, 0.531 mmol)。在0°C下攪拌該反應15分鐘, 並緩慢逐滴添加11-溴十一烷酸乙酯(143 mg, 0.486 mmol)。將該反應升溫至室溫, 並攪拌16小時。用 EtOAc(40 ml)稀釋該混合物, 並用H₂O(20 mL)清洗一次。用EtOAc(40 ml)萃取水層一次, 並合併有機層, 在Na₂SO₄上乾燥, 過濾並濃縮得到澄清黃色油。將樣本溶解於1 mL DCM中, 並經由急驟管柱(12 g矽膠管柱, 0-20% EtOAc/庚烷, 15 min)純化。合併溶離份, 並濃縮得到90.1 mg期望產物(35%)。 ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) δ ppm 1.28 (br. s., 24 H) 1.45 (s, 18 H) 1.48 (s, 3 H) 1.53 (d, $J=7.58$ Hz, 3 H) 1.51 (s, 1 H) 1.64 (br. s., 1 H) 1.61 (d, $J=7.33$ Hz, 1 H) 1.77 (d, $J=16.93$ Hz, 2 H) 1.74-1.80 (m, 2 H) 1.94 (t, $J=2.65$ Hz, 1 H) 2.18 (td, $J=7.07$, 2.53 Hz, 2 H) 2.29 (t, $J=7.58$ Hz, 2 H) 4.13 (q, $J=7.24$ Hz, 2 H)。

中間物41: 12,12-雙(第三丁氧基羰基)二十三-22-烯酸



在30℃及N₂下，向中間物**40** (21.7 mg, 0.037 mmol)含於^tBuOH (1 mL)之溶液添加KOtBu (114 mg, 1.012 mmol)含於^tBuOH (2 mL)之溶液中。在室溫下攪拌該混合物，並藉由TLC (1:1 EtOAc/己烷，KMnO₄，回流)監測。3小時後消耗起始材料，並用1 M HCl (20 mL)使反應混合物驟冷，並用EtOAc (25 mL)萃取兩次。合併有機層，在Na₂SO₄上乾燥，過濾並濃縮得到澄清無色油(18 mg, 87%)。該物質無需進一步純化繼續用於下一步驟中。¹H NMR (400 MHz, 氯仿-d) δ ppm 1.27 (br. s., 22 H) 1.44 (br. s., 18 H) 1.48 (s, 3 H) 1.52 (s, 3 H) 1.62 (br. s., 2 H) 1.77 (br. s., 4 H) 1.94 (br. s., 1 H) 2.18 (s, 2 H) 2.35 (s, 2 H)。

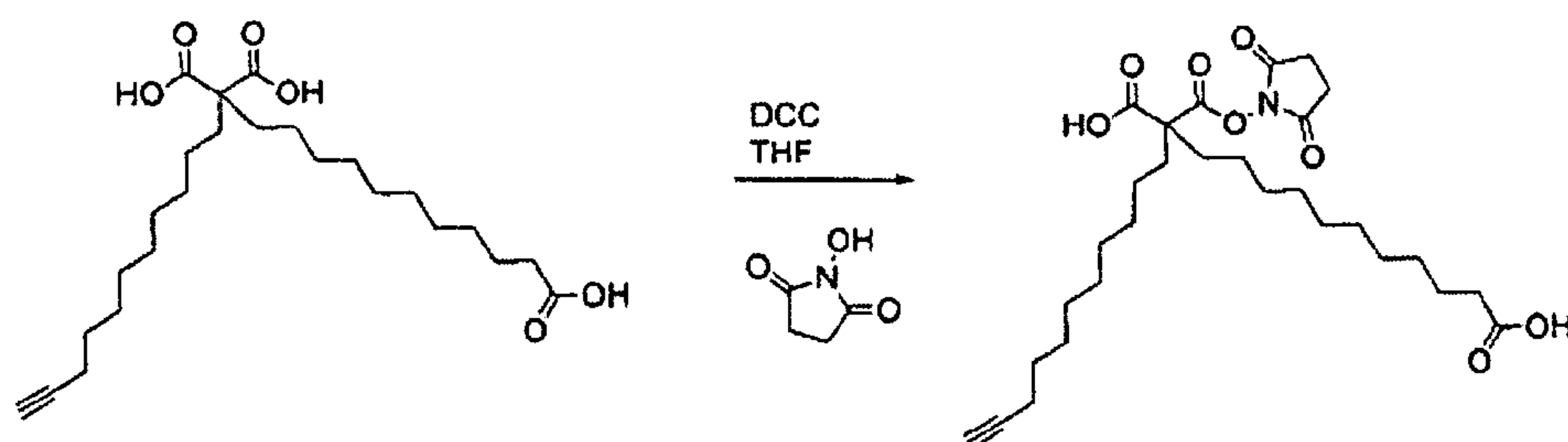
中間物**42**：二十二-21-炔-1,11,11-三羧酸



向中間物**41** (12 mg, 0.022 mmol)添加TFA (2 mL)，並在室溫下攪拌該反應1小時。用DCM (10 mL)稀釋該混合物，並濃縮兩次得到棕色油。將該物質溶解於EtOAc(10 mL)中，並用H₂O(20 mL)清洗。在Na₂SO₄上乾燥有機層，過濾並濃縮得到棕色油。將粗物質溶解於1 mL MeOH中，並經由MS-觸發之HPLC (Sunfire 30x50mm 5μm管柱 ACN/H₂O w/ 0.1%TFA 75 mL/min，注射1.5 mL，45-70% ACN，在3.5

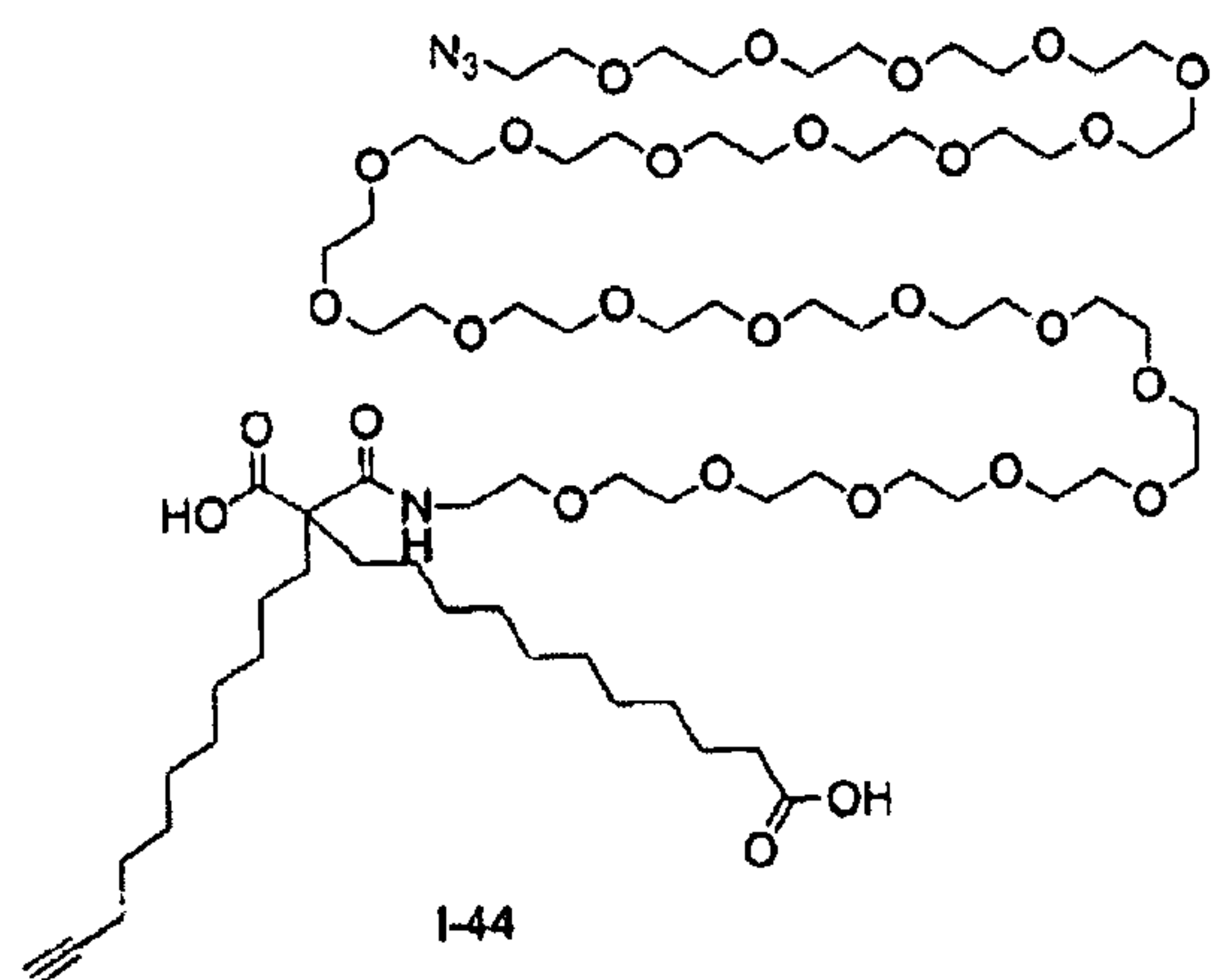
min內)純化： $R_t = 3.42$ min；MS $[M+H+Na]$ 觀測值：461.00，計算值：461.597。合併溶離份，並凍乾得到5.3 mg標題化合物，產率56%。

中間物43：2-(((2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基)羰基)-2-(十一-10-炔-1-基)十三烷二酸



向中間物42 (5.3 mg, 0.012 mmol)含於THF (0.5 mL)之溶液添加N-羥基琥珀醯亞胺(1.53 mg, 0.013 mmol)。添加DCC (2.493 mg, 0.012 mmol)含於THF (0.5 mL)之溶液，並在室溫及 N_2 下攪拌該混合物4小時。藉由LCMS觀察到起始材料完全轉化。濃縮該混合物，且無需進一步純化繼續用於下一步驟中。LCMS (Sunfire C18 3.5 μ m 3.0x30 mm, 40°C, 酸性溶離液A：水+ 0.05%三氟乙酸，鹼性溶離液A：水+ 5mM氫氧化銨，溶離液B：ACN, 5-95%, 在2 min內)： $R_t = 1.72$ min；MS $[M+H+Na]$ 觀測值：558.0，計算值：558.67。

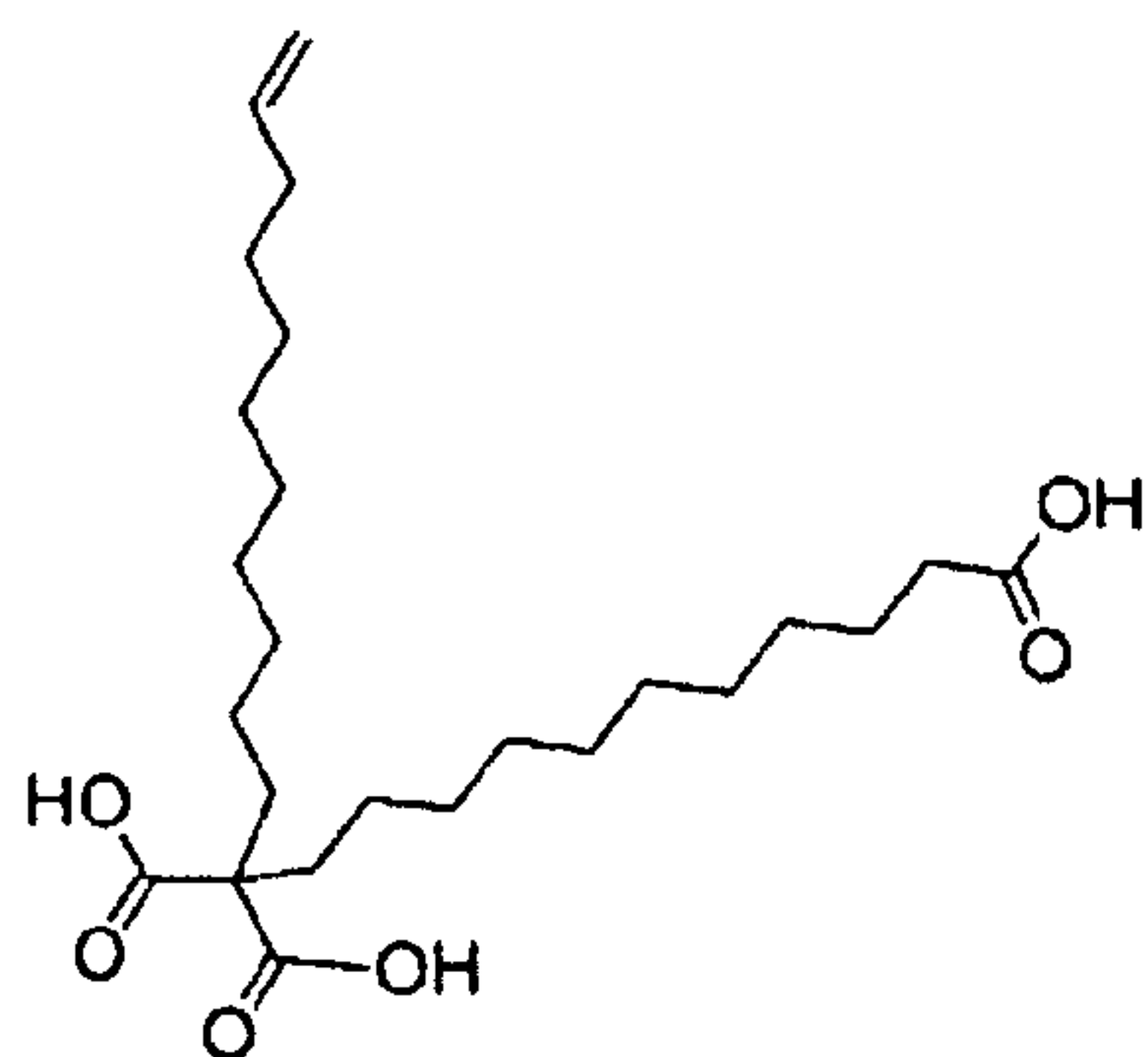
中間物44：



向中間物43 (3.2 mg, 5.97 μ mol)含於DCM (0.5 mL)之溶液添加疊氮基-dPEG23-胺(Quanta Biodesign, 7.88 mg, 7.17 μ mol)含於DCM

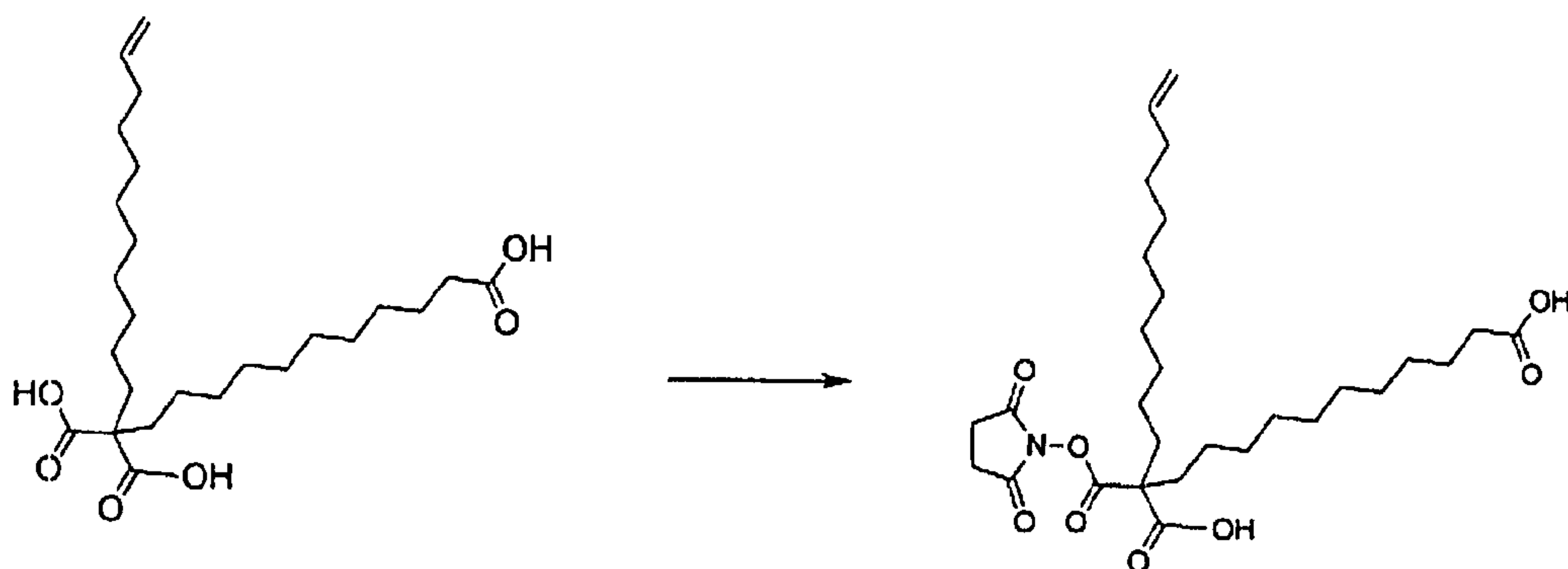
(0.5 mL)及DIPEA (2.09 μ L, 0.012 mmol)之溶液，並在室溫下攪拌該混合物16小時，在此時藉由LCMS觀察到起始材料轉化。濃縮反應混合物，並溶解於1 mL MeOH中，並藉由MS-觸發之HPLC (Sunfire 30x50mm 5 μ m管柱ACN/H₂O w/ 0.1%TFA 75 ml/min，注射1.5 ml，55-80% ACN 5 min梯度， R_t = 1.92 min)純化，且合併溶離份，並凍乾得到1.7 mg標題化合物，產率19%。LCMS (Acquity BEH 1.7 μ m 2.1x50 mm-50 $^{\circ}$ C，溶劑名稱A：水+0.1%甲酸，溶劑名稱B：乙腈+0.1%甲酸，98% B，在2.20 min內)： R_t = 1.89 min；MS [M+H/2]觀測值：760.0，計算值：759.5。

中間物45：二十二-21-烯-1,11,11-三羧酸



按照中間物39至42之程序製備中間物45，用11-溴-癸-1-烯替代11-溴-癸-1-炔。

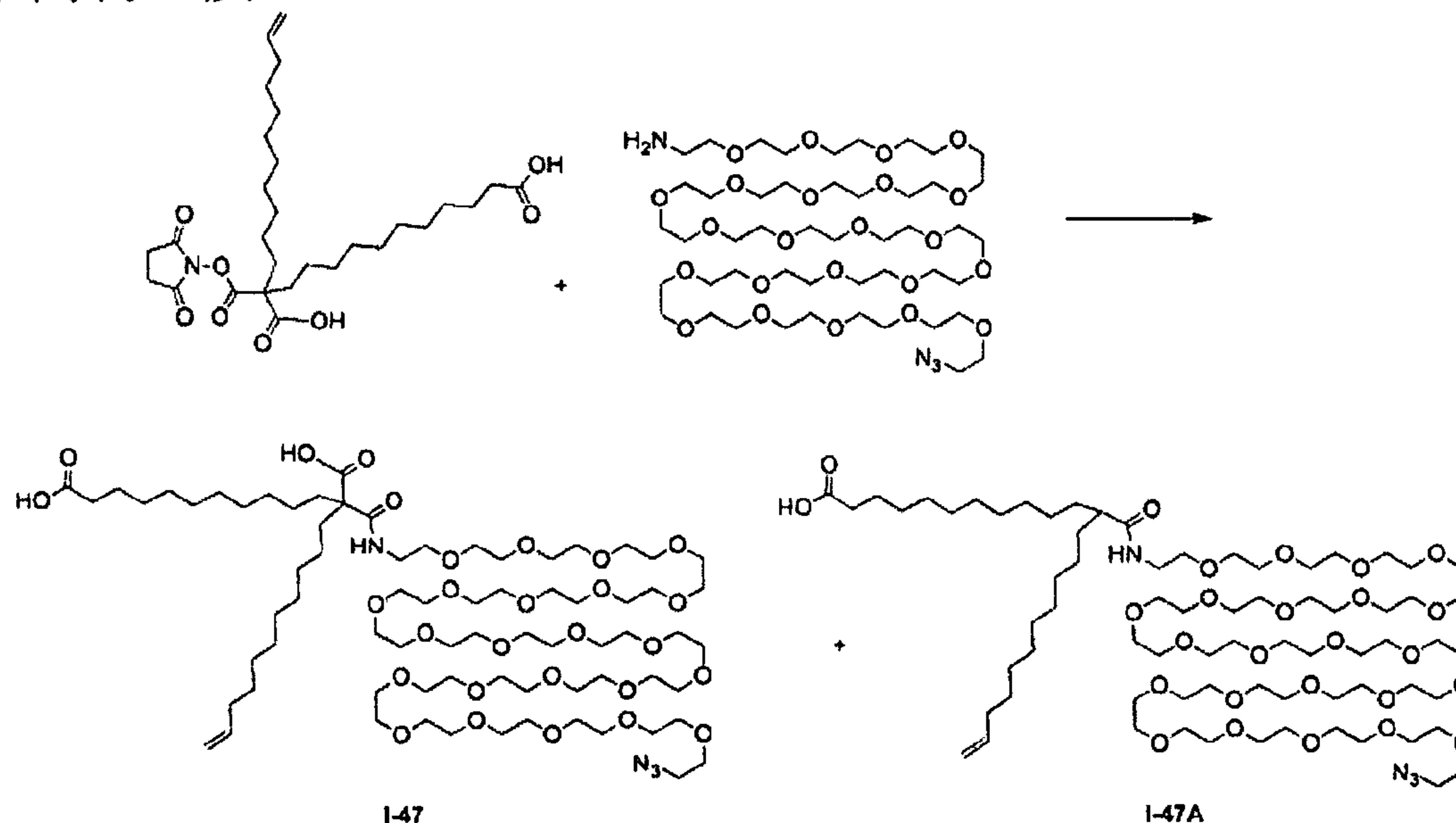
中間物46：2-(((2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基)羰基)-2-(十一-10-烯-1-基)十三烷二酸



將含於DCM (2 mL)之DCC (187 mg, 0.908 mmol)添加至N-羥基

琥珀醯亞胺(99 mg, 0.862 mmol)及二十二-21-烯-1,11,11-三羧酸(中間物45: 400 mg, 0.908 mmol)含於DCM (7 mL)及THF (0.7 mL)之溶液。攪拌該反應過夜，然後蒸發溶劑。藉由HPLC (Sunfire C18 30x50 mm; 55-80% ACN /水 +0.1% TFA)純化殘餘物，得到標題化合物(155 mg, 0.288 mmol, 32%)：藉由LCMS方法C $R_t = 1.51$ min, $M+H$ 538.3; ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) δ ppm 1.16-1.46 (m, 28 H) 1.60-1.87 (m, 3 H) 1.91-2.17 (m, 5 H) 2.38 (t, $J=7.03$ Hz, 2 H) 2.86 (br. s., 4 H) 3.68 (dd, $J=11.25, 7.34$ Hz, 1 H) 3.78 (dd, $J=11.31, 5.20$ Hz, 1 H) 3.99-4.10 (m, 1 H)。

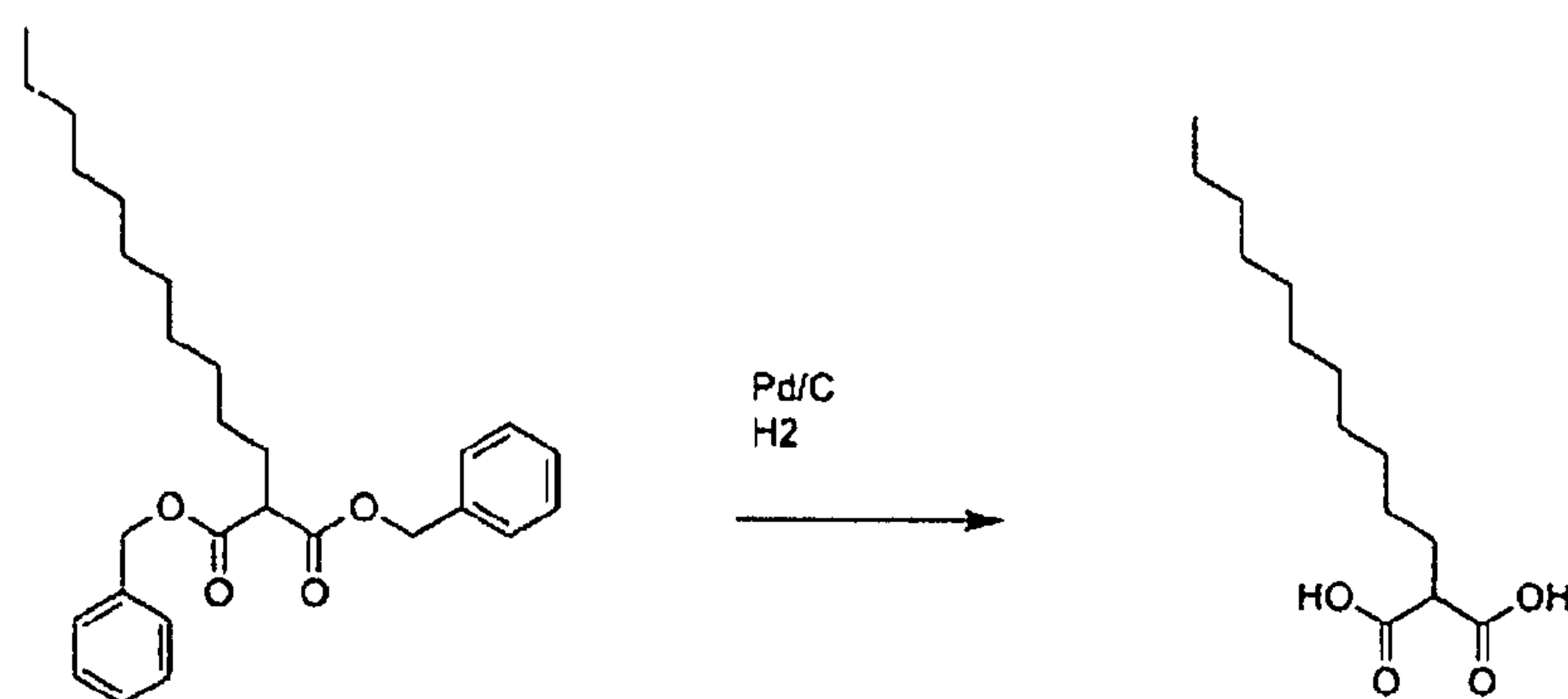
中間物47及47A：



將疊氮基-dPEG23-胺(Quanta Biodesign: 164 mg, 0.149 mmol)及中間物46 (80 mg, 0.149 mmol)溶解於THF (2.5 mL)中。添加DIPEA (39 μ L, 0.233 mmol)並攪動該反應過夜。蒸發溶劑，並藉由HPLC (Sunfire C18 30x50 mm; 45-70% ACN/水+0.1% TFA)純化殘餘物，得到中間物47(97 mg, 0.061 mmol, 41%)及47A(32 mg, 0.021 mmol, 14%)：LCMS方法C $R_t = 1.35$ min, $[M+2H]^{+2}$ 761.9; ^1H NMR (400 MHz, 乙腈- d_3) δ ppm 1.05-1.18 (m, 3 H) 1.19-1.32 (m, 20 H) 1.36 (t,

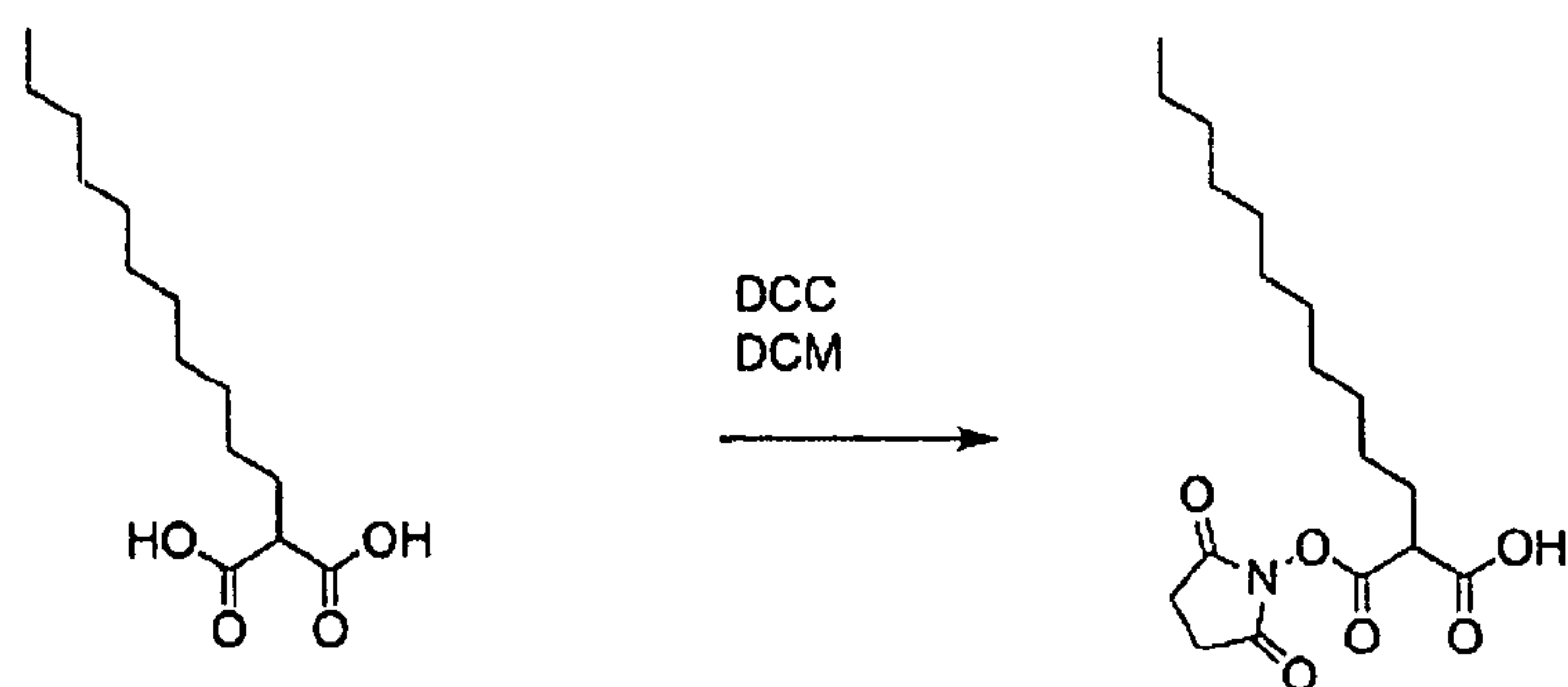
$J=7.15$ Hz, 1 H) 1.48-1.59 (m, 2 H) 1.65-1.75 (m, 2 H) 2.01-2.06 (m, 2 H) 2.25 (t, $J=7.46$ Hz, 2 H) 3.33-3.39 (m, 2 H) 3.39-3.44 (m, 2 H) 3.50-3.67 (m, 98 H) 4.84-4.95 (m, 1 H) 4.95-5.06 (m, 1 H) 5.83 (ddt, $J=17.07, 10.29, 6.68, 6.68$ Hz, 1 H) 7.31 (t, $J=5.44$ Hz, 1 H); LCMS方法C $R_t = 1.50$ min, $[M+2H]^{+2}$ 739.9; ^1H NMR (400 MHz, 乙腈- d_3) δ ppm 1.16-1.42 (m, 30 H) 1.42-1.63 (m, 5 H) 2.00-2.07 (m, 2 H) 2.22-2.28 (m, 2 H) 2.40-2.52 (m, 2 H) 3.25-3.33 (m, 2 H) 3.33-3.42 (m, 2 H) 3.42-3.50 (m, 2 H) 3.50-3.68 (m, 88 H) 4.86-5.06 (m, 2 H) 5.83 (ddt, $J=17.04, 10.26, 6.71, 6.71$ Hz, 1 H) 6.40-6.74 (m, 1 H)。

中間物48：2-十一基丙二酸



使用中間物22 (290 mg, 0.661 mmol)，以與中間物19類似之方式合成標題化合物(185 mg, 定量)：LCMS方法B LCMS $R_t = 0.82$ min, M-H 257.3。

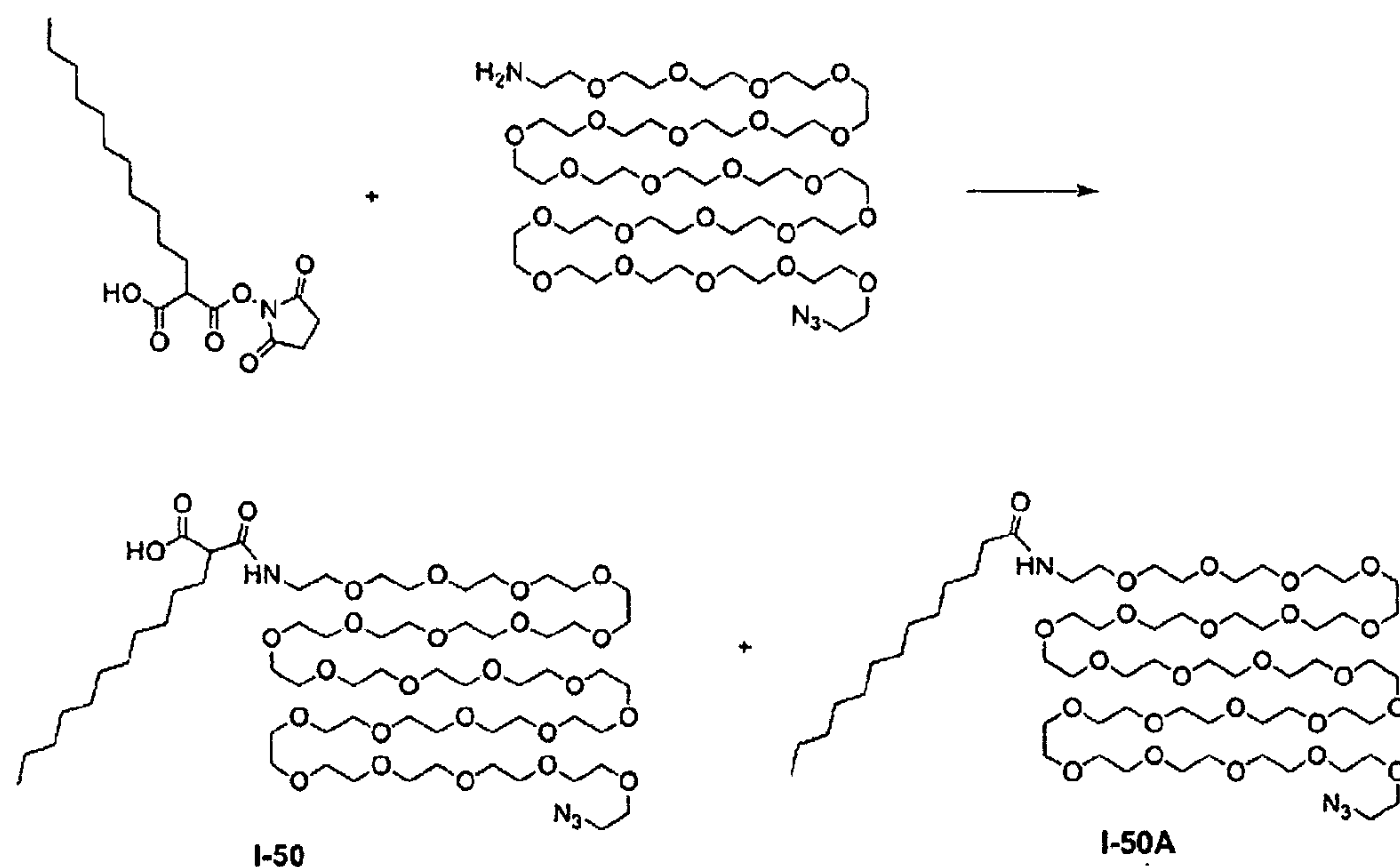
中間物49：2-(((2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基)羰基)十三酸



將DCC (122 mg, 0.592 mmol)添加至中間物48 (170 mg, 0.658

mmol)及N-羥基琥珀醯亞胺(68 mg, 0.592 mmol)含於DCM (6 mL)及THF (0.5 mL)之溶液中。攪拌該反應16 hr, 然後添加更多含於DMF (0.5 mL)之DCC (30 mg, 0.145 mmol)。另外攪拌該反應2天。蒸發溶劑, 並藉由HPLC (Sunfire C18 30x50 mm, 45-70% ACN/水+0.1% TFA)純化殘餘物, 得到呈白色粉末之標題化合物(46 mg, 0.129 mg, 20%): LCMS方法B $R_t = 0.94$ min, $M+H$ 356.3; ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.89 (t, $J=7.00$ Hz, 3 H) 1.20-1.40 (m, 16 H) 1.43-1.55 (m, 2 H) 1.99-2.14 (m, 2 H) 2.86 (s, 4 H) 3.71 (t, $J=7.46$ Hz, 1 H)。

中間物50及50A:



以與50及50A類似之方式自中間物49 (30 mg, 0.084 mmol)合成標題化合物, 得到中間物50 (18 mg, 0.013 mmol, 16%)及中間物50A (5 mg, 4 μ mol, 5%): LCMS方法B $R_t = 0.85$ min, $M+H$ 1340.3; ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.82-0.98 (m, 3 H) 1.20-1.36 (m, 16 H) 1.36-1.51 (m, 2 H) 1.83-2.02 (m, 1 H) 2.11-2.27 (m, 1 H) 2.33 (dd, $J=11.80, 4.22$ Hz, 1 H) 3.41 (t, $J=5.14$ Hz, 3 H) 3.49 (d, $J=5.01$ Hz, 1 H) 3.56-3.79 (m, 92 H); LCMS方法B $R_t = 0.96$ min, $M+H$ 1296.3。

中間物51至57: GDF15蛋白質之突變體。

在大腸桿菌細胞中表現人類GDF-15蛋白質

大腸桿菌菌株 BL21 (DE3) Gold (Stratagene) 及 Rosetta (DE3) pLysS細胞(Novagen)分別經構築體 51至56及構築體 MAHA-(200-308)-hGDF15轉形，並選殖至pET26b載體中。轉形細胞在抗生素篩選條件下先後於3 ml及50 ml Luria肉湯(細菌用胰化蛋白胨10 g/L，酵母提取物5 g/L、NaCl 5/L、葡萄糖6 g/L)中生長，直至OD600達到1.5。使用預培養物接種兩個裝滿Terrific肉汁培養基(NH_4SO_4 1.2 g/L， H_2PO_4 0.041 g/L， K_2HPO_4 0.052 g/L，細菌用胰化蛋白胨12 g/L，酵母提取物24 g/L)之1-L發酵槽。當pH增加至高於7.1時，藉由自動添加1 mM 異丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)誘導培養物。其他發酵參數為：溫度=37°C；pH 7.0+/-0.2，藉由添加2N NaOH/ H_2SO_4 調節； $\text{pO}_2 > 30\%$ ，具有攪拌器速度，氣流及添加氧氣級聯。誘導後五小時，將培養物冷卻至10°C，並藉由離心收穫細胞。

GDF15變體之純化及再折疊

a) 內含體

再次將表現受關注蛋白質之重組桿菌小球懸浮(5% w/v)於50 mM NaH_2PO_4 / 150 mM NaCl / 5 mM 苯甲脒中。在4°C下，HCl/5 mM DTT(pH 8.0)經均質化，並藉由2次通過法式壓碎機(800及80 bar)溶解。在4°C下，內含體(IB)藉由以12000 rpm離心60 min。

b) 粗製未折疊蛋白質之純化

將IBs溶解(5% w/v)於6 M 胍/100 mM NaH_2PO_4 /10 mM Tris/20 mM β -巯基乙醇(pH 8.0)中，並在室溫攪拌2小時。藉由12000 rpm離心移除碎片。在Ni-NTA-Superflow (不含His標記之構築體亦由於高組胺酸含量結合至此樹脂)上進一步純化溶解之IBs。在用6 M 胍/100 mM NaH_2PO_4 /10mM Tris/5 mM β -巯基乙醇(pH 8.0)基線洗後，用調節至pH 4.5之相同緩衝液溶離結合之物質。將溶離液調節至pH 8.0，添加100

mM DTT，該溶液在4℃攪拌過夜。然後藉由添加三氟乙酸(TFA，10%原料於水中)將pH調節至2，且該溶液進一步用於水中之0.1% TFA以1:1稀釋。藉由RP-HPLC (Poros)使用0-50%乙腈梯度在50 min內進一步純化粗製蛋白質溶液。合併含GDF-15之溶離份，並凍乾。

c)蛋白質折疊

方法1：以2 mg/ml凍乾物質溶解於100 mM乙酸中，以15-20倍稀釋於折疊緩衝液(100 mM CHES/1 M NaCl/30 mM CHAPS/5 mM GSH/0.5 mM GSSG/20% DMSO，pH 9.5，4℃)中，並在3天期間於4℃溫和攪拌溶液。3天後，添加3體積100 mM乙酸，並藉由超濾(5 kDa截止點)將溶液濃縮至約100-200 ml，用100 mM乙酸稀釋10倍，並再濃縮。進一步藉由製備型RP-HPLC於Vydac C4管柱上於50℃運行(緩衝液A：0.1% TFA於水中；緩衝液B：0.05% TFA於乙腈中)純化再折疊物質。裝載後，用15%緩衝液B洗管柱，並以15% B至65% B之梯度在50 min內溶離。用等體積之緩衝液A稀釋所收集之含受關注蛋白之溶離份並凍乾。兩種蛋白質之再折疊率為約25%。

方法2：此方案遵循方法1，使用折疊緩衝液：100 mM CHES，pH 9.4，0.9 M精胺酸，0.5 M NaCl，1 mM EDTA，2.5 mM GSH，1 mM GSSG (最終濃度)。

按照上述程序製備以下GDF15突變體：

中間物51：M-(His)₆-hGDF15

MHHHH HHAR NGDHC PLGPG RCCRL HTVRA SLEDL
GWADW VLSPR EVQVT MCIGA CPSQF RAANM HAQIK TSLHR
LKPDT VPAPC CVPAS YNPMV LIQKT DTGVS LQTYD DLLAK
DCHCI (SEQ ID NO:1)

LCMS：計算質量：26462觀測質量：26464

中間物52：M-(His)₆-M-hGDF15

MHHHHHHMARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWV
LSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVP
ASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:2)

LCMS：計算質量：26724觀測質量：26725

中間物53：**His-dGDF15**：

MHHHHHHHAHARDGCPLGEGRCCRLQSLRASLQDLGWANWVV
APRELDVRMCVGACPSQFRSANTHAQMQARLHGLNPDAAPAPCCVP
ASYEPVVLMMHQDSDGRVSLTPFDDLVAKDCHCV (SEQ ID NO:3)

LCMS：計算質量(二聚體)：26368觀測質量：26363

中間物54：**MH-(199-308)-hGDF15**

MHNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI
QKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:4)

LCMS：計算質量：24636觀測質量：24638

中間物55：**AH-(199-308)-hGDF15**

AHNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI
QKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:5)

步驟1：製備構築體M-His₆-TEV(ENLYFQ/A)-H-hsGDF15 aa199-308

按照上述程序(步驟a、b及c)製備構築體M-His₆-TEV(ENLYFQ/A)-H-hsGDF15 aa199-308。

步驟2：步驟1之蛋白質之TEV裂解。

將凍乾蛋白質溶解於水中，至最終濃度為1.75 mg/ml。藉由以1:1稀釋於6M Guan/50mM Tris，pH 8.0 + 50mM DTT中再次展開該蛋白質，並在室溫下攪拌1 h。藉由製備型RP-HPLC於Vydac C4管柱上再

次純化該物質並凍乾。將26 mg凍乾物溶解於26 ml 50 mM Tris/3M UREA, pH 7.5 + 3000單位AcTEV蛋白酶(Invitrogen, 12575-023)中, 並培育4天。然後藉由添加三氟乙酸(TFA, 10%原料含於水)將pH調節為pH 2.0, 並用含於水之0.1% TFA將溶液進一步稀釋至150 ml。濾過0.22 μ m膜後, 再次藉由製備型RP-HPLC於Vydac C4管柱上純化該物質, 以成功單離裂解蛋白質。手動收集溶離份; 單離含目標蛋白之溶離份並凍乾。然後使裂解GDF15蛋白再折疊, 並如上所述純化再折疊蛋白:

LCMS: 計算質量(二聚體): 24516觀測質量: 24518

可按照上述程序製備以下GDF15突變體:

中間物56: **MHA-(200-308)-hGDF15**

MHAGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI
QKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:6)

LCMS: 計算質量(二聚體): 24752

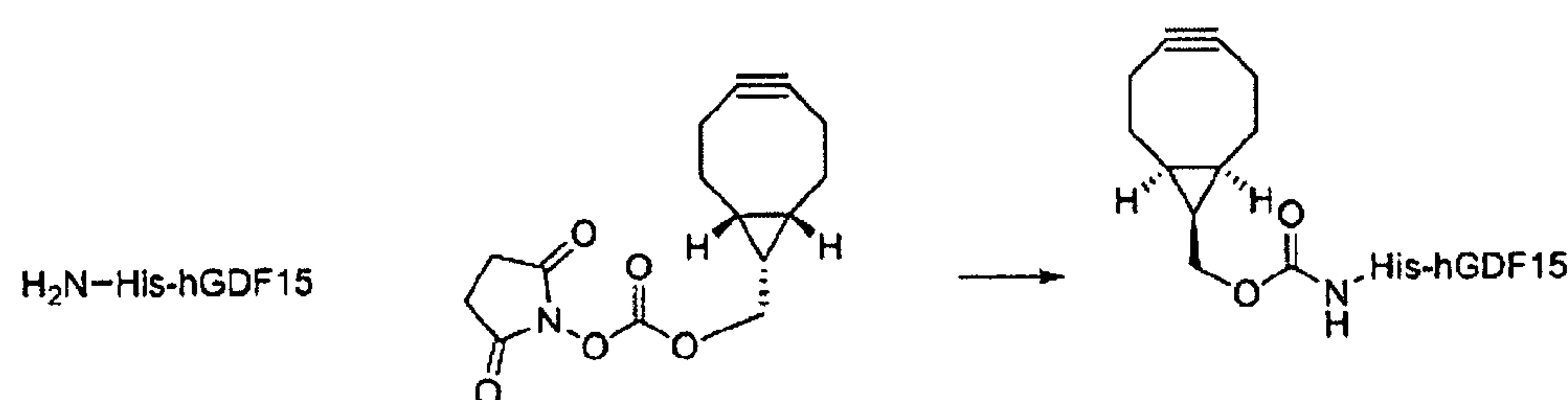
按照上述程序製備以下GDF15突變體:

中間物57: **AHA-(200-308)-hGDF15**

AHAGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVT
MCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLI
QKTDGTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO:7)

LCMS: 計算質量(二聚體): 24430:觀測質量(二聚體): 24432

中間物58: **His-hGDF15 BCN共軛物**



His-hGDF15

Seq:MHHHHHHMARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVL
SPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPA
SYNPMVLIQKTD TGVS LQTYDDLAKDCHCI

用30mM NaOAc pH 4.5緩衝液(5.2 mL)將His-hGDF15原液(中間物52：0.6 ml，4.8 mg/mL)稀釋至0.5 mg/mL。緩慢添加(1R,8S,9s)-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)碳酸酯(NHS-BCN)含於DMSO (251 µL)之10 mg/mL原液，並將該反應置於24℃振盪器板上21 hr。用30 mM NaOAc pH 4.5緩衝液將該反應稀釋至30 mL，並用10kDa MWCO超濾濾筒濃縮至2 mL(重複4x)，得到2.5 mL濃縮物。基於A₂₈₀ ($\epsilon = 29090\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ，26730 g/mol)，該濃縮物為0.93 mg/mL (2.33 mg，80%)：LCMS QT2_15-60kDa_15min_極性(方法E)。藉由MALDI分析所得溶液，指示主要共軛(major conjugation)為+1及+2(單體及二聚體之N端標記)。

標記度(Degree of Labelling)	計算值	觀測值	% TIC (MS+)強度
GDF15	26726	26726	26
GDF15 +1BCN	26903	26904	43
GDF15 +2BCN	27080	27080	23
GDF15 +3BCN	27257	27256	9

His-hGDF15 +1BCN (雙環[6.1.0]壬-4-炔基)對應GDF15同型二聚體之一個分子上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +2BCN對應GDF15同型二聚體之兩個單體單元上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +3BCN對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之

釋至 60 ml，並用 10kDa MWCO 超濾濾筒濃縮至 4 mL(重複 4x)，得到

I KPDT VPAPC CVPAS YNPMV LIQKT DTGVS LOTYD DLLAK



用30 mM NaOAc pH 4.5緩衝液(12.95 mL)將His-hGDF15原液(中

間物 **51** : 7.04 ml , 1.42 mg/mL) 稀釋至 0.5 mg/mL 。 緩慢添加

(1R,8S,9s)-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基(2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)碳

酸酯(NHS-BCN)含於DMSO (0.88 ml)之10 mg/mL原液，並將該反應置

反應在24°C下維持24 hr。用30 mM NaOAc pH 4.5緩衝液將該反應稀

4.1 ml濃縮物。基於 A_{280} ($\epsilon = 29090\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 26700 g/mol)，該濃縮物

法E)

標記名	計算値	観測値	% TIC (MS)強度
-----	-----	-----	--------------

標記度	計算値	観測値	% TIC (MS+)強度
-----	-----	-----	---------------

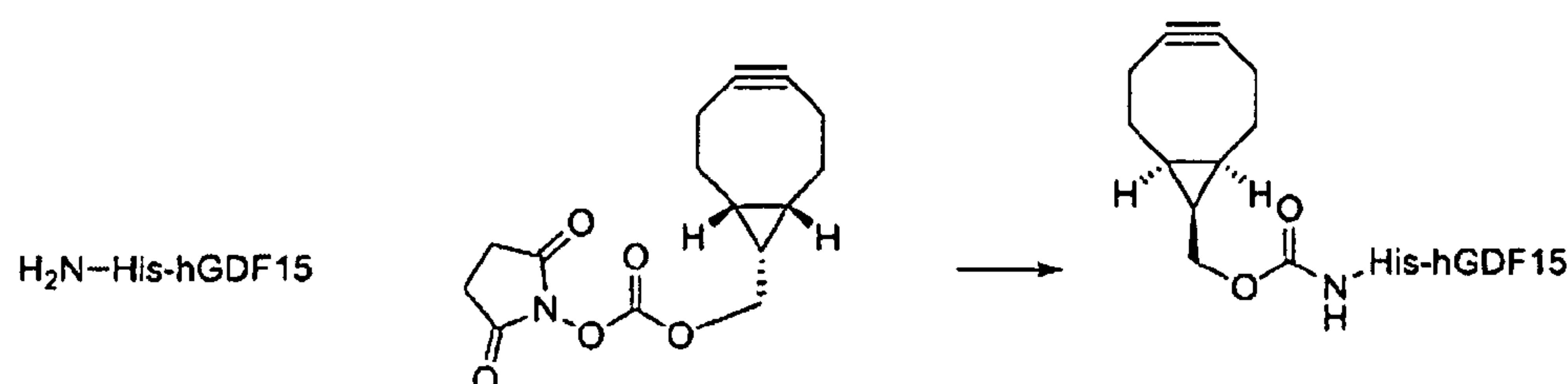
His-hGDF15 +1BCN (雙環[6.1.0]壬-4-炔基)對應GDF15同型二聚

體之一個分子上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 + 2BCN對應GDF15同型二聚體之兩個單體單元上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 + 3BCN對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

中間物60：His-dog-GDF15-BCN

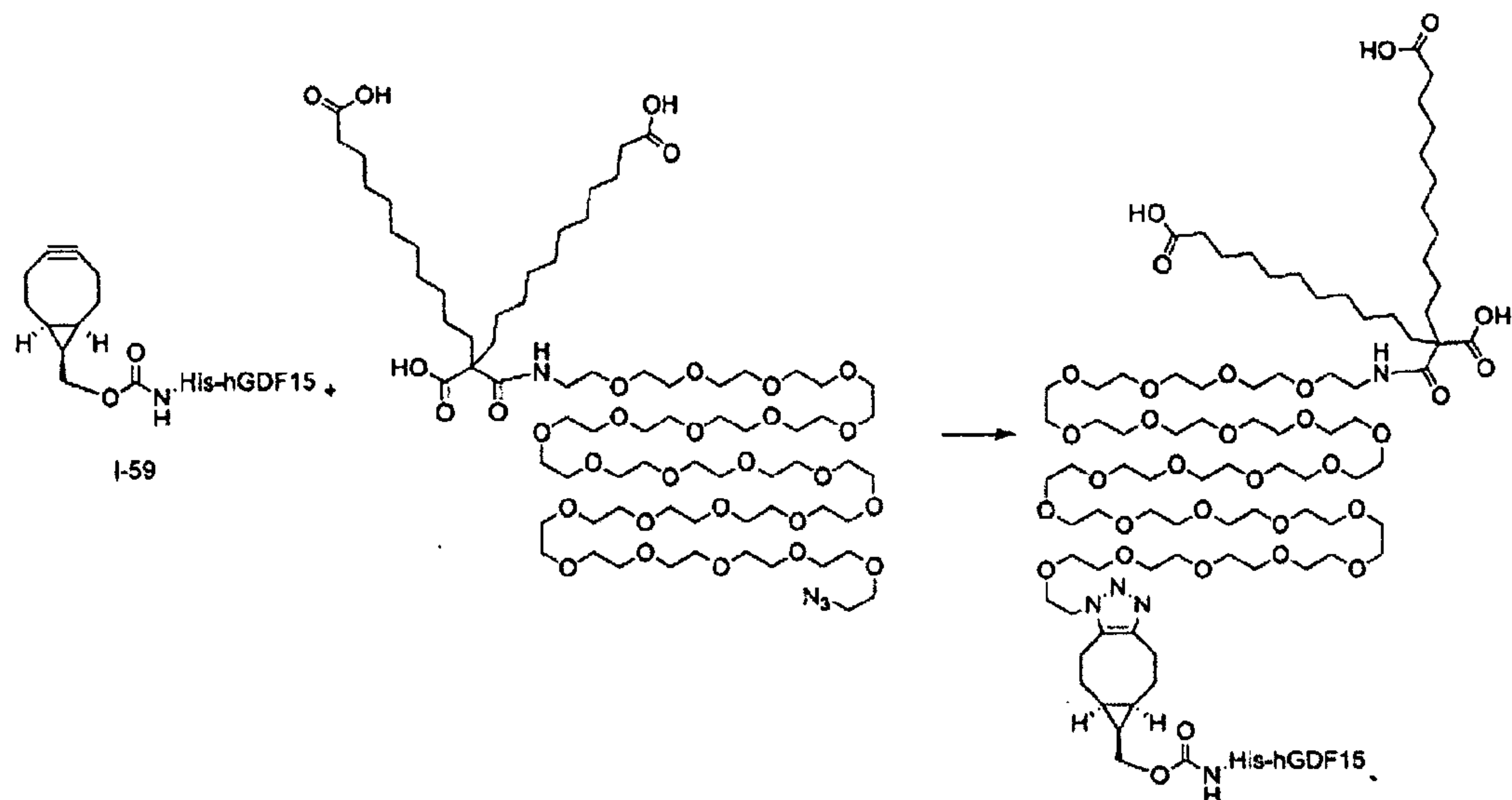


將100 uL His-dGDF15 (0.68 mg/mL)、100 uL pH 4.5緩衝液、4 uL 10 mg/mL BCN-NHS溶液合併在一起，並在室溫下培育兩天。用Amicon 10k清洗所得混合物4次，得到200 uL溶液，將其用於下一步驟中。該產物作為粗物質繼續進一步轉化為共軛物。

本發明實例：

His-hGDF15 + 脂肪酸-PEG-N₃點擊之一般程序。在30mM NaOAc pH 4.5緩衝液中將BCN標記之GDF15稀釋至0.5 mg/mL，同時製備FA-PEG-N₃ (脂肪酸-PEG23-疊氮化物)含於水之10 mg/mL溶液。向GDF15溶液添加10當量FA-PEG-N₃，並將該反應置於24℃振盪器板上過夜。藉由LCMS (QTOF法15-60kDa_15min_極性)監測反應進程，添加額外FA-PEG-N₃，若有必要至多50當量，直至觀察不到未反應之BCN標記之GDF15。然後用30 mM NaOAc pH 4緩衝液將反應稀釋5-10x，並用10 kDa MWCO超濾濾筒使該緩衝液與新鮮緩衝液交換(4個濃縮加稀釋循環)。將樣本濃縮至約1 mg/mL，由A₂₈₀測定，回收率量化為34%。藉由LCMS (QTOF方法15-60kDa_15min_極性)或Maldi分析最終共軛物。

實例1：共軛至中間物21之His-hGDF15 BCN (I-59)：



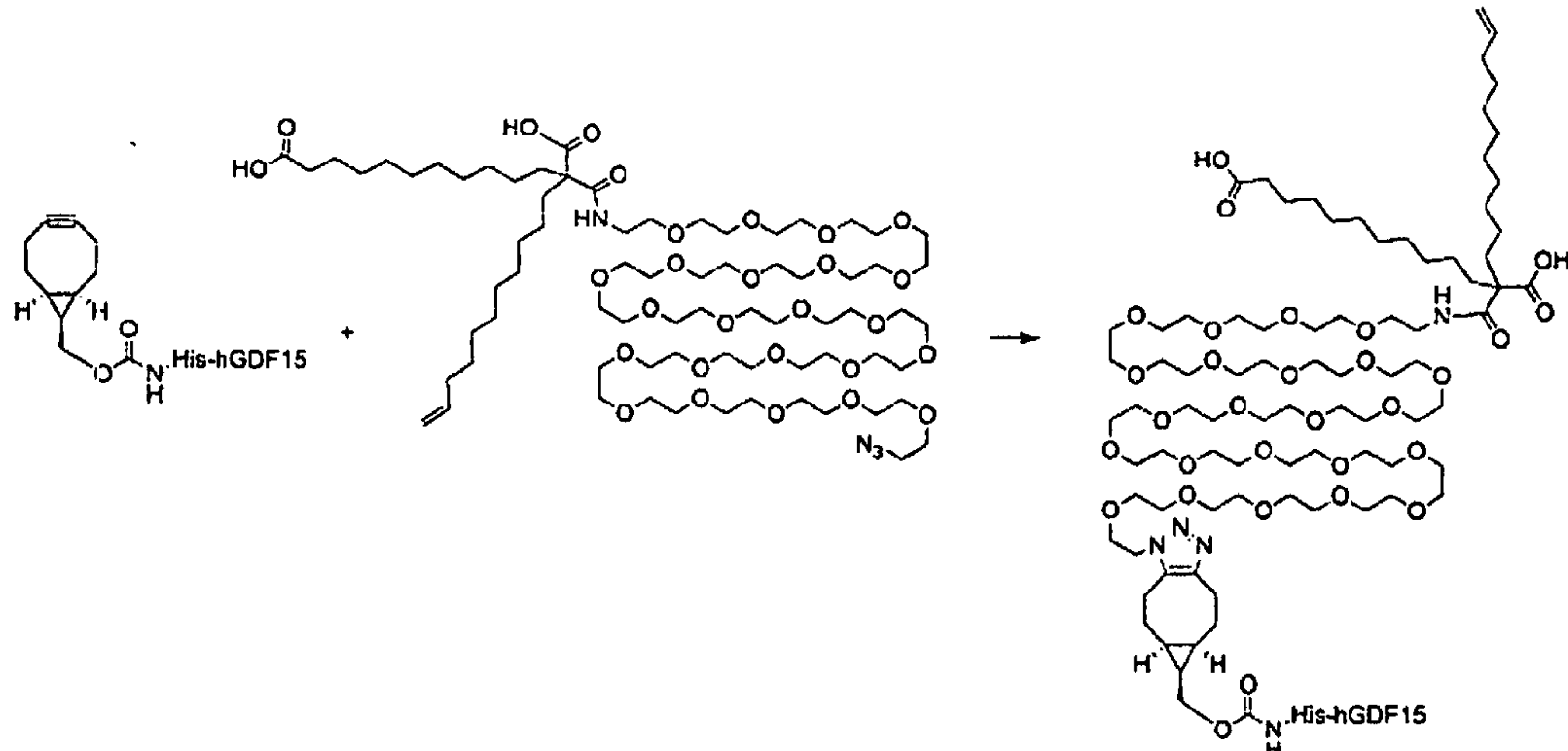
標記度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26468	26466	18
His-hGDF15 +1FA	28198	28192	36
His-hGDF15 +2FA	29928	29926	35
His-hGDF15 +3FA	31658	31654	11

His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子(一個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個單體單元上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +3FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

實例2：共軛至中間物44之His-hGDF15 BCN (I-59)：



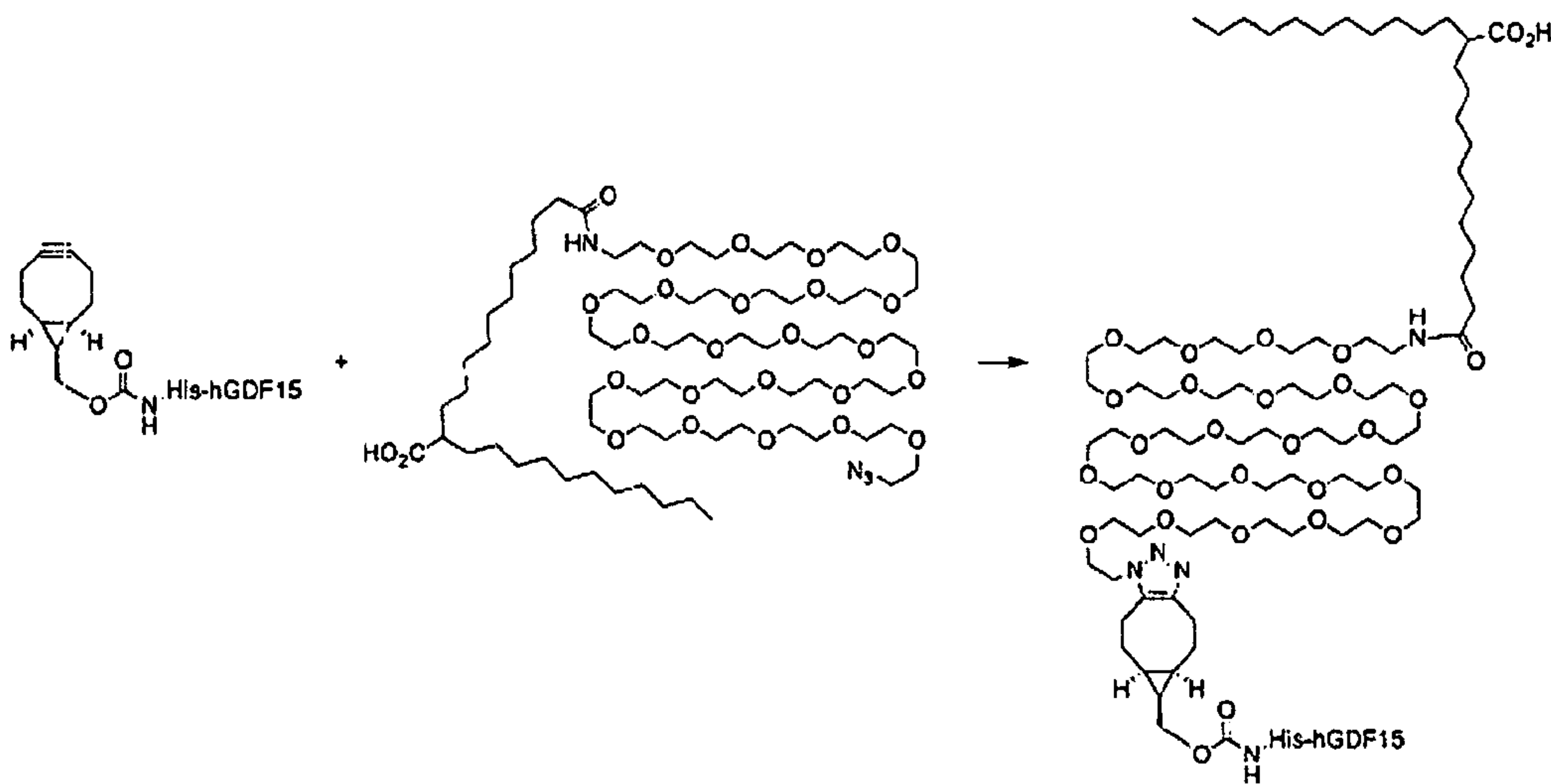
標記度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26464	26464	38
His-hGDF15 +1FA	28162	28162	33
His-hGDF15 +2FA	29860	29860	21
His-hGDF15 +3FA	31558	31558	9

His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子(一個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個單體單元上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +3FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

實例3：共軛至中間物29A之His-hGDF15 BCN (I-59)：



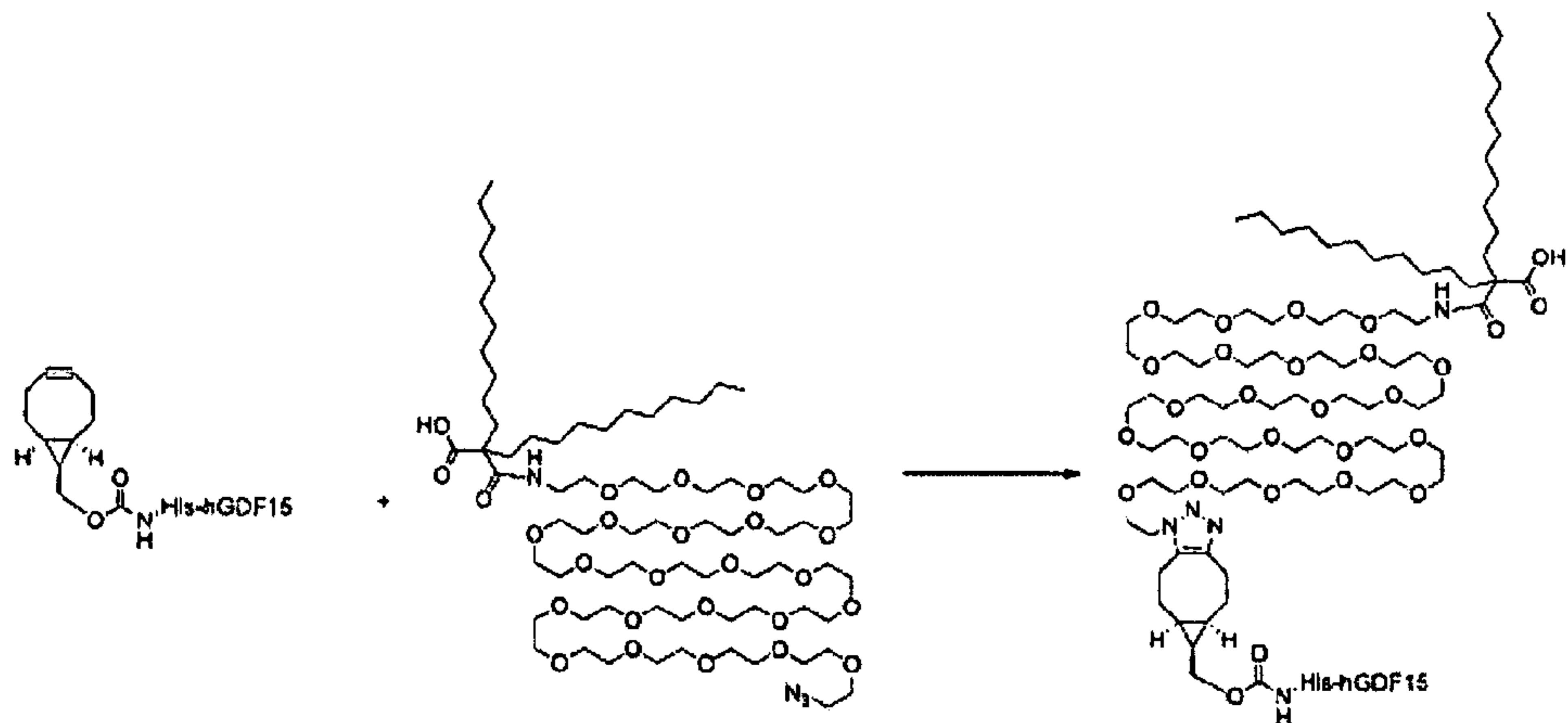
標記度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26464	26466	50
His-hGDF15 +1FA	28124	28120	28
His-hGDF15 +2FA	29780	29776	16
His-hGDF15 +3FA	31436	31432	7

His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子(一個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個單體單元上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +3FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

實例4：共軛至中間物24之His-hGDF15 BCN (中間物58)：



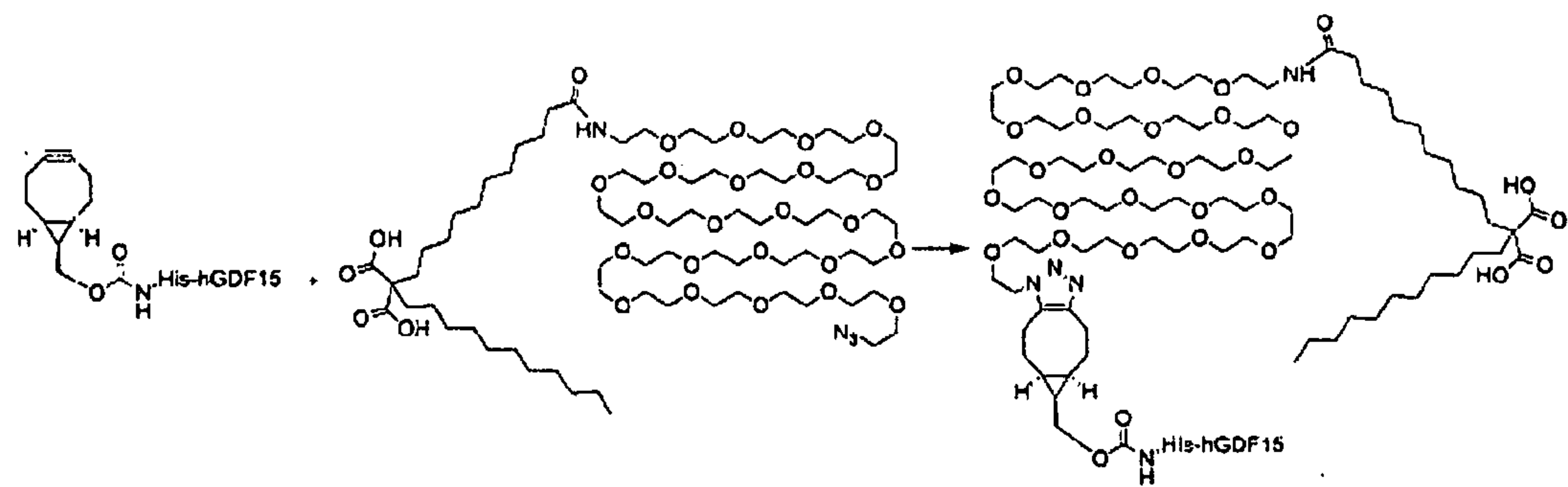
標記度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26726	26728	27
His-hGDF15 +1FA	28396	28398	42
His-hGDF15 +2FA	30066	30068	24
His-hGDF15 +3FA	31736	31738	7

His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子(一個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個單體單元上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +3FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

實例5：共軛至中間物29之His-hGDF15 BCN (I-58)：



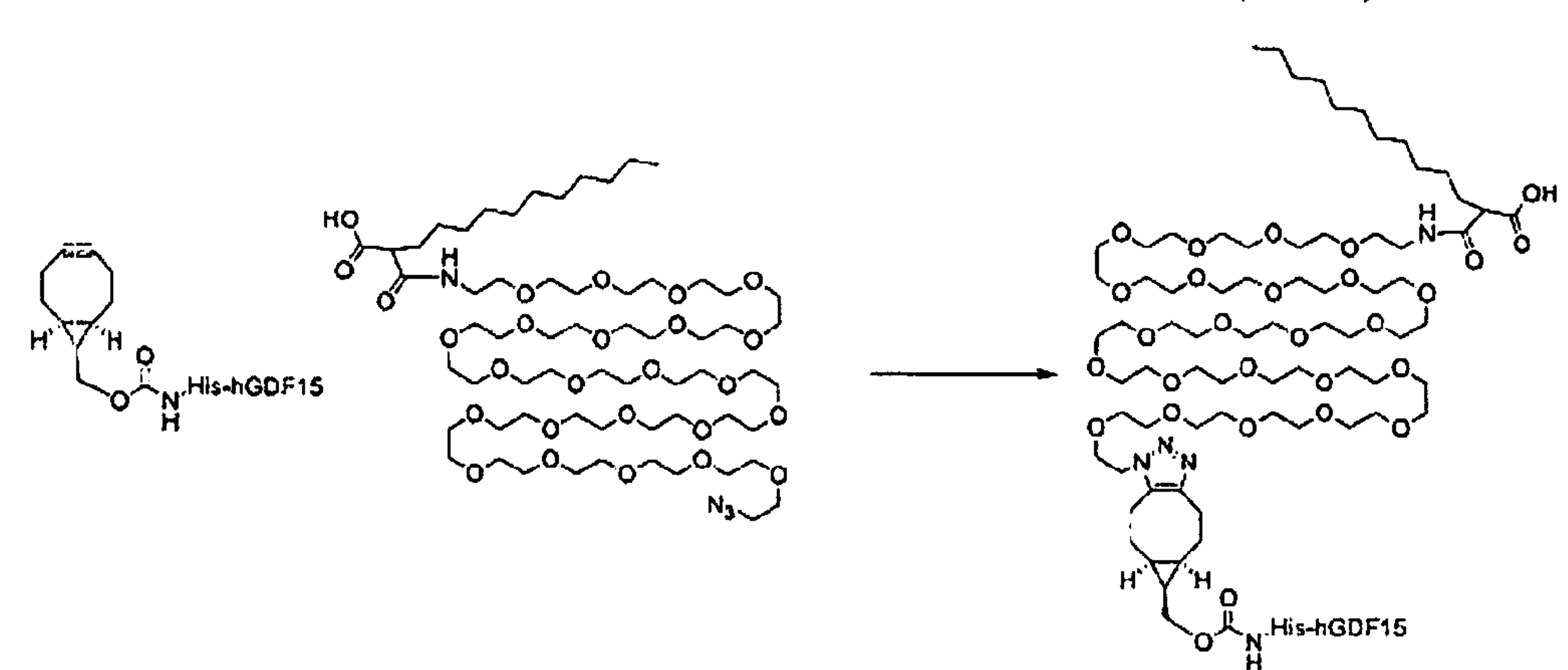
標記度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26726	26728	30
His-hGDF15 +1FA	28425	28426	36
His-hGDF15 +2FA	30125	30126	23
His-hGDF15 +3FA	31825	31740	12

His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個單體單元上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +3FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

實例6：共軛至中間物55之His-hGDF15 BCN (I-58)：



標記度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26726	26728	28

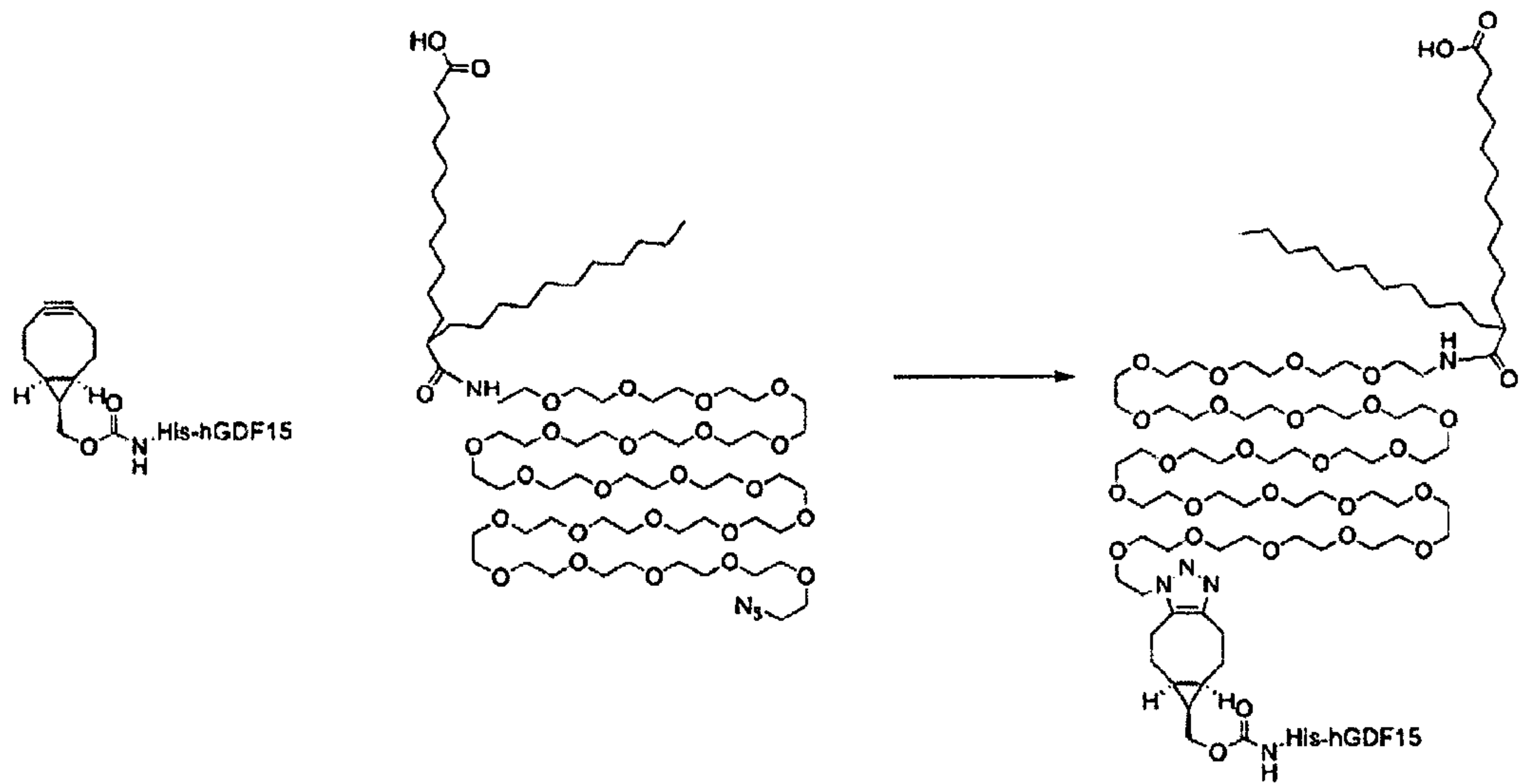
His-hGDF15 +1FA	28242	28243	36
His-hGDF15 +2FA	29758	29759	28
His-hGDF15 +3FA	31274	31275	11

His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個單體單元上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +3FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

實例7：共軛至中間物6A之His-hGDF15 BCN (I-58)：



標記度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26726	26728	28
His-hGDF15 +1FA	28382	28382	42
His-hGDF15 +2FA	30038	30040	29
His-hGDF15 +3FA	31916	n/a	n/a

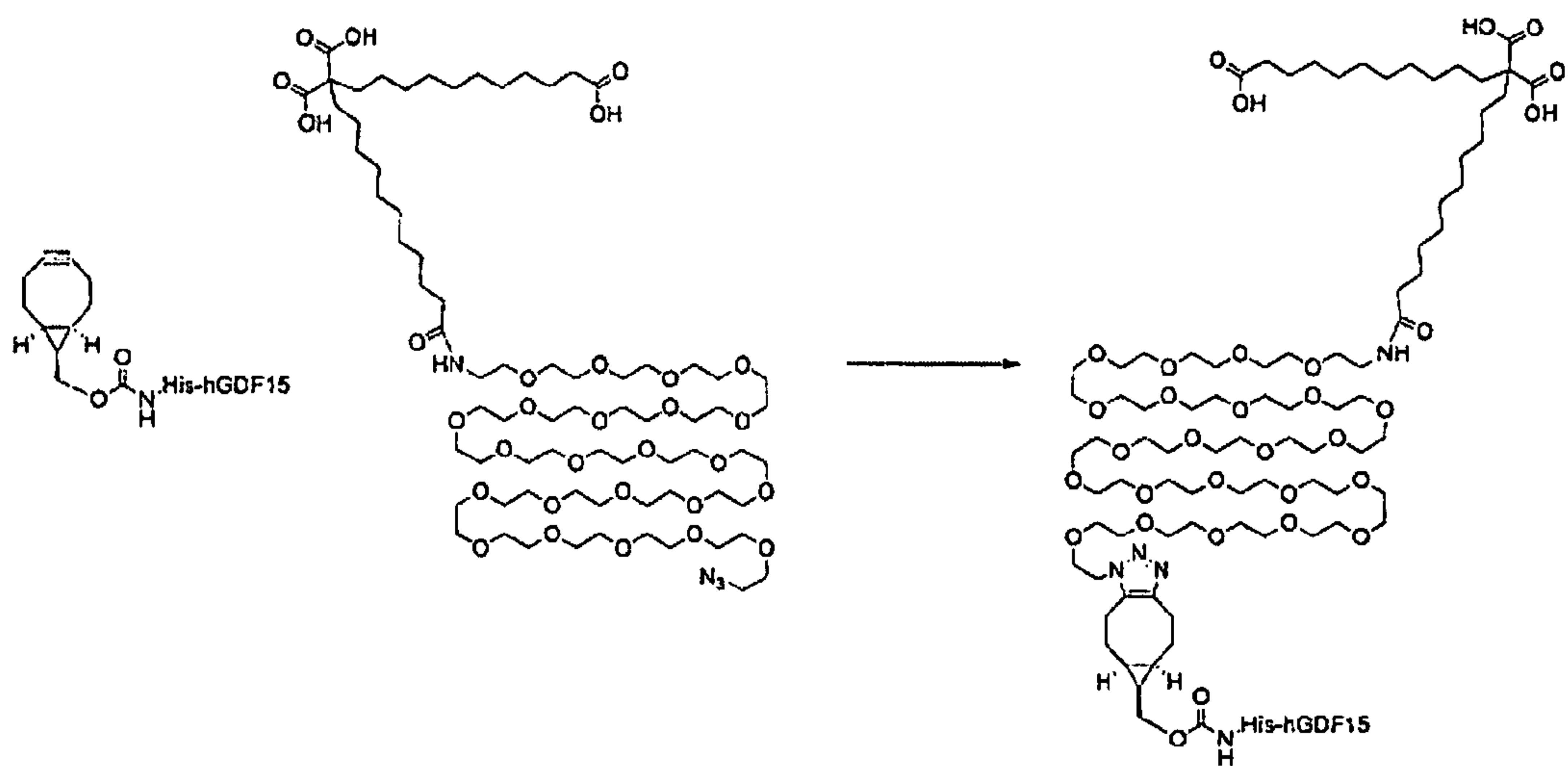
His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子(一個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個單體單元上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +3FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一些其他位

點處之非選擇性反應。

實例9：共軛至中間物30之His-hGDF15 BCN (I-58)：



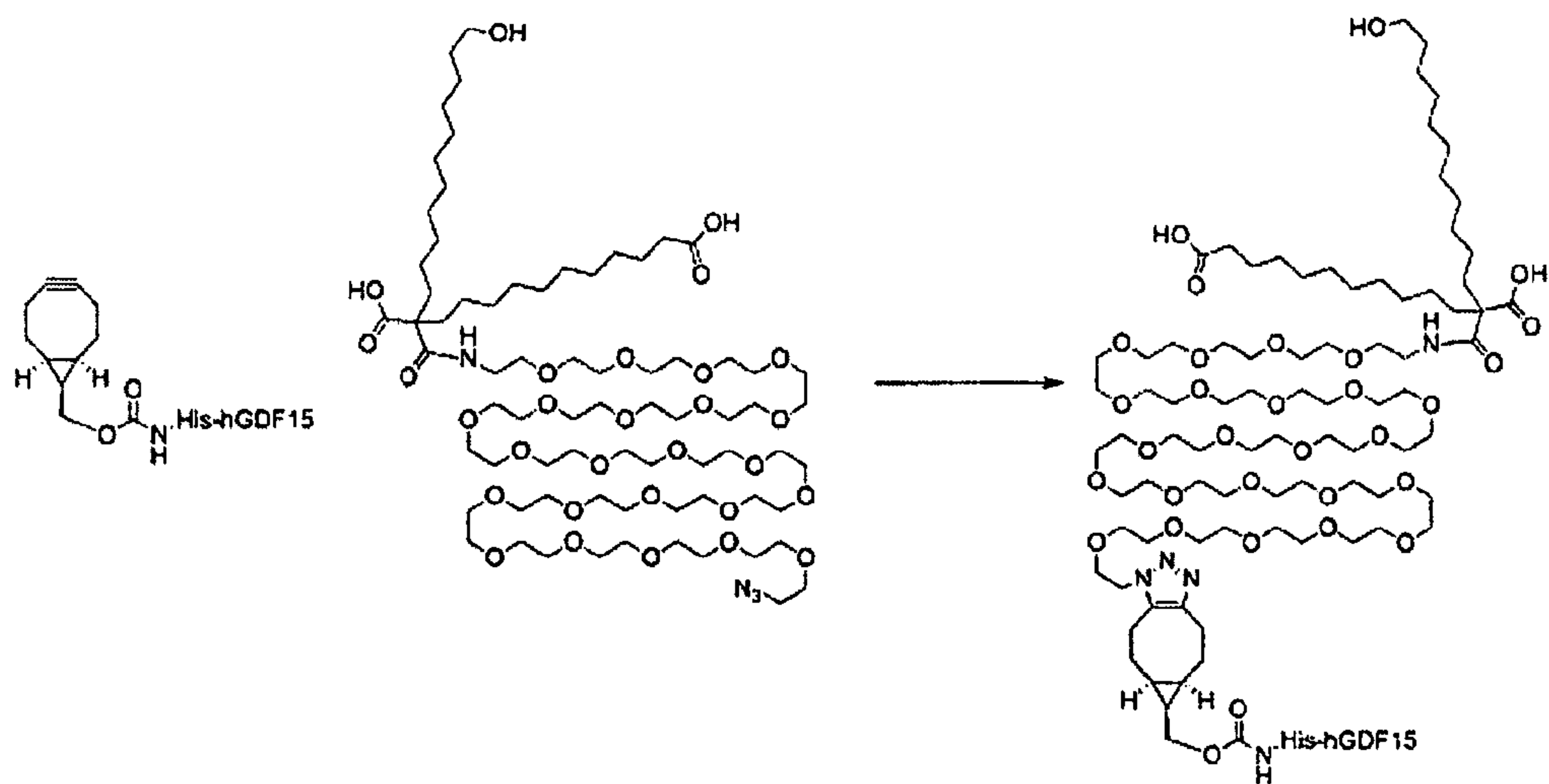
標記度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26726	26728	21
His-hGDF15 +1FA	28456	28456	47
His-hGDF15 +2FA	30186	30188	32
His-hGDF15 +3FA	31916	n/a	n/a

His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子(單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個分子(單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +3FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

實例10：共軛至中間物12之His-hGDF15 BCN (I-58)：



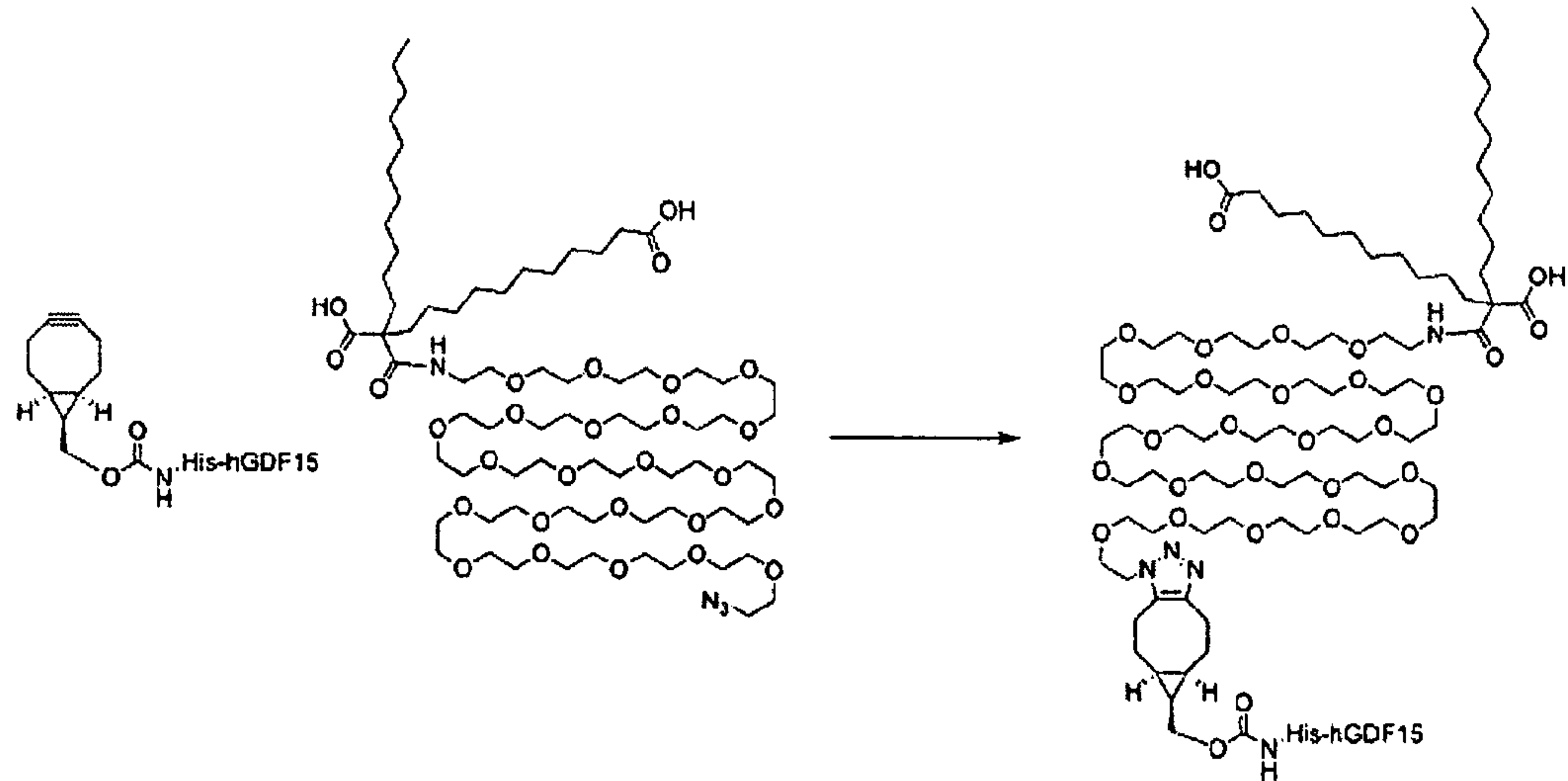
標記度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26726	26729	17
His-hGDF15 +1FA	28442	28445	37
His-hGDF15 +2FA	30158	30158	32
His-hGDF15 +3FA	31874	31877	13

His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子(一個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個分子(單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +3FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

實例13：共軛至中間物6之His-hGDF15 BCN (I-59)：



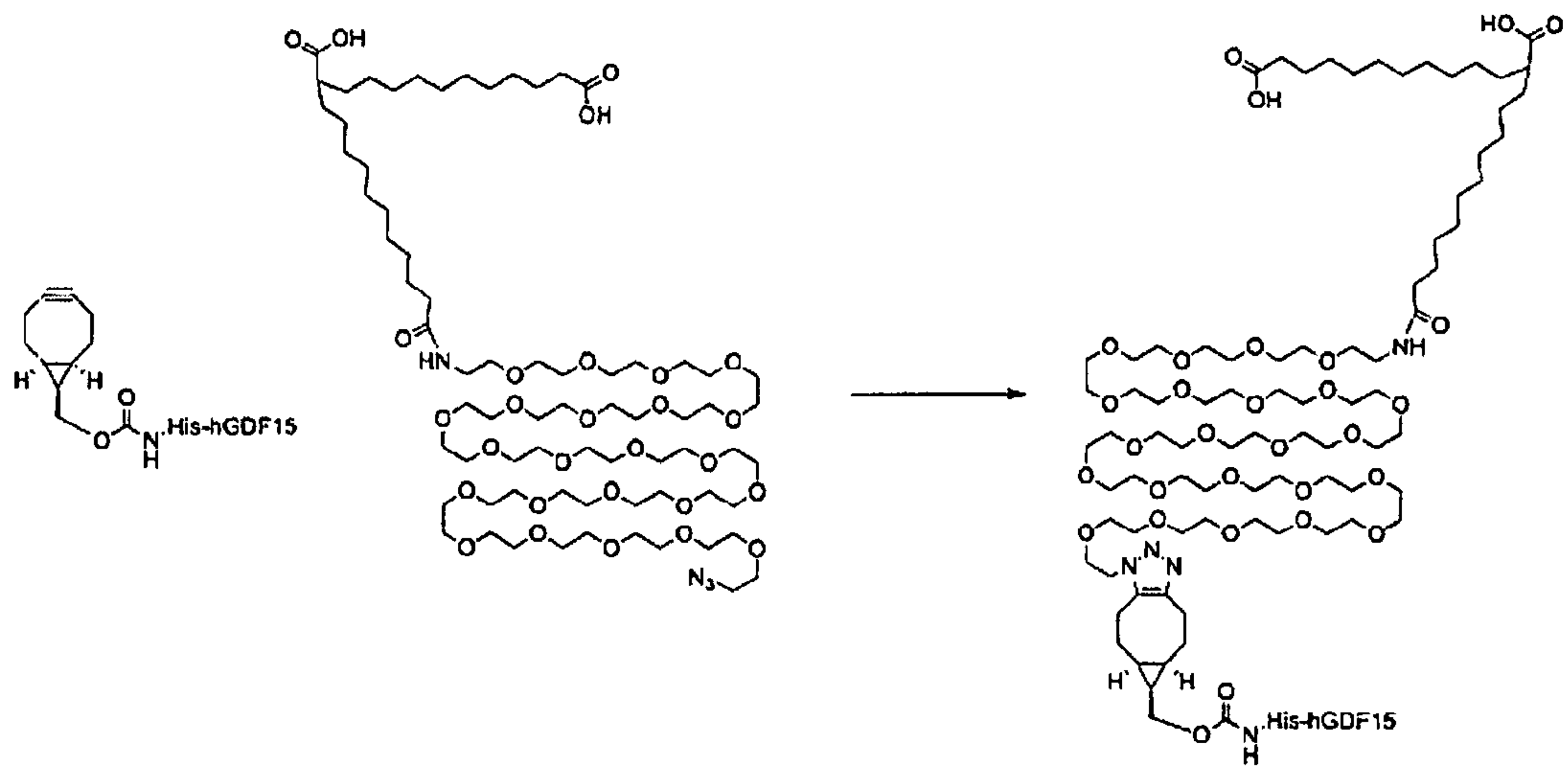
標記度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26468	26464	28
His-hGDF15 +1FA	28168	28164	42
His-hGDF15 +2FA	29868	29864	21
His-hGDF15 +3FA	31568	31564	10

His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子(一個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個分子(兩個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

● His-hGDF15 +3FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

實例14：共軛至中間物17之His-hGDF15 BCN (I-58)：



負荷度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26726	26728	18
His-hGDF15 +1FA	28413	28414	34
His-hGDF15 +2FA	30100	30054	35
His-hGDF15 +3FA	31787	31726	13

His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子(一個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

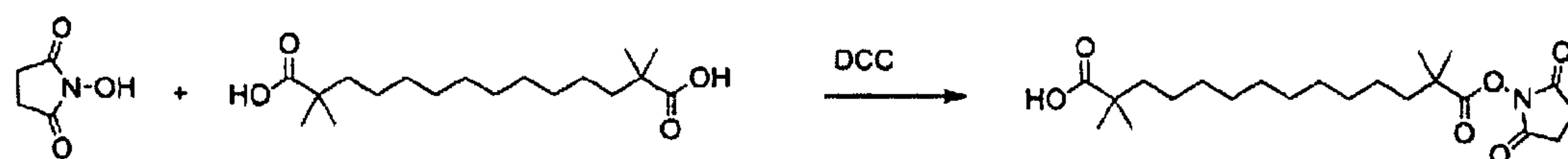
His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個分子(兩

個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

His-hGDF15 +3FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

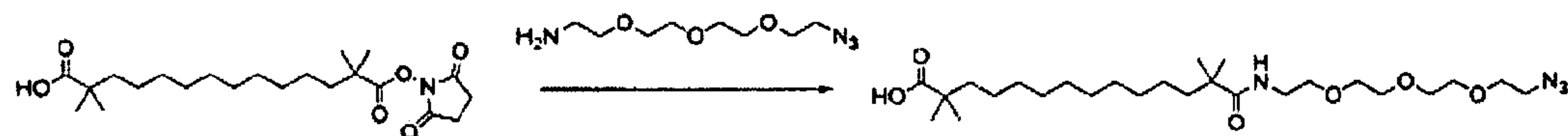
實例 15：

步驟 1：



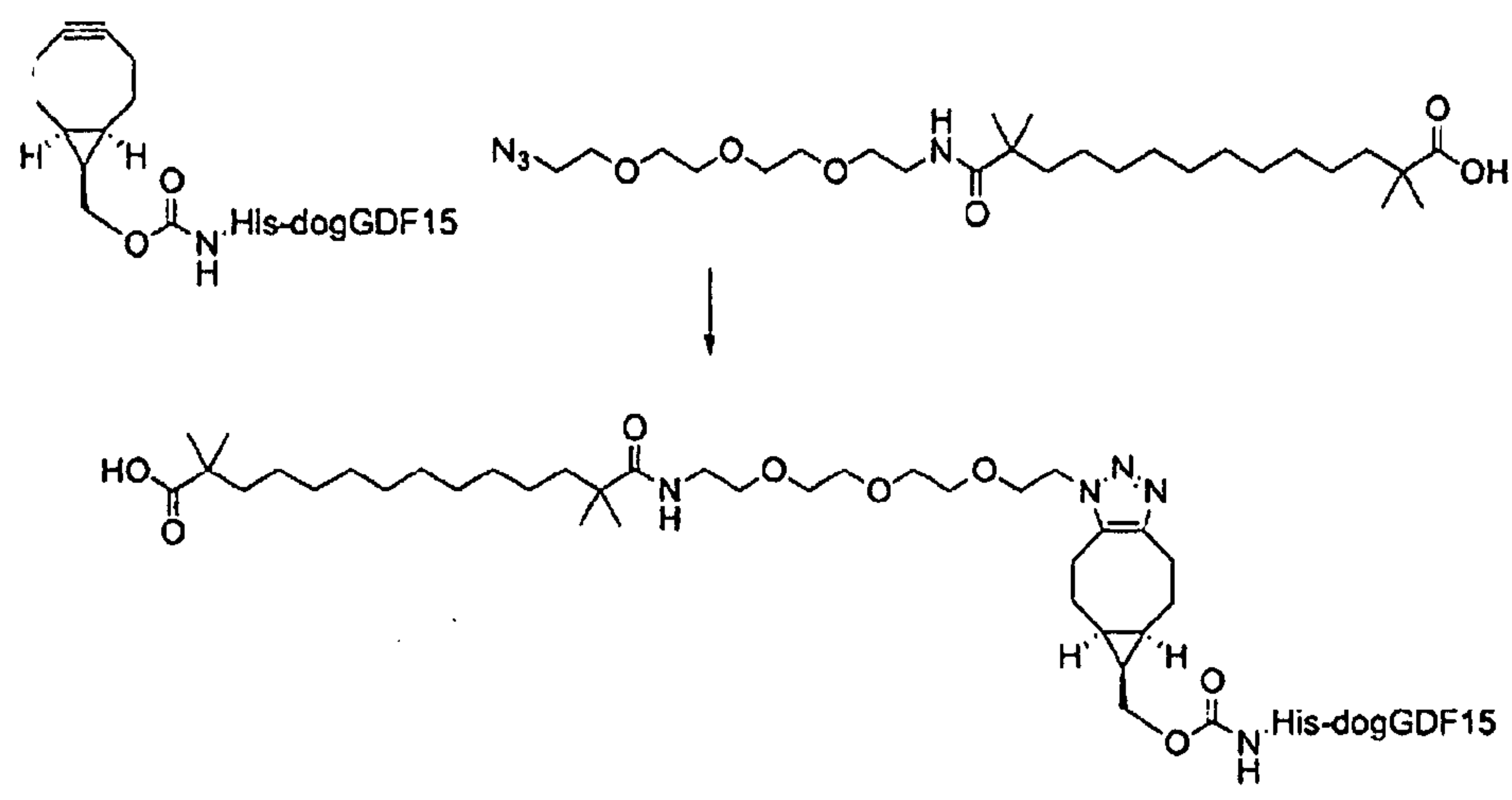
向2,2,13,13-四甲基十四烷二酸(Aldrich CPR, 訂單號PH002322) (100 mg, 0.318 mmol)及N-羥基琥珀醯亞胺(40.3 mg, 0.35 mmol)含於THF (5 ml)之溶液添加DCC (65.6 mg, 0.318 mmol)含於THF (5 ml)之溶液, 並在室溫下攪拌該混合物過夜。藉由LC-MS分析觀察到部分轉化為期望產物。過濾該混合物, 並濃縮濾液。再將殘餘物溶解於DCM (40 ml)中, 並用水清洗, 在Na₂SO₄上乾燥, 並藉由矽膠層析用庚烷/EtOAc/DCC (10:1:1)溶離純化得到混合物。藉由MS觸發酸HPLC [(55-80% ACN 3.5 min梯度)進一步純化混合物: rt= 2.48 min, 計算質量: 314.46觀測質量: 314.00], 得到清潔產物(50 mg, 38.2%產率), 並回收起始材料。

步驟 2：



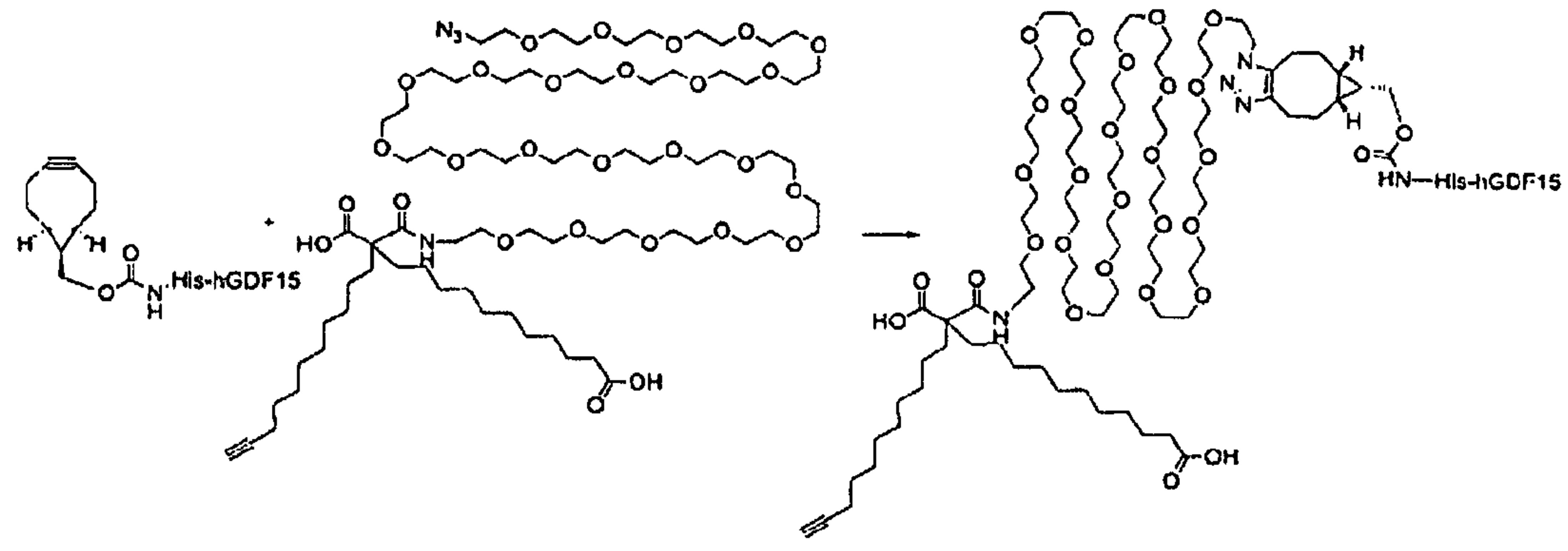
向NHS-2,2,13,13-四甲基十四烷二酸(10 mg, 0.024 mmol)含於DCM (3 mL)之溶液添加疊氮基-dPEG3-胺(10 mg, 0.049 mmol)及DIPEA (9 μ L, 0.049 mmol), 並在室溫下攪拌該混合物1 h。濃縮混合物, 再溶解於MeOH (3 mL)中, 並藉由MS-觸發之HPLC (55-80% ACN 3.5 min梯度rt=2.35, 預期質量: 514.70觀測質量: 514.40)純化, 得到7 mg清潔產物, 產率58%。

步驟3：



向100 μ L BCN-dGDF15 (I-60：0.68 mg/mL含於pH 4.5緩衝液)溶液添加pH 4.5緩衝液(100 μ L)及疊氮化物(6 μ L含於DMSO中，10 mg/mL)，並在室溫下培育該混合物過夜。藉由Amicon 10k清洗混合物4次。藉由MALDI分析所得溶液，指示主要共軛為+1及+2。Maldi：計算質量：26546觀測質量：26483；計算質量：27060觀測質量：27128；計算質量：27574觀測質量：27789。

實例16：共軛至中間物44之His-hGDF15 BCN (I-58)：

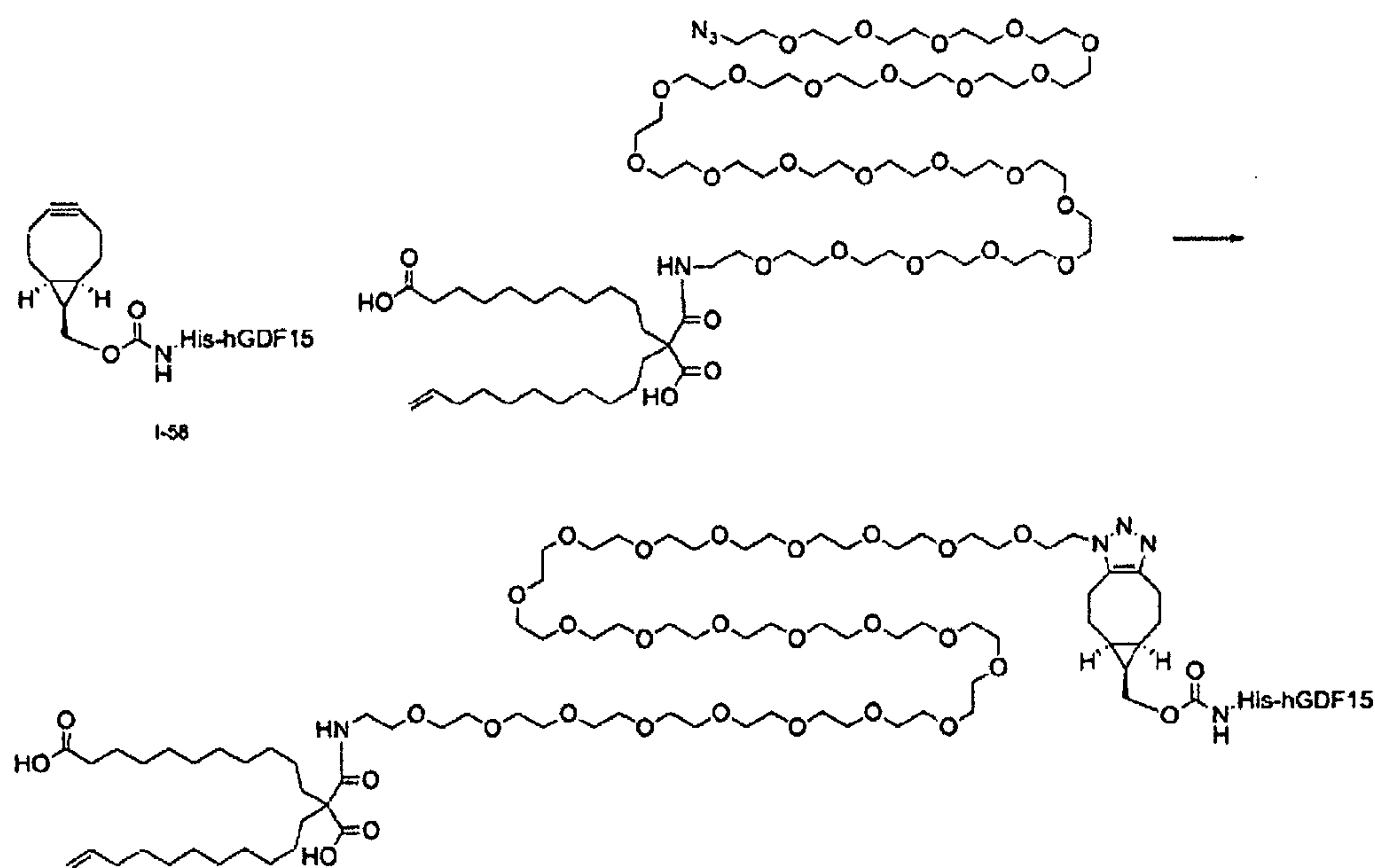


標記度	計算值	觀測值	280 nm下之% AUC
His-hGDF15	26726	26728	45
His-hGDF15-BCN	26902	26904	21
His-hGDF15 +1FA	28422	28360	25
His-hGDF15 +2FA	29868	30012	9

His-hGDF15 +1FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之一個分子(一個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

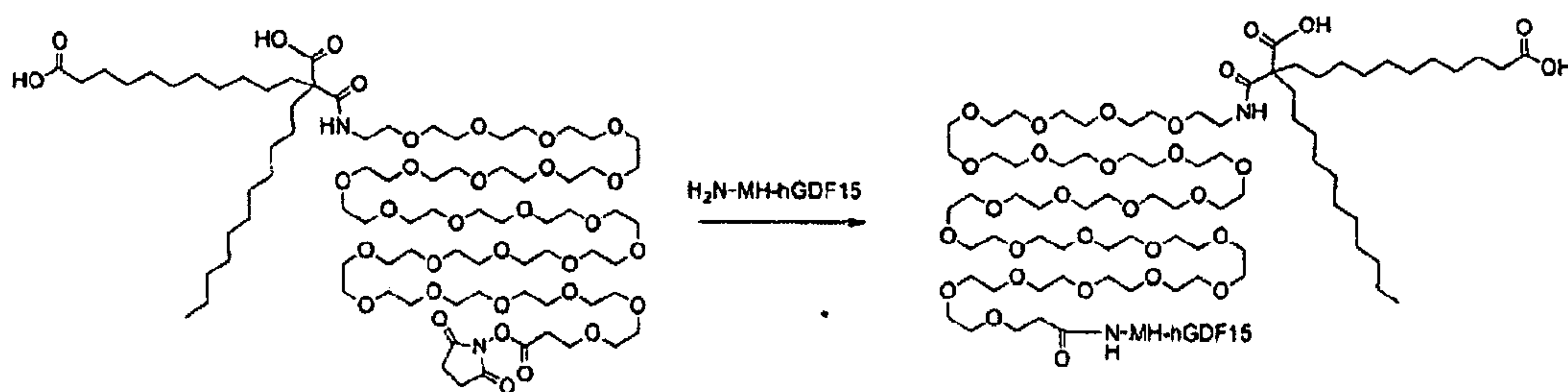
His-hGDF15 +2FA (脂肪酸)對應GDF15同型二聚體之兩個分子(兩個單體單元)上之N端胺基官能性處之反應。

實例17：共軛至中間物52之His-hGDF15-BCN



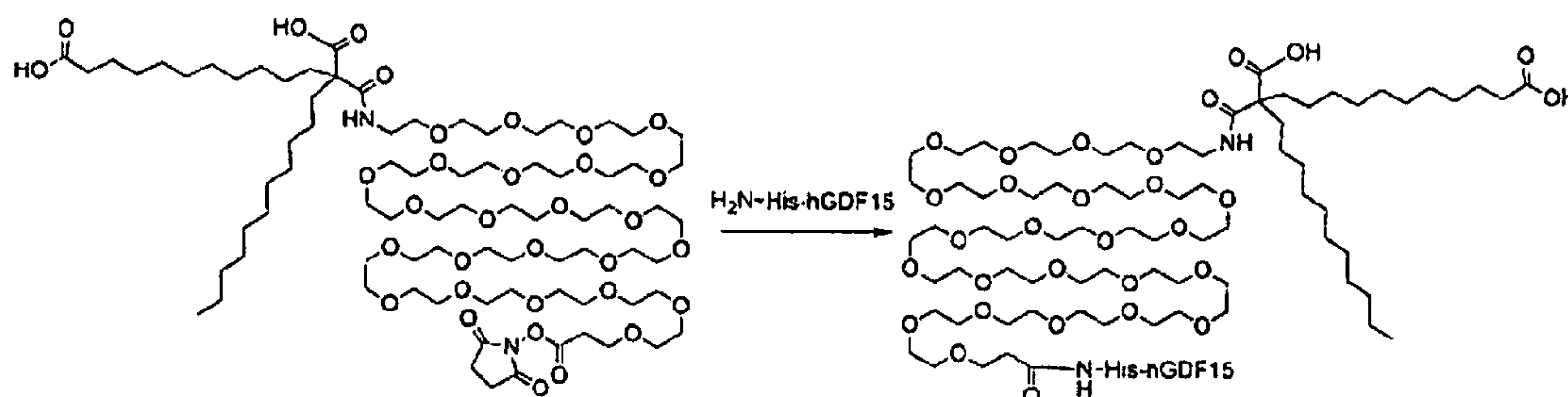
向3 ml環辛炔GDF15 (I-58：0.46 mg/mL，0.051 umol)含於7 ml pH 4 乙酸鈉緩衝液之溶液添加脂肪酸peg疊氮化物(15 uL含於35 mg/mL DMSO，0.36 umol)，並在室溫下培育該混合物過夜。藉由MALDI分析觀察到完全轉化。藉由amicon過濾10kD清洗三次純化產物，得到4.3 ml 0.29 mg/ml期望產物，產率90%。Maldi：環辛炔sm約5% 預期質量：26902觀測質量：26997；+1脂肪酸約40% 預期質量：28421觀測質量：28525；+2脂肪酸約50% 預期質量：29940觀測質量：30191；+3脂肪酸5% 預期質量：31459觀測質量：31874。

實例18：共軛至中間物37之MH-(199-308)GDF15 (I-54)



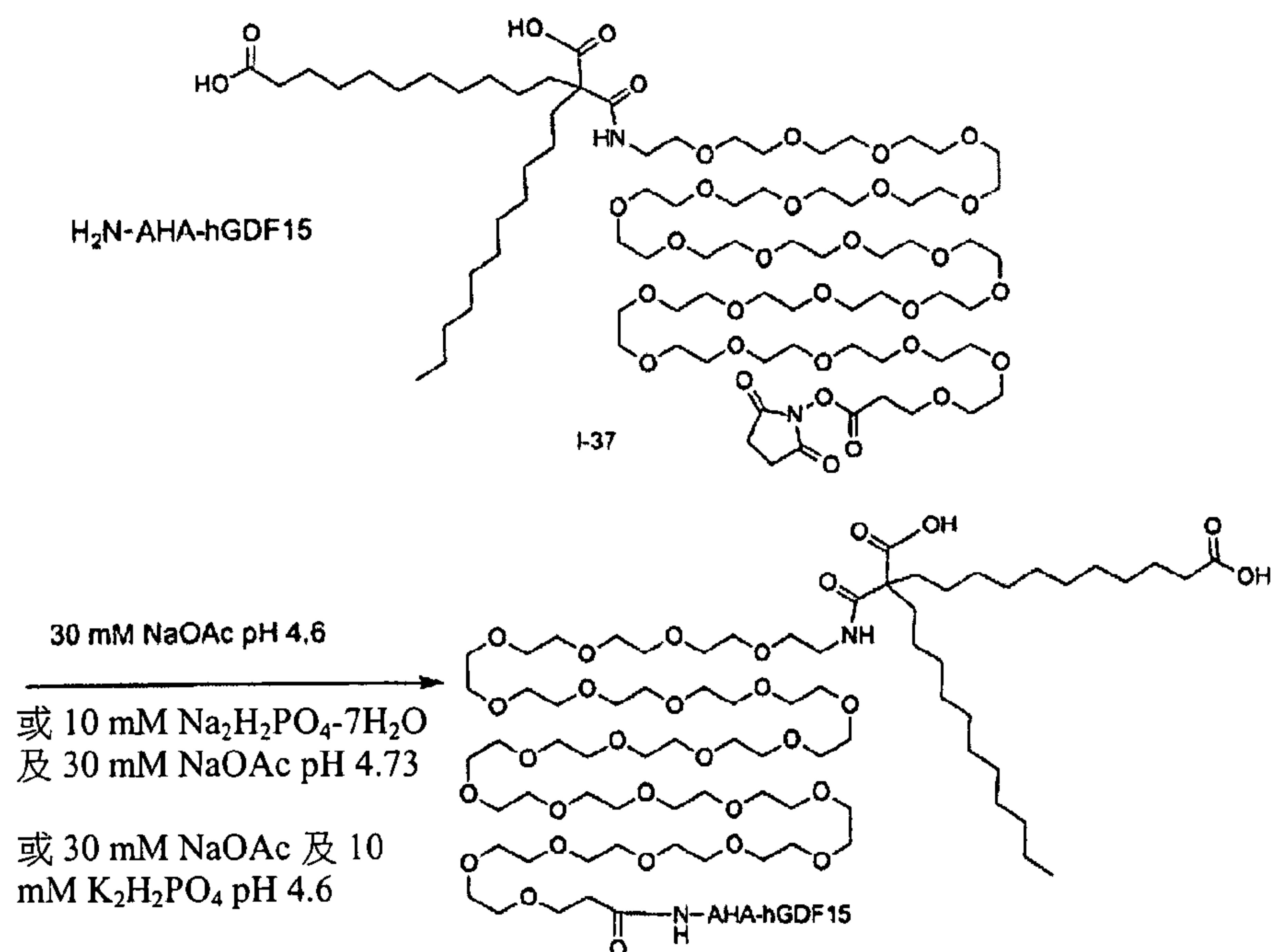
將MH-(199-308)-GDF15 (中間物54：0.393 ml，0.028 μmol ，1.78 mg/mL)添加至1.5 ml 30 mM乙酸鈉緩衝液，向溶液添加NHS脂肪酸(474 μg ，0.284 μmol ，10 mg/mL)。5小時後，根據MALDI，反應完全。藉由用amicon超濾10kD清洗5次純化產物，得到575 μg 共軛物，產率73%。MALDI：sm (18%)，預期質量：24638觀測質量：24735；+1脂肪酸(38%) 預期質量：26192觀測質量：26268；+2脂肪酸(40%) 預期質量：27746觀測質量：27798；+3脂肪酸(4%) 預期質量：29300觀測質量：29333。

實例19A：共軛至中間物37之His-hGDF15 (I-59)



將His-GDF15 (0.493 ml，0.026 μmol ，1.42 mg/mL)添加至1.5 ml 30 mM乙酸鈉pH=4緩衝液，向溶液添加nhs脂肪酸(0.221 mg，0.132 μmol ，10 mg/mL)。過夜，反應未完全，所以再添加2.5當量脂肪酸NHS (0.110 mg，0.066 μmol ，10 mg/mL)，並在5 hr後，Maldi顯示+2共軛物作為主要產物。藉由用amicon超濾10kD清洗5次純化產物，得到565 μg 共軛物，產率76%。MALDI：sm (18%)，預期質量：26468觀測質量：26553；+1脂肪酸(38%)預期質量：28022觀測質量：28099；+2脂肪酸(40%)預期質量：29576觀測質量：29649；+3脂肪酸(4%)預期質量：31130觀測質量：31201。

實例19B：共軛至中間物37之AHA-hGDF15



製備中間物37含於分子生物級水之10 mg/mL溶液。向AHA-hGDF15 (中間物57, 6.67 mg/mL含於30 mM NaOAc pH 4.0, 5.247 mL, 1.433 μmol)添加30 mM NaOAc pH 4.6 (可接受範圍4.5-5.0), 得到0.88 mg/mL之最終蛋白濃度。添加中間物37 (10 eq., 2.39 mL, 0.014 mmol), 並在室溫下混合該反應18小時。在反應小瓶中形成沉澱物。將反應混合物分在4x15 mL 10kDa Amicon離心過濾池中, 各自用30 mM NaOAc pH 4.0稀釋至15 mL。該材料經緩衝液交換4x進入30 mM NaOAc pH 4.0, 並將樣本合併得到25.6 mL體積, 在清洗間隔, 在過濾池中用移液管管嘴攪動沉澱物。沉澱物留在溶液中, 所以使混合物在4°C下靜置過夜。藉由A280 ($30040 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 27538 g/mol)測得濃度為1.62 mg/mL (100%)。UPLC分析顯示+1FA(滯留時間: 4.88 min)及+2FA產物(滯留時間: 5.80 min)之回收率為60%(方法J)。LCMS方法T顯示期望質量。

在活體內測試實例19B之粗製混合物(下表中呈現比例), 並匯報在表1中:

種類	計算值	觀測值 LCMS方法T	觀測% UPLC方法J	滯留時間 (min) UPLC方法J
AHA-GDF15	24430	24432	29	3.24
AHA-GDF15 +1 FA	25984	25985	27	4.88
AHA-GDF15 +2 FA	27538	27540	33	5.80
AHA-GDF15 +3 FA	29092	29091	11	6.66

AHA-hGDF15 +1FA(脂肪酸)對應 GDF15 同型二聚體(如實施例 11B 中所表示，式 H)中之一條多肽鏈(在單體單元上)上之 N 端胺基官能性處之反應。

AHA-hGDF15 +2FA(脂肪酸)對應 GDF15 同型二聚體(如實施例 11B 中所表示，式 G)之兩條多肽鏈上之 N 端胺基官能性處之反應。

AHA-hGDF15 +3FA(脂肪酸)對應 GDF15 同型二聚體之一些其他位點處之非選擇性反應。

純化：

藉由逆相層析(緩衝液 A 0.1% TFA 含於水；緩衝液 B 0.1M TFA 含於 ACN 梯度；99%-80%緩衝液 A)在 Waters BEH300(130Å，3.5 μm，4.6 mm X 100 mm，流速 2.5 ml/min)上純化粗製產物。

溶離份 1：未反應之 AHA-hGDF15：Rt=17.33 min

溶離份 2：(19B1)：AHA-GDF15 +1FA：Rt=20.2 min (約 15%產率) (式 H)

溶離份 3：(19B2)：AHA-GDF15 + 2FA：Rt=21.6 min (約 15%產率) (式 G)

溶離份 4：(19B3)：AHA-GDF15 + 3 FA：Rt=23.0 min (約 5%產率)

製備 19B1 及 19B2 之比例為 1:1 之混合物並測試(19Bm)。

或者，可在 10 mM Na₂HPO₄-7H₂O 及 30 mM NaOAc 中於 4.73 之 pH

下進行反應：製備中間物37含於分子生物級水之10 mg/mL溶液。向AHA-hGDF15 (中間物57，12.04 mg/mL含於30 mM NaOAc pH 4.0，4.15 μL，0.002 μmol)添加30 mM NaOAc 10 mM Na₂HPO₄·7H₂O pH 4.73，得到0.88 mg/mL之最終蛋白濃度。添加中間物37 (20 eq.，6.83 μL，0.041 μmol)，並在室溫下混合該反應18小時。反應混合物變得混濁，具有沉澱物。UPLC分析顯示58% +1及+2產物(方法J)。

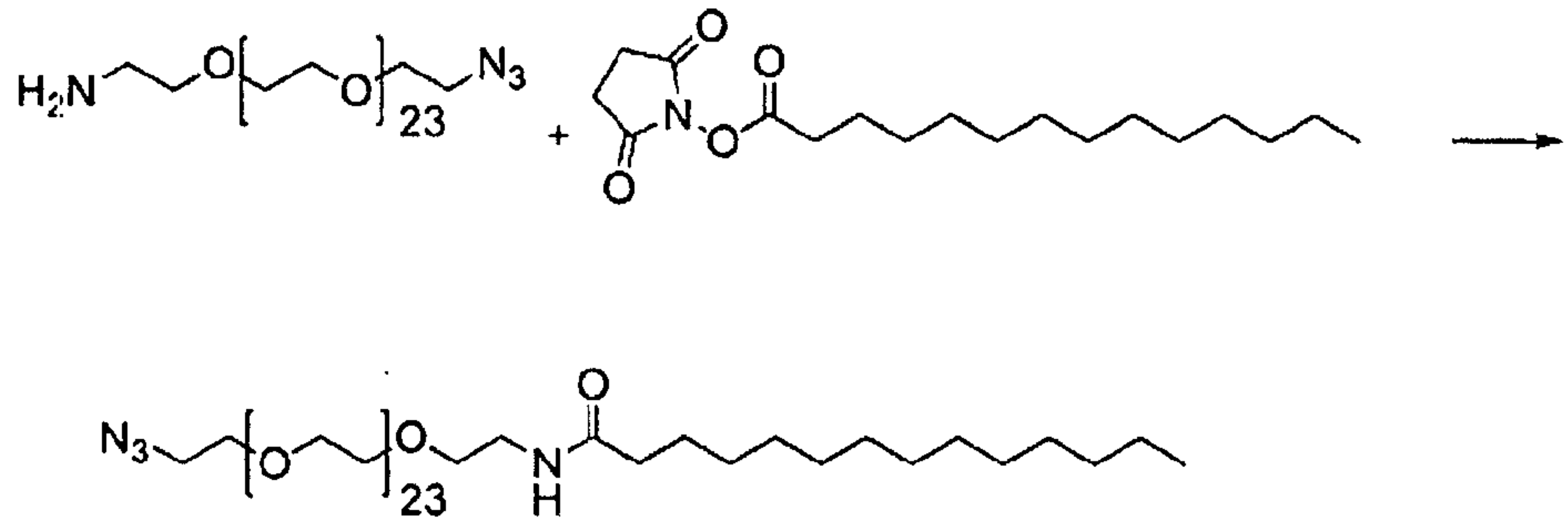
種類	計算值	觀測%
AHA-GDF15	24430	0
AHA-GDF15 +1 FA	25984	11
AHA-GDF15 +2 FA	27538	47
AHA-GDF15 +3 FA	29092	34
AHA-GDF15 +4 FA	30646	7

該反應亦可在30 mM NaOAc及10 mM K₂HPO₄中於4.6之pH下進行：製備中間物37含於分子生物級水之10 mg/mL溶液。向AHA-hGDF15 (中間物57，6.21 mg/mL含於30 mM NaOAc pH 4.0，5.261 mL，1.337 μmol)添加30 mM NaOAc 10 mM K₂HPO₄ pH 4.6 (可接受範圍4.5-5.0)，得到0.88 mg/mL之最終蛋白濃度。添加中間物37 (10 eq.，68.3 μL，0.409 μmol)，並在室溫下混合該反應7小時。反應混合物變得混濁，具有沉澱物。將反應混合物分成4個9 mL部分，分在15 ml 10kDa Amicon離心過濾器中，並用30 mM NaOAc pH 4.0稀釋至15 ml。該材料經緩衝液交換4x進入30 mM NaOAc pH 4.0，在各次清洗間隔用移液管管嘴攪動沉澱物。將反應混合物濃縮至75 ml體積。留下沉澱物，所以材料在4℃下儲存兩天。藉由A₂₈₀ (30040 cm⁻¹M⁻¹，27538 g/mol)測得濃度為0.4 mg/mL (97%)。UPLC分析顯示+1及+2產物之回收率為61%(方法J)。

種類	計算值	觀測值	觀測%
		LCMS方法T	UPLC方法J
AHA-GDF15	24430	24434	34
AHA-GDF15 +1 FA	25984	25987	34
AHA-GDF15 +2 FA	27538	27540	27
AHA-GDF15 +3 FA	29092	n/a	5

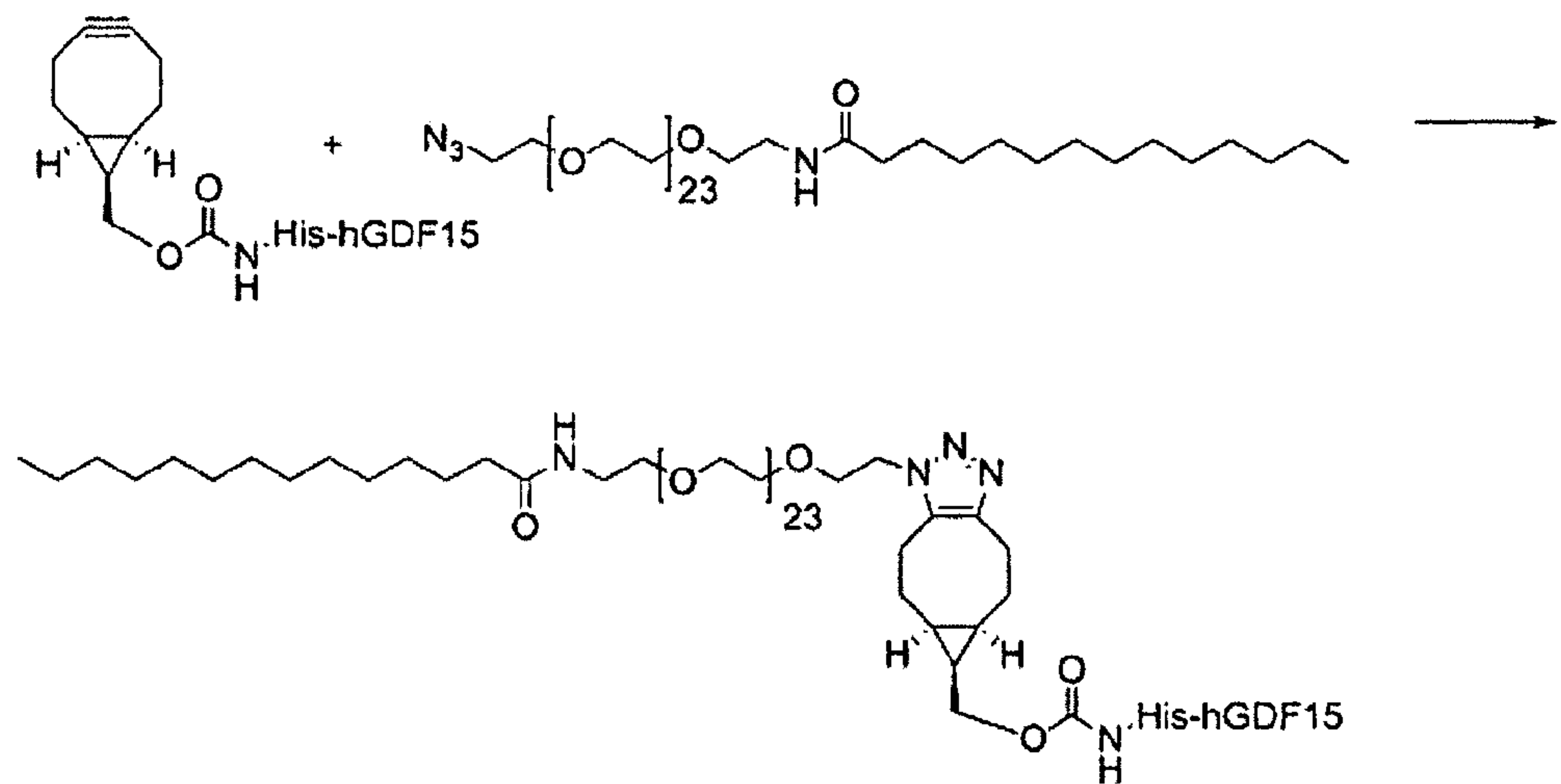
參考實例1：共軛至中間物PEG-肉豆蔻酸構築體之His-hGDF15
BCN (I-58)：

步驟1：



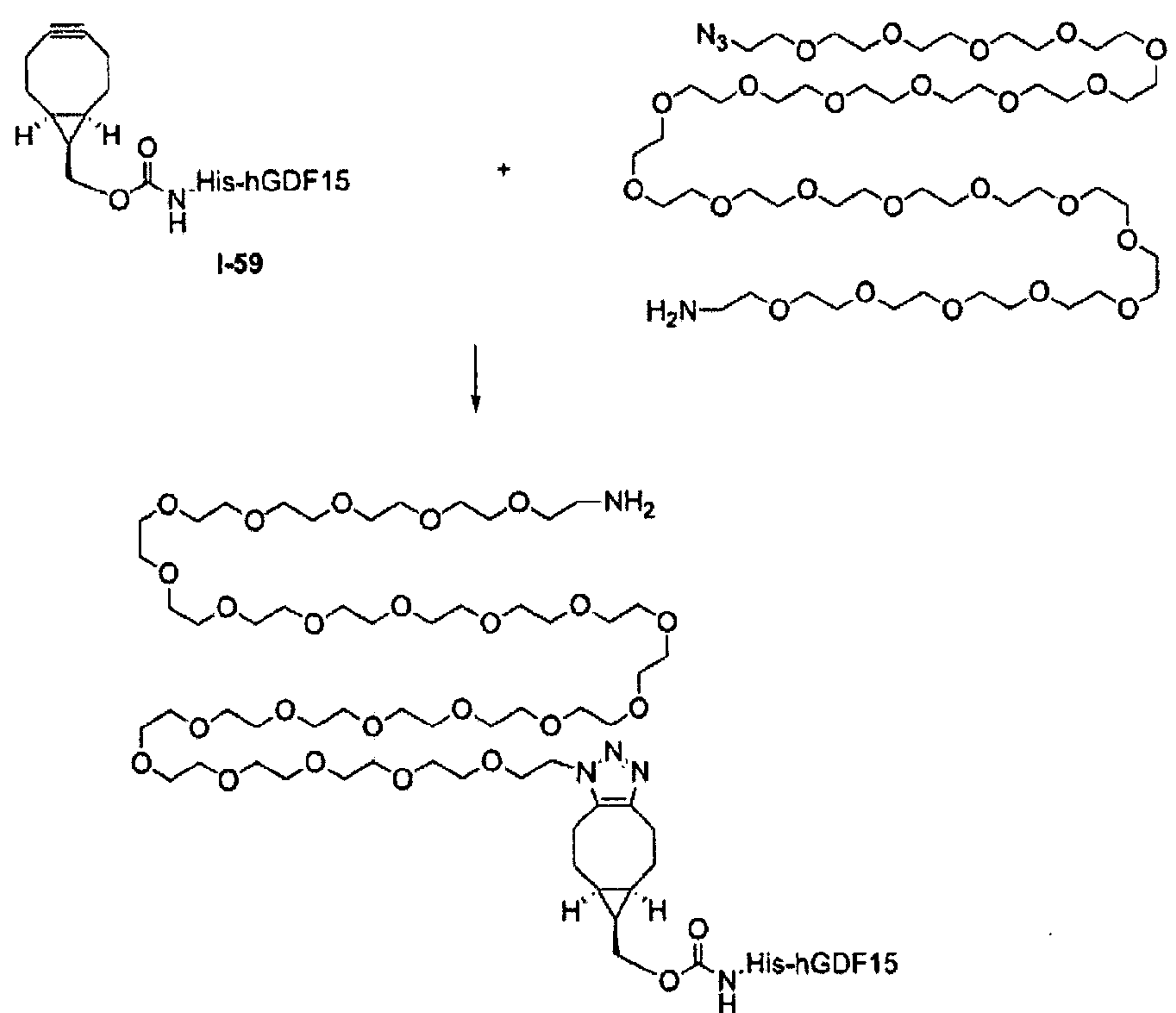
向疊氮基-PEG23-胺 (30 mg，0.027 mmol) 及肉豆蔻 NHS 酯 (Toronto Research Chemicals, cat # S69080) (12 mg，0.037 mmol) 之混合物添加 DCM (1 mL) 及 DIPEA (13 uL)，並在室溫下攪拌該混合物過夜。藉由矽膠層析，先後用 EtOAc/庚烷 (0-100%) 及 MeOH/DCM (0-10%) 溶離純化混合物，在 5% MeOH/DCM 左右得到清潔產物。
LCMS：(梯度：在 1.4 min 內自 40 至 98% B-流速 1 mL/min，溶離液 A：水 + 0.05% 甲酸 + 3.75 mM 乙酸銨，溶離液 B：乙腈 + 0.04% 甲酸)
LCMS：rt=2.20 (方法 C) 質量+H 計算值：1354.71 觀測質量：1354.4。

步驟2：



向 BCN-hGDF15 (I-52 : 800 uL , 0.25 mg/mL) 之溶液添加 (2 mg/mL於DMSO中 , 6.3 uL , 10 eq) , 並在室溫下攪拌該混合物過夜。
定量產率 : 1.1 mL 0.20 mg/mL 。 (Maldi : +1計算質量 : 28223觀測質量 : 28640 ; +2計算質量 : 29543 ; 觀測質量 : 29962 , +3計算質量 : 30863 ; 觀測質量 : 31426 , +4計算質量 : 32183觀測質量 : 32911) 。

參考實例2 : his-hGDF15-PEG23



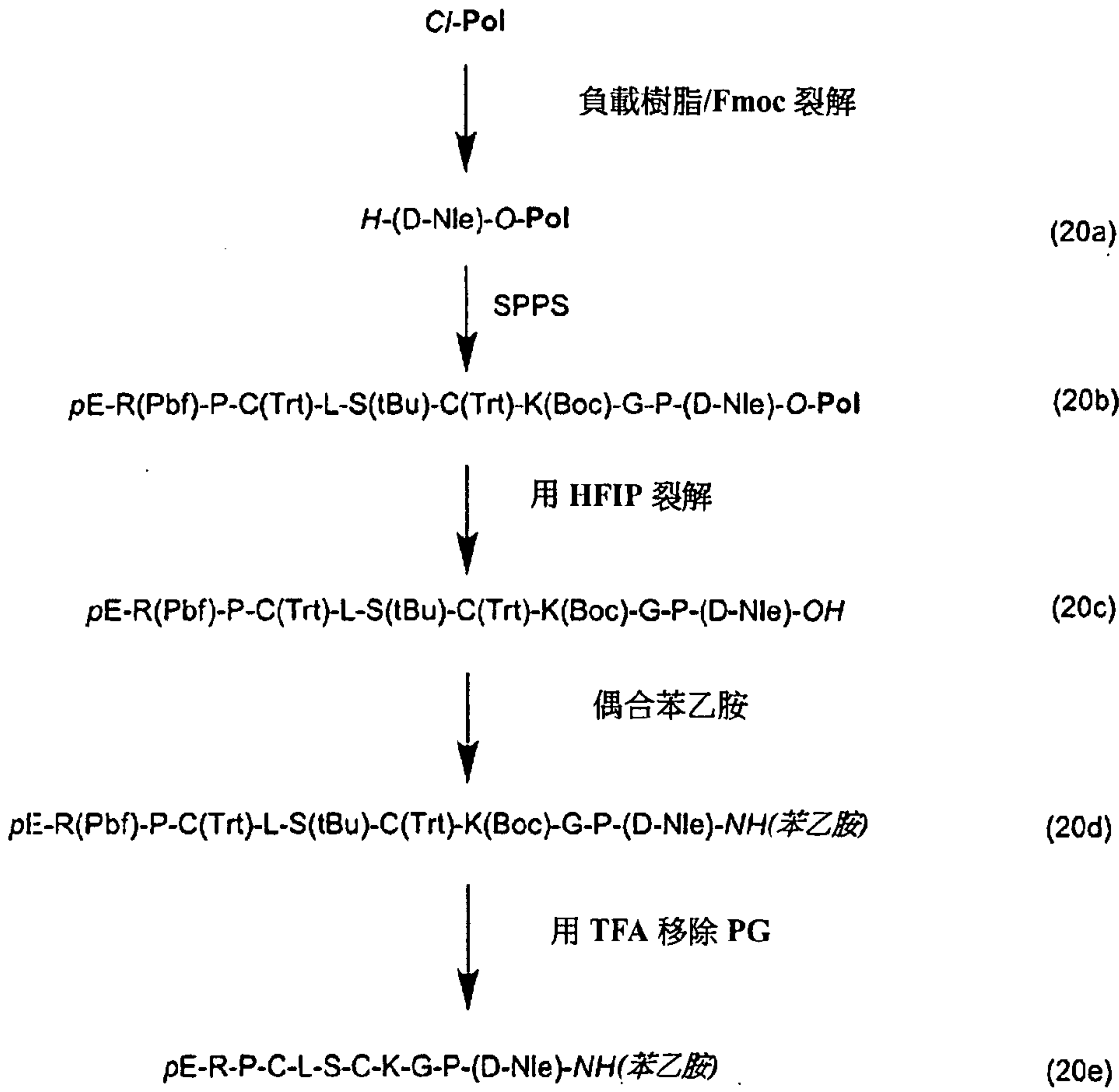
標記度	計算值	觀測值	%
His-hGDF15	26468	26360.3	5
His-hGDF15-BCN	26644	n/a	0

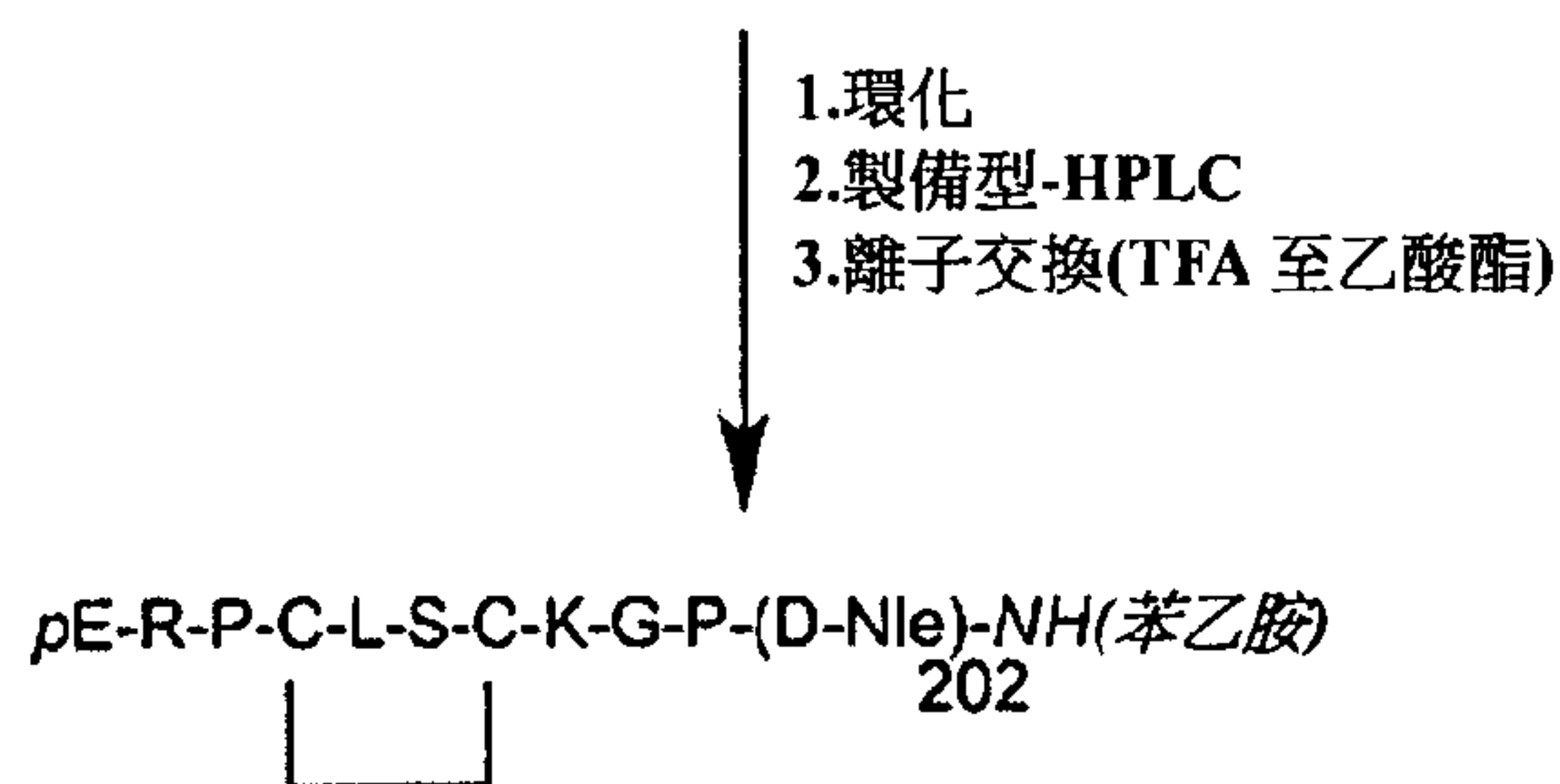
His-hGDF15 +1 PEG23	27567	28178.6	15
His-hGDF15 +2 PEG23	28666	29385.1	46
His-hGDF15 +3 PEG23	29765	30547.2	28
His-hGDF15 +4 PEG23	30864	31731.8	5

向His-hGDF15 BCN (I59：427 μL ，1.17 mg/mL，0.019 μmol)含於30 mM NaOAc pH 4.0 (427 μL)之溶液添加疊氮基-dPEG₂₃-胺(Quanta Biodesign，104 μg ，0.094 μmol)。在室溫下混合該反應16小時，在此時用10 kDa MWCO Amicon離心過濾器，藉由稀釋及濃縮樣本5次至140 μL 之體積，使該混合物交換進入30 mM NaOAc pH 4.0。MALDI分析顯示完全轉化為+1至+4產物。藉由A₂₈₀ (29090 M⁻¹cm⁻¹，27600 g/mol)測得濃度為2.099 mg/mL (57%)。

實例20：共軛至中間物47之愛帕琳環肽BCN：

步驟1：合成*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基) (二硫鍵C⁴-C⁷)乙酸酯





• 製備中間物**20a**

(給2-氯三苯甲基氯樹脂負載Fmoc-D-Nle-OH，移除Fmoc並測定該樹脂之負載)

將2-氯三苯甲基氯樹脂(50.0 g, 85.0 mmol)懸浮於DCM (400 mL)中，攪拌該懸浮液10 min，然後排乾溶劑，用DCM (3 x 200 mL)清洗樹脂。然後向該樹脂添加Fmoc-D-Nle-OH (24.0 g, 68.0 mmol)及DIPEA (96.5 ml, 552.5 mmol)含於DCM (120.0 ml)之溶液，用氮氣沖洗懸浮液，並在室溫下攪拌5 min。添加另一份DIPEA (22.7 ml, 127.5 mmol)，並在室溫下攪拌反應混合物過夜。

排乾反應混合物，並用DCM (3 x 250 mL)清洗樹脂，每次2 min。用混合物DCM/MeOH/DIPEA (70:15:15) (2 x 250 ml)使樹脂驟冷，每次10 min。

藉由用哌啶/DMF (1:3) (1 x 300 mL)處理樹脂5 min切除Fmoc基團，然後排乾樹脂(1 x 300 mL)，持續15 min，然後進行清洗步驟：DMF (6 x 250 mL，每次2 min)、異丙醇(2 x 250 mL，每次2 min)及TBME (6 x 250 mL，每次2 min)。在真空及35°C下乾燥樹脂，持續24小時，得到中間物**20a** (57.8 g，負載=1.08 mmol/g)。

• 製備中間物**20b**(組裝線性肽)

在自動肽合成器(CSBIO536TM)上使中間物**20a** (18.5 g, 20.0 mmol)接受固相肽合成。偶合循環之定義如下：

- 胺基酸偶合：AA (3.0 eq.)、DIC (3.0 eq.)、HOBt (3.0 eq.)、

DMF (參見下表)

- 清洗：DMF (4 x 150 ml，每次2 min)。
- Fmoc去保護：哌啶/DMF (1:3) (150 mL。持續5 min，然後150 mL持續1.5 min)。
- 清洗：DMF (6 x 150 mL，每次2 min)。

偶合	AA	偶合次數x反應時間	偶合方法
1	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
2	Fmoc-Gly-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
3	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
4	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
5	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
6	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
8	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt
10	Boc-L-Pyr-OH	1 x 120 min	DIC/HOBt

組裝肽後，用DMF (6 x 150 mL，每次2 min)、異丙醇(6 x 150 mL，每次2 min)及TBME (6 x 150 mL，每次2 min)清洗樹脂。在高真空及35℃下乾燥肽樹脂過夜，得到中間物**20b** (57.6 g，20.0 mmol)。

- 製備中間物**20c**
(自樹脂之HFIP裂解)

將一份中間物**20b** (27 g，9.37 mmol)懸浮於DCM (300 mL)中，並攪拌15 min。排乾樹脂，然後用HFIP/DCM (3:7) (3 x 270 mL，每次15 min)處理。濾出並收集裂解溶液，用DCM(3×300 mL)清洗樹脂。在真空中將合併裂解物及清洗溶液濃縮至乾燥。在真空及35℃下乾燥白色粉末過夜，得到中間物**20c**-批料1 (23.5 g，9.37 mmol)。

用另一份中間物**20b** (28.0 g，9.72 mmol)重複上述程序，得到中

間物**20c**-批料**2** (26.1 g, 9.72 mmol)。

- 製備中間物**20d**

(苯乙胺之溶液相偶合)

將中間物**20c**-批料**2** (20.0 g, 7.44 mmol, 1.0 eq)及HATU (5.23 g, 13.8 mmol, 1.85 eq)溶解於DMF (400 mL)中。添加苯乙胺(1.67 g, 13.8 mmol, 1.85 eq)及DIPEA (3.56 g, 27.6 mmol, 3.71 eq)含於DMF (60 mL)之溶液。

在室溫下攪拌反應混合物30 min，然後冷卻至0℃，然後添加鹽水(460 mL)。攪拌該懸浮液10 min，然後藉由過濾單離出產物。用H₂O (300 mL)清洗濾餅，然後小心移除，然後溶解於DCM (300 mL)中。在MgSO₄上乾燥溶液，然後在真空中濃縮至乾。使粗製產物在矽膠(溶離液：DCM及DCM/iPrOH (8:2))上進行急驟層析，得到中間物**20d**-批料**1** (14.4 g, 6.6 mmol)。

用中間物**20c**-批料**1** (23.4 g, 9.37 mmol)重複相同程序，不包括急驟層析，得到中間物**20d**-批料**2** (28.0 g, 9.37 mmol)。

- 製備中間物**20e**(移除保護基)

將中間物**20d**-批料**2** (28.0 g, 9.37 mmol)溶解於TFA/DCM/EDT/TIS (90:5:2.5:2.5) (290mL)中，並在室溫下攪拌該反應2 h。

濾出裂解溶液，並傾倒至冷TBME (3 L) (0-4℃)上。在冰水浴中攪拌混濁懸浮液30 min，然後濾過4孔玻璃過濾器。用TBME (2 x 100 mL)清洗由此得到之白色固體，然後在真空及35℃下乾燥過夜，得到中間物**20e**-批料**1**(8.9 g, 5.9 mmol)。

用中間物**20d**-批料**1** (14.4 g, 6.6 mmol)重複相同程序，得到中間物**20e**-批料**2** (9.6 g, 6.3 mmol)。

- 製備

E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基) (二硫鍵C⁴-

C⁷)乙酸酯

1)環化

將中間物**20e** (5.0 g, 3.3 mmol)溶解於水(500 mL)中。添加一份碘(1.18 g, 4.66 mmol, 1.41 eq)含於乙酸(93 mL)之溶液。在室溫下攪拌反應混合物10 min。添加抗壞血酸(1.03 g, 5.83 mmol, 1.77 eq)含於水(5.8 mL)之溶液，並攪拌反應混合物10 min，過濾並在4℃下儲存，直至純化。

重複相同環化程序，直至18.3 g (12.1 mmol)中間物**20e**被處理。

2)純化

每次注射0.5-5.0 g肽，逐份使環肽溶液進行製備型HPLC。合併純度高於95%之溶離份，並經凍乾得到總量4.89 g (3.2 mmol)純化肽(TFA肽)。

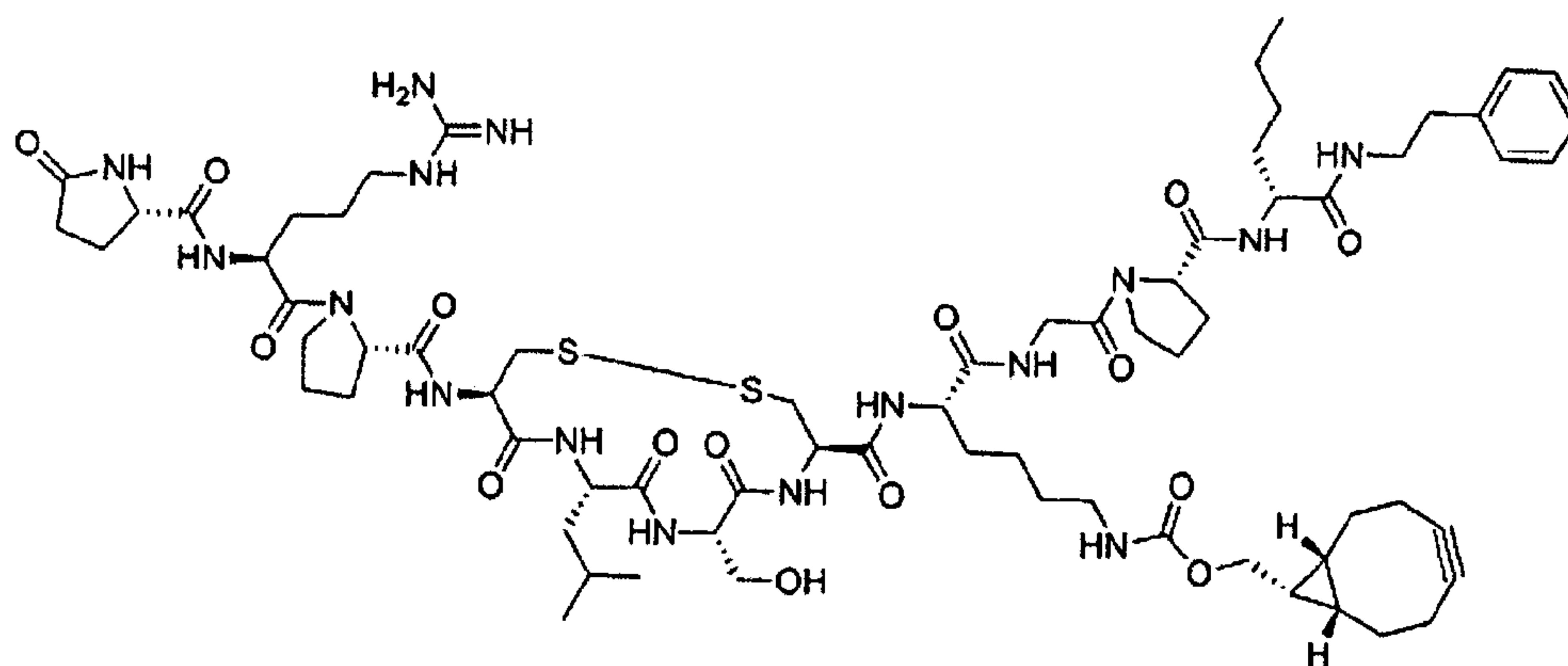
3)藉由離子交換形成乙酸酯

將75 g (100 mL)呈其OH⁻形式之強陰離子交換樹脂(離子交換劑III, Merck)置於燒結玻璃過濾器(孔隙度3)中，然後添加乙酸/水(1:3)溶液(300 mL)，手動攪拌懸浮液2 min，然後排乾樹脂。用另一份乙酸/水(1:3) (300 mL)重複該過程。用去離子水清洗樹脂，直至觀察到中性廢水(drain)。然後將樹脂轉移至配備有燒結玻璃過濾器(孔隙度3)之4 x 20 cm管柱。

將4.8 g純化肽溶解於去離子水(50 mL)中，並添加至該管柱。用去離子水(200 mL)溶離產物。藉由TLC點樣(spotting)控制產物溶離，合併富溶離份，並凍乾得到pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)(二硫鍵C⁴-C⁷)乙酸酯(4.1 g, 2.9 mmol)。

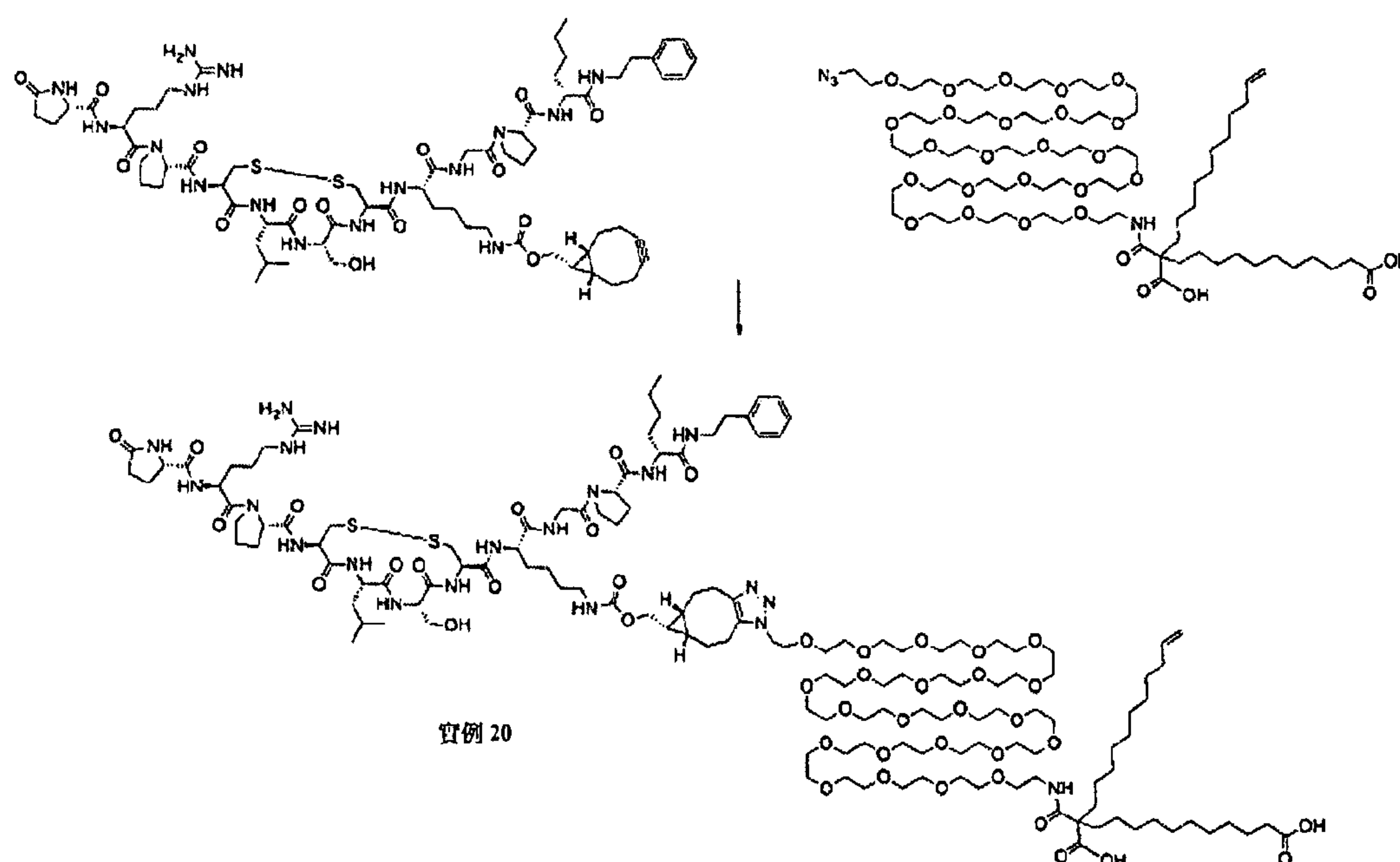
藉由分析型HPLC (分析方法F；t_R=8.01 min)及UPLC-HRMS (分析方法G；測量值：[M+2H]²⁺=643.328；計算值[M+2H]²⁺=643.324)分析純淨產物。乙酸酯含量為7.99-8.27%，且水含量為1.94-1.96%。

步驟2：製備pE-R-P-C*-L-S-CP-*N*⁶-[[*(1α,8α,9α)*-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲氧基]羰基]-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基) [二硫鍵C4-C7]



在室溫下攪拌pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)三乙酸酯[二硫鍵C4-C7] (100 mg, 0.068 mmol)、碳酸氫鈉(38 mg, 0.452 mmol)及水(83 μ L)含於DMF (1 mL)之混合物10 min，然後添加(*1R,8S*)-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基琥珀醯亞胺碳酸酯(Berry & associates, 20 mg, 0.068 mmol)。在室溫下攪拌該反應混合物90 min。向該混合物添加1 mL水，並將所得溶液凍乾得到粉末，其無需進一步純化即可用於下一步驟中。

步驟3：製備實例20：

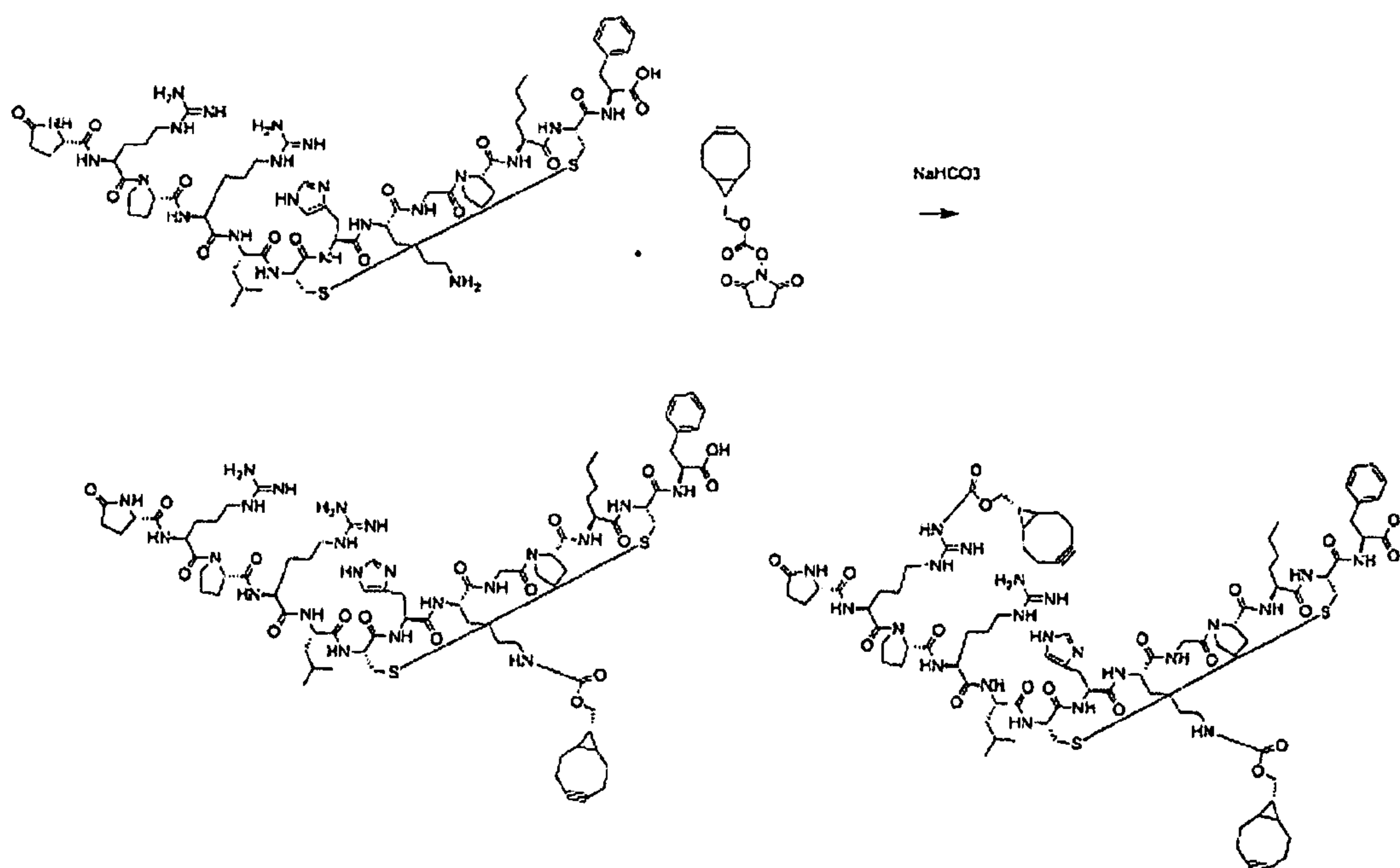


在室溫下攪拌pE-R-P-C*-L-S-C*-*N*⁶-[[*(1α,8α,9α)*-雙環[6.1.0]壬-4-

炔-9-基甲氧基]羰基]-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基) [二硫鍵C4-C7] (50 mg步驟2之產物含於1 mL水中，0.034 mmol)及中間物47(52 mg，含於268 μ L水)之混合物約3 hr。然後藉由製備型HPLC (Sunfire 30x50 mm 5 μ m管柱ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/min，15-40% ACN梯度5 min)純化反應混合物。將產物溶離液凍乾得到呈TFA鹽之標題產物(24 mg，21%)。LCMS (Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1x50 mm，50 $^{\circ}$ C，溶離液A：水+ 0.1%甲酸，溶離液B：乙腈+ 0.1%甲酸，梯度2%至98% B/A，在5.15 min內)：滯留時間：2.77 min；MS [M+2]²⁺：觀測值：1491.8808，計算值：1491.8560。

實例21A：共軛至中間物47之愛帕琳環肽BCN

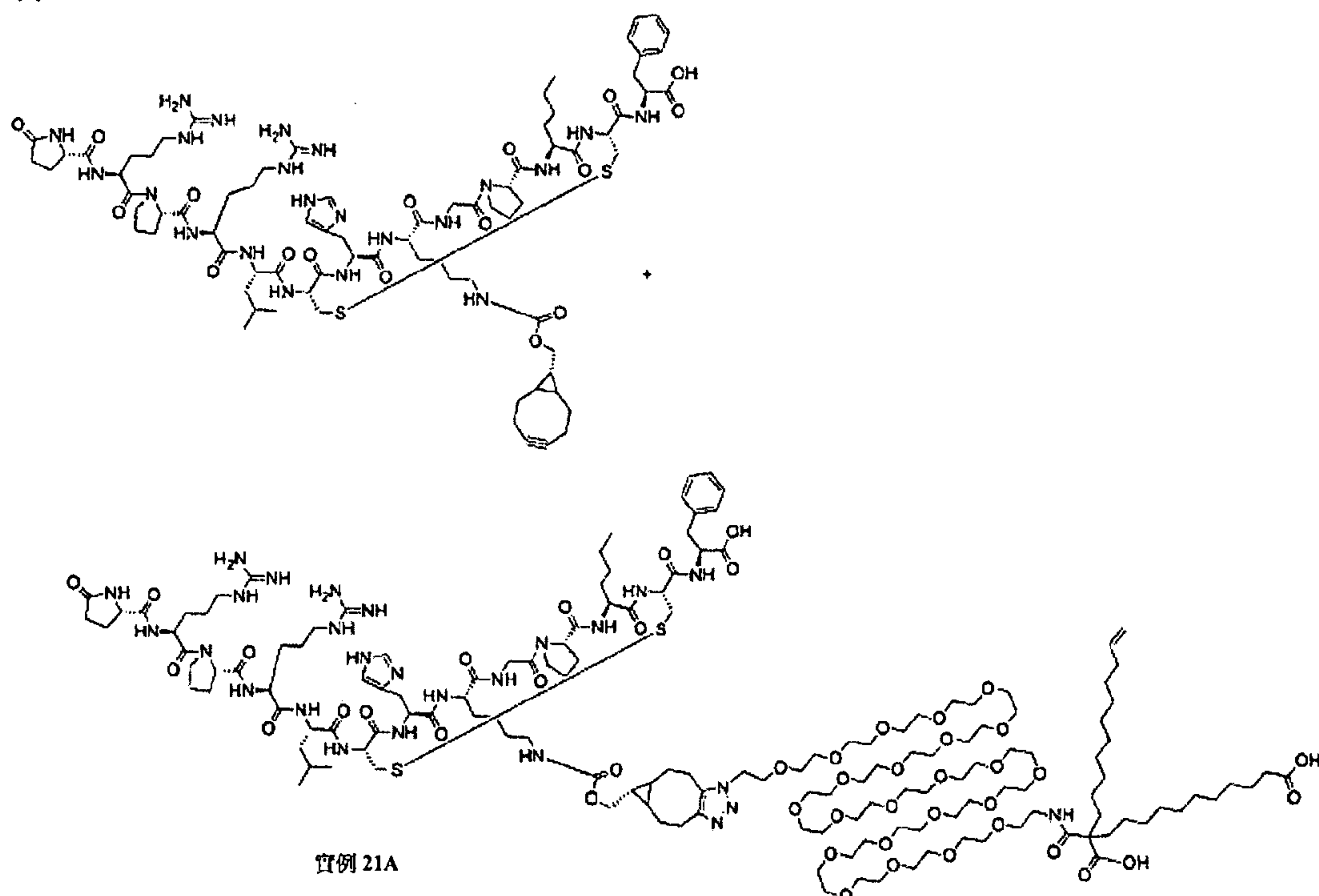
步驟1：



在室溫下攪拌 *p*E-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH(二硫鍵C⁶-C¹²) (50 mg，0.033 mmol，如美國專利案第8,673,848號製備)、碳酸氫鈉(18 mg，0.215 mmol)及水(40 μ L)含於DMF (0.5 mL)之混合物10 min，然後添加(1R,8S)-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基琥珀醯亞胺碳酸酯(Berry & associates，18 mg，0.065 mmol)。在室溫下攪拌該反應混

合物90 min。藉由LCMS觀察到+ 1及+2加成物之混合物，所以藉由質量觸發之HPLC (肽方法5 25-50% ACN梯度5 min：條件：Sunfire 30x50 mm 5 um管柱ACN/H₂O w/ 0.1% TFA 75 ml/min注射1.5 ml)：rt 3.2 min (+1)，rt 4.65 min、4.9 min (+1及+2混合物)純化混合物。LCMS確認期望+1產物之產率為61%，且+1、+2混合物之產率為18%。LCMS：(鹼性溶離液A：水+ 5 mM氫氧化銨，溶離液B：ACN酸性管柱：Sunfire C18 3.5 μm 3.0x30 mm -40℃，鹼性管柱：XBridge C18 3.5 μm 3.0x30 mm -40℃)滯留時間：0.98 min；MS [M+2]²⁺：觀測值：856.0，計算值：865.0245。

步驟2：



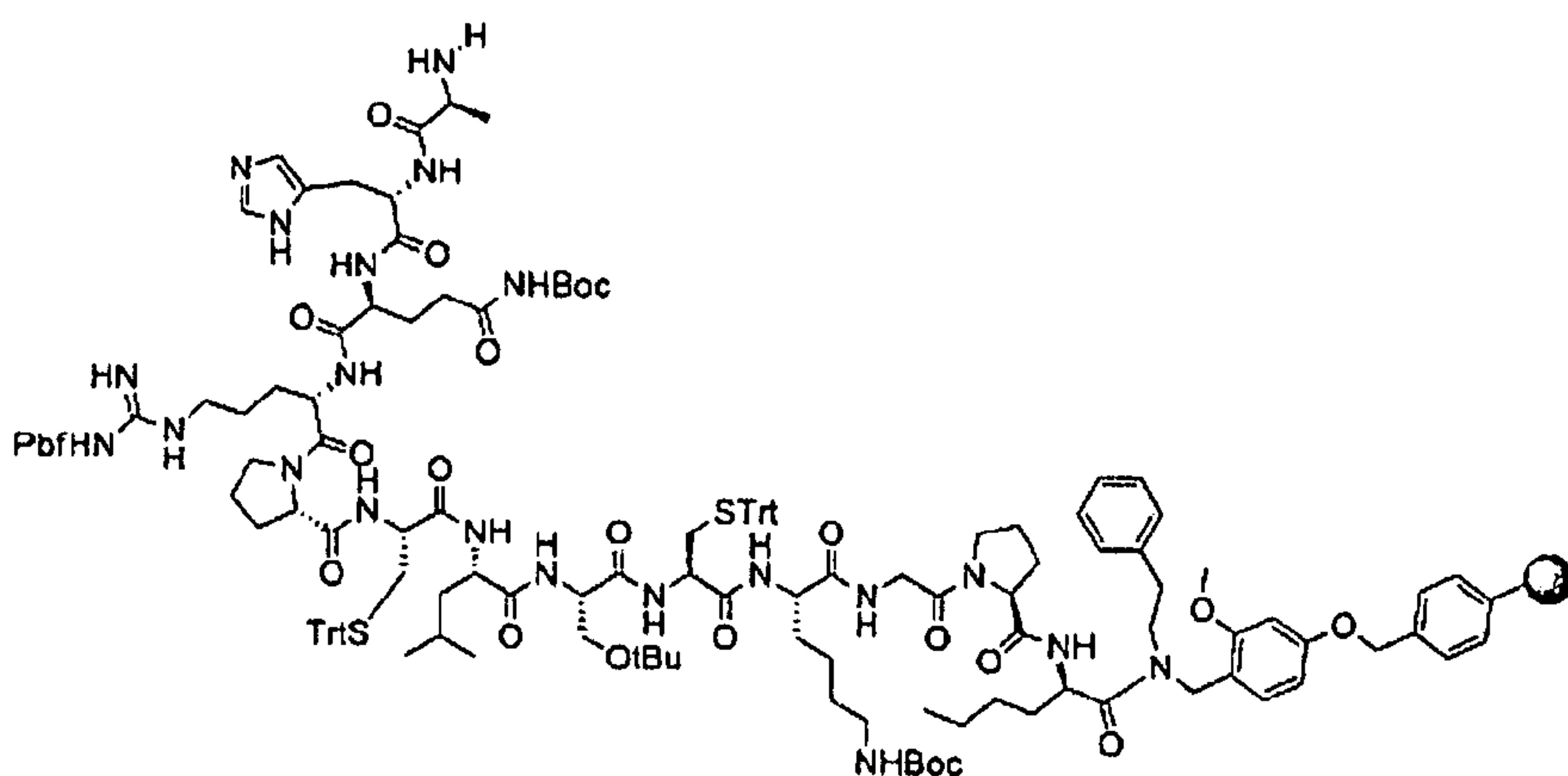
在室溫下攪拌

E-R-P-R-L-C*-H-N⁶-[[[(1α,8α,9α)-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲氧基]羰基]-K-G-P-Nle-C*-F-OH(二硫鍵C⁶-C¹²) (21.33 mg，0.014 mmol)及中間物47 (24 mg，0.014 mmol)之混合物約3 hr。藉由LCMS，反應完全，並凍乾得到標題產物(23 mg，48%)。LCMS (Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 um 2.1x50 mm，50℃，溶離液

A：水 + 0.1% 甲酸，溶離液 B：乙腈 + 0.1% 甲酸，梯度 2% 至 98% B/A，在 5.15 min 內)：滯留時間：2.22 min；MS [M+2]²⁺：觀測值：1616.9464，計算值：1616.976。

實例21B：共軛至脂肪酸-連接子構築體I-37之愛帕琳環肽

步驟1：合成A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-Dnle-苯乙胺中間物21B1



在自動肽合成器 (CEM Liberty Blue Microwave) 上使苯乙胺 - AMEBA 樹脂 (Sigma Aldrich, 0.1 mmol，1.0 mmol/g) 接受固相肽合成，該自動肽合成器具有對應 Arg 殘基之標準雙倍 Arg 及雙倍 Dnle 偶合時間。將胺基酸製成含於 DMF 之 0.2 M 溶液。標準偶合循環之定義如下：

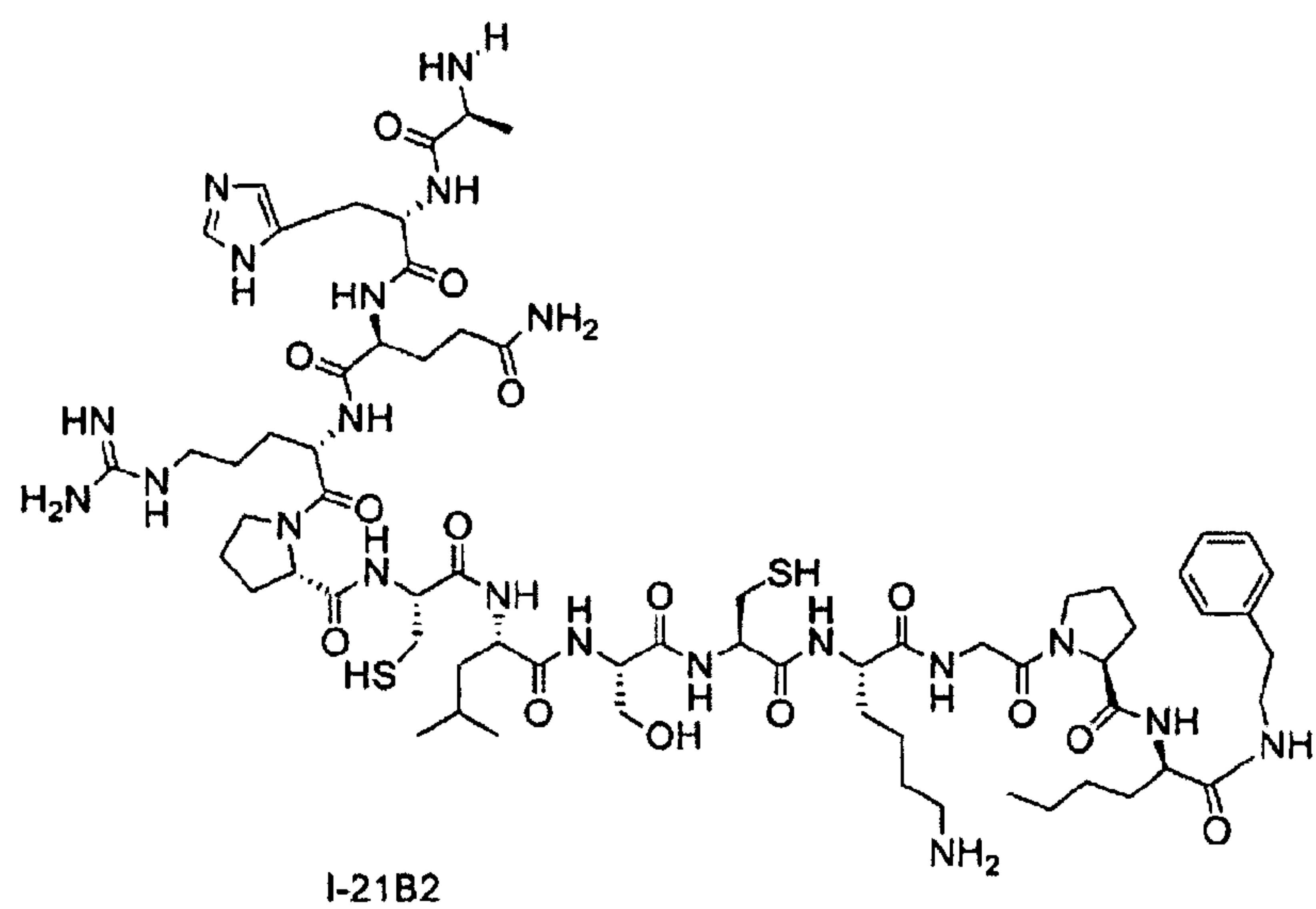
- 胺基酸偶合：AA (5 eq.)、HATU (5 eq.)、DIEA (25 eq.)
- 清洗：DMF (3 X 7 mL)
- Fmoc去保護：20%哌啶/0.1 M HOBt (2 x 7 ml)
- 清洗：DMF (4 x 7 mL及1 x 5 mL)

偶合	AA	偶合次數x反應時間(Temp)	偶合方法
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

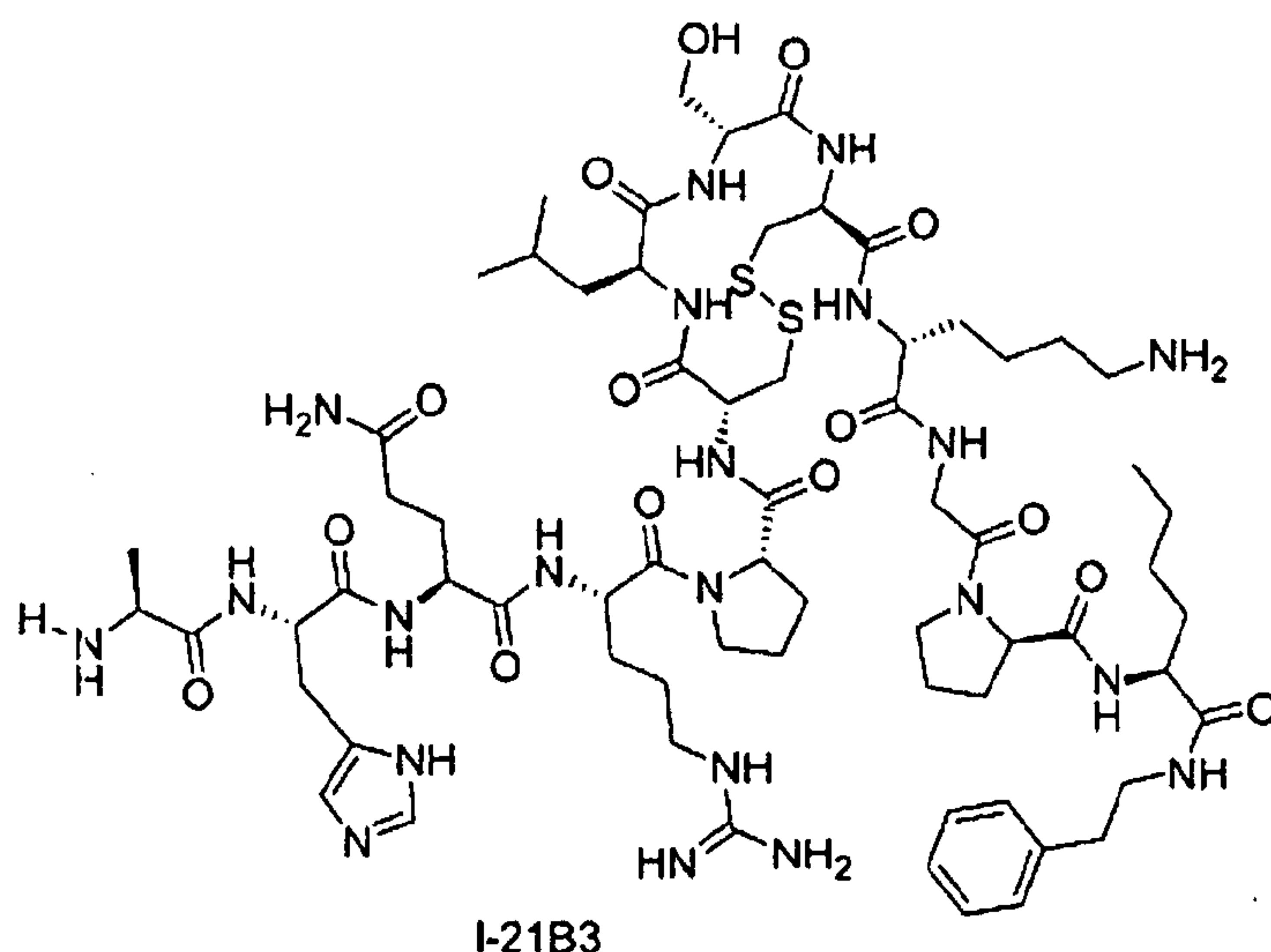
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 min (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-His-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

組裝肽後，用DMF (2 x 50 mL)及DCM (2 x 50 mL)清洗樹脂，然後在真空下乾燥得到中間物**21B1** (276 mg，0.1 mmol)。

步驟2： 製備中間物**21B2**(自樹脂裂解肽)



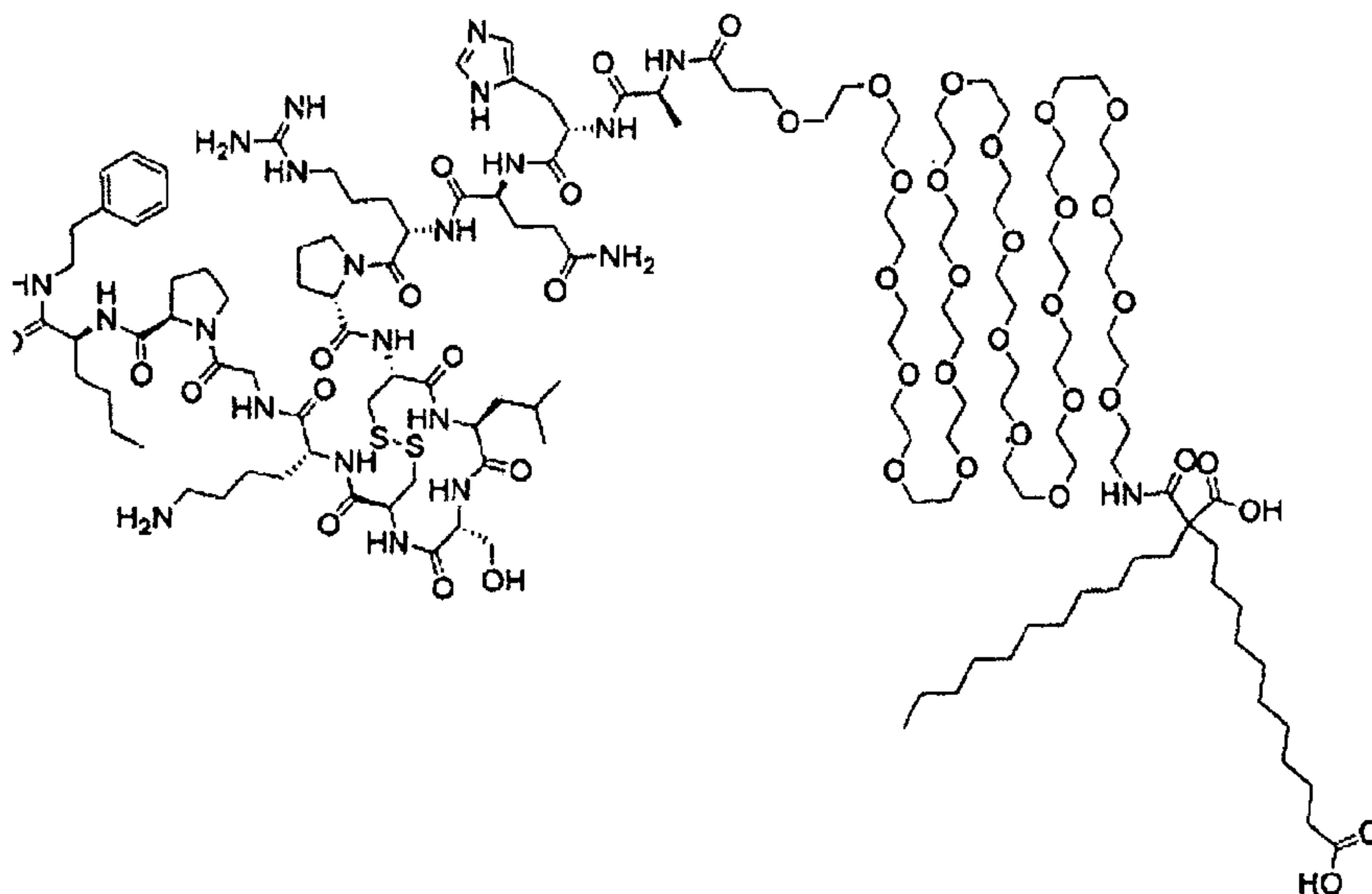
將中間物**21B1** (276 mg，0.1 mmol)及4 ml TFA溶液(37 mL TFA、1 mL H₂O、1 mL TIPS、3.06 g DTT)合併在一起，並在室溫下振盪3小時。移除樹脂之溶液，並沈澱至40 mL冷Et₂O中。使溶液渦旋混合，並使之在冰上靜置10分鐘，然後以4000 rpm離心5分鐘。移除溶劑，並再用冷Et₂O 清洗白色固體兩次(每次40 mL)、離心(每次5分鐘)及傾析。在真空下乾燥固體過夜，得到中間物**21B2** (17.4 mg，0.012 mmol)。LCMS (SQ2 產物分析-酸性-肽-極性，Acquity UPLC BEH C18管柱，130 Å，1.7 μm，2.1 mm x 50 mm，50°C)：R_t = 1.83分鐘，MS [M+H] 1513.5。



步驟3：製備中間物**21B3**(半胱氨酸殘基之環化)

● 將中間物**21B1** (29.6 mg, 0.020 mmol)溶解於水(3 mL)及10滴DMSO中，得到略微混濁溶液。緩慢逐滴添加碘(50 mM含於HOAc, 0.783 mL, 0.039 mmol)，並在室溫下混合該反應過夜。粗反應之LCMS分析顯示起始材料完全轉化。逐滴添加0.5 M抗壞血酸，直至顏色消失。經由MS-觸發之HPLC純化材料。凍乾合併溶離液得到7 mg呈白色粉末之期望產物(4.63 μ mol, 24%)。LCMS (SQ2 產物分析-酸性-肽，Acquity UPLC BEH C18管柱，130 Å, 1.7 μ m, 2.1 mm x 50 mm, 50°C)： R_t = 0.90分鐘，MS [M+H] 1511.8。

● 步驟4：製備含愛帕琳A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-Dnle-苯乙胺及中間物I-37 (N端共軛)-實例21B之共軛物



在H₂O中製備NHS-脂肪酸之10 mg/mL溶液。將中間物**21B3** (1.5 mg, 0.993 μmol)溶解於30 mM pH4 NaOAc緩衝液(672 μL)中，並添加NHS-脂肪酸(**I-37**: 0.850 ml, 5.10 μmol)。在室溫下混合該反應16小時，在此時另外添加1.5 mg NHS-脂肪酸(10 mg/mL含於H₂O)，並在室溫下混合該反應16小時。添加8 mg NHS-脂肪酸(10 mg/mL含於H₂O)，並在室溫下混合該反應3天，並添加1.7 mg NHS-脂肪酸(10 mg/mL含於H₂O)。在室溫下振盪該混合物16小時，並經由M-觸發之HPLC純化得到1.7 mg呈白色粉末之標題化合物(0.510 μmol, 51%)。LCMS (SQ2 產物分析-酸性-肽-極性, Acquity UPLC BEH C18管柱, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm x 50 mm, 50°C): R_t = 3.87分鐘, MS [M+H+2/2] 1533.1; [M+H+3/3] 1022.9。

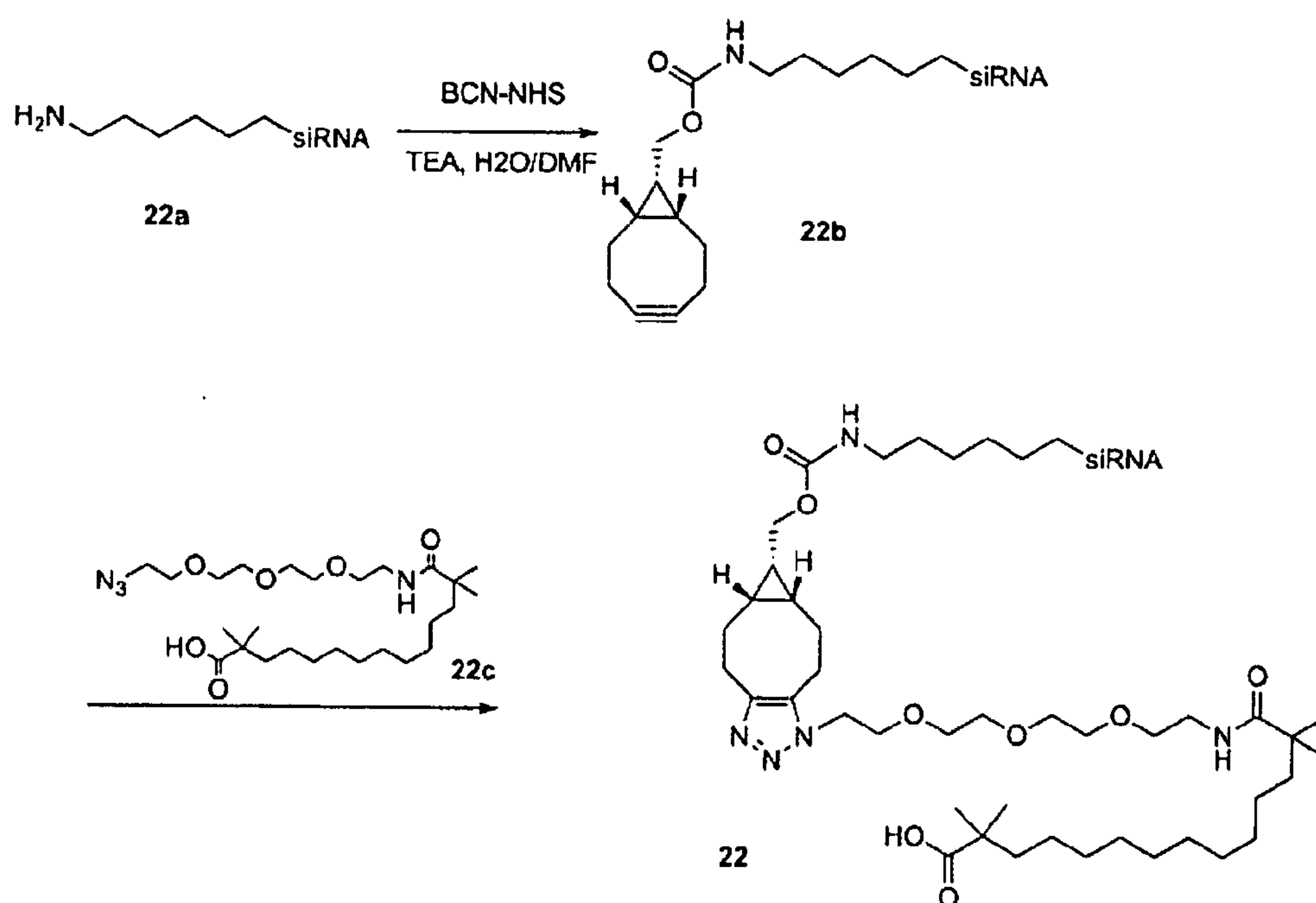
實例22至24係指脂肪酸與siRNA之共軛物。

siRNA合成套組可自(例如)New England Biolabs與Ambion購得。siRNA劑可使用化學合成法及使用此項技術中已知之程序之酶促連接反應構建。例如，siRNA劑可使用天然核苷酸或經設計以降低脫靶效應及/或增加分子之生物穩定性或增加反義及正義核酸間所形成之雙螺旋之物理穩定性之經各種修飾之核苷酸以化學方式合成，例如，可使用硫代磷酸酯衍生物及經吡啶取代之核苷酸。「G」、「C」、「A」、

「T」及「U」通常各代表分別含鳥嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸苷及尿嘧啶作為鹼基之核苷酸。然而，術語「核糖核苷酸」、「脫氧核苷酸」或「核苷酸」亦可指代經修飾核苷酸或替代置換部分。

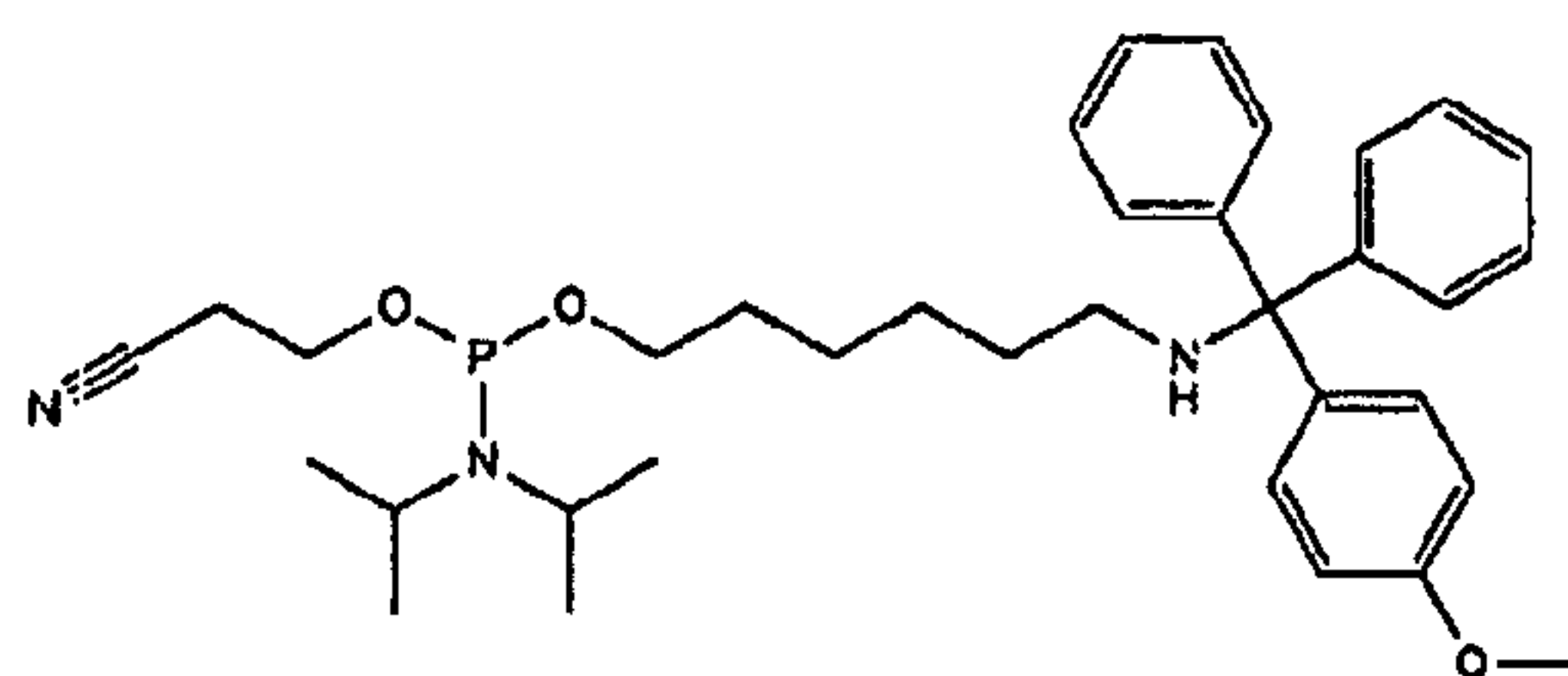
熟習此項技術者將瞭解，可視需要使用此項技術中所知之任何習知方法合成及修飾siRNA(參見Henschel等人2004 DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. *Nucleic Acids Research* 32 (Web Server Issue): W113-W120)。

實例22：式A3之脂肪酸部分與siRNA之共軛作用



製備中間物22a：

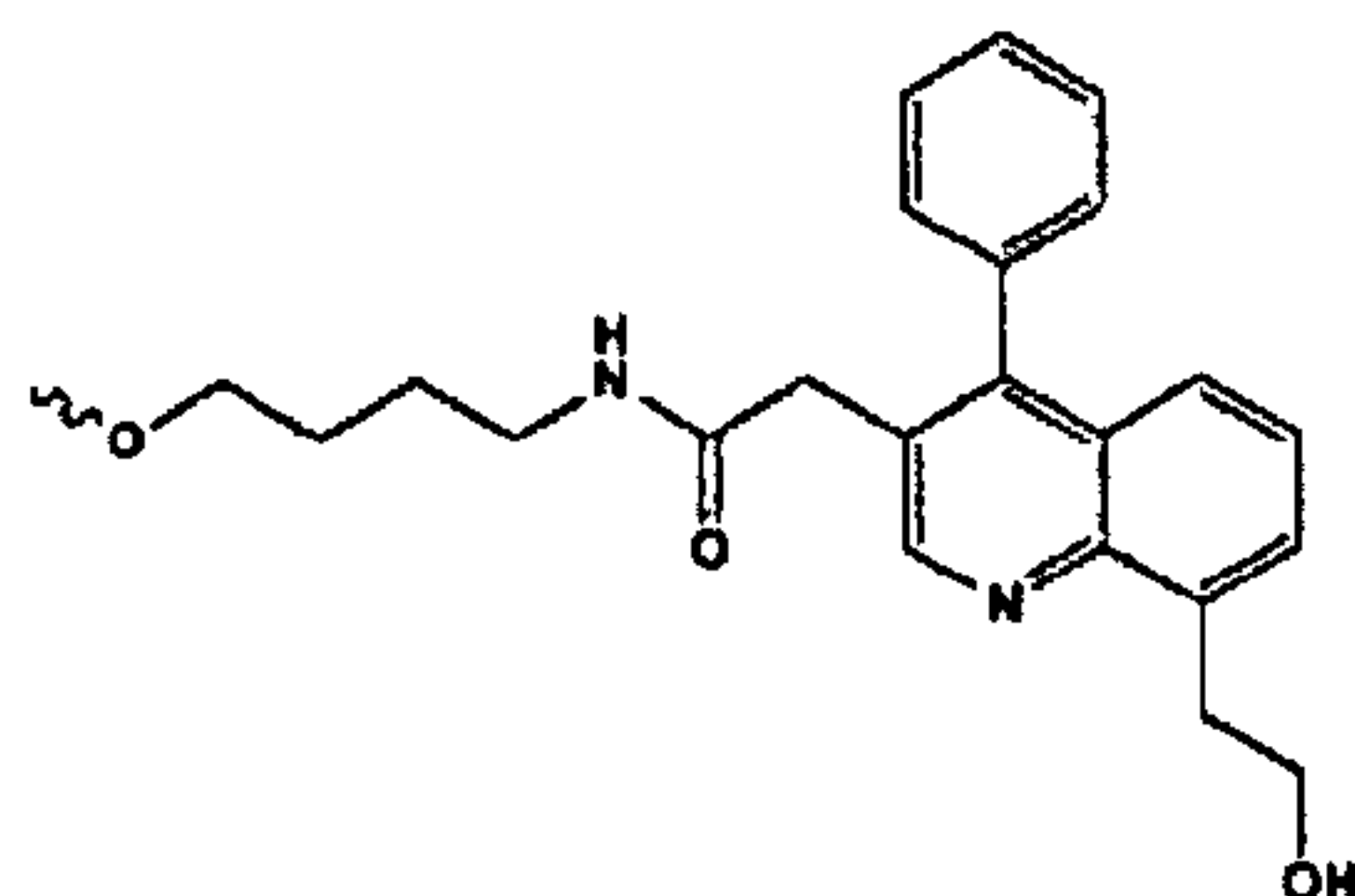
使用標準寡核苷酸程序(例如與6-(4-單甲氧基三苯甲基氨基)己基-(2-氰乙基)-(N,N-二異丙基)-亞磷醯胺(Glen Research Catalog NO:10-1906)反應)自TTR siRNA [甲狀腺素運載蛋白(TTR)之siRNA，利用此項技術中已知之習知方法合成]轉化為22a。



TTR siRNA :

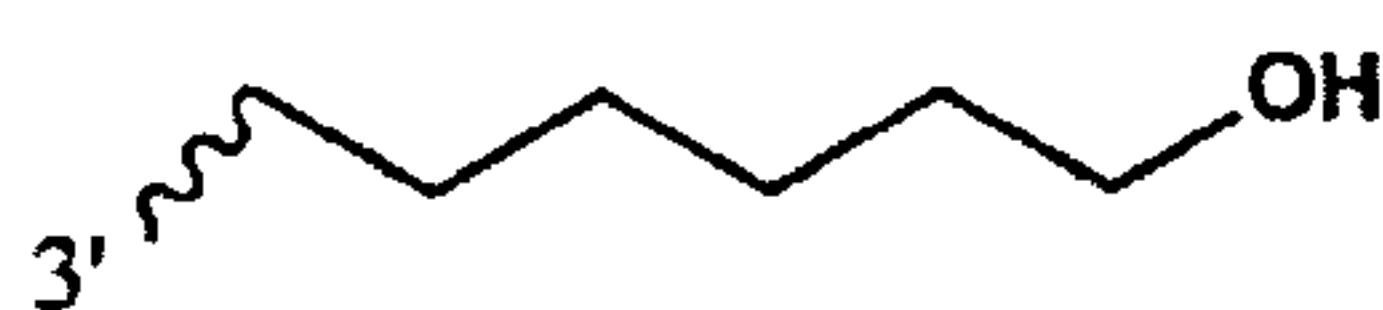
反義鏈：Puagagcaagacacugu*u*rX058其中：

P係磷酸，小寫字母表示2'-經OMe修飾之核苷酸，帶下劃線字母表示2'-經F修飾之核苷酸，斜體字母表示2'-經MOE修飾之核苷酸，r係無鹼基核糖醇，*係指硫代磷酸酯鍵，且X058係下式之非核苷酸3'端帽：



正義鏈：aacaguguucugcucuar-C6OH。

- 係指磷酸；且C6OH (亦稱為C6)係下式之非核苷酸3'端帽：



製備中間物**22b**：

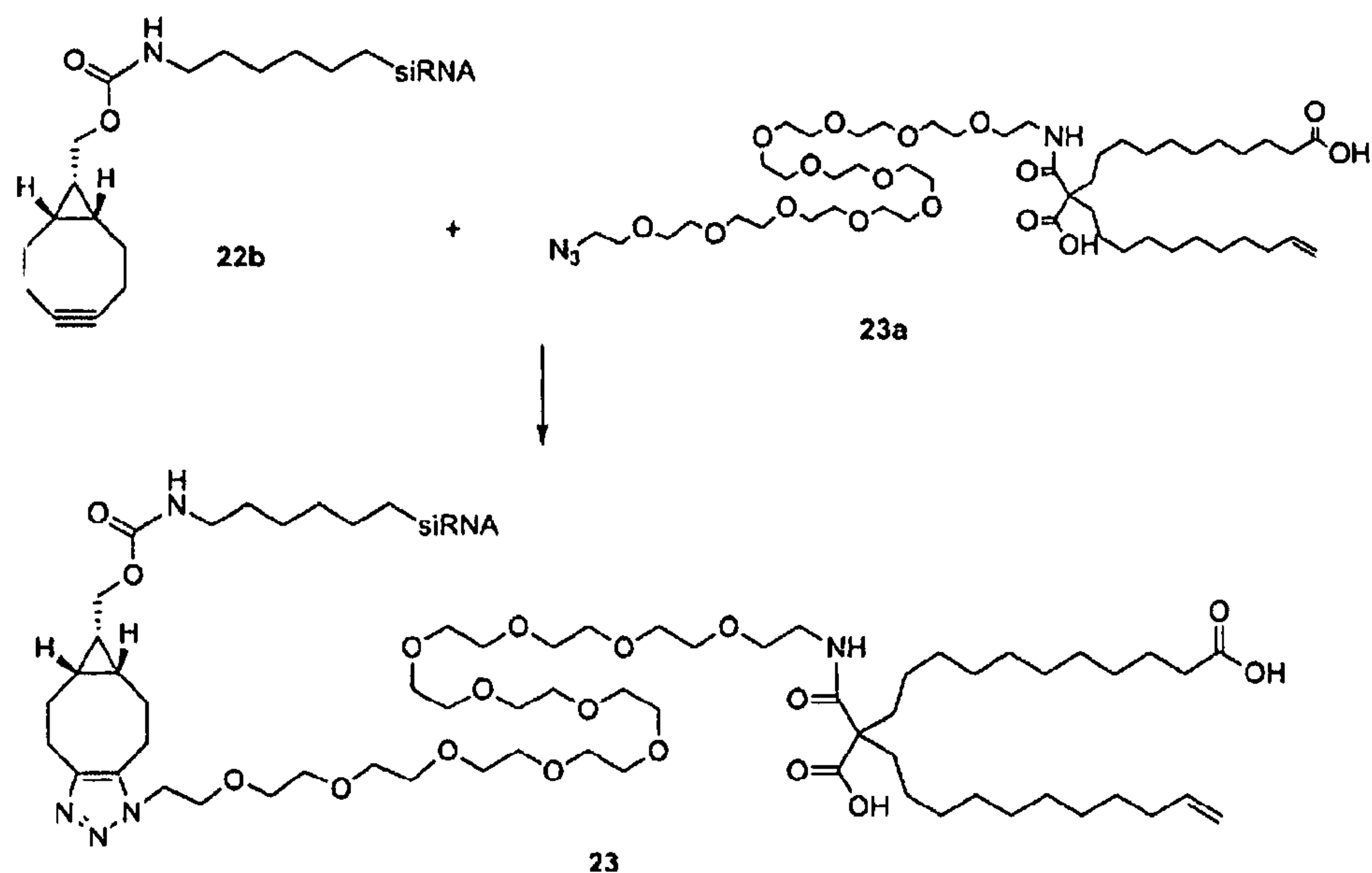
在0℃下向0.556 ml siRNA **22a**溶液(TTR siRNA 14.02mM含於H₂O，7.79 μmol)添加0.556 ml DMF，並升溫至室溫。添加208 μl TEA (0.3 M含於DMF，62 μmol)及260 μl BCN-NHS ((1R,8S,9s)-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基 N-琥珀醯亞胺碳酸酯) (0.15 M含於DMF，39 μmol)。在室溫下攪拌所得反應1 hr。分析型HPLC顯示起始材料**22a**消失。用去離子H₂O將反應稀釋至10 ml，並變得渾濁。用乙酸乙酯萃取上述混合物5次，以移除小型有機分子。分離水層並凍乾。按原樣使用乾燥產物固體(**22b**)。

製備實例**22**：

混合80 μl化合物**22b** (12.3 mM含於H₂O，0.968 μmol)及65 μl雙脂肪酸-N₃ (**22c**：實例15之步驟2：44.7 mM含於DMSO，2.90 μmol)。所

得混合物係渾濁，所以添加80 μ l 1:1 DMF/THF，且反應仍然略微渾濁。另外添加80 μ l DMSO，得到澄清溶液。在室溫下攪拌反應過夜。用去離子H₂O稀釋反應，並經HPLC純化得到5.6 mg化合物**22** (65.9%產率)。純化之HPLC條件：管柱：Xselect Prep苯基己基5 μ m OBD 19x50 mm；有機溶劑：經100 mM TEA.HOAc修飾之ACN；水性溶劑：經100 mM TEA.HOAc修飾之H₂O；梯度：5-60% AcCN/H₂O；時間：10 min。按照LC-MS方法H，產物在解迴旋(deconvolution)後顯示單一峰，滯留時間為5.44 min，期望MW為8778。

實例23：式A1之脂肪酸部分與化合物4之siRNA製劑之共軛作用



使用與實例22相同之程序製備實例23。

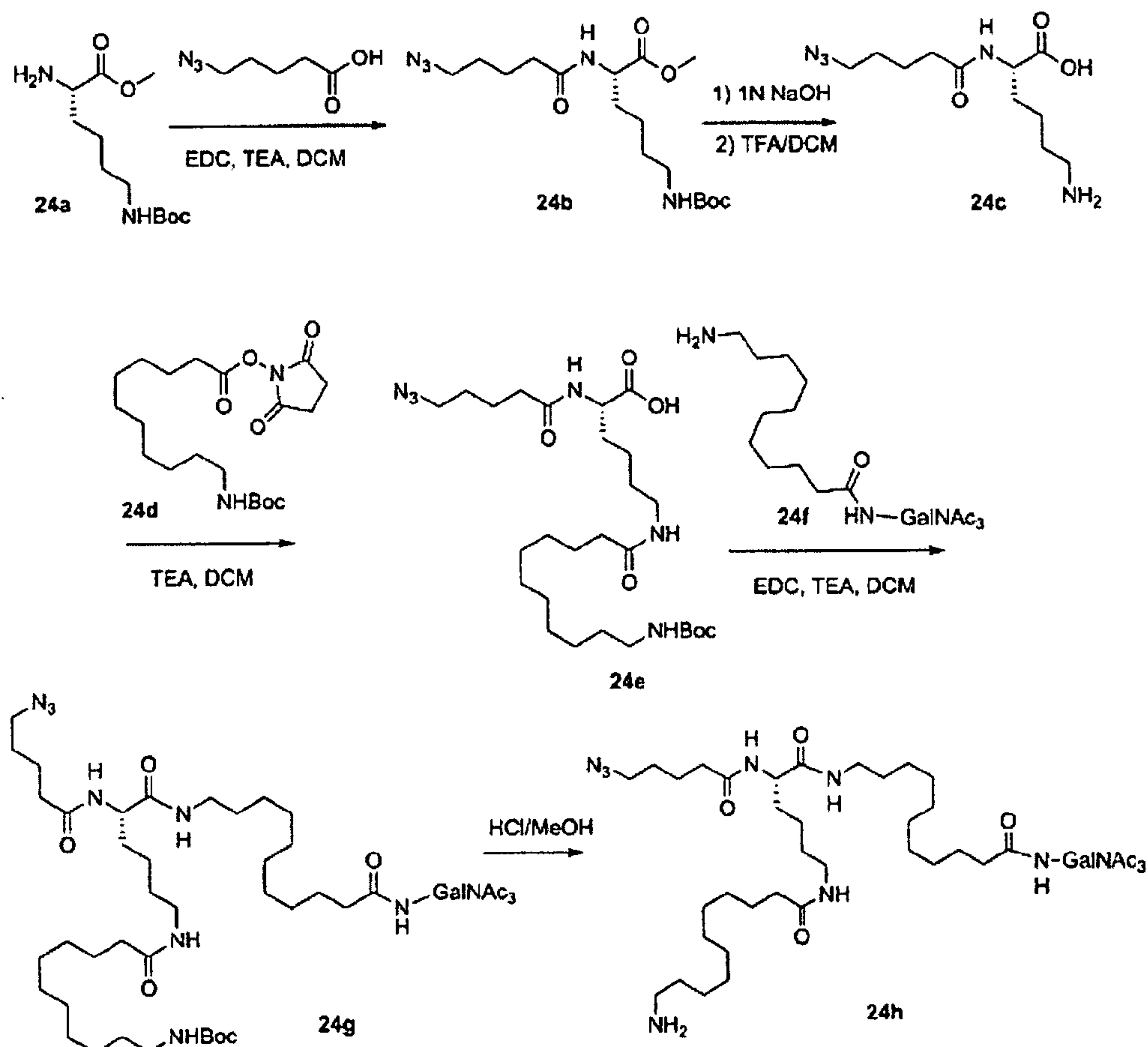
製備23a：

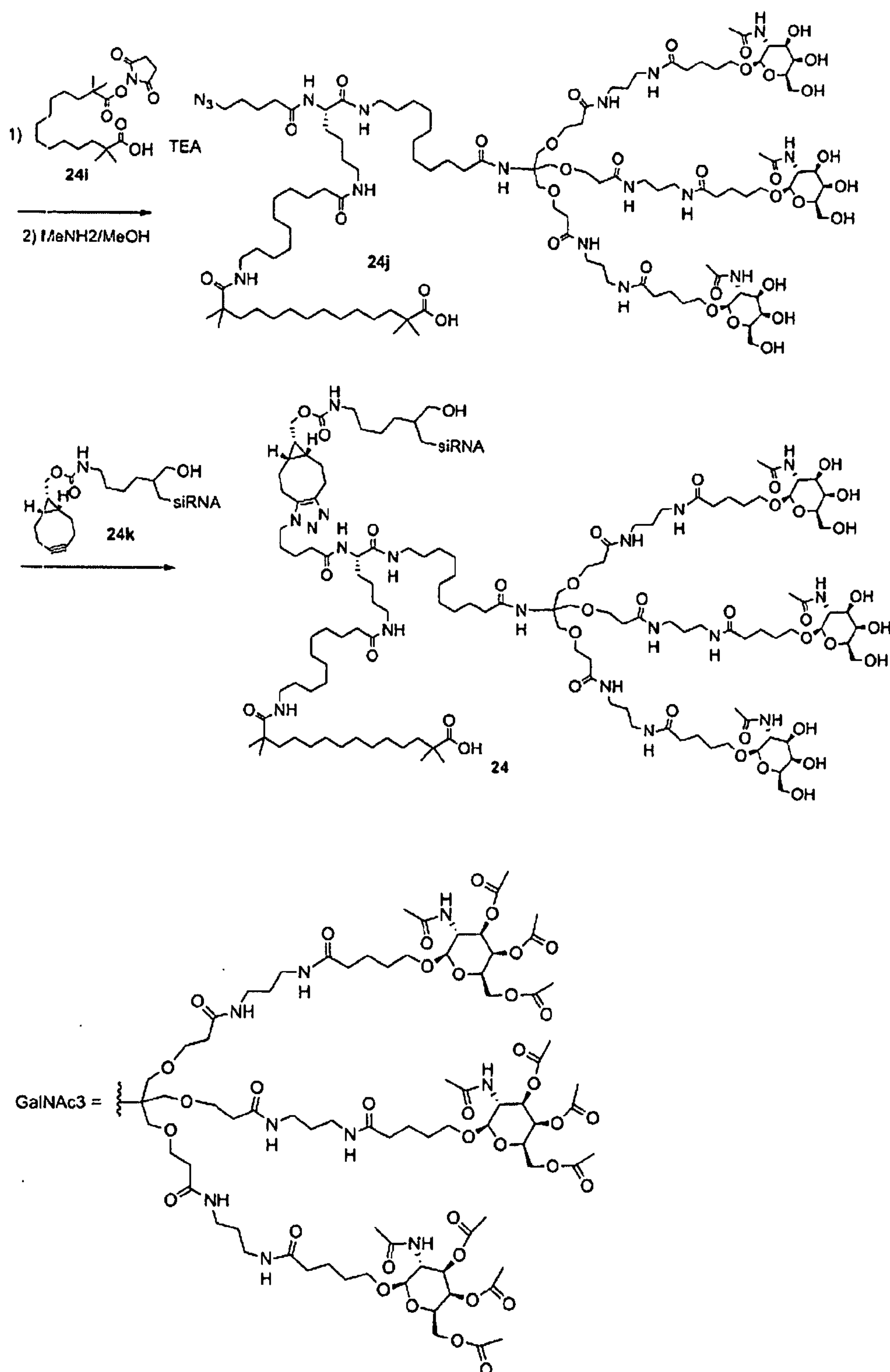
向NHS-脂肪酸(20 mg)含於DCM (16 ml)之溶液添加疊氮基-peg7-胺(QuantaBioscience, cat #10523) (31 mg)及DIPEA (52 μ L)，並在室溫下攪拌該混合物2 h。藉由LC-MS分析觀察到完全轉化。濃縮混合物，再溶解於MeOH (3 mL)中，並藉由MS-觸發之HPLC及0.1% TFA (rt=1.59 min，預期質量(M+1)：818.062，觀測質量：817.9)純化得到清潔產物。損失半數材料，因為HPLC MS系統設置了800 Da截止點。

得到5-10 mg (17-33%)清潔產物。

混合80 μ l **22b** (12.3 mM含於H₂O, 0.968 μ mol)及65 μ l三脂肪酸-N3 (**23a**: 44.7 mM含於DMSO, 2.90 μ mol)。反應得到5.2 mg化合物**23** (58.0%產率)。按照LC-MS方法H, 產物在解迴旋後顯示單一峰, 滯留時間為5.87min, 期望MW為9257。

實例24：式A3之脂肪酸與APOCIII siRNA之共軛作用





製備 24b

向**24a** (1.244 g, 4.19 mmol)含於25 ml DCM之溶液先後添加TEA (0.58 ml, 4.19 mmol)及N3-戊酸(500 mg, 3.49 mmol)。最後添加EDC (804 mg, 4.19 mmol)。在室溫下攪拌反應4 hr。在鹽水與DCM之間萃取該反應。合併所有有機物，乾燥，濃縮並經具有60%乙酸乙酯/庚烷

之SiO₂膠純化得到1.20 g化合物**24b** (89%產率)。¹H NMR (氯仿-d, 400MHz) d:5.88-6.37 (m, 1H), 4.60 (d, J=4.8 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.33 (t, J=6.7 Hz, 2H), 3.13 (d, J=6.5 Hz, 2H), 2.30 (t, J=7.2 Hz, 2H), 1.81-1.95 (m, 1H), 1.63-1.81 (m, 5H), 1.48-1.57 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.36 (d, J=6.8 Hz, 2H)

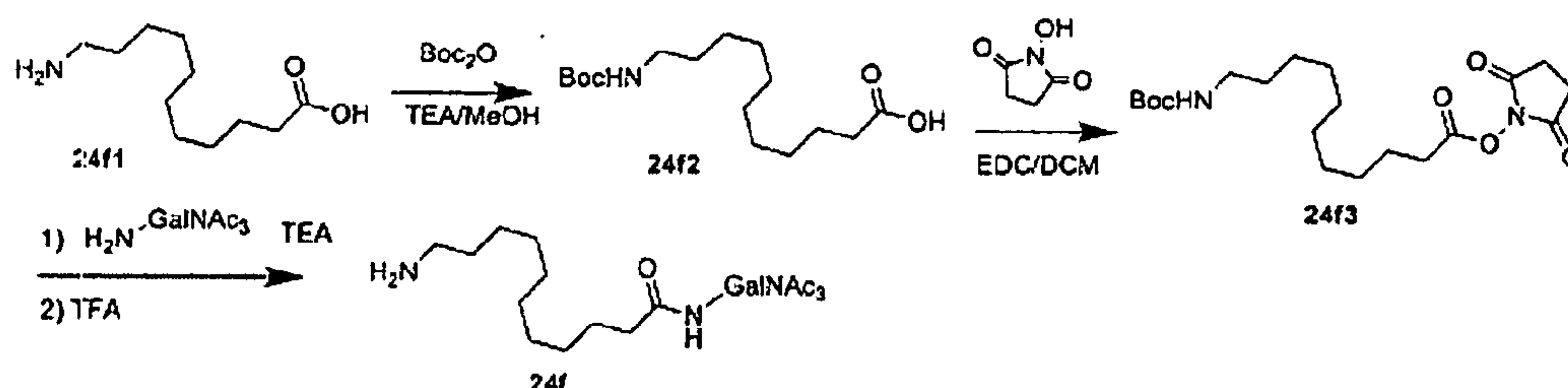
製備**24c**

向**24b** (860 mg, 2.23 mmol)含於12 ml THF之溶液添加1N NaOH (5.58 ml, 5.58 mmol)。在室溫下攪拌反應0.5 hr。用鹽水稀釋該反應，並添加20 ml DCM。用1N HCl將水層之pH調節至約pH 5，然後用DCM萃取。合併所有有機物，乾燥，濃縮並再將粗製固體溶解於6 ml DCM中。添加0.6 ml TFA，並在室溫下攪拌該反應2 hr。濃縮該反應，並得到粗製**24c** (400 mg, 54%)，其無需進一步純化即可直接使用。按照LC-MS方法I，產物在0.43 min時顯示主峰，質量為272.5 (M+H⁺)。

製備**24e**

向**24c** (400 mg, 1.04 mmol)含於10 ml DCM之溶液先後添加TEA (0.434 ml, 3.11 mmol)及**24d** (538 mg, 1.35 mmol)。在室溫下攪拌反應3 hr。在H₂O與DCM之間萃取該反應。合併所有有機物，乾燥，濃縮並經具有8% MeOH/DCM之SiO₂膠純化得到475 mg化合物**24e** (82%產率)。¹H NMR (氯仿-d, 400MHz) d:6.74-6.98 (m, 1H), 5.95-6.13 (m, 1H), 4.55 (dd, J=7.2, 2.4 Hz, 2H), 3.32 (t, J=6.7 Hz, 4H), 3.11 (d, J=5.8 Hz, 2H), 2.30-2.37 (m, 2H), 2.20-2.26 (m, 2H), 1.90 (br. s., 2H), 1.71-1.80 (m, 2H), 1.59-1.71 (m, 4H), 1.51-1.59 (m, 2H), 1.35-1.51 (m, 13H), 1.20-1.35 (m, 13H)

製備**24f**



製備中間物24f2

向24f1 (1.0 g, 4.97 mmol)含於MeOH (40 ml)之溶液先後添加TEA (1.04 ml, 7.45 mmol)及二碳酸二第三丁酯(2.17 g, 9.94 mmol)。在60℃下加熱該反應1.5 hr。濃縮該反應並經具有5% MeOH/DCM之SiO₂管柱純化得到1.2 g化合物24f2 (80%產率)。¹H NMR (氯仿-d, 400MHz) δ:4.51 (br. s, 1H), 3.00-3.22 (m, 2H), 2.37 (t, J=7.4 Hz, 2H), 1.59-1.71 (m, 2H), 1.46 (s, 11H), 1.29 (br. s., 12H)。

製備中間物24f3

向24f2 (1.2 g, 3.98 mmol)含於DCM (30 ml)之溶液先後添加N-羥基琥珀醯亞胺(0.60 g, 5.18 mmol)及EDC (1.0 g, 5.18 mmol)。在室溫下攪拌該溶液過夜。濃縮該反應，直接負載至SiO₂管柱上，並經40%乙酸乙酯/庚烷純化得到1.46 g化合物24f3 (92%產率)。¹H NMR (氯仿-d, 400MHz) δ:4.49 (br. s, 1H), 3.04-3.19 (m, 2H), 2.86 (d, J=4.5 Hz, 4H), 2.62 (t, J=7.4 Hz, 2H), 1.70-1.82 (m, 2H), 1.37-1.53 (m, 13H), 1.30 (br. s., 10H)。

製備中間物24f

向GalNAc3-NH₂ (300 mg, 0.16 mmol)含於DCM (1.5 ml)之溶液先後添加TEA (0.11 ml, 0.79 mmol)及24f3 (188 mg, 0.47 mmol)。在室溫下攪拌反應過夜。然後添加三氟乙酸(1.0 ml)。2 hr後，LC-MS顯示中間物消失。濃縮該反應，並在酸性條件下於開放獲取(open access)HPLC上純化，使用ELSD作為檢測器。收集含產物之HPLC分離份，並蒸發溶劑得到220 mg化合物24f (67%產率)。LC-MS顯示部

分產物丟失一個乙醯基。純化之HPLC條件：管柱：Sunfire 30x100 mm 5 um管柱；有機溶劑：ACN w/ 7.5% TFA；水性溶劑：H₂O w/ 7.5% TFA；流速：75 ml/min。梯度：15-40% H₂O/AcCN；時間：9.5 min，檢測：ELSD (蒸發光散射檢測器)作為檢測器。按照LC-MS方法I，產物在0.83 min時顯示峰，質量為989.9 (M/2+H⁺)。

製備24g

向**24e** (172 mg, 0.31 mmol)含於3 ml DCM之溶液先後添加**24f** (250 mg, 0.12 mmol)及TEA (0.069 ml, 0.50 mmol)。最後添加EDC (95 mg, 0.5 mmol)。在室溫下攪拌反應過夜。濃縮該反應並經具有5% MeOH/DCM之SiO₂管柱純化得到230 mg **24g** (74%產率)。按照LC-MS方法I，產物在1.30 min時顯示峰，質量為1258.2 (M/2+H⁺)。

製備24h

向**24g** (230 mg, 0.091 mmol)含於1 ml THF之溶液添加0.457 ml 4N HCl (含於二噁烷, 1.83 mmol)。在室溫下攪拌反應1 hr。濃縮該反應並經HPLC純化得到50 mg **24h** (23%產率)，其糖上丟失一個乙醯基。純化之HPLC條件：管柱：Sunfire 30x100mm 5 um管柱；有機溶劑：ACN w/ 7.5% TFA；水性溶劑：H₂O w/ 7.5% TFA；流速：75 ml/min。梯度：15-40% H₂O/AcCN；時間：9.5 min，檢測：ELSD (蒸發光散射檢測器)作為檢測器。按照LC-MS方法I，產物在0.95 min時顯示峰，質量為1187.1 (M/2+H⁺)。

製備24i

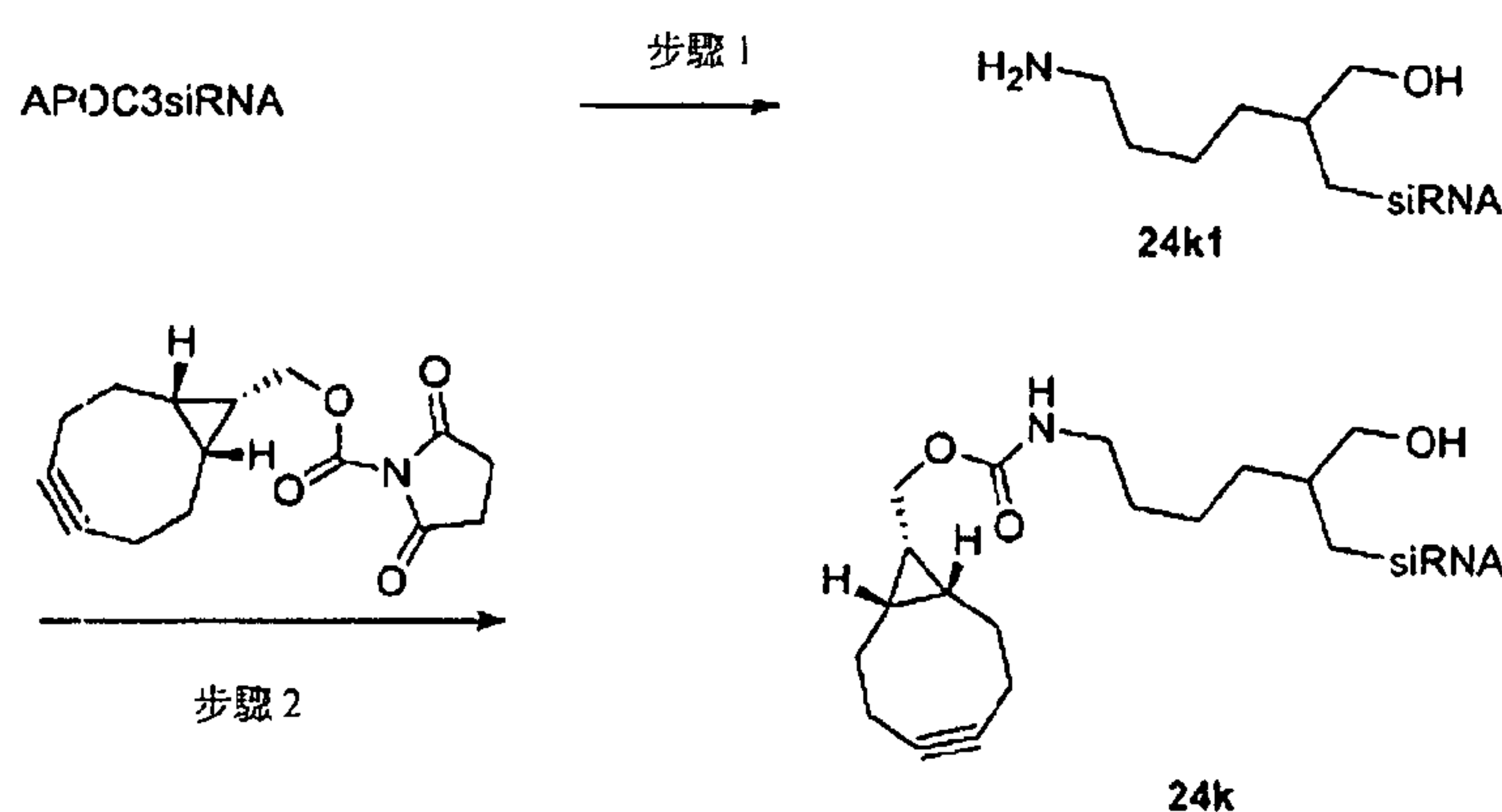
向2,2,13,13-四甲基十四烷二酸 (40 mg, 0.127 mmol)含於2 ml DCM之溶液先後添加N-OH琥珀醯亞胺 (9.81 mg, 0.085 mmol)及EDC (16.34 mg, 0.085 mmol)。在室溫下攪拌該反應過夜。濃縮該反應，並經HPLC純化得到20 mg **24i** (38%產物)。純化之HPLC條件：管柱：Sunfire 30x100 mm 5 um管柱；有機溶劑：ACN w/ 7.5% TFA；水性溶

劑：H₂O w/ 7.5% TFA；流速：75 ml/min。梯度：45-70% H₂O/AcCN；時間：9.5 min，檢測：ELSD (蒸發光散射檢測器)作為檢測器。按照LC-MS方法I，產物在1.55 min時顯示峰，質量為434.3 (M+Na⁺)。

製備24j

向**24h** (20 mg, 8.05 μmol)含於0.5 ml DCM之溶液先後添加TEA (4.5 μL, 32 μmol)及**24i** (6.62 mg, 16 μmol)及DMAP (3.93 mg, 32 μmol)。在室溫下攪拌反應過夜。然後添加0.5 ml 2N MeNH₂/MeOH進行去保護。又在室溫下攪拌反應過夜。濃縮該反應，添加丙酮，以使產物沈澱，並移除過量試劑及脂質得到12 mg **24j** (64%產率)。按照LC-MS方法I，產物在0.69 min時顯示峰，質量為1166.9 (M/2+H⁺)。

製備24K



步驟1：

APOCIII siRNA [基因APOCIII (亦稱為APOC3或Apoc 3)之siRNA，利用此項技術中已知之習知方法合成]：

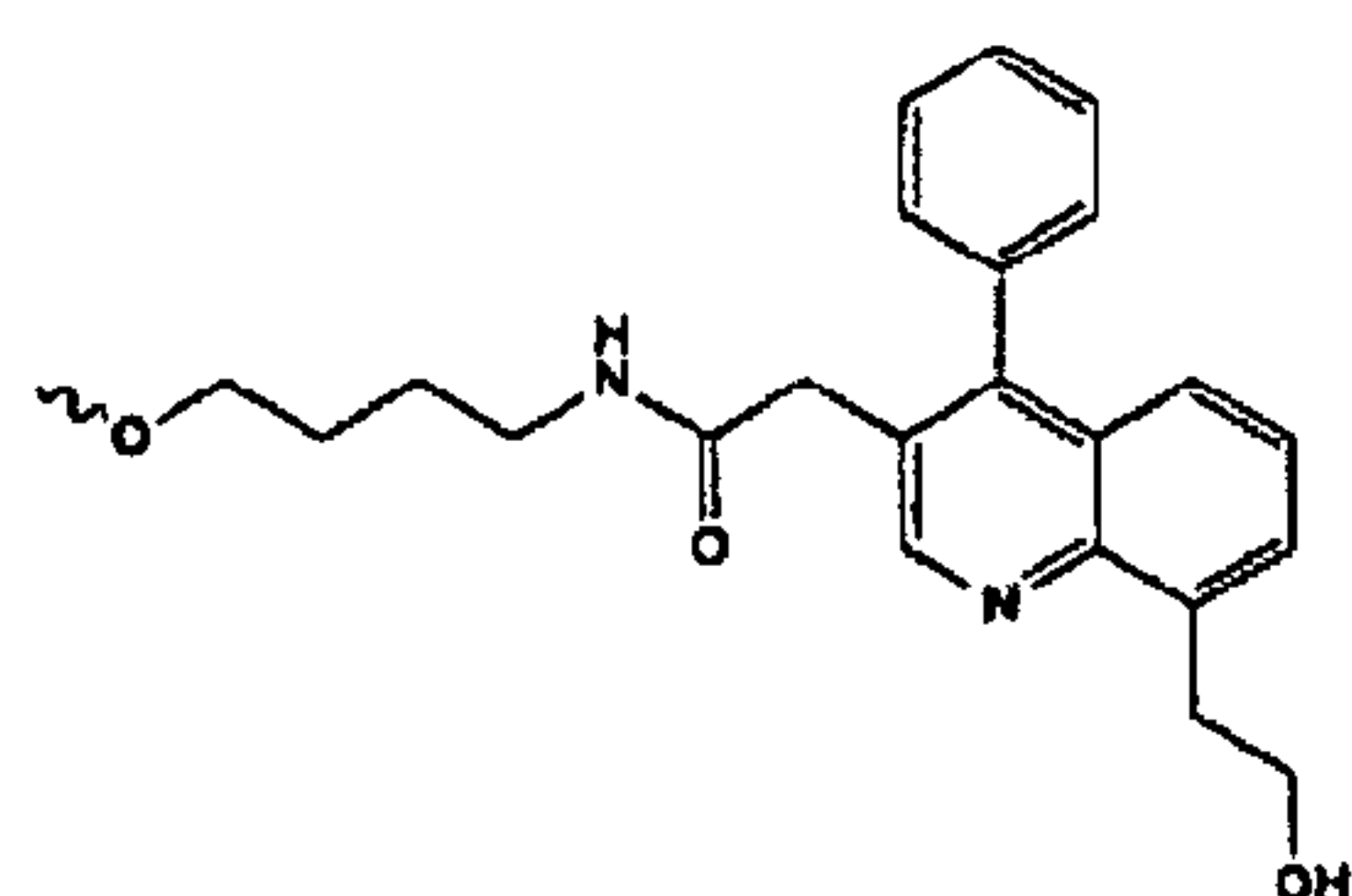
使寡核苷酸黏著

一般程序：

簡單地使各寡核苷酸顆粒在離心機中向下旋轉，並以高濃度(1-10 OD₂₆₀/100 mL緩衝液)溶解於Duplex緩衝液(100 mM乙酸鉀；30 mM HEPES, pH 7.5)中。可利用加熱(上至94℃)及渦旋混合促進再懸

浮。然後以等莫耳量一起添加正義及反義鏈。然後將混合寡核苷酸加熱至94℃，並逐漸冷卻。就具有明顯二級結構之序列而言，可採用更平緩冷卻/黏著步驟。此係簡單地將寡聚溶液置於水浴或加熱塊中，並拔出機器電源插頭/關機完成。所得產物將呈穩定雙鏈形式，且可儲存在4℃下或冷凍。

APOCIII siRNA之反義鏈包含APOCIII序列，其中該鏈之3'端以磷酸結束，且另外以5'至3'之次序包含核糖醇、另一磷酸及3'端帽X058，一種具有下式之非核苷酸3'端帽：



正義鏈包含與該反義鏈互補之APOCIII序列，其中該鏈之3'端以磷酸結束，且另外以5'至3'之次序包含核糖醇、另一磷酸及3'端帽C6OH，一種具有下式之非核苷酸3'端帽：



APOCIII siRNA與2-二甲氧基三苯甲氧基甲基-6-苄基甲氧基羰基胺基-己烷-1-琥珀醯基-長鏈烷基胺基-CPG (Glen Research Catalog No 20-2957)反應產生產物**24k1**。

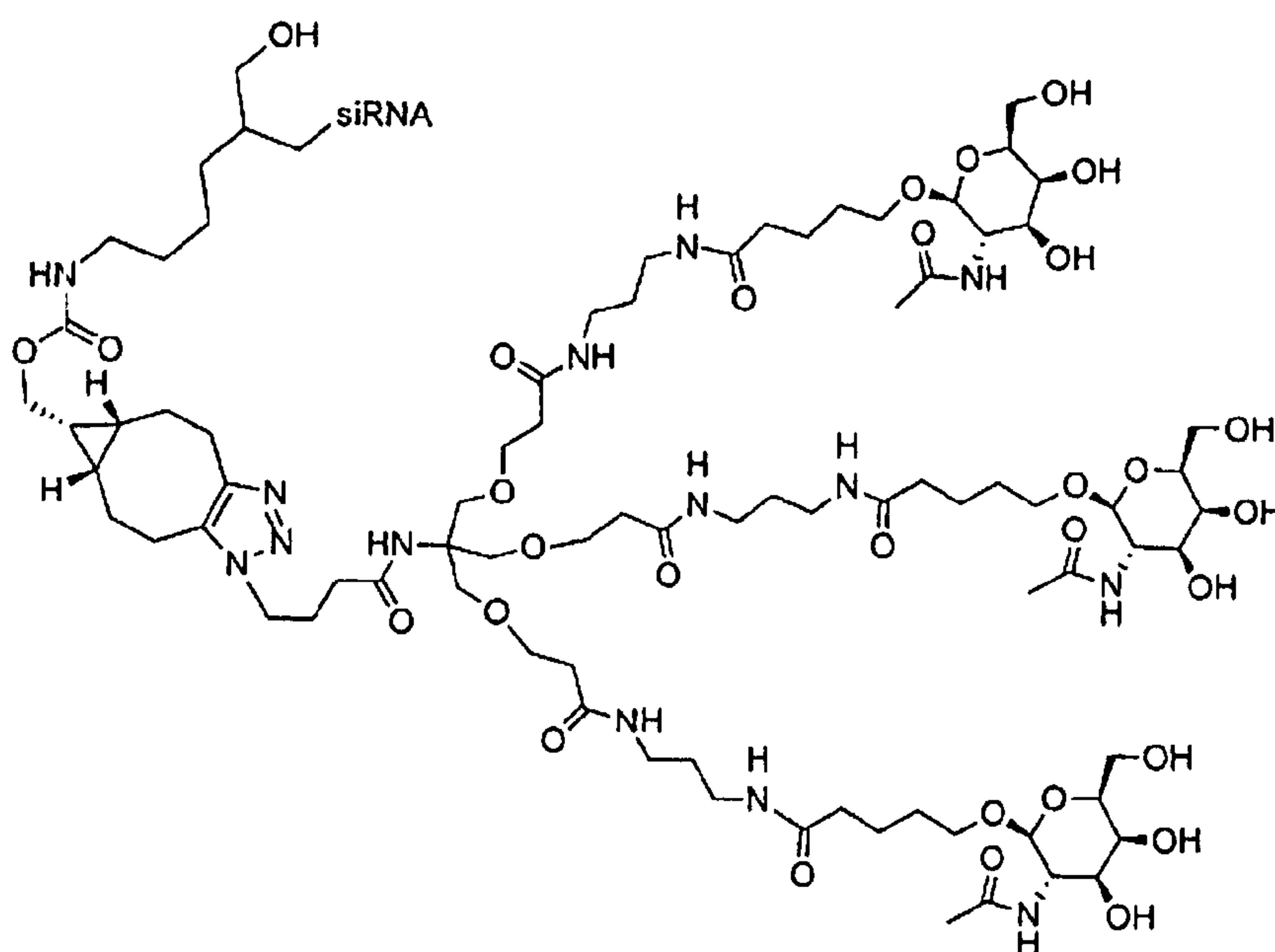
步驟2

將APOCIII siRNA (**24k1**：401 μL，11.2 mM含於H₂O，4.49 μmol)與401 μl DMF混合得到澄清溶液。然後先後添加TEA (180 μl，0.25 M含於DMF，45 μmol)及BCN-NHS ((1R,8S,9s)-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基N-琥珀醯亞胺碳酸酯) (9.16 mg，31 μmol)。在室溫下攪拌反應1 hr。用H₂O將該反應稀釋至10 ml，並用乙酸乙酯萃取3次。分離水層並濃縮至約5 ml，並經PD-10脫鹽管柱(GE healthcare)純化。

製備 24

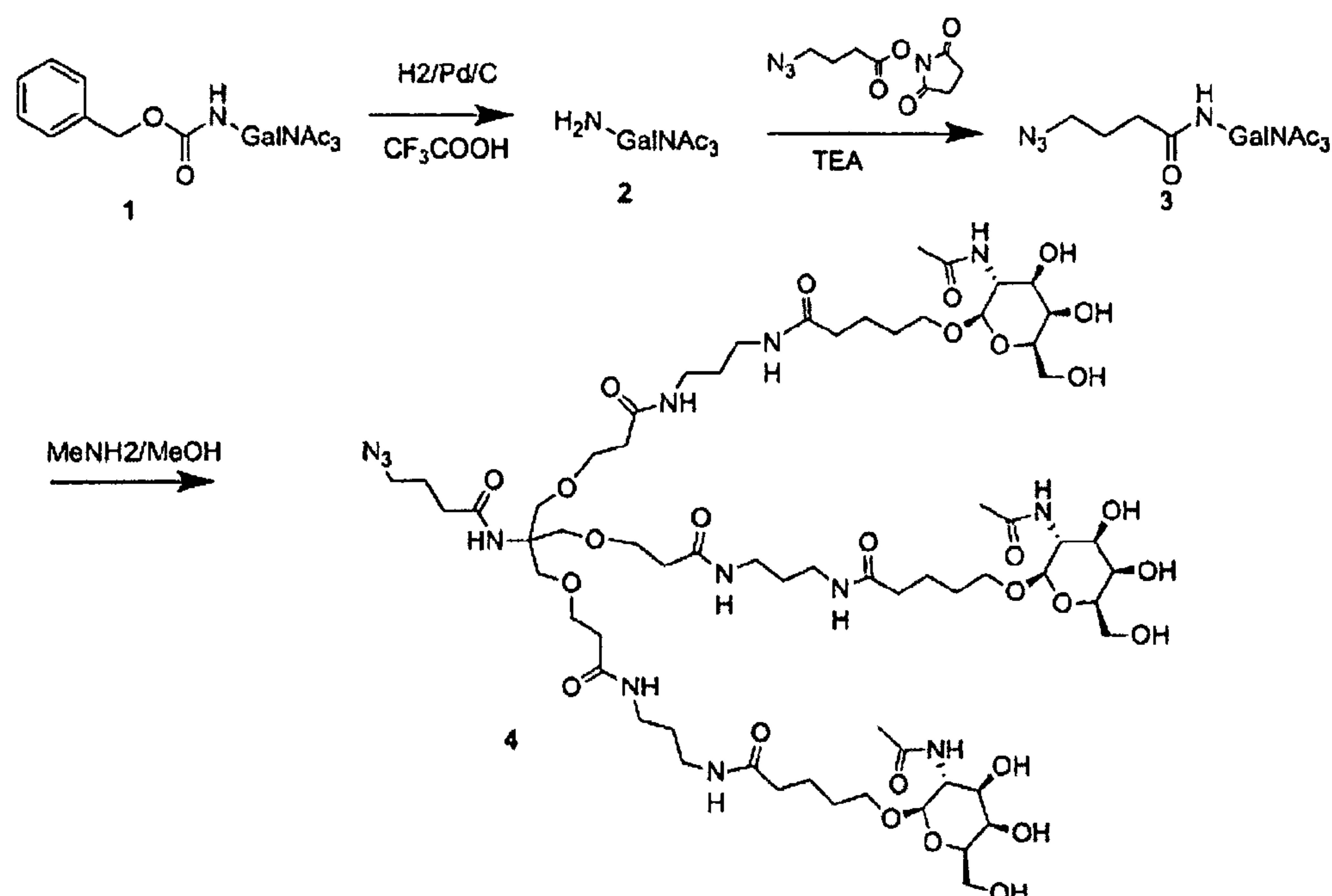
將 **24j** (5.8 mg, 2.5 μmol) 添加至 105 μl 化合物 **24k** (Apoc 3 siRNA 9.5 mM 含於 H_2O , 0.993 μmol) 中。1 hr 後，該反應變得黏稠。所以另外添加 60 μl H_2O ，並在室溫下攪拌該反應過夜。用 H_2O 稀釋反應，並經 HPLC 純化得到 5 mg 共軛物 **24** (57% 產率)。純化之 HPLC 條件：管柱：Xselect Prep 苯基己基 5 μm OBD 19x50 mm；有機溶劑：經 100 mM TEA.HOAc 修飾之 AcCN；水性溶劑：經 100 mM TEA.HOAc 修飾之 H_2O ；梯度：5-50% AcCN/ H_2O ；時間：10 min。按照 LC-MS 方法 H，產物在 5.96 min 時顯示峰，在解迴旋後之期望質量為 8896。

參考實例 3：與 GalNAc 共軛之 siRNA



根據實例 24 之程序製備參考實例 3 (用 GalNAc3-N3 (下文) 置換 **24j**)。

製備 GalNAc3-N3



製備中間物2

將化合物1 (2.06 g, 1.07 mmol)溶解於20 ml乙醇中，先後添加TFA (82 μ l, 1.07 mmol)及10% Pd/C (0.114 g, 0.11 mmol)。該反應在H₂氣球下處理6小時。過濾反應，用乙醇清洗，並濃縮得到白色固體，其可直接用於下一步驟中。按照LC-MS方法I，產物在0.81 min時顯示峰，質量為898.5 (M/2+H⁺)。

製備中間物3

將化合物2 (4.848 g, 0.479 mmol)溶解於10 ml無水DMF中，先後添加2,5-二側氧基吡咯啶-1-基-4疊氮基丁酸酯(0.325 g, 1.436 mmol)及DIPEA (0.418 ml, 2.394 mmol)。該反應在室溫下反應過夜。在不加熱下濃縮該反應，直接負載至經預先平衡之SiO₂管柱上，並經0-20%甲醇/DCM分級梯度純化得到2.383 g化合物3 (49.25%產率)。

按照LC-MS方法I，產物在1.27 min時顯示峰，質量為953.7 (M/2+H⁺)。

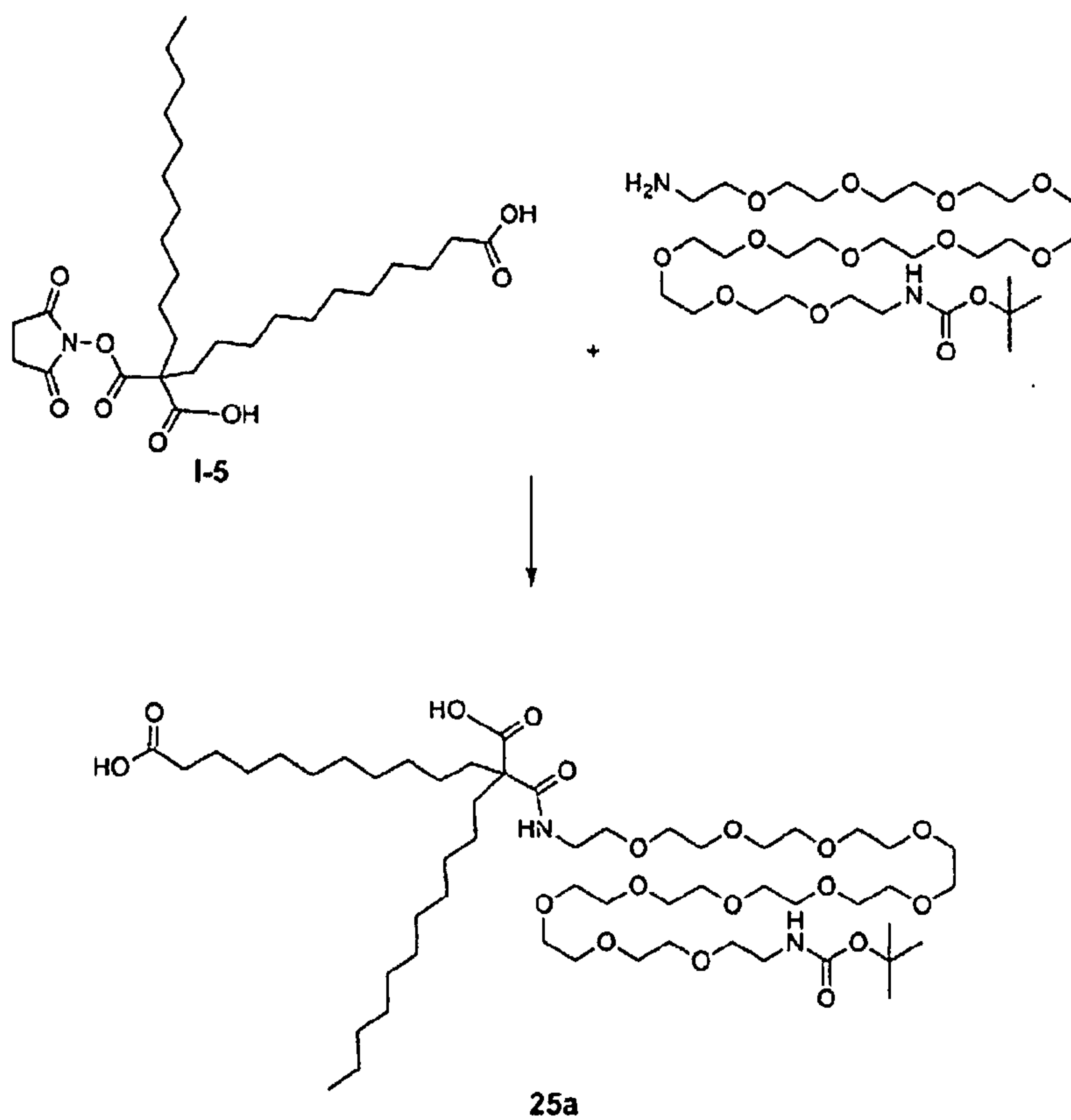
製備中間物4

混合化合物3 (1.33 g, 0.70 mmol)與MeNH₂ (17.45 ml, 2.0 M含

於甲醇，34.9 mmol)。在室溫下攪拌該反應2 hr。LC-MS僅顯示產物峰。濃縮該反應。然後再將固體溶解於乙醇中，並用丙酮沈澱得到1.0 g化合物4 (94%產率)。按照LC-MS方法I，產物在0.53 min時顯示峰，質量為764.5 (M/2+H⁺)。

實例 25：載體蛋白 (CRM197) 與脂肪酸之共軛作用

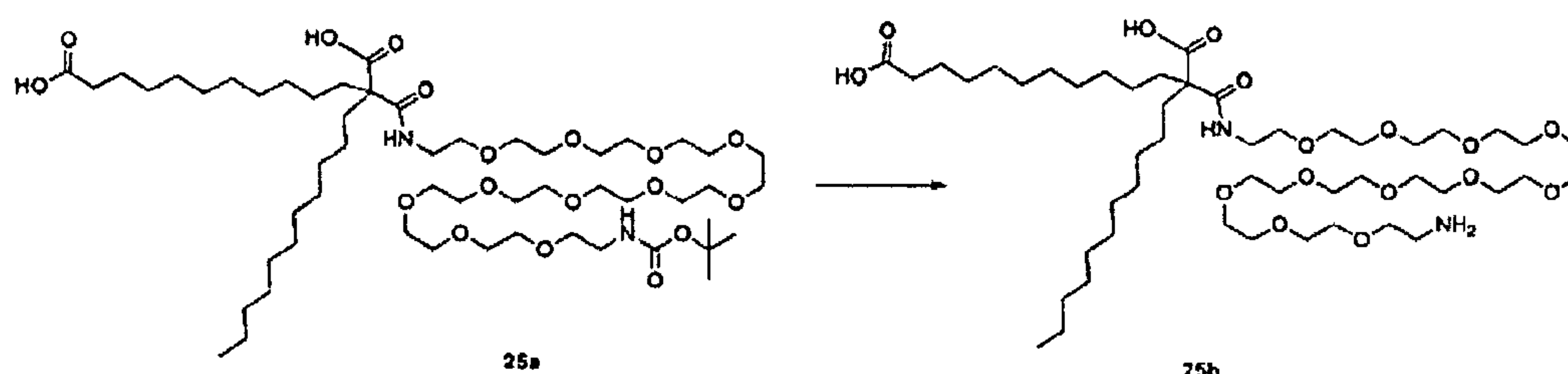
步驟 1 : 2-((2,2-二甲基-4-側氧基-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-十二氧雜-5-氮雜四十烷-40-基)胺甲醯基)-2-十一基十三烷二酸(25a)。



將第三丁氧羰基-N-醯胺基-dPEG®₁₁-胺(100 mg, 0.155 mmol, Quanta Biodesign)及中間物5 (80 mg, 0.148 mmol)溶解於THF (3 mL)中，並在室溫及氮氣下攪拌。30分鐘後，添加DIPEA (0.05 mL, 0.286 mmol)，並在室溫下攪拌反應混合物過夜。藉由LCMS (酸性溶離液A：水+ 0.05%三氟乙酸，溶離液B：ACN，管柱Sunfire C18 3.5µm 3.0x30mm -40°C，5-95%梯度2分鐘，滯留時間1.92 min)觀察到

完全轉化。在減壓下濃縮反應混合物，然後溶解於約1.5 mL乙腈中。在MS-觸發之HPLC (Sunfire 30x50 mm 5um管柱ACN/H₂O w/ 0.1%TFA 75 ml/min注射1.5 ml，65-95% ACN 3.5 min梯度，滯留時間3.23分鐘)上純化，並合併溶離份，並凍乾得到85 mg清潔產物，產率為54%。澄清油。LCMS：方法D Rt= 1.18 min，M+H 1070.1；¹H NMR (400 MHz，乙腈-*d*₃) δ ppm 0.82-1.03 (m, 1 H) 1.11-1.37 (m, 10 H) 1.37-1.51 (m, 2 H) 1.51-1.64 (m, 1 H) 1.69-1.82 (m, 1 H) 1.90-2.04 (m, 66 H) 2.05-2.21 (m, 8 H) 2.21-2.42 (m, 1 H) 3.17-3.28 (m, 1 H) 3.40-3.68 (m, 13 H)。

步驟2：2-((35-胺基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十一氧雜三十五基)胺甲醯基)-2-十一基十三烷二酸(25b)。

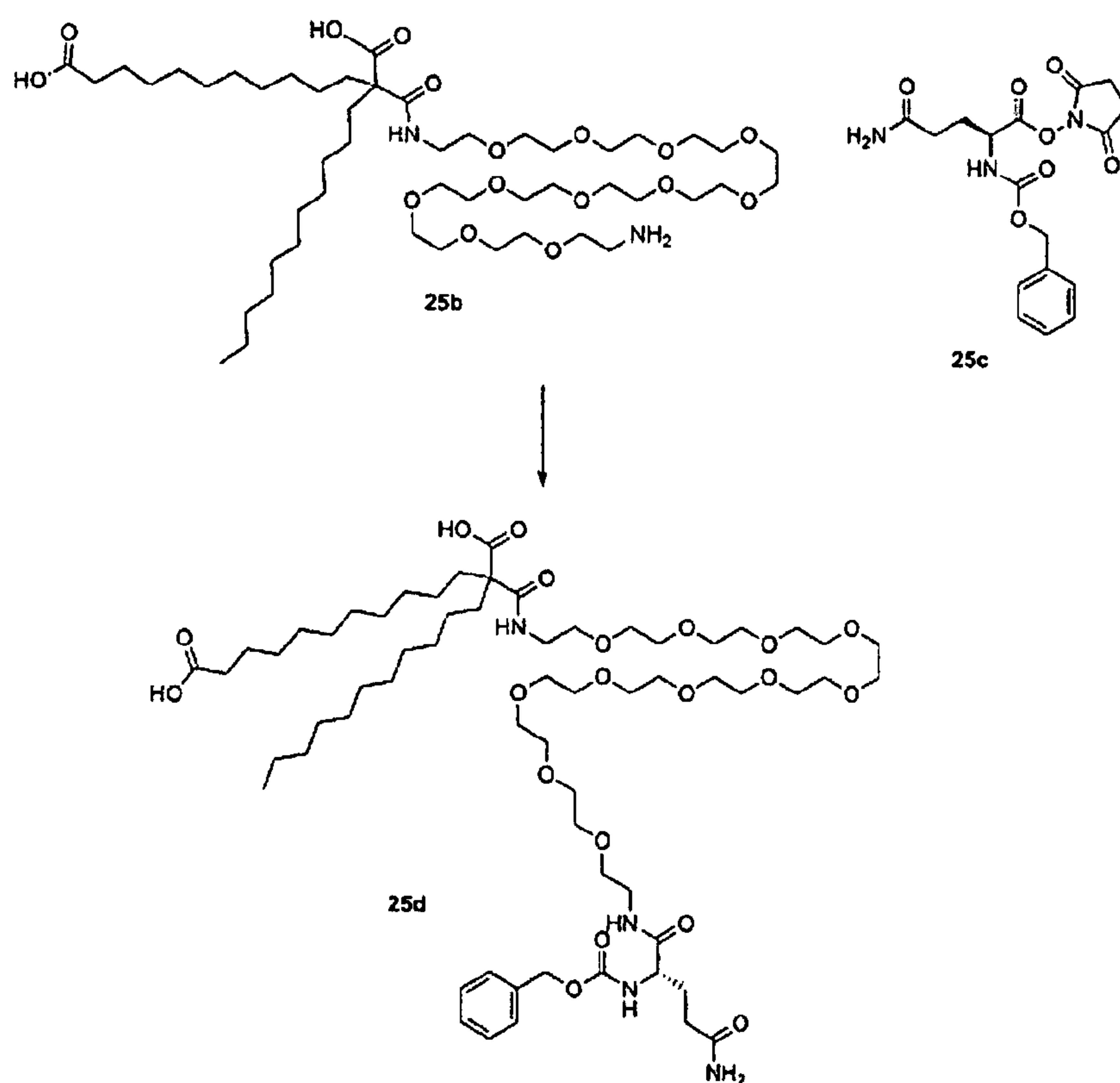


將**25a** (5 mg，4.68 μmol)溶解於DCM (體積：2 mL)中，然後添加三氟乙酸(25 μl，0.324 mmol)。在室溫下及氮氣氛下攪拌反應混合物約2小時。藉由LCMS (酸性溶離液A：水+ 0.05%三氟乙酸，溶離液B：ACN，管柱Sunfire C18 3.5μm 3.0x30mm -40℃，5-95%梯度2分鐘，滯留時間1.45 min)觀察到完全轉化。在減壓下濃縮反應混合物，然後用DCM沖洗，並再濃縮三次。溶解於乙腈與DMSO之混合物中。在MS-觸發之HPLC (Sunfire 30x50 mm 5 um管柱ACN/H₂O w/ 0.1%TFA 75 ml/min注射1.5 ml，45-70% ACN 3.5 min梯度，滯留時間2.50分鐘)上純化，並合併溶離份，並凍乾得到2.5 mg清潔產物，產率為55%。澄清油。

方法A Rt = 1.45 min，M+H 969.9；¹H NMR (400 MHz，乙腈-*d*₃)

δ ppm 0.62-0.91 (m, 2 H) 0.91-1.10 (m, 3 H) 1.10-1.31 (m, 18 H) 1.46 (quin, $J=7.21$ Hz, 2 H) 1.59-1.89 (m, 35 H) 1.94-2.09 (m, 1 H) 2.16 (t, $J=7.40$ Hz, 2 H) 2.97-3.11 (m, 1 H) 3.24-3.37 (m, 1 H) 3.37-3.61 (m, 28 H) 3.61-3.89 (m, 2 H) 7.85 (br. s., 1 H)。

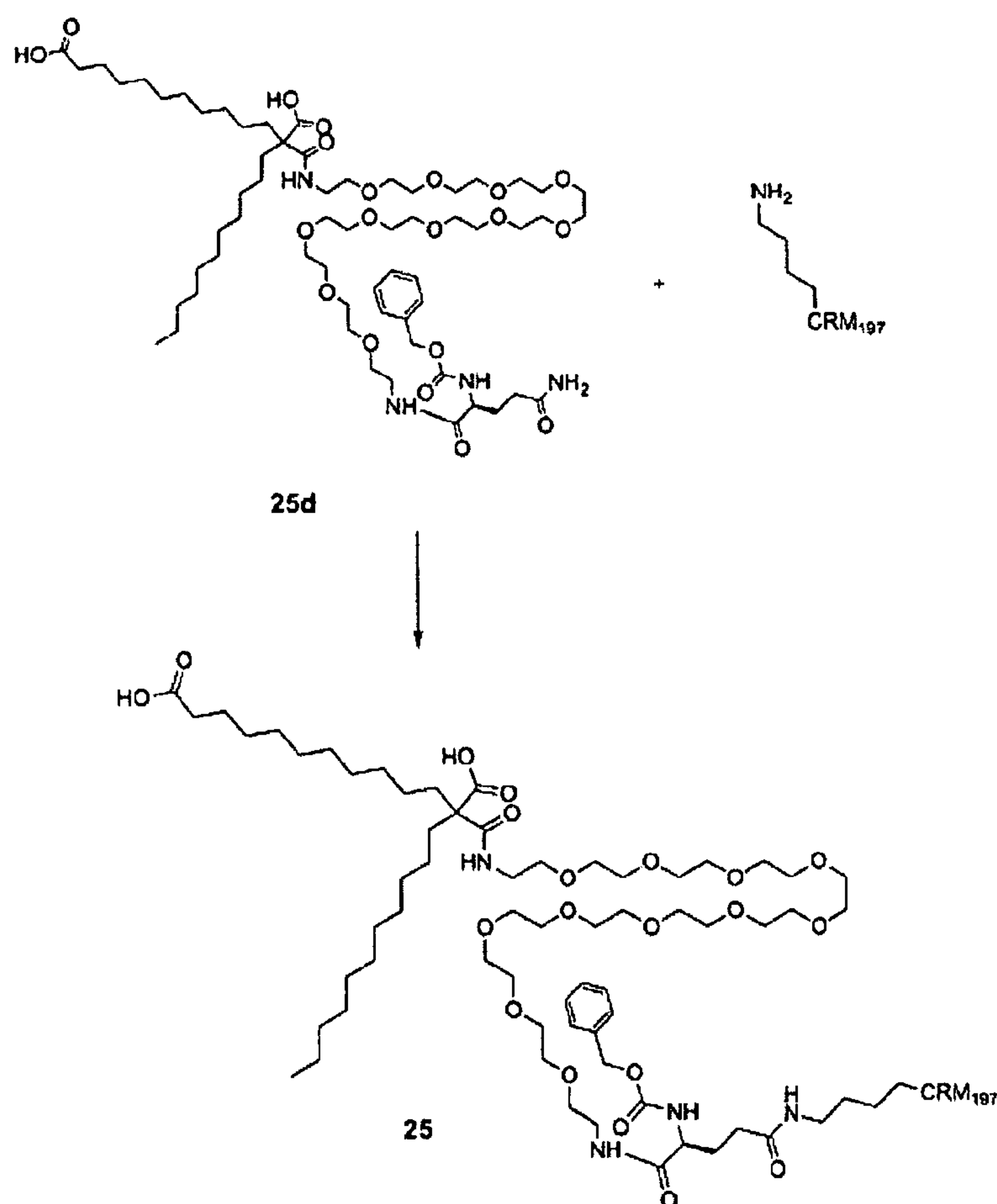
步驟3：2-(((S)-5-(3-胺基-3-側氧基丙基)-3,6-二側氧基-1-苯基-2,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-十二氧雜-4,7-二氮雜四十二烷-42-基)胺甲醯基)-2-十一基十三烷二酸(25d)。



將**25b** (20 mg, 0.018 mmol)含於THF (體積：2 mL)之溶液添加至Z-L-Gln-Osu **25c** (Santa Cruz Biotechnology, CAS 34078-85-8, 11 mg, 0.029 mmol)中，然後添加DIPEA (75 μ l, 0.429 mmol)。在室溫及氮氣氛下攪拌度過週末。藉由LCMS (酸性溶離液A：水+ 0.05%三氟乙酸，溶離液B：ACN，管柱Sunfire C18 3.5 μ m 3.0x30mm -40 $^{\circ}$ C，5-95%梯度2分鐘，滯留時間1.77 min)觀察到完全轉化。在減壓下濃縮反應混合物，然後溶解於乙腈中。在MS-觸發之HPLC (Sunfire 30x50

mm 5 μ m管柱ACN/H₂O w/ 0.1%TFA 75 ml/min注射1.5 ml, 55-80% ACN 3.5 min梯度, 滯留時間2.70分鐘)上純化, 並合併溶離份, 並凍乾得到10.5 mg呈無色澄清油之清潔產物, 產率為46%。方法C Rt = 1.60 min, M+H 1232.4; ¹H NMR (400 MHz, 乙腈-*d*₃) δ ppm 0.67-0.93 (m, 2 H) 0.93-1.10 (m, 2 H) 1.10-1.32 (m, 15 H) 1.45 (quin, *J*=7.24 Hz, 1 H) 1.59-1.69 (m, 1 H) 1.75-1.93 (m, 30 H) 1.94-2.21 (m, 20 H) 3.23 (quin, *J*=5.26 Hz, 1 H) 3.28-3.51 (m, 23 H) 3.95 (td, *J*=7.73, 5.44 Hz, 1 H) 4.92-5.22 (m, 1 H) 5.78 (br. s., 1 H) 6.13-6.42 (m, 1 H) 6.88 (br. s., 1 H) 7.20-7.36 (m, 2 H) 7.42 (t, *J*=5.07 Hz, 1 H)。

步驟4：mTGase-介導CRM197之以脂肪酸(實例25)標記：



向**25d**含於100 mM tris緩衝液pH 8 (8 mg/mL, 203 μ L, 1.316 μ mol)之溶液先後添加CRM197 (33 mg/mL, 1.515 μ L, 0.00086 μ mol)及轉麩醯胺酸酶(味之素)含於PBS (50 mg/mL, 0.455 μ L, 0.00060

μmol)之溶液中。在室溫下攪拌該反應16小時。用10 kDa MWCO Amicon離心過濾器，藉由稀釋及濃縮反應5次至100 μL之體積，使該反應混合物交換進入100 mM tris緩衝液pH 8。LCMS分析顯示轉化為+1、+2、+3及+4產物。LCMS QT2；蛋白質_35-70 kDa_3 min：R_t = 1.45 min；MS [M+25d]：觀測值：59625，計算值：59624；MS [M+(2 x 25d)]：觀測值：60839，計算值：60838；MS [M+(3 x 25d)]：觀測值：62054，計算值：62052；MS [M+(4 x 25d)]：觀測值：63270，計算值：63266。

CRM197序列：

GADDVVDSSK SFVMENFSSY HGTKPGYVDS IQKGIQKPKS GTQGNYDDDW
KEFYSTDNKY DAAGYSVDNE NPLSGKAGGV VKVTYPGLTK VLALKVDNAE
TIKKELGLSL TEPLMEQVGT EEFIKRFGDG ASRVVLSLPF AEGSSSV EYI
NNWEQAKALS VELEINFETR GKRGQDAMY EYMAQACAGNR VRRSVGSSLS
CINLDWDVIR DKTKTKIESL KEHGPIKNKM SESPNTVSE EKAKQYLEEF
HQTALEHPEL SELKTVTGTN PVFAGANYAA WAVNVAQVID SETADNLEKT
TAALSILPGI GSVMGIADGA VHHNTEEIV QSIALSSLMV AQAIPLVGEL
VDIGFAAYNF VESIINLFQV VHNSYNRPAY SPGHKTQPF HDGYAVSWNT
VEDSIIRTGF QGESGHDIKI TAENTPLPIA GVLLPTIPGK LDVNKSKTHI
SVNGRKIRMR CRAIDGDVTF CRPKSPVYVG NGVHANLHVA FHRSSSEKIH

標記度	計算值	觀測值	%	R _t (min)
CRM197	58410	n/a	0	n/a
CRM197 +1 25d	59624	59625	14	1.45
CRM197 +2 25d	60838	60839	23	1.45
CRM197 +3 25d	62052	62054	35	1.45
CRM197 +4 25d	63266	63270	28	1.45

肽定位實驗概述：

肽定位消化作用：用20 mM DTT使5 μg經修飾CRM197及陽性對照CRM197樣本還原，並在26℃下以1/30 (w/w)酶/蛋白質用胰蛋白酶消化過夜。在26℃下進一步用GluC酶，以1/20酶/蛋白質比率消化經胰蛋白酶消化之蛋白質之一等分式樣4 hr；注意，所有酶均購自Roche Diagnostics (Gmbh, Germany)。

逆相LC-MS/MS分析：藉由液相層析電灑串聯式質譜法(LC-ESI

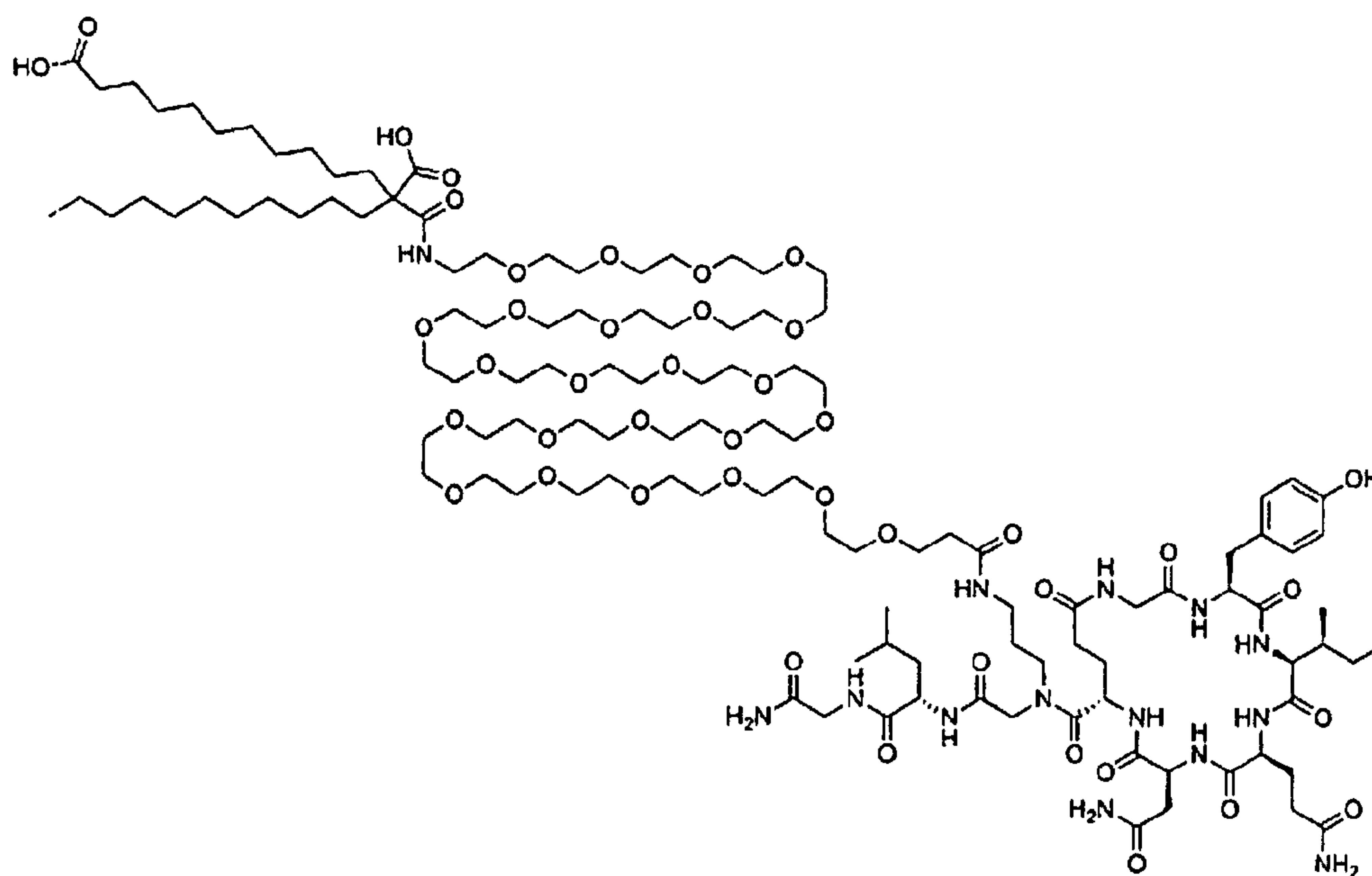
MS/MS)在耦合至Agilent CapLC (Santa Clara, CA)之Thermo LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA)上分析所得經消化肽。在40℃下負載約10-15皮莫耳CRM對照及經修飾CRM197消化物於管柱(Waters Acuity BEH C18, 1.7 μ m, 1x100 mm管柱)。以10 μ L/min運行80 min總梯度，在0-1 min開始，4% B，在1.1 min時增加至7% B，在55 min時為45% B，然後在63 min時為95% B，隨後清洗並進行管柱平衡。質譜儀參數包括用FTMS，以30000解析度自m/z 300至2000之全掃描事件，持續30 ms。在離子阱分析儀中對強度前七位離子(不包括1+離子)進行碰撞誘導之解離MS/MS，以500 (就所有事件而言)信號強度閾值計數活化，持續30 ms。

數據分析及數據庫搜索：所有質譜均在Qual Browser V 2.0.7 (Thermo Scientific)中處理。用MS DeconTools (R.D. Smith Lab, PPNL)生成Mascot通用文件(mgf)，並用Mascot V2.3.01 (Matrix Science Inc., Boston, MA)數據庫搜索，比對所提供添加至內部(in-house)自定義數據庫之蛋白質序列及用於污染蛋白質之SwissProt數據庫(具有513,877條序列之V57)進行搜索。搜索參數包括：酶：半胰蛋白酶(semi-trypsin)或胰蛋白酶/Glu-C，至多允許存在三次失誤裂解；可變修飾：將預期質量之小分子(362.147787 Da及463.206698 Da) (稱為「CRM Tgase +炔烴 362Da mod (CKR)、CRM Tgase +炔烴 362Da mod (N-端)、CRM Tgase+疊氮化物463Da mod (CKR)、CRM Tgase+疊氮化物463Da mod (N-端)」)添加至數據庫；肽容差： ± 20 ppm；MS/MS容差： ± 0.6 Da。在離子上完成序列覆蓋率及小分子修飾評估，得分具有>95%置信度。然後選擇得分高的肽離子，使用Qual Browser進行人工MS/MS分析。

根據上述定位實驗可確定發生離胺酸修飾之位置。根據2014年7月11日申請之美國申請案號US 2015/0017192(代理人檔案號

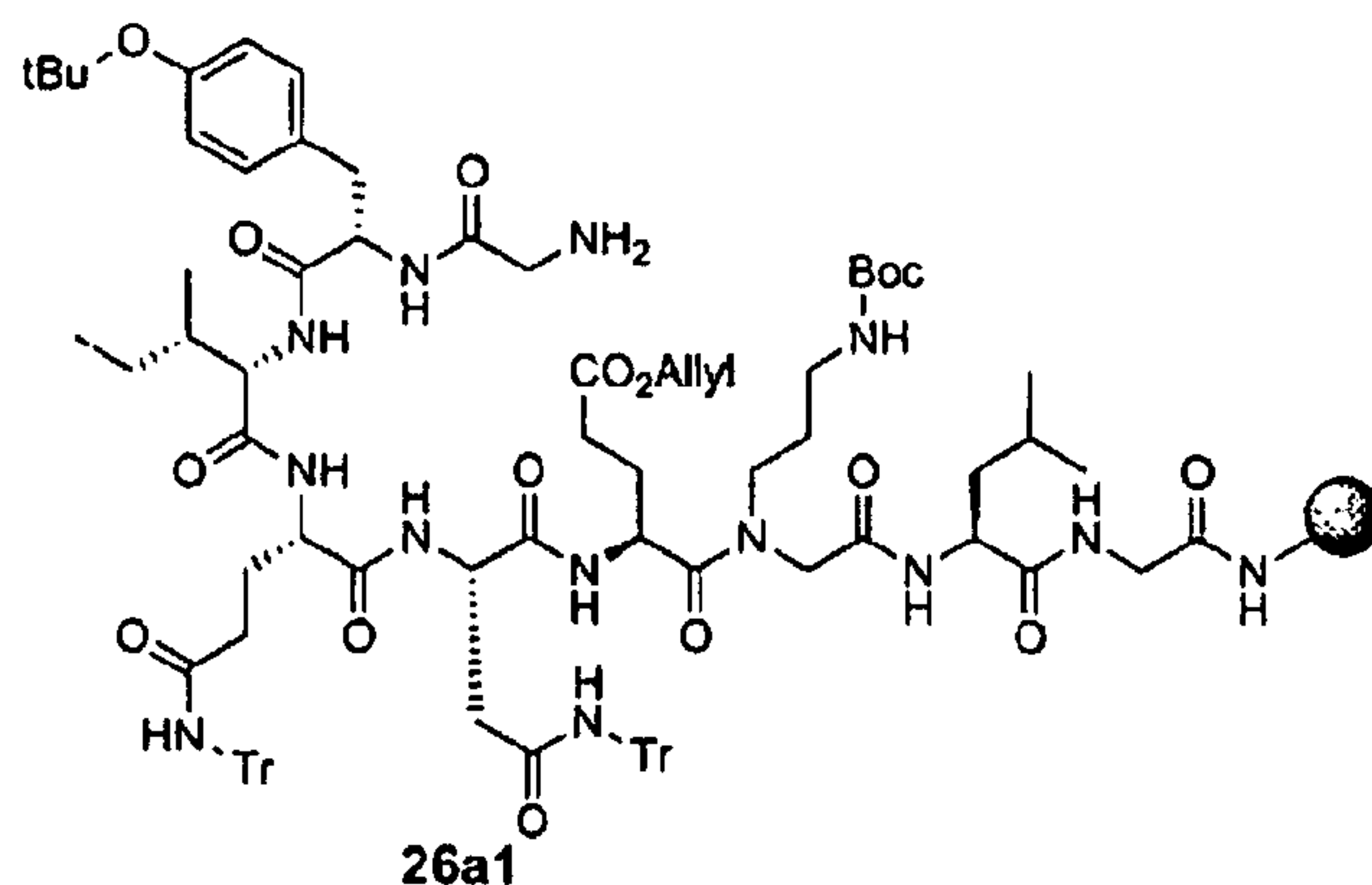
PAT055641-US-NP)中針對CRM197所述之類似共軛作用，吾人推斷修飾發生在Lys37或Lys39、Lys33及Lys440上。

實例26A：催產素衍生物與脂肪酸之共軛作用



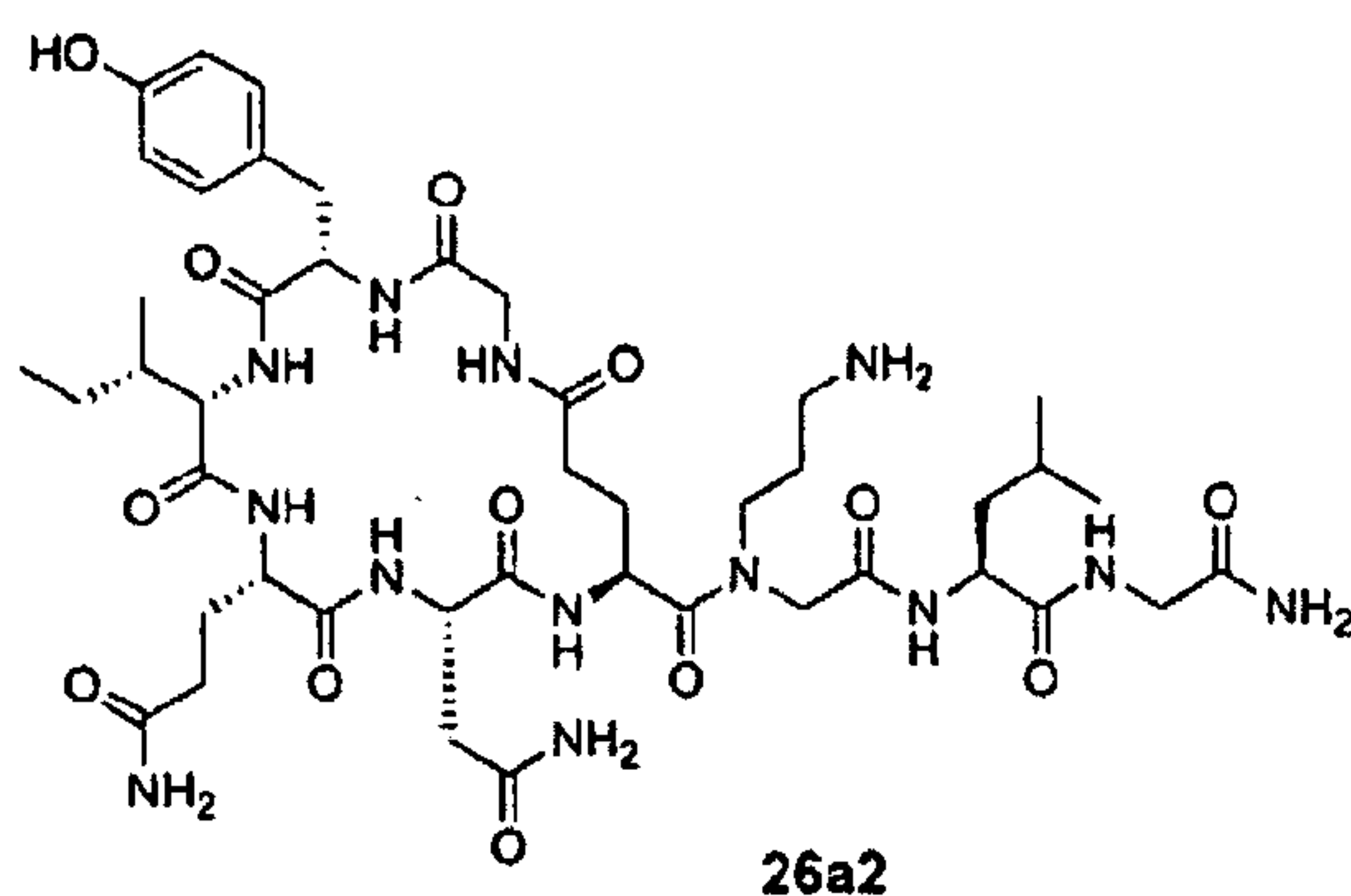
催產素FA共軛物

步驟1：在樹脂上製備受保護催產素



在樹脂上藉由與實例21B步驟1類似之方式合成催產素之受保護形式(**26a1**)。

步驟2：烯丙基去保護作用、環化作用、自樹脂裂解

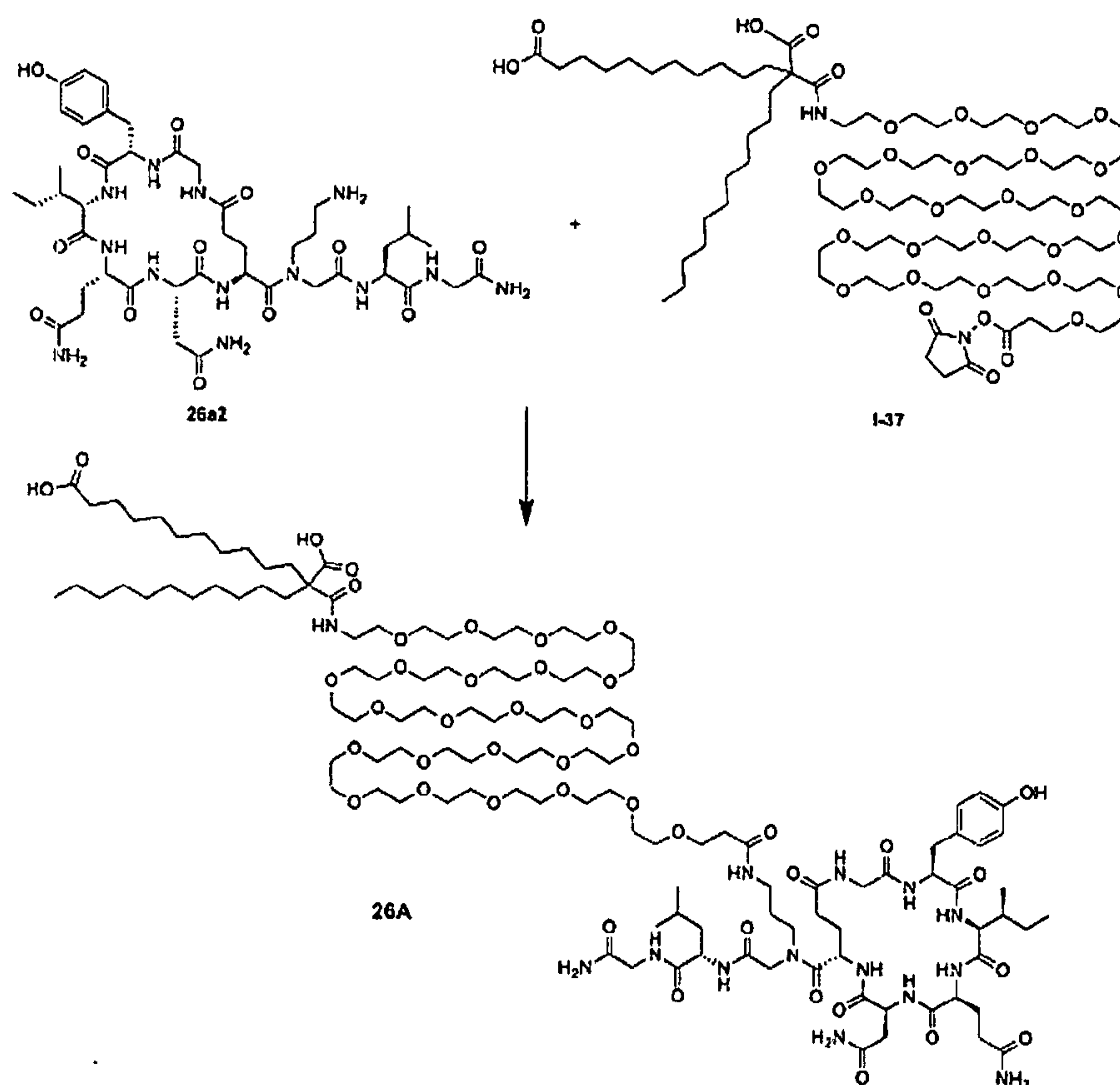


將受保護之中間物(**26a1**) (0.2 mmol)溶解於6 ml含苯基矽烷(1 mmol)及Pd(PPh₃)₄ (0.02 mmol)之DCM中。在此溶液中攪動該樹脂15分鐘，然後過濾。用含於DCM之苯基矽烷/Pd(PPh₃)₄溶液重複此程序兩次。最後一次攪動後，過濾樹脂，並用NMP (3次)、DCM (3次)、0.5% DIEA/DCM (3次)及最後用NMP (3次)清洗。在真空中乾燥所得經清洗樹脂。將一份乾燥樹脂(約0.1 mmol)溶解於PyBOP (0.2 mmol)、HOBt (0.4 mmol)及DIEA (0.5 mmol)含於6 mL NMP之溶液中。在室溫下攪動此反應20小時。過濾樹脂，並用EtOAc (3次)及DCM (3次)清洗。然後將樹脂溶解於4 mL 95/2.5/2.5 TFA/TIPS/H₂O中，並攪動2小時。然後將TFA/TIPS/H₂O溶液過濾至冷(<-20°C) Et₂O中，以沈澱出裂解肽。離心後，倒出Et₂O，並用Et₂O清洗灰白色殘餘物，並再次離心。在N₂下乾燥所得灰白色固體過夜。在質量觸發之製備型HPLC (Waters Autopure HPLC系統；Sunfire C18 30x50 mm 5 um管柱；流動相：7.5-20% ACN含於水中，5 min梯度，75 mL/min，經0.1% TFA修飾)上純化此固體。合併對應中間物(**26a2**)之溶離份，冷凍及凍乾得到白色固體(13.5 mg, 14%)。HRMS-分析方法G：R_t = 0.90 min，MS m/z 988.5225 [M+H]⁺。

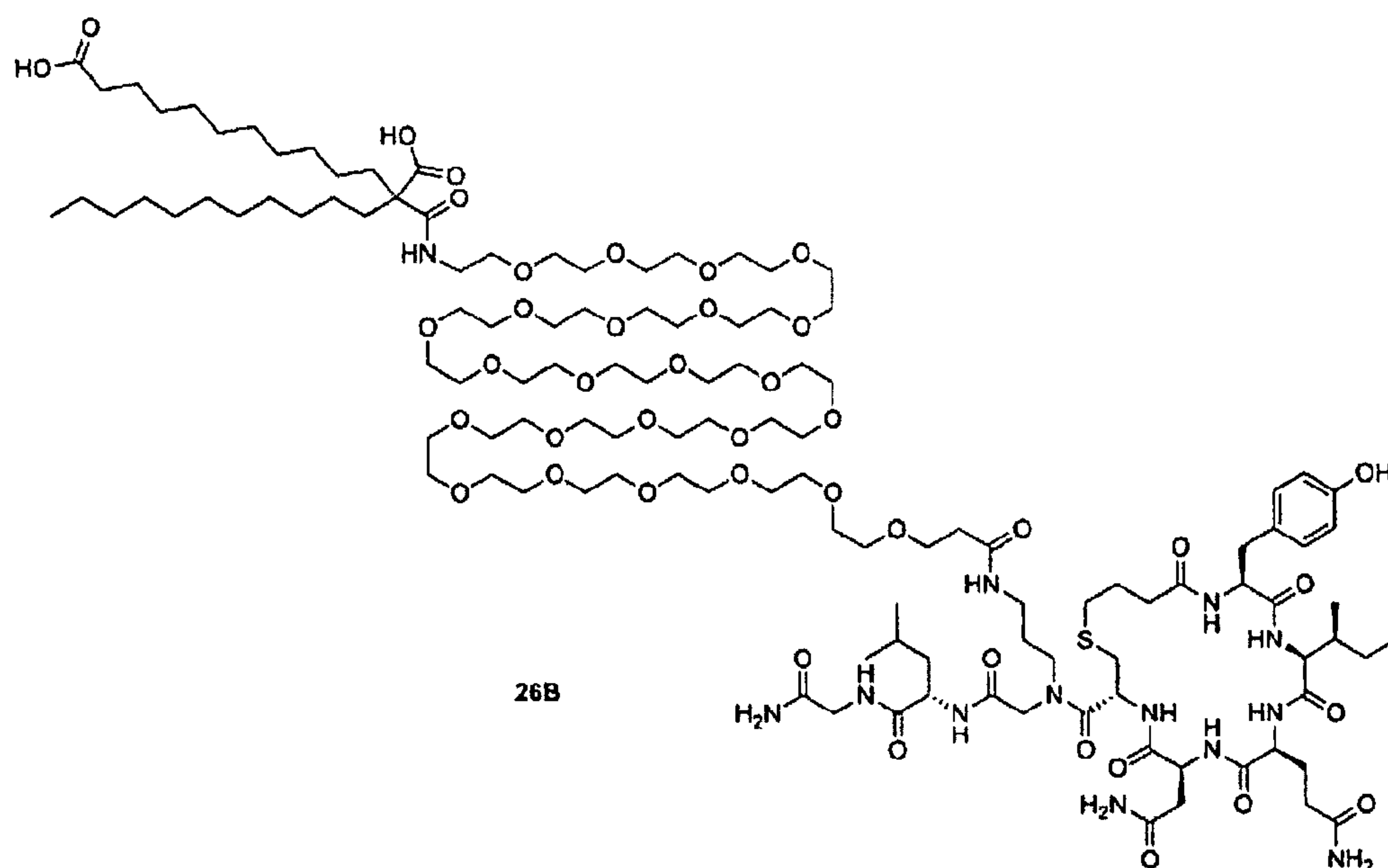
步驟3：共軛至脂肪酸

向中間物(**26a2**) (2.82 μmol)含於0.5 mL pH = 6.40磷酸鹽緩衝液之溶液添加**I-37** (8.39 μmol)含於0.5 mL pH = 6.40磷酸鹽緩衝液之溶

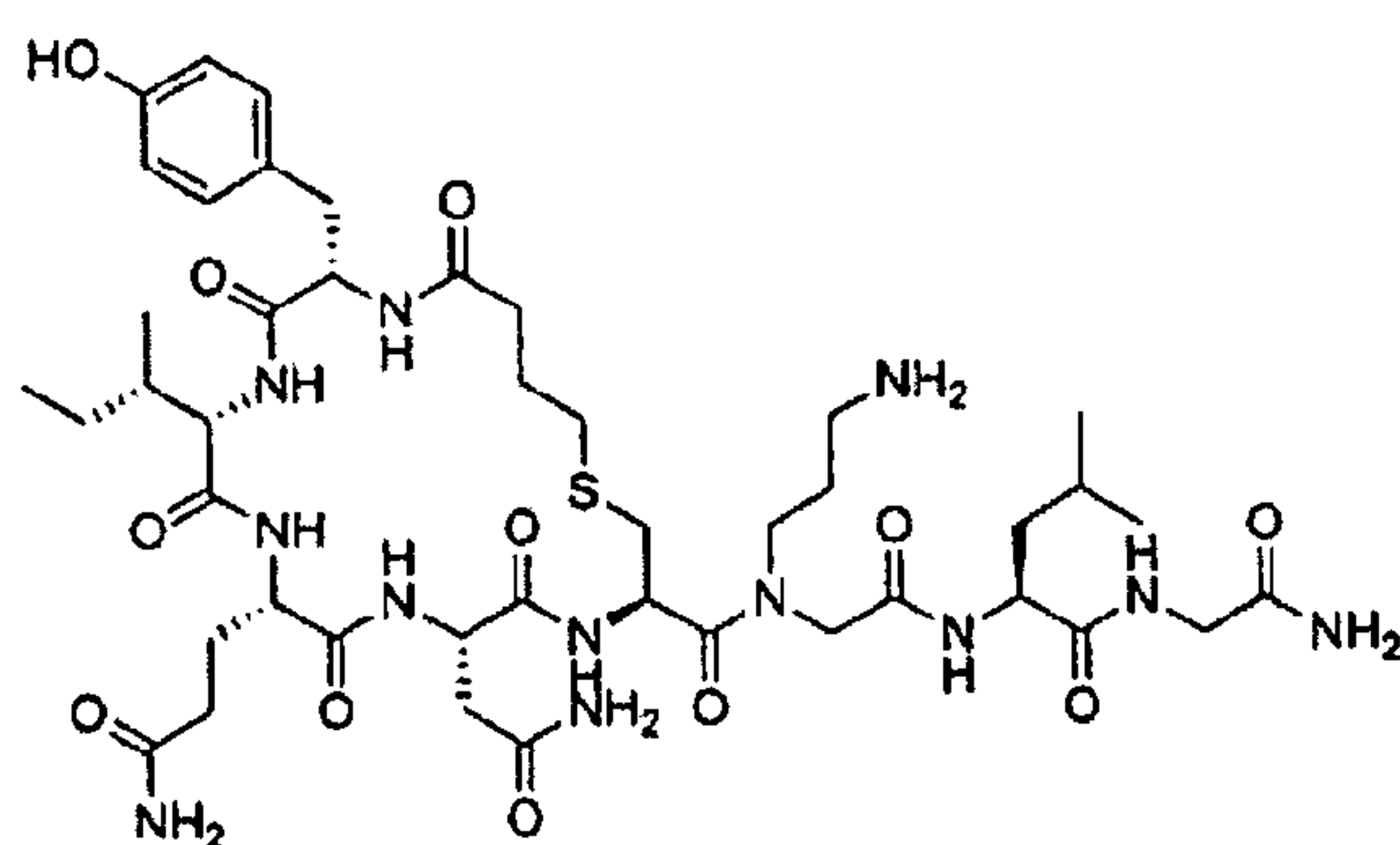
液。在室溫下攪拌該反應18小時。然後使反應混合物濾過4.5 μm 玻璃料，並在質量觸發之製備型HPLC (Waters Autopure HPLC系統；Sunfire C18 30x50mm 5 μm 管柱；流動相：45-70% ACN含於水中，5 min梯度，75 ml/min，經0.1% TFA修飾)上純化。合併對應催產素-FA共軛物(**26A**)之溶離份，冷凍及凍乾得到白色固體(1.71 mg，24%)。LCMS-分析方法G：Rt = 3.07 min，MS m/z 2540.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。



實例**26B**：催產素衍生物與脂肪酸之共軛作用：



可根據上述實例**26A**之步驟3製備上述實例(**26B**)，其係藉由使以下物質反應： $\ast$ 丁酸-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys $\ast$ -Gly(N-CH₂CH₂CH₂NH₂)-Leu-Gly-NH₂ $\ast$ =硫鍵(**26b1**)：



(**26b1**)與中間物I-37。

藉由修改Wisniewski等人，J. Med. Chem. (2014), 57 5306-5317中所揭示之實例41之程序製備環肽(**26b1**)，該文獻以引用的方式併入本文中。

在1 mmol Fmoc-Rink醯胺AMS樹脂上經由Fmoc化學手動合成該肽。用於胺基酸之保護基為：第三丁基用於Tyr，Trt基用於Gln及Asn。使用兩種不常見胺基酸Fmoc-Cys(CH₂CH₂CH₂CO₂烯丙基)-OH及Fmoc-[Na-CH₂CH₂CH₂NH(Boc)]Gly-OH。在樹脂上藉由反複移除Fmoc保護基及在DMF中偶合受保護胺基酸(3eq)組裝肽鏈。使用HBTU及

HOBt (3eq:3eq)作為偶合劑；並使用N-甲基嗎啉(NMM, 6eq)作為鹼。使用20%哌啶(含於DMF) (3倍於樹脂體積)作為去-Fmoc試劑。每次在偶合及去-Fmoc後，藉由DMF(3倍於樹脂體積)清洗樹脂；每次在偶合後進行寧海準測試，以檢查偶合效率。

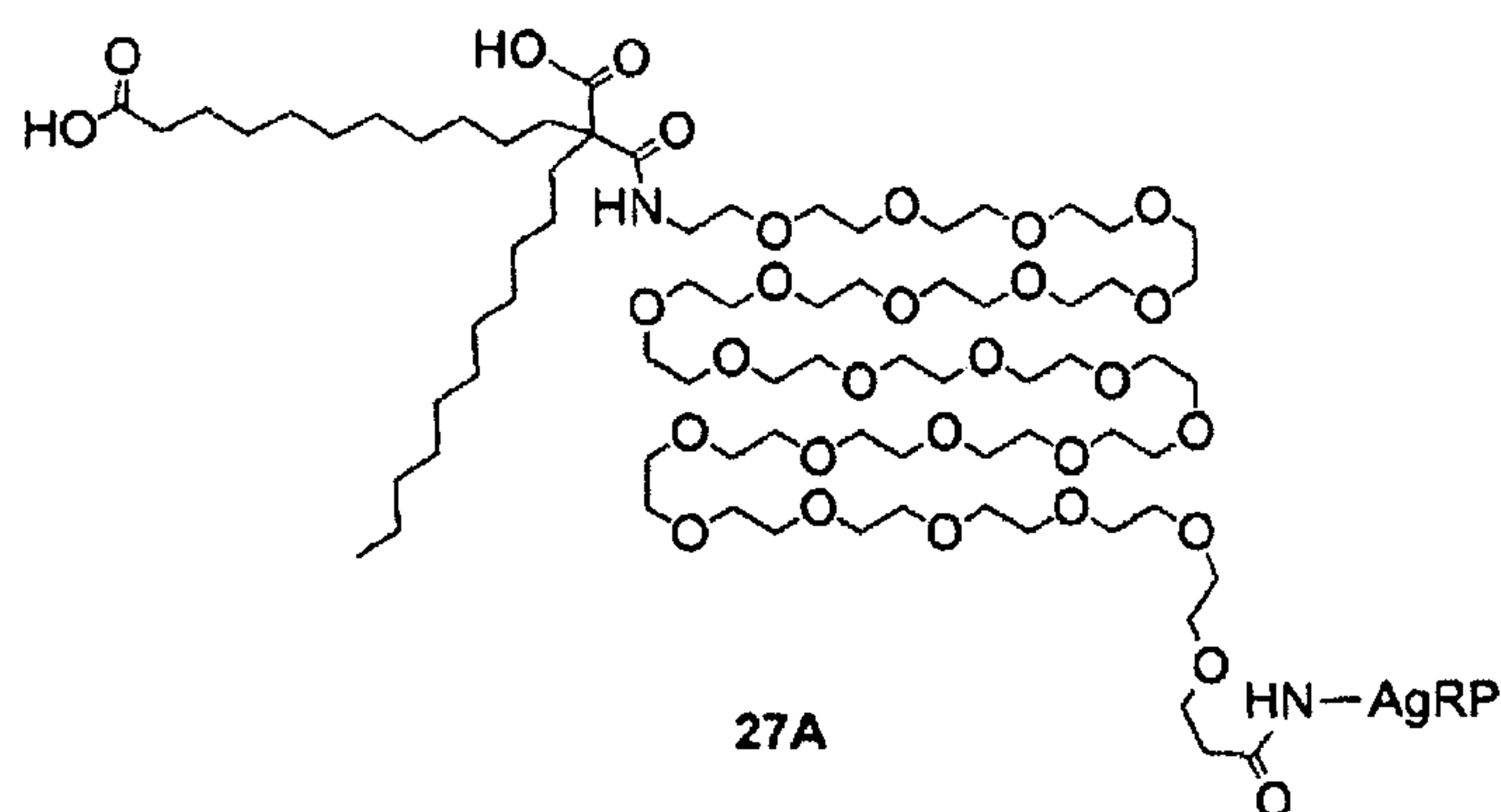
移除最後的Fmoc保護基後，用乙醚清洗樹脂，並在真空下乾燥。選擇性在樹脂上(on-resin)移除烯丙酯保護基係在DCM/THF (1/1, 10倍於樹脂體積)中3小時藉由Pd(PPh₃)₄/5,5-二甲基-1,3-環己二酮(1eq/10eq)進行。先後用DMF (3x)及0.5%二乙二硫胺甲酸鈉(含於DMF) (5x)清洗該樹脂。最後，藉由HCTU/NMM (3eq/6eq)在DMF中進行樹脂上環化。清洗該樹脂並在真空下乾燥得到3.2公克肽樹脂，在室溫下用32 ml TFA/TIS/DOT/H₂O(92.5/2.5/2.5/2.5, v/v)處理3小時，以移除側鏈保護基及自樹脂裂解肽。自冷乙醚中沈澱出粗製肽，然後藉由過濾收集，並在高真空下乾燥。產量：1.15g (116%)。

所有粗製肽均係在2-英吋C18管柱上用TFA緩衝液(緩衝液A, 0.1% TFA含於水中；緩衝液B, 乙腈)純化。純度>95%之合併溶離份經凍乾以乾燥。得到84 mg最終肽(TFA鹽)。MS: 991.6 [M+H]⁺, HPLC滯留時間9.49 min (方法：流速1.2 ml/min；緩衝液A：0.1% TFA含於水中，緩衝液B：0.1% TFA含於乙腈；室溫；管柱：Discovery, C18, 4.6mm x 250 mm, 5微米；梯度(線性) 15%-35%緩衝液B, 在20 min內；注射體積0.02 mL)

實例27：Agouti相關蛋白(AgRP)-脂肪酸共軛物

AgRP(83-132)-FA共軛物：

實例27A：AgRP之單脂肪酸共軛物(AgRP+1FA)，其中該脂肪酸係經由連接子(PEG)連接至AgRP之N端



其中AgRP(83-132)具有以下序列：

Ser-Ser-Arg-Arg-Cys-Val-Arg-Leu-His-Glu-Ser-Cys-Leu-Gly-Gln-Gln-Val-Pro-Cys-Cys-Asp-Pro-Cys-Ala-Thr-Cys-Tyr-Cys-Arg-Phe-Phe-Asn-Ala-Phe-Cys-Tyr-Cys-Arg-Lys-Leu-Gly-Thr-Ala-Met-Asn-Pro-Cys-Ser-Arg-Thr；其在位置 C87&C102、C94&C108、C101&C119、C105&C129、C110&C117 橋處包含5個雙硫橋。

實例27B：AgRP(83-132)之二脂肪酸共軛物(AgRP+2 FA)，其中一個脂肪酸經由連接子(PEG)連接至AgRP之N端(亦即絲胺酸83)，且另一脂肪酸經由PEG連接子連接至位置121上之離胺酸之側鏈。

向0.90 ml AgRP(83-132) (可自R&D SystemsTM得到)含於pH 4.5檸檬酸鹽緩衝液(9 mg, 1.585 μmol)之10 mg/ml溶液先後添加0.80 ml pH=4.43乙酸鹽緩衝液及1.30 ml **I-37**含於H₂O (13 mg, 7.79 μmol)之10 mg/ml溶液。在室溫下攪拌該反應16小時。HRMS (QT2)顯示同時存在AgRP + 1FA, m/z 7226.3 [M+H]⁺在1.89 min時；及AgRP + 2FA, m/z 8778.4 [M+H]⁺在2.41 min時。使該反應濾過4.5 μm玻璃料，與如上運行之第二反應合併(0.881 μmol AgRP, 2.64 μmol **I-37**)，並在製備型HPLC (Waters Autopure HPLC系統；Waters Protein BEH C4管柱，300 埃，5 μm，10x250 mm；流動相：20-80% ACN含於水中，11 min梯度，10 mL/min，經0.1% TFA修飾；運行時間：15 min；收集溶離液：UV 210 nm))上純化。單離出對應**AgRP + 1FA**及**AgRP + 2FA**之溶

離份，冷凍並凍乾得到**AgRP + 1FA (27A)**及**AgRP + 2FA (27B)**之TFA鹽，呈白色固體(3.24 mg，16% **AgRP + 1FA**；2.26 mg，9% **AgRP + 2FA**) LCMS-分析方法G：**(AgRP + 1FA)** Rt = 1.91 min，MS m/z 7226.4 [M+H]⁺；**(AgRP + 2FA)** Rt = 2.43 min，MS m/z 8778.4 [M+H]⁺。

測定脂肪酸之連接位置之標記實驗。

根據製造商方案，藉由用Asp-N (Promega)消化反應混合物確認N端Ser殘基之標記。所有肽定位分析均係使用與Bruker Maxis Impact Q-TOF質譜儀耦合之Thermo Dionex Ultimate 3000 LC實現。分離係在保持在40℃下之ACQUITY UPLC BEH130 C18管柱(2.1x150 mm，1.7 μm，Waters)上進行。流速為0.1 ml/min，以0.1% FA(含於水)作為流動相A及0.1% FA(含於乙腈)作為流動相B。

使Asp-N (Promega Part# V162A)在20 uL HPLC/MS水(0.1 μg/μL)中還原。在6 M尿素、10 mM二硫蘇糖醇、5 mM EDTA及50 mM Tris_HCl (pH = 8.0)中將約10 μg樣本稀釋至25 μL之最終體積。還原及烷基化後，用50 mM Tris_HCl (pH = 8.0)稀釋溶液六次，然後用額外1微克Asp-N進行蛋白質水解。在37℃下發生消化過夜。LCMS分析顯示，野生型AgRP及經修飾AgRP之N端D位置處出現裂解，各片段上添加一個脂肪酸，如下表中所示。

肽序列	位置	質量	RT	預期m/z	觀測m/z	電荷
SSRRCVRLHESCLGQQVPCC	A(1-20)	2488.13	8.1	623.04	623.03	4
DPCATCYCRFFNAFCYCRKLGTA MNPCSRT	A(21-50)	3783.58	10.1	757.72	757.72	5
經修飾						
SSRRCVRLHESCLGQQVPCC + fa	A(1-20)	4040.12	17.4	1011.04	1011.03	4

DPCATCYCRFFNAFCYCRKLGTA MNPCSRT + fa	A(21-50)	5335.56	18.1	1068.12	1068.12	5
---	----------	---------	------	---------	---------	---

實例 28 (28A、28B及28C)係關於hFGF23變體之共軛物。

所用FGF23變體

用於此實例中並命名為「hFGF23(R179Q)」、「hFGF23 R179」或僅「hFGF23」之人類FGF23變體之序列係提供於SEQ ID NO:10。此FGF23變體缺乏信號肽，但在位置1具有恢復M，且在R179具有突變(R179Q)。用此FGF23肽製備含本文所述脂肪酸之共軛物(實例28C)，且顯示其保留表8中之至少一種FGF23活性。

此實例(實例28A及28B)中亦使用人類FGF23之兩種其他變體來與本文所揭示脂肪酸構建共軛物。如SEQ ID NO:10之肽一樣，此等變體缺乏FGF23信號肽，且在R179具有突變但具有一或多個其他突變，但保留至少一種FGF23活性。此等兩種FGF23變體用於此實例中，並命名為「hFGF23-變體」或「FGF23變體」或類似者。

本文所述製造共軛物之方法可使用其他FGF23肽，包括FGF23、或其同系物、變體、片段或修飾形式。

用於製造FGF23變體之方案

轉形：

如下製得hFGF23(R179)多肽：將pET28c-hFGF23 R179Q表現質體瞬時轉染至BL21(DE3)勝任細胞中，在冰上培育30 min，在42℃下熱休克45秒，添加SOC培養基，並在37℃振蕩儀中培育細菌一小時。此後，將細菌培養物攤在含康黴素(Kanamycin)之LB板上，並在37℃下培育過夜。將單離菌落轉移至含康黴素之LB培養基中，在37℃及振盪下培育過夜，並將25 mL等分式樣轉移至新的含康黴素之LB培養基中，並在37℃下振盪約2.5小時。當細胞密度足夠(OD約0.6)時，向



各培養物添加1M IPTG，同時繼續在37°C下振盪，以誘導表現該多肽。四小時後，藉由以6000 rpm離心10 min使細胞粒化，並使顆粒在-20°C下冷凍。隨後，再將顆粒懸浮於溶解緩衝液(50 mM Tris, pH 8, 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100)中，並用微流化器使細胞溶解。每100 mL溶解混合物添加10 mg溶菌酶及10 µL DNase (1單位/mL, Invitrogen)，並在室溫下培育30 min，然後在4°C下以8000 rpm離心沉降20 min，用三份100 mL溶解緩衝液清洗並旋轉，並在第四次使用不含Triton X-100之溶解緩衝液。立即將最後旋轉所得(內含體)顆粒溶解於50 mM Tris(pH 7.4)、6 M胍、10 mM DTT中，並測定蛋白質濃度，並在再折疊前調節至1 mg/ml。

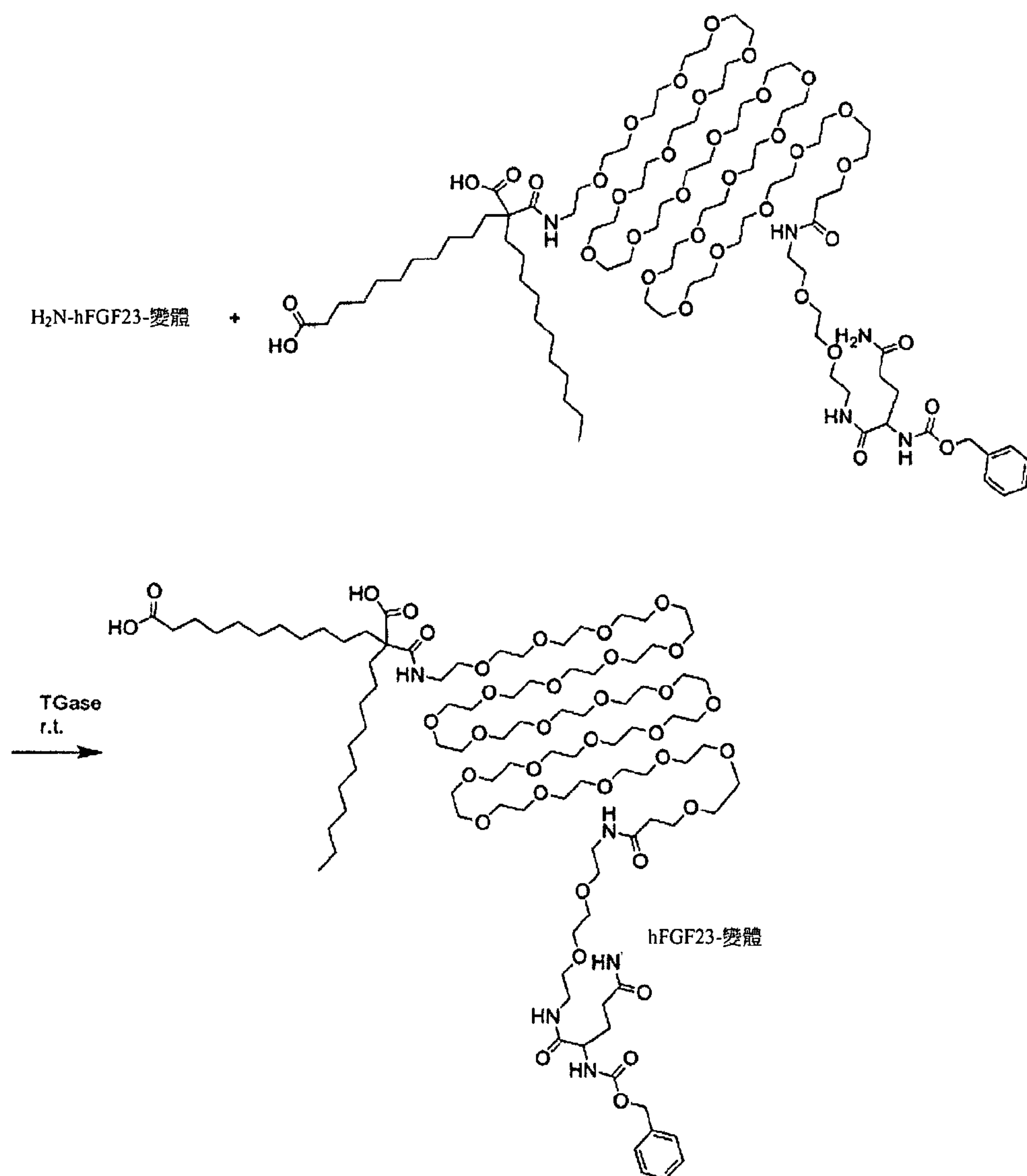
蛋白質再折疊：

為使蛋白質再折疊，向各400 ml溶解內含體添加368 mg還原麩胱甘肽(GSSH)及74 mg氧化麩胱甘肽(GSSG)。蛋白質在4°C相對於4 L 50 mM Tris(pH 8.0)及250 mM精胺酸透析過夜。然後移除2 L透析緩衝液，並用2 L水置換，並另外繼續透析8小時。然後將透析緩衝液換成20 mM Tris(pH 8.0)、50 mM NaCl、25 mM精胺酸，並繼續透析過夜。

蛋白質純化：

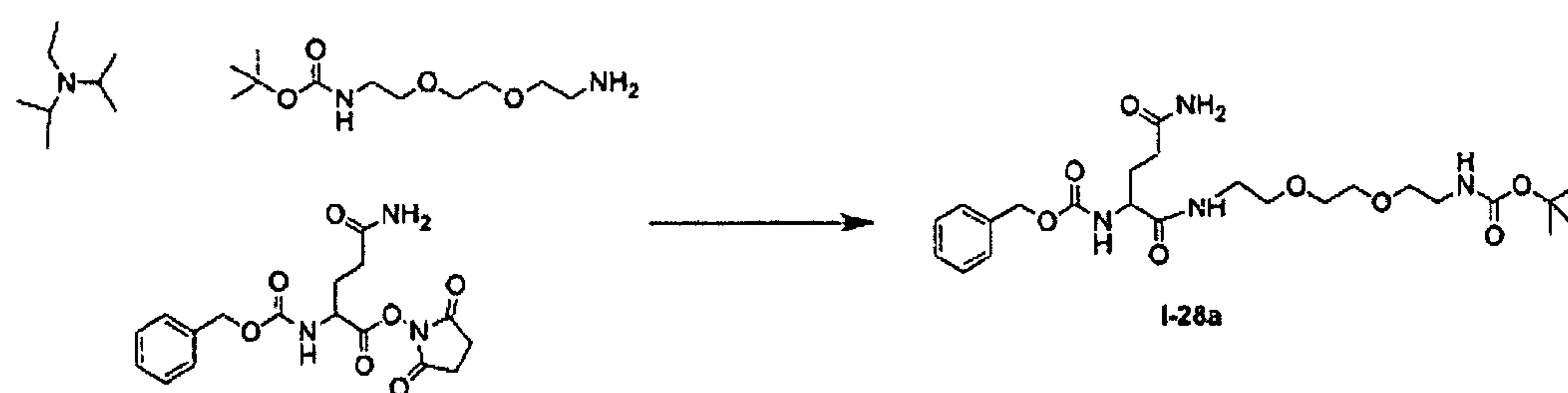
為純化蛋白質，以12000 rpm使透析混合物離心沉降30 min，將上清液負載至經最終透析緩衝液平衡之肝素-瓊脂糖管柱，並用20x柱床體積之1xPBS清洗管柱。用補充有0.5M NaCl之1xPBS溶離再折疊蛋白質，藉由SDS-PAGE凝膠評估蛋白質純度，並根據其在280 nm波長下之OD測定蛋白質濃度。

實例28A：hFGF23變體與脂肪酸之共軛作用



其中hFGF23變體-NH₂-中之-NH₂意指離胺酸殘基之胺基官能性。

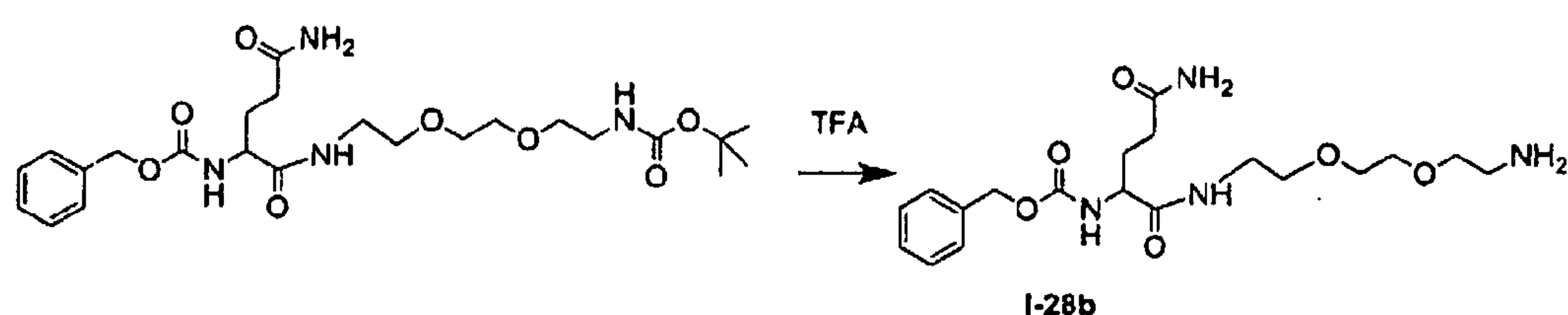
步驟1：中間物28a



將2,5-二側氧基吡咯啉-1-基5-胺基-2-(((苄氧基)羰基)胺基)-5-側氧基戊酸酯(0.5 g, 1.325 mmol)溶解於DMF (體積：9.96 ml)中，並添加(2-(2-(2-胺基乙氧基)乙氧基)乙基)胺基甲酸第三丁酯(0.503 ml, 2.120 mmol)。向該混合物添加DIPEA (0.274 g, 2.120 mmol)，並在室

溫下攪拌該反應2小時，在此時，LCMS分析顯示形成期望產物及消耗ZQ-NHS起始材料(方法A， $R_t = 0.98$ min， $M+H$ 511.4)。將反應混合物傾倒至DCM (100 mL)中，並用冰水(3 x 50 mL)清洗。在 Na_2SO_4 上乾燥有機層，過濾並濃縮得到1.14 g黃色油。LCMS分析顯示存在期望產物(方法M， $R_t = 1.82$ min， $M+H$ 511.4，1.14 g)。該物質無需進一步純化繼續用於下一步驟中。

步驟2：中間物**28b**，(5-胺基-1-((2-(2-(2-胺基乙氧基)乙氧基)乙基)胺基)-1,5-二側氧基戊-2-基)胺基甲酸苄酯

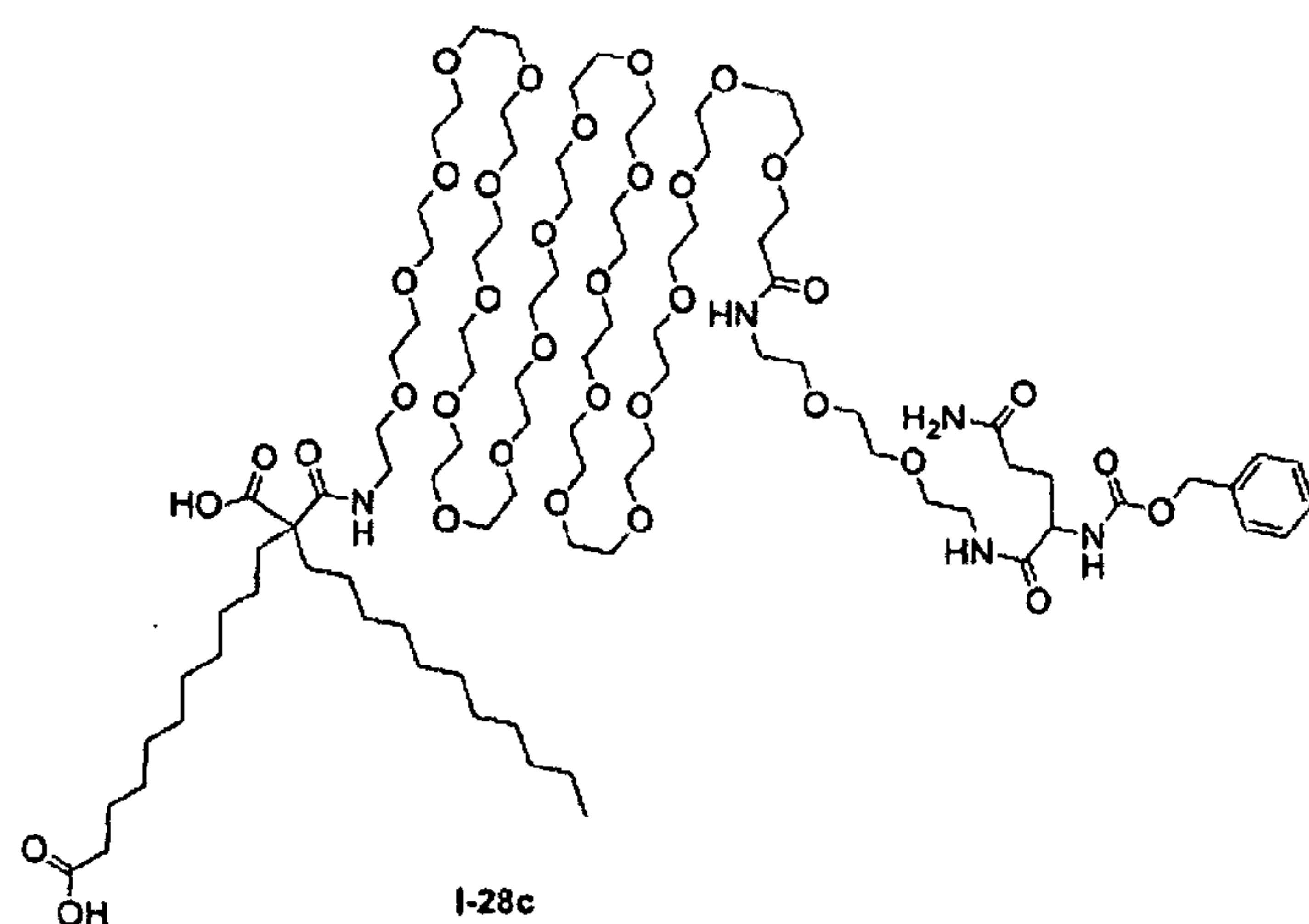


向中間物**28a** (1.14 g，2.233 mmol)添加三氟乙酸(10 mL，2.233 mmol)，並在室溫下攪拌約一小時。LCMS分析顯示起始材料完全轉化為期望產物(方法A， $R_t = 0.56$ min， $M+H$ 411.3)。將反應混合物溶解於DCM (30 mL)中，並濃縮得到油，濃縮兩次。用1 mL ACN及1 mL MeOH稀釋該油，並藉由MS-觸發之HPLC (方法N)純化。合併具有期望質量之溶離份，冷凍並凍乾得到呈白色粉末之中間物**28b**(方法O， $R_t = 0.22$ min， $M+H$ 411.3，160 mg，18%)。

步驟3：中間物**28c**

將中間物**28b** (19.69 mg，0.048 mmol)溶解於DMF (0.5 mL)中，並添加至中間物**37** (50 mg，0.030 mmol)含於DMF (1.0 mL)之溶液中。添加3滴DIPEA，並在室溫下攪拌該反應2小時，在此時，LCMS分析顯示完全轉化為產物(方法B， $R_t = 1.22$ min， $M+H+2/2$ 982.9)。將反應混合物負載至20g C-18管柱上進行逆相層析。使用在20分鐘內自100%水(0.1% TFA)變化為100% MeCN之溶劑梯度，收集溶離份並

藉由LCMS分析。合併具有期望質量之溶離份，冷凍並凍乾過夜得到呈無色澄清油之中間物**28c**(方法C， $R_t = 1.21$ min， $M+H+2/2$ 982.9， $M+H+3/3$ 655.5，15.3 mg，26%)。初步解釋的 ^1H -NMR顯示存在在6.29 ppm(1H, br m)下形成之醯胺鍵。 ^1H NMR (400 MHz，氯仿- d) δ 7.52 (s, 1H), 7.35 (d, $J = 3.3$ Hz, 5H), 5.10 (s, 2H), 4.30 (s, 1H), 3.77 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.69-3.49 (m, 94H), 3.46 (s, 4H), 2.59 (s, 3H), 2.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 25H), 2.08-1.94 (m, 4H), 1.79-1.65 (m, 2H), 1.65-1.52 (m, 2H), 1.40-1.06 (m, 31H), 0.94-0.82 (m, 3H)。



步驟4：hFGF23-變體+中間物**28c**

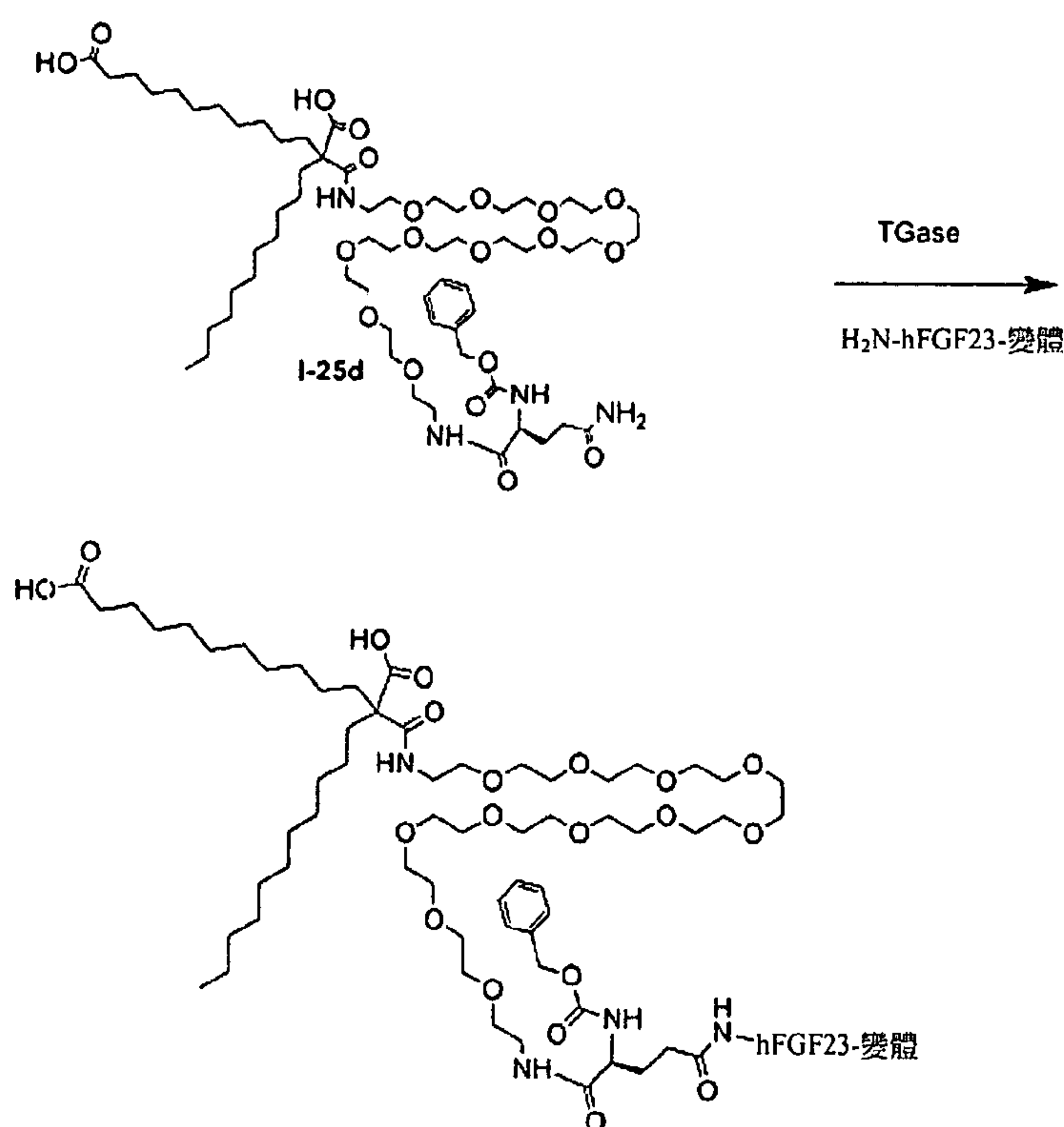
就此步驟而言，使用人類FGF23 (hFGF23)變體(「hFGF23-變體」)，其缺乏信號肽，但相對於SEQ ID NO:8具有一或多個突變，但保留至少一種FGF23活性，且其中「FGF23-變體-NH₂」中之「-NH₂」指離胺酸殘基之胺基官能性。

製備TGase含於30 mM MES pH 6之50 mg/mL溶液及中間物**28c**含於30 mM MES pH 6緩衝液之8 mg/mL溶液。脂肪酸溶液在MES pH 6中變得混濁。向hFGF23-變體(0.3 mg/mL含於30 mM MES pH 6，7.5 ml，0.088 μmol)先後添加中間物**28c** (217 μl ，0.883 μmol)及TGase (33.5 μl ，0.044 μmol)。在室溫下混合該反應18小時，並額外添加217

μL 中間物**28c**。在室溫下混合該反應18小時，並額外添加217 μL 中間物**28c**。在室溫下混合該反應18小時，並額外添加108.5 μL 中間物**28c**。在室溫下混合該反應4小時，在此時，LCMS分析顯示起始材料完全轉化(方法**P**， $R_t = 1.55 \text{ min}$ ， $M+H$ 27432)。將反應混合物分在兩個4 mL 10kDa MWCO Amicon離心過濾器中，並用30 mM MES pH 6 緩衝液交換緩衝液3x，然後濃縮成1.5 mL。將材料儲存在冰箱中過夜。一些固體沉降於管底部。藉由A280 ($18730 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ，25485 g/mol)測得上清液濃度為0.43 mg/mL (27%)。

實例28B：hFGF23-變體與ZQG-PEG11-脂肪酸之共軛作用

就此實例而言，製備含脂肪酸及FGF23變體之共軛物，該變體缺乏信號肽且相對於SEQ ID NO:8具有一或多個突變，但該等變體保留至少一種FGF23活性。



其中hFGF23-變體 $-\text{NH}_2$ -中之 $-\text{NH}_2$ 意指離胺酸殘基之胺基官能性。

在100 mM pH 8 tris緩衝液中製備中間物**25d**之8 mg/mL溶液。在

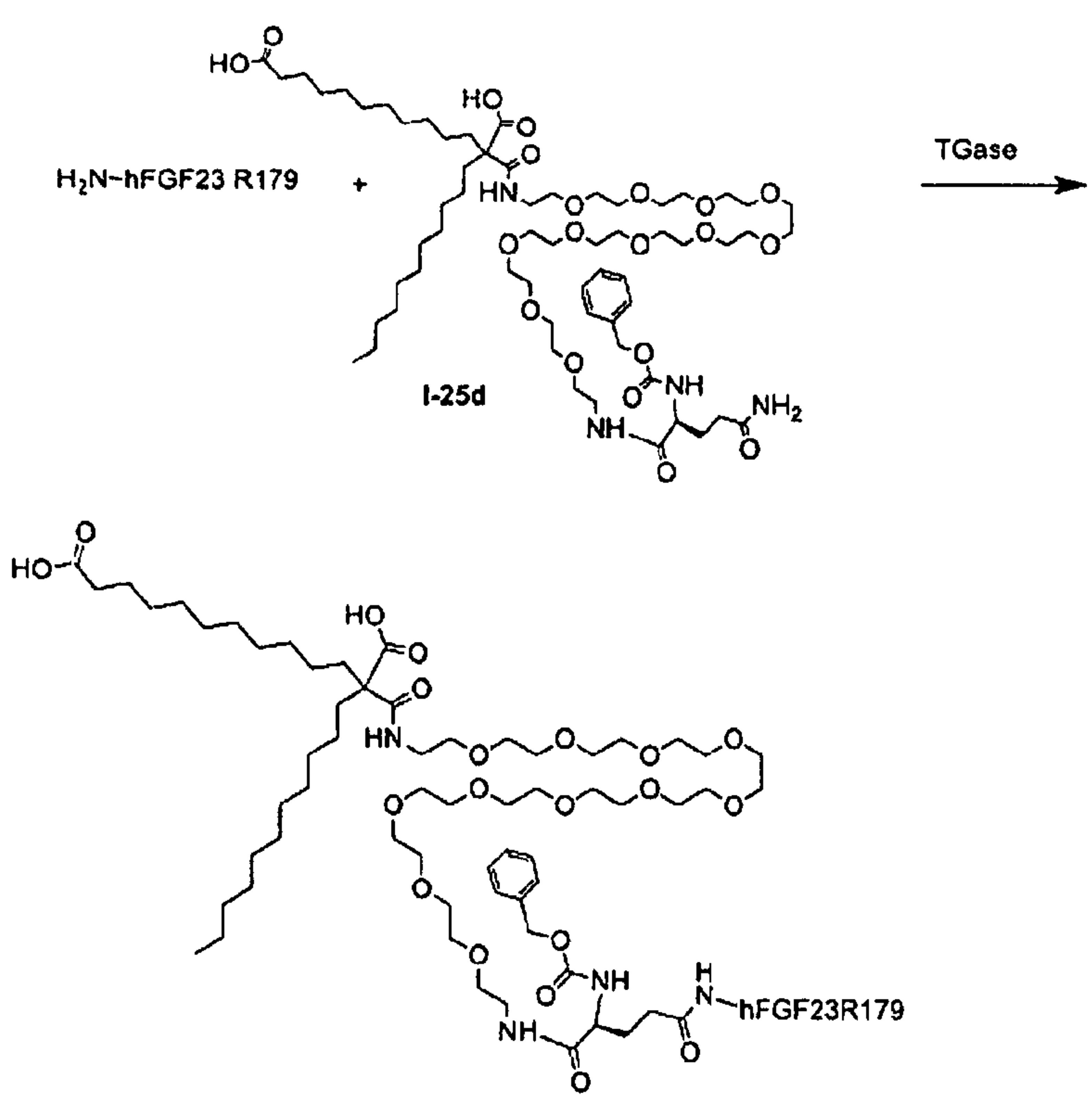
H₂O中製備TGase之50 mg/mL溶液。向hFGF23-變體(6.5 mL, 0.090 μmol)之溶液先後添加中間物**25d** (0.207 mL, 1.343 μmol)及TGase (0.136 mL, 0.179 μmol)。在室溫下攪拌該反應三天，並觀察到90%轉化為+1物質(LCMS方法Q, $R_t = 7.24$ min, $M+H$ 26616)。用10 kDa MWCO Amicon離心過濾器，藉由稀釋及濃縮反應6次至2 mL之體積，使該反應混合物交換進入PBS 1X緩衝液。藉由A280 ($18730 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, 26617 g/mol)測得濃度為0.125 mg/mL (LCMS方法Q, $R_t = 7.24$ min, $M+H$ 26616)。

實例28C：h-FGF23 R179 + ZQG-PEG11-脂肪酸之共軛作用：

就此實例而言，使用FGF23變體「hFGF23 R179」製備共軛物。此變體缺乏信號肽且在R179處具有突變。該序列係以SEQ ID NO:10提供。

計算質量：25463

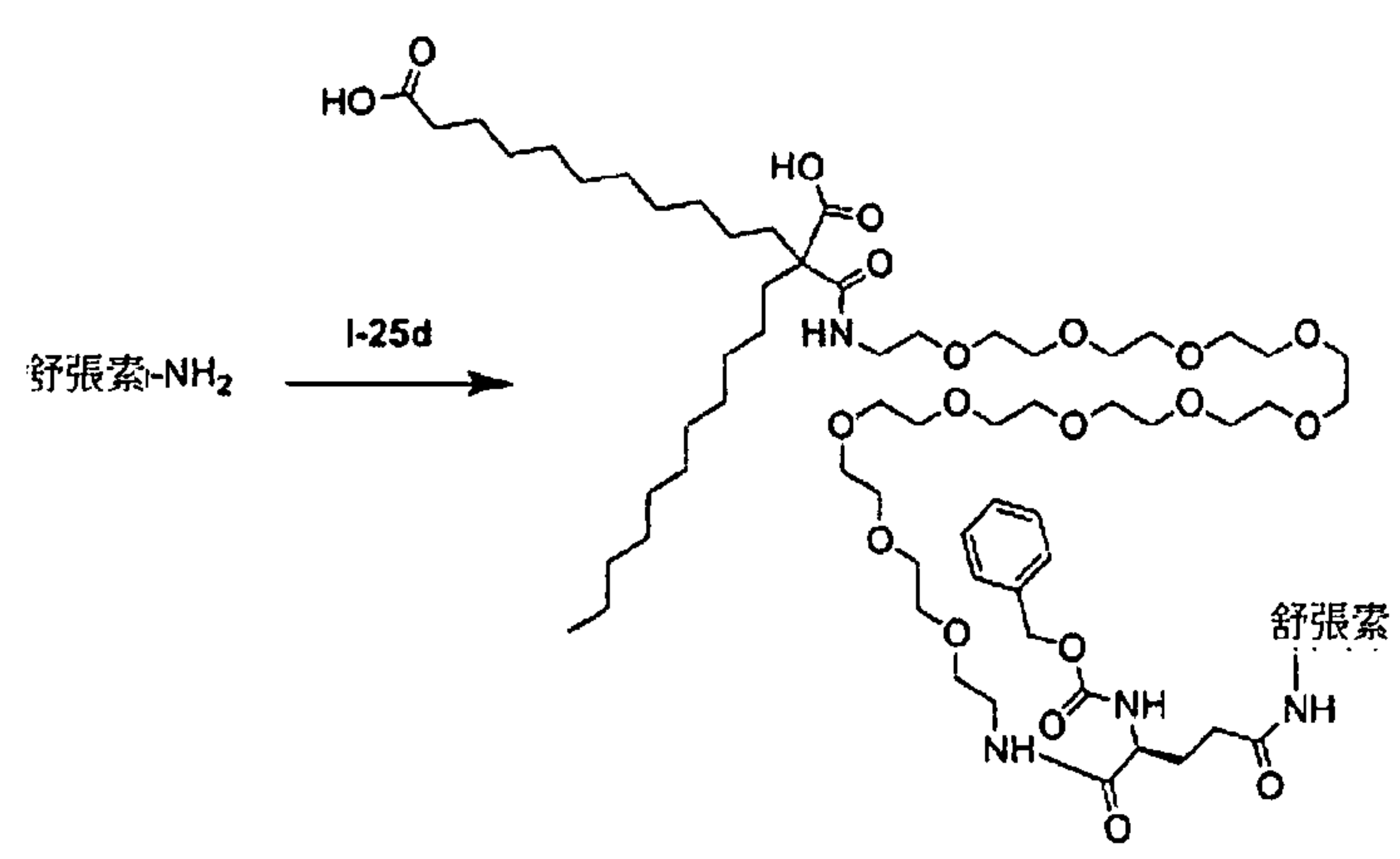
在100 mM pH 8 tris緩衝液中製備中間物25d之8 mg/mL溶液。在H₂O中製備TGase之50 mg/mL溶液。向hFGF23 R179 (2.50E+04 μl, 0.393 μmol)之溶液先後添加中間物**25d** (750 μl, 4.87 μmol)及TGase (597 μl, 0.785 μmol)。在室溫下混合該反應兩天，在此時，LCMS分析顯示起始材料完全轉化(方法P, $R_t = 1.58$ min, $M+H$ 26674)。經由離子交換層析純化反應混合物，得到+1共軛物(方法R, $R_t = 3.87$ min, $M+H$ 26674)：



其中hFGF23 R179-NH₂中之-NH₂意指離胺酸殘基之胺基官能性。

實例29A及29B係指舒張素(*serelaxin*)之共軛物。

實例29A：舒張素-脂肪酸共軛物(+1脂肪酸共軛物)



舒張素 + ZQG-PEG₁₁-脂肪酸(實例25d)：

舒張素序列：

DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSCFRALSRKTCGVHC
CKNALASYLE；且

「舒張素-NH₂」中之-NH₂意指離胺酸K17側鏈處之反應性胺基官能性，如由下文定位實驗所證實；MW 5963 g/mol。

在100 mM tris pH 8緩衝液中製備ZQG-PEG₁₁-脂肪酸(實例**25d**)之8 mg/mL溶液。在H₂O中製備mTGase之50 mg/mL溶液。向舒張素(211 µL, 0.168 µmol)含於100mM tris pH 8 (1.018 ml, 0.5 mg/mL反應)之溶液先後添加實例**25d** (516 µl, 3.35 µmol)及mTGase (Ajinomoto, 255 µl, 0.335 µmol)。在37°C下混合該反應3天，然後額外添加100 µL ZQG-PEG₁₁-脂肪酸。在37°C下混合該反應18小時，然後用10 kDa MWCO Amicon離心過濾器，藉由稀釋及濃縮反應5次至0.7 mL之體積交換進入PBS 1X緩衝液。經由方法**K**純化材料，並合併具有期望材料之溶離份，冷凍並凍乾得到白色粉末。將材料溶解於1 mL 30 mM NaOAc緩衝液pH 5中，並藉由A280 (5969cm⁻¹M⁻¹, 7178 g/mol)測得濃度為0.25 mg/mL (25%)。LCMS方法**L**：R_t = 1.65 min；MS [M+1 +1FA]：觀測值：7180，計算值：7178。

舒張素定位之實驗程序

樣本蛋白質水解

將約10 µg蛋白質溶解於6 M尿素、10 mM二硫蘇糖醇、5 mM EDTA及50 mM Tris_HCl (pH = 8.0)中，至25 µL之最終體積，並在37 °C下維持1小時以減少二硫鍵。向烷基化游離硫醇(alkylate free thiols)添加碘乙醯胺(500 mM, 1 µL)，並容許溶液在室溫下在黑暗中靜置1小時。然後用50 mM Tris_HCl (pH = 8.0)將溶液稀釋6X，添加LysC (1 µg, Promega V107A)，並使溶液在37°C下維持過夜，以消化蛋白質。添加甲酸(98%，2 µL)以中止蛋白質水解，並藉由LC-MS/MS分析所得肽混合物。

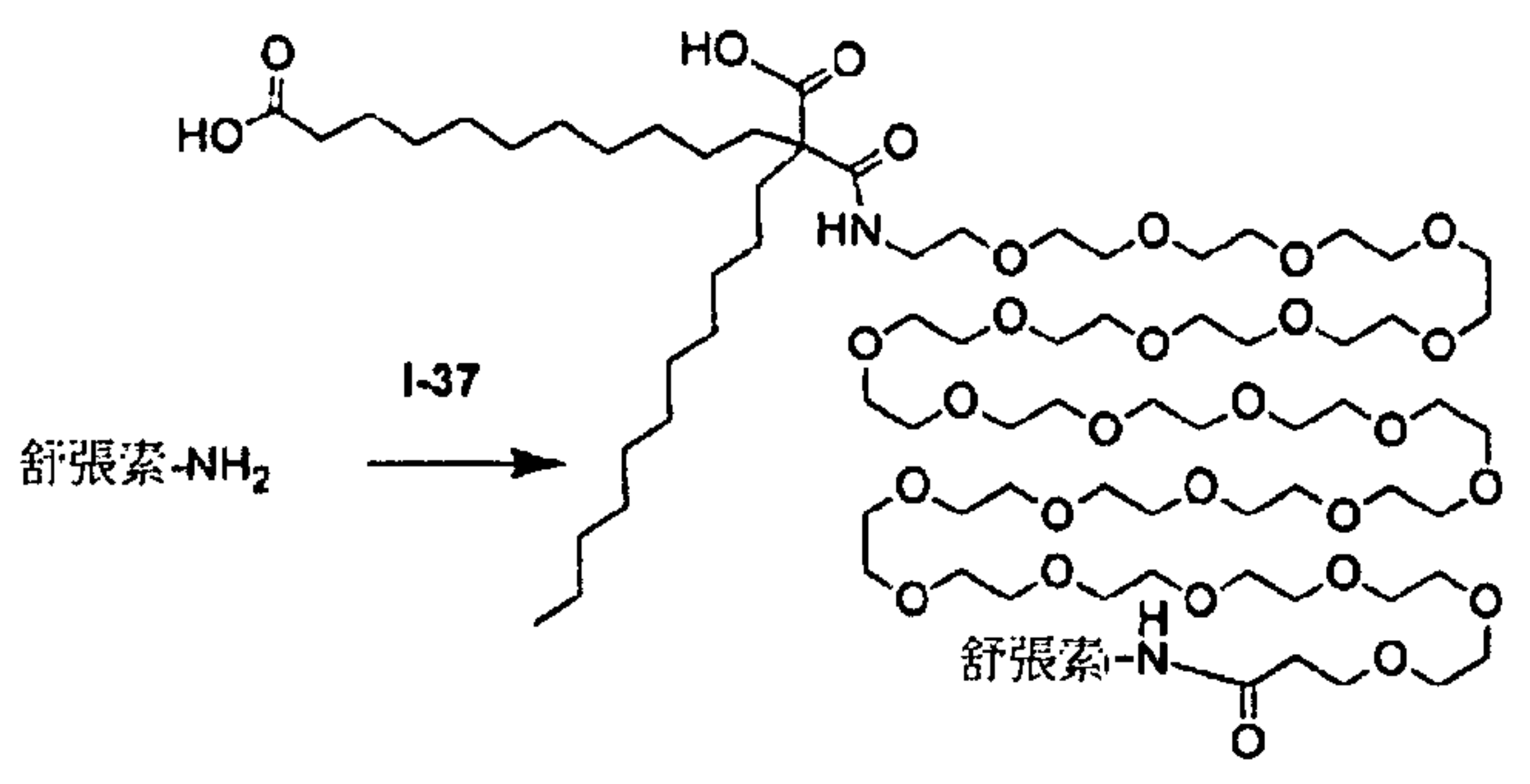
LC-MS/MS分析

肽定位係使用與Bruker Maxis Impact Q-TOF質譜儀耦合之Thermo Dionex Ultimate 3000 HPLC實現。利用Bruker Compass第1.7版及Bruker otofControl第3.4版軟體控制MS，儀器參數設置如下：質量範

圍300至2,000 Da；噴霧電壓4.0 kV；毛細管溫度200℃；乾燥氣流5.0 L/min。用維持在40℃下之Waters ACQUITY UPLC BEH130 C18管柱 (2.1x100 mm，1.7 μm)完成分餾。流動相分別為0.1%甲酸(含於水)及乙腈，且流速為100 uL/min。所用梯度為0-2 min，2% B；2-3 min，2%-8% B；3-10 min，8%-29% B；10-14 min，29%-33% B；14-16 min，33%-37% B；16-20 min，37%-73% B；20-22 min，73%-95% B；22-25 min，95% B；25-26 min，95%-2% B；26-30 min，2% B。用Bruker DataAnalysis第4.2版完成數據處理。

定位實驗表明，添加至舒張素之脂肪酸主要出現在離胺酸K17上，依據係指定為[CCHVGCTK₁₇(fa)RSLARFC-2H₂O]之肽，質量：3088.56 Da，電荷：5，Rt = 13.4 min，觀測m/z 618.71，預期m/z 618.72。

實例29B：舒張素-脂肪酸共軛物(如下文所述之+1FA、+2FA及+3FA共軛物之混合物)



其中，「舒張素-NH₂」中之-NH₂意指離胺酸側鏈處之反應性胺基官能性。

舒張素 +中間物37：實例29B係作為下文混合物測試

標記度	計算值	觀測值	%
舒張素	5963	5964	3
舒張素 +1 FA	7517	7516	19
舒張素 +2 FA	9071	9069	52
舒張素 +3 FA	10625	10622	25

序列：

DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSCFRALSRKTCGVHC
CKNALASYLpE

在H₂O中製備脂肪酸中間物**37**之10 mg/mL溶液。向舒張素 (105 μL, 0.084 μmol, 4.75 mg/mL)含於30 mM NaOAc緩衝液pH 4 (755 μL)之溶液添加脂肪酸中間物**37** (140 μL, 0.839 μmol)。在室溫下混合該反應16小時，在此時，LCMS分析顯示90%起始材料轉化。額外添加70 μL中間物**37**，並在室溫下混合該反應16小時，在此時，MALDI分析顯示轉化>95%。用3 kDa MWCO Amicon離心過濾器，藉由稀釋及濃縮反應4次至0.2 mL之體積，使溶液交換進入PBS 1x緩衝液。藉由A₂₈₀ (5969 M⁻¹cm⁻¹; 9068 g/mol)測得濃度為2.61 mg/mL。LCMS方法L: R_t = 1.56 min; MS [M+1 +1 FA]: 觀測值: 7516, 計算值: 7517; R_t = 1.65 min; MS [M+1 +2 FA]: 觀測值: 9069, 計算值: 9071; R_t = 1.74 min; MS [M+1 +3 FA]: 觀測值: 10622, 計算值: 10625。

實例30：M-His-hPIP與脂肪酸構築體(I-37)之共軛作用-(如下文所述+1 FA共軛物及+2 FA共軛物之混合物)

M-His-hPIP (29-146)序列：

MHHHHHHQDNTRKIIKNFDIPKSVRPNDEVTAVLAVQTELKECMVVKTYLISSIPLQGAFNYKYT
ACLCDDNPKTFYWDFYTNRTVQIAAVVDVIRELGICPDAAVPIKNNRFYTIEILKVE (SEQ ID
NO:13)

表現自

表現蛋白序列：

METDTLLLWLLLWVPGSTGMHHHHHHQDNTRKIIKNFDIPKSVRPNDEVTAVLAVQTE
LKECMVVKTYLISSIPLQGAFNYKYTACLCDDNPKTFYWDFYTNRTVQIAAVVDVIRELG
ICPDAAVPIKNNRFYTIEILKVE

核苷酸序列：

GCTAGCCACCATGGAGACTGATACTTTGTTGTTGTGGGTACTG

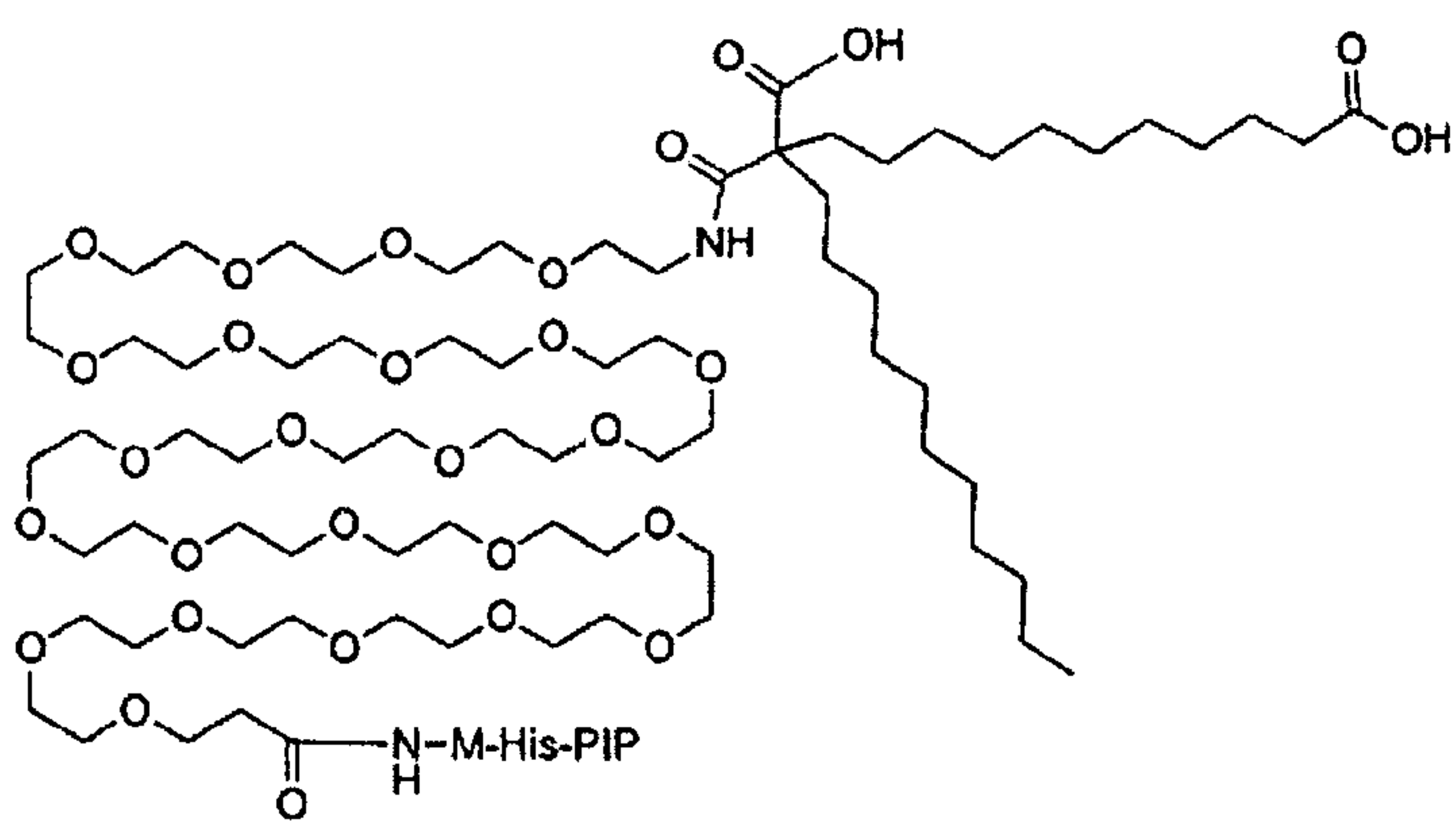
TTGCTTTGGGTGCCCCGGTAGTACCGGTATGCATCACCACCACC
 ATCACCAGGACAACACCCGGAAGATCATCATCAAGAACTTCG
 ACATCCCTAAGAGCGTGCGCCCAAACGATGAAGTCACCGCGG
 TGCTGGCAGTGCAGACTGAGCTGAAGGAGTGCATGGTGGTCA
 AGACGTACCTGATTTCGTCCATCCCGCTGCAAGGCGCCTTCAA
 CTACAAGTACACTGCCTGCCTCTGTGACGACAACCCCAAGAC
 CTTTTACTGGGACTTCTACACCAATAGAAGTGTCCAGATTGCT
 GCCGTGGTGGATGTGATCAGGGAATTGGGAATTTGCCCCGAC
 GATGCGGCCGTGATTCCGATCAAGAACAACCGCTTCTATACCA
 TCGAGATCCTTAAAGTGGAATGAGAATTC

PIP表現載體：

藉由標準選殖方法產生編碼人類PIP之哺乳動物表現載體。含小鼠Igκ鏈信號序列，後接MHHHHH序列及具有5'-NheI之成熟PIP(後接Kozak序列)及3'-EcoRI位點之片段經密碼子最優化並合成(DNA2.0)。然後將此序列選殖至CMV啟動子下游之基於pcDNA3.1 (Invitrogen)之載體之獨特5'-NheI及3'-EcoRI位點中。

PIP表現及純化：

以 1×10^6 個細胞/ml之密度使用標準聚乙亞胺法將PIP表現質體DNA轉染至HEK293T細胞中。然後在37°C及8% CO₂增濕氣氛下，將500 ml培養物生長於3 L燒瓶中之FreeStyle 293培養基(Life Technologies)中，持續4天。自澄清條件培養基純化PIP蛋白質。



其中M-His-PIP具有SEQ ID NO:12，且「M-his」係MHHHHHHH。

共軛作用：

在H₂O中製備脂肪酸-連接子構築體#1之10 mg/mL溶液。用30 mM NaOAc緩衝液pH 4 (619 µL，0.5 mg/mL反應)稀釋M-His-hPIP (0.700 mL，0.048 µmol)，並添加中間物37 (0.081 mL，0.484 µmol)。在室溫下混合該反應18小時，在此時，LCMS分析顯示70%轉化為+1 (50%)及+2 (20%)產物。然後用3 kDa MWCO Amicon離心過濾器，藉由稀釋及濃縮反應5次至350 µL之體積，使材料交換進入PBS 1X緩衝液。藉由A₂₈₀ (13850 cm⁻¹M⁻¹，14472 g/mol)測得濃度為1.7 mg/mL (70%)。LCMS方法L，R_t = 1.46 min；MS [M+1]：觀測值：14472，計算值：14476。R_t = 1.57 min；MS [M+1 +1FA去糖基化]：觀測值：16025，計算值：16030。R_t = 1.69 min；MS [M+1 +2FA去糖基化]：觀測值：17578，計算值：17584。

M-His-hPIP + 脂肪酸-連接子構築體I-37：實例30係作為下文混

合物測試

標記度	計算值	觀測值	%
M-His-PIP	14476	14472	4
M-His-PIP +糖基化		18139	30
M-His-PIP +1 FA	16030	16031	7
M-His-PIP +1 FA+糖基化		19692	37
M-His-PIP +2 FA	17584	17578	15



M-His-PIP +2 FA+糖基化		21242	7
---------------------	--	-------	---

PIP定位之實驗程序

樣本蛋白質水解

將約10 μg蛋白質溶解於6 M尿素、10 mM二硫蘇糖醇、5 mM EDTA及50 mM Tris_HCl (pH = 8.0)中，至25 μL之最終體積，並在37 °C下維持1小時以減少二硫鍵。向烷基化游離硫醇添加碘乙醯胺(500 mM，1 uL)，並容許溶液在室溫下在黑暗中靜置1小時。然後用50 mM Tris_HCl (pH = 8.0)將溶液稀釋6X，添加LysC (1 ug，Promega)或 Trypsin/Lys C混合物(1 ug，Promega)，並使溶液在37°C下維持過夜，以消化蛋白質。添加甲酸(98%，2 uL)以中止蛋白質水解，並藉由LC-MS/MS分析所得肽混合物。

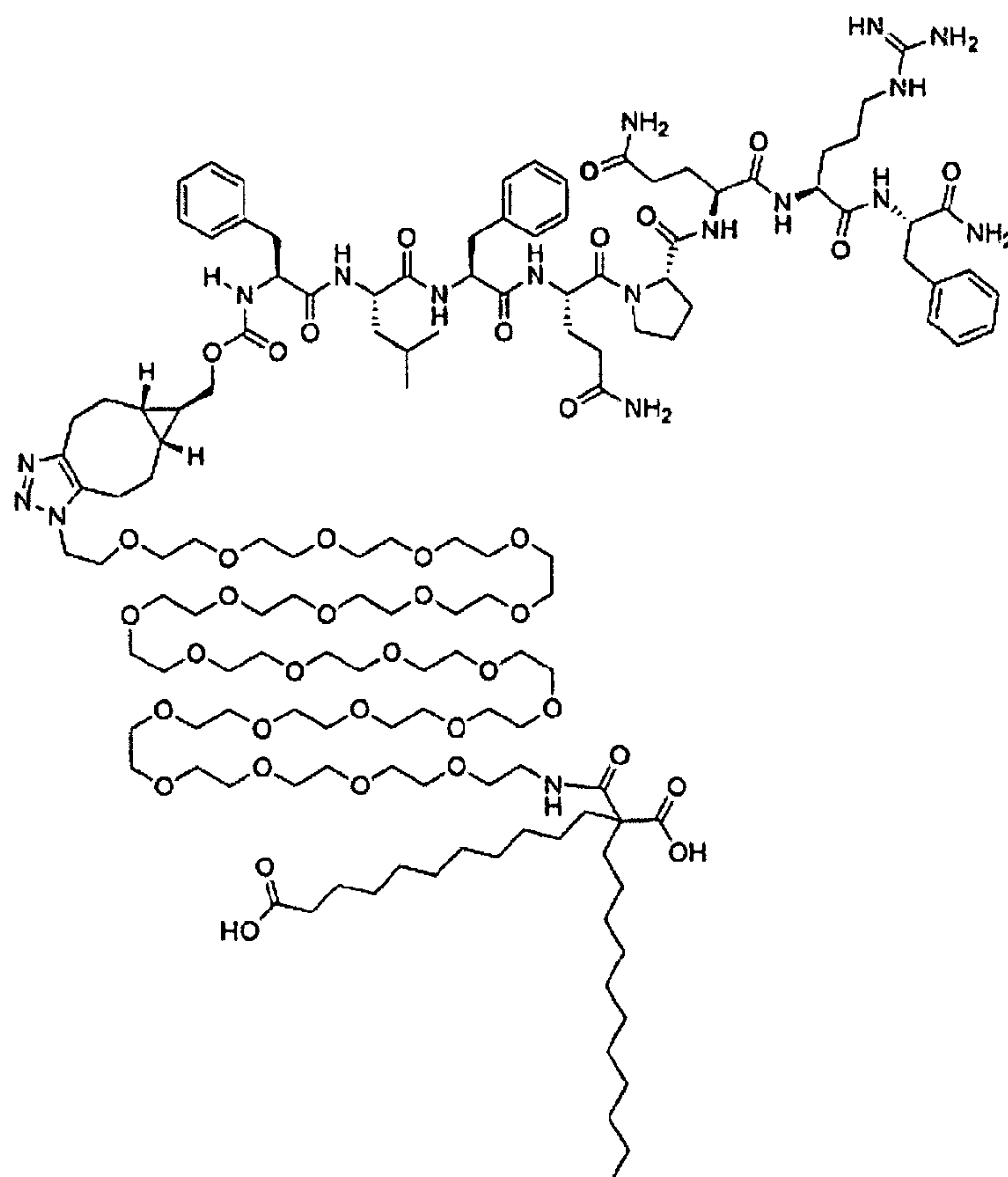
LC-MS/MS分析

肽定位係使用與Bruker Maxis Impact Q-TOF質譜儀耦合之Thermo Dionex Ultimate 3000 HPLC實現。利用Bruker Compass第1.7版及 Bruker otofControl第3.4版軟體控制MS，儀器參數設置如下：質量範圍300至2,000 Da；噴霧電壓4.0 kV；毛細管溫度200°C；乾燥氣流5.0 L/min。用維持在40°C下之Waters ACQUITY UPLC BEH130 C18管柱 (2.1x100 mm，1.7 μm)完成分餾。流動相分別為0.1%甲酸(含於水)及乙腈，且流速為100 uL/min。所用梯度為0-2 min，2% B；2-3 min，2%-8% B；3-10 min，8%-29% B；10-14 min，29%-33% B；14-16 min，33%-37% B；16-20 min，37%-73% B；20-22 min，73%-95% B；22-25 min，95% B；25-26 min，95%-2% B；26-30 min，2% B。用Bruker DataAnalysis第4.2版完成數據處理。

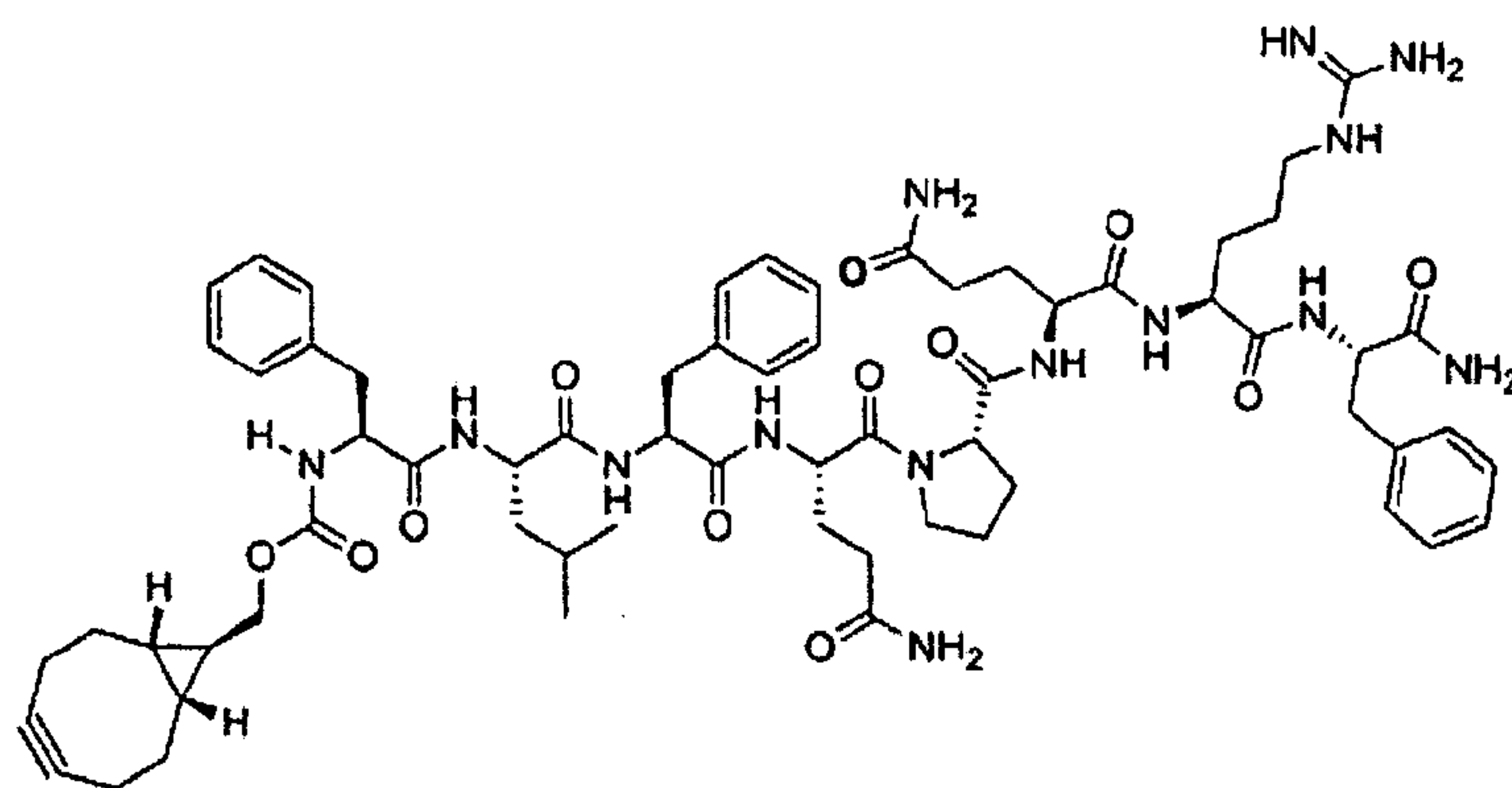
定位實驗表明，添加至MH₆-PIP之脂肪酸偏好出現在N端，其係由[fa-MHHHHHHQDNTRK]證實：質量：3265.76 Da，電荷：4，Rt = 23.4 min，觀測m/z：817.44，預期m/z：817.45。

少量脂肪酸添加出現在離胺酸 K42 處，其係由肽片段 [SVRPNDEVTA VLAVQTELK(fa)ECMVVK]證實，質量：4366.45 Da，電荷3， $R_t = 23.5$ min，觀測 m/z ：1456.49，預期 m/z ：1456.49。在 K42處添加脂肪酸阻斷鄰近這個離胺酸之胰蛋白酶裂解，發揮確認添加位置之作用。

實例31：NPFF與脂肪酸利用點擊化學之共軛作用



步驟1：準備NPFF點擊化學處理



計算MH+ 1258.8

向NPFF (Alfa Aesar, J66509, 5 mg, 3.82 μ mol)含於DMSO (1 mL)之溶液先後添加三乙胺(5.32 μ L, 0.038 mmol)及(1R,8S,9r)-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)碳酸酯(1.335 mg, 4.58 μ mol)。在室溫下攪拌該反應混合物。完成後，反應混合物呈現為下一反應步驟之粗物質。

步驟2：共軛作用

向步驟1之粗製反應混合物添加中間物6 (I-6)。在室溫下振盪該反應混合物。完成後，利用逆相層析純化反應混合物(系統：Agilent Bioinert SystemDate；管柱：Waters Protein BEH C4管柱，300 埃，5 μ m，10x250 mm；用於UPLC法研發之管柱為BEH C4m，300A，1.7 μ m，2.1x50 mm；流動相：46-56% ACN梯度，在6 min內，經0.1% TFA修飾 A：水，B：乙腈；流速：2.0 mL/min；運行時間：15 min；收集溶離液：UV 210 nm)，得到呈TFA鹽之標題化合物，一種白色固體；

LCMS：方法S：ELSD：Rt 1.46 min；MS m/z 928.3 [(M/3)⁺H]⁺

可以看到，本發明共軛物與非共軛生物分子相比具有類似或經改良療效，但此外，本發明共軛物與非共軛生物分子相比具有增進的血漿穩定性。已發現，上文實例中之共軛物具有高於5 h，高於10 h，高於20 h，高於30 h，高於40 h，且在一些情形下高於50 h之血漿穩定性。

雖然已由此描述本發明之示例性實施例，但一般技術者應注意到，其中之揭示內容僅係示例，且可在本發明範圍內作出各種其他替代、改編及修改。因此，本發明並不限於如文中所述之具體實施例。

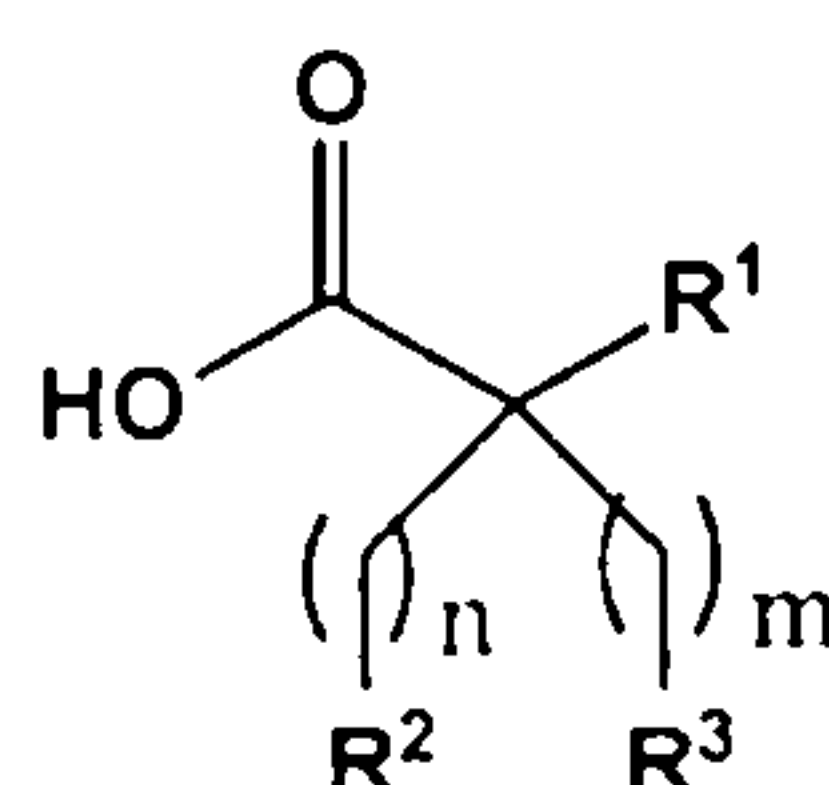
【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種共軛物，其包含經由連接子鍵聯至脂肪酸之生物分子，其中該生物分子係人類生長分化因子15 (GDF15)、其同系物、變體、突變體及片段或其二聚體，

其中該脂肪酸具有下式A1：



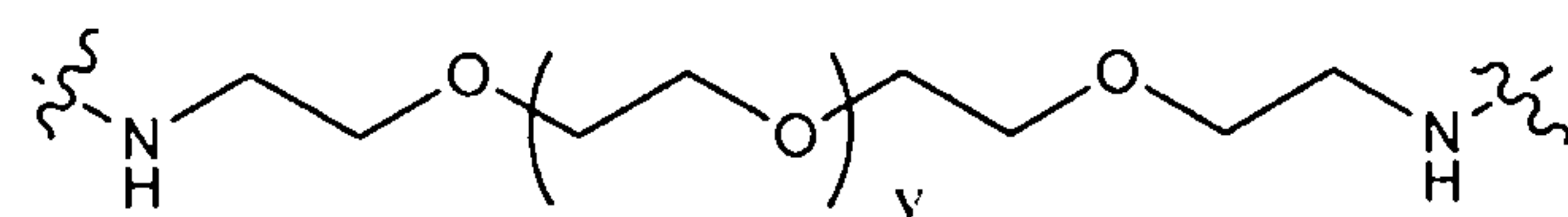
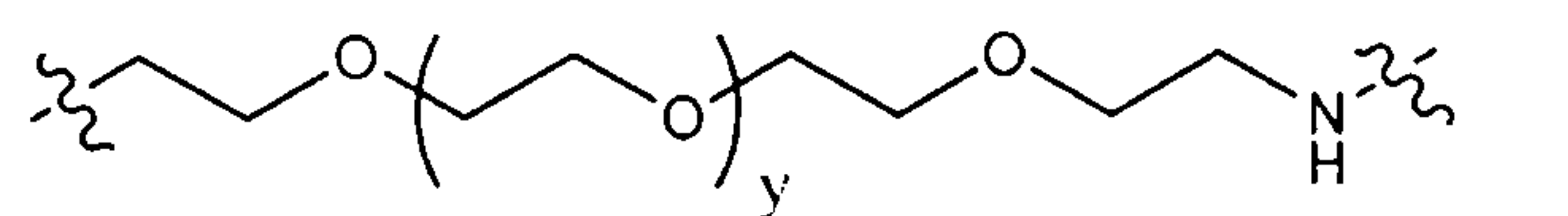
A1 ,

R¹係CO₂H或H；

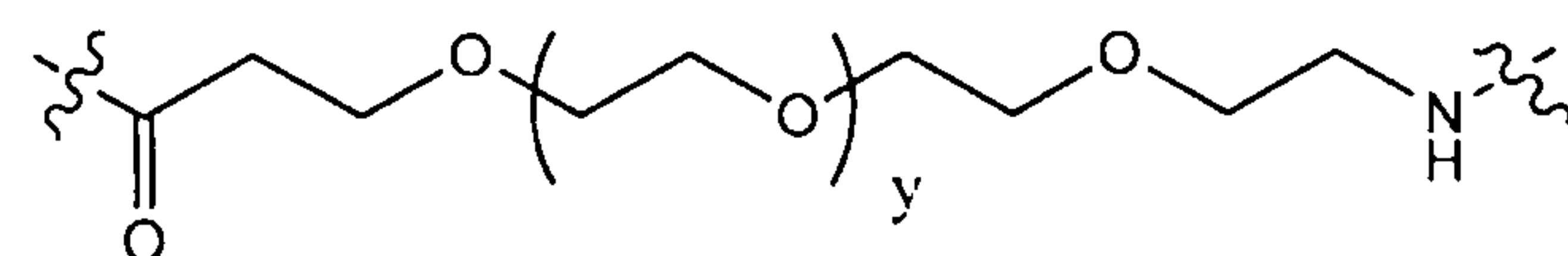
R²及R³彼此獨立地為H、OH、CO₂H、-CH=CH₂或-C=CH；

n及m彼此獨立地為6與30間之整數；及

其中該連接子包括下式之未分支寡聚乙二醇部分：



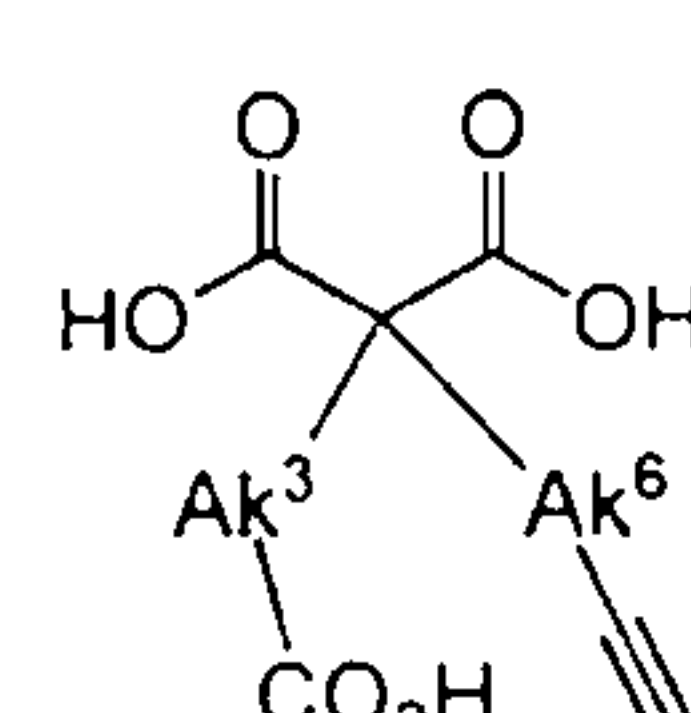
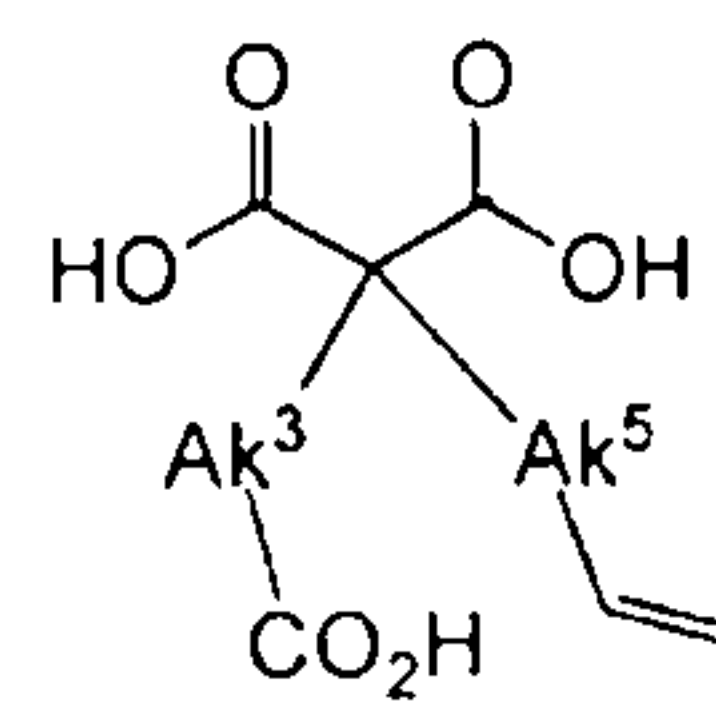
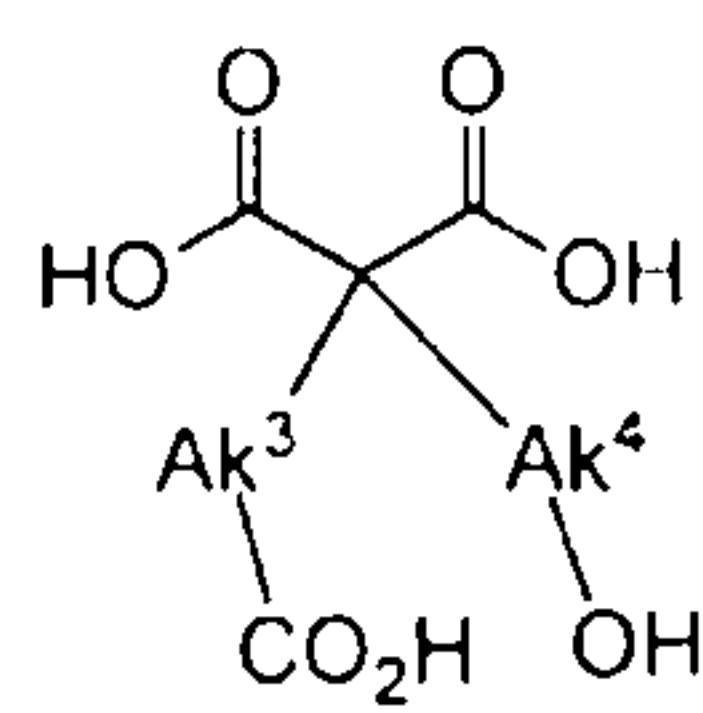
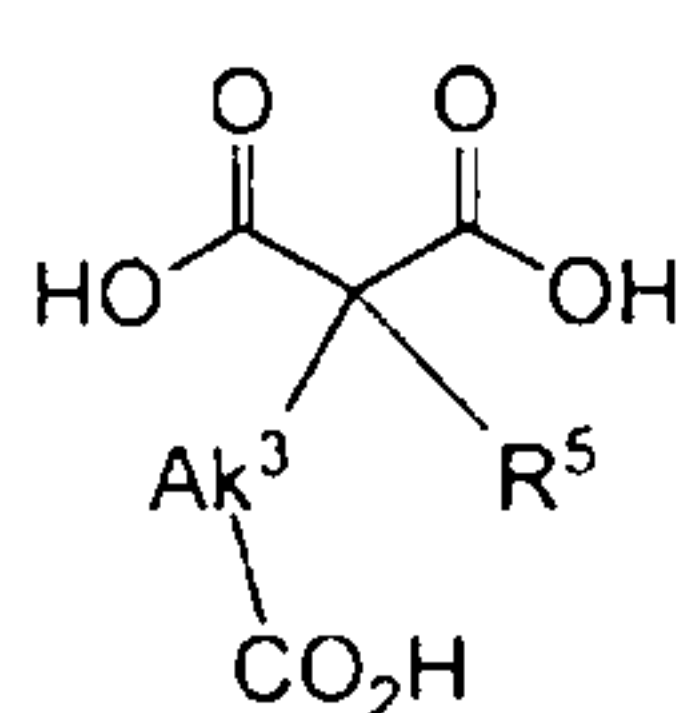
或

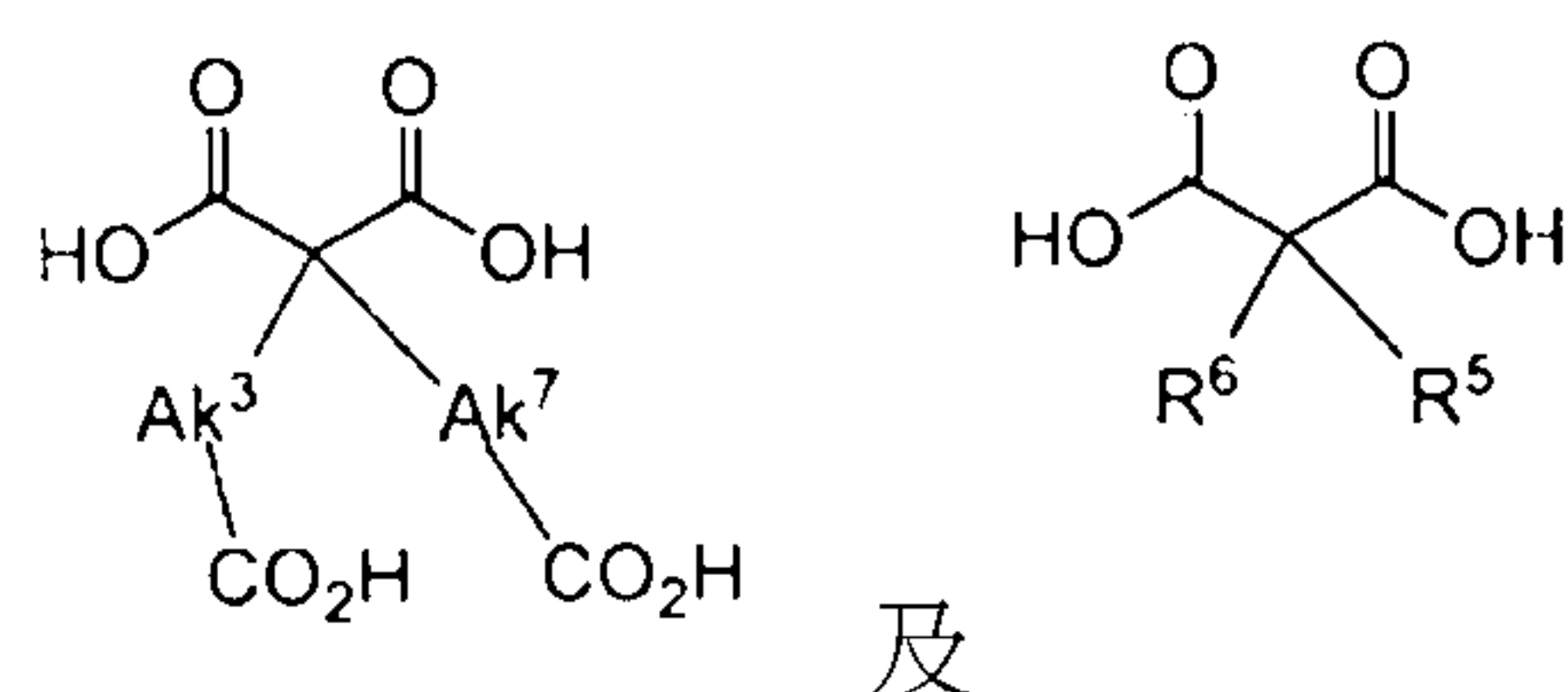


其中y係0至34；

或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽。

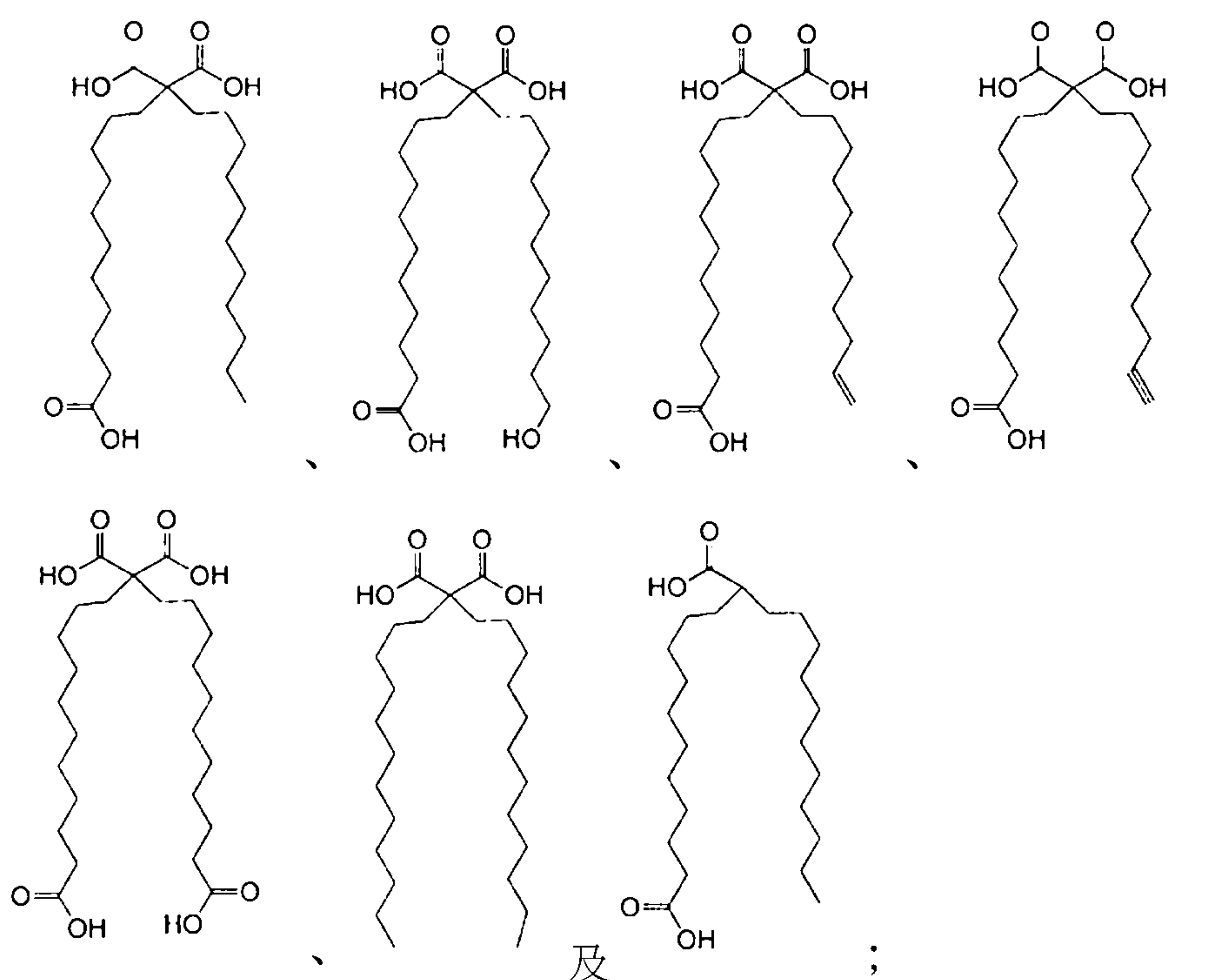
2. 如請求項1之共軛物，其中該脂肪酸係選自





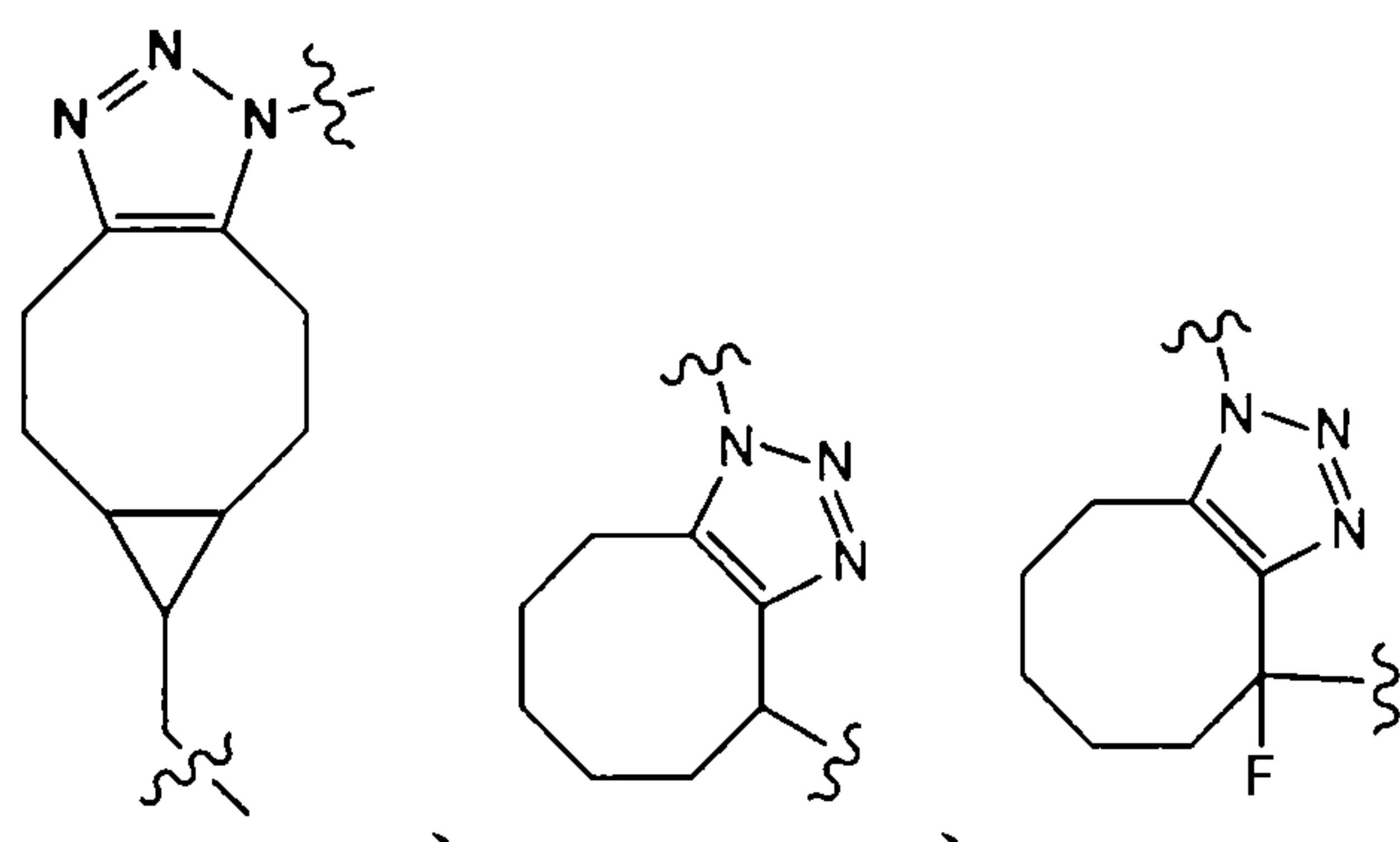
其中 Ak^3 、 Ak^4 、 Ak^5 、 Ak^6 及 Ak^7 獨立地為直鏈(C_{8-20})伸烷基， R^5 及 R^6 獨立地為直鏈(C_{8-20})烷基；或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽。

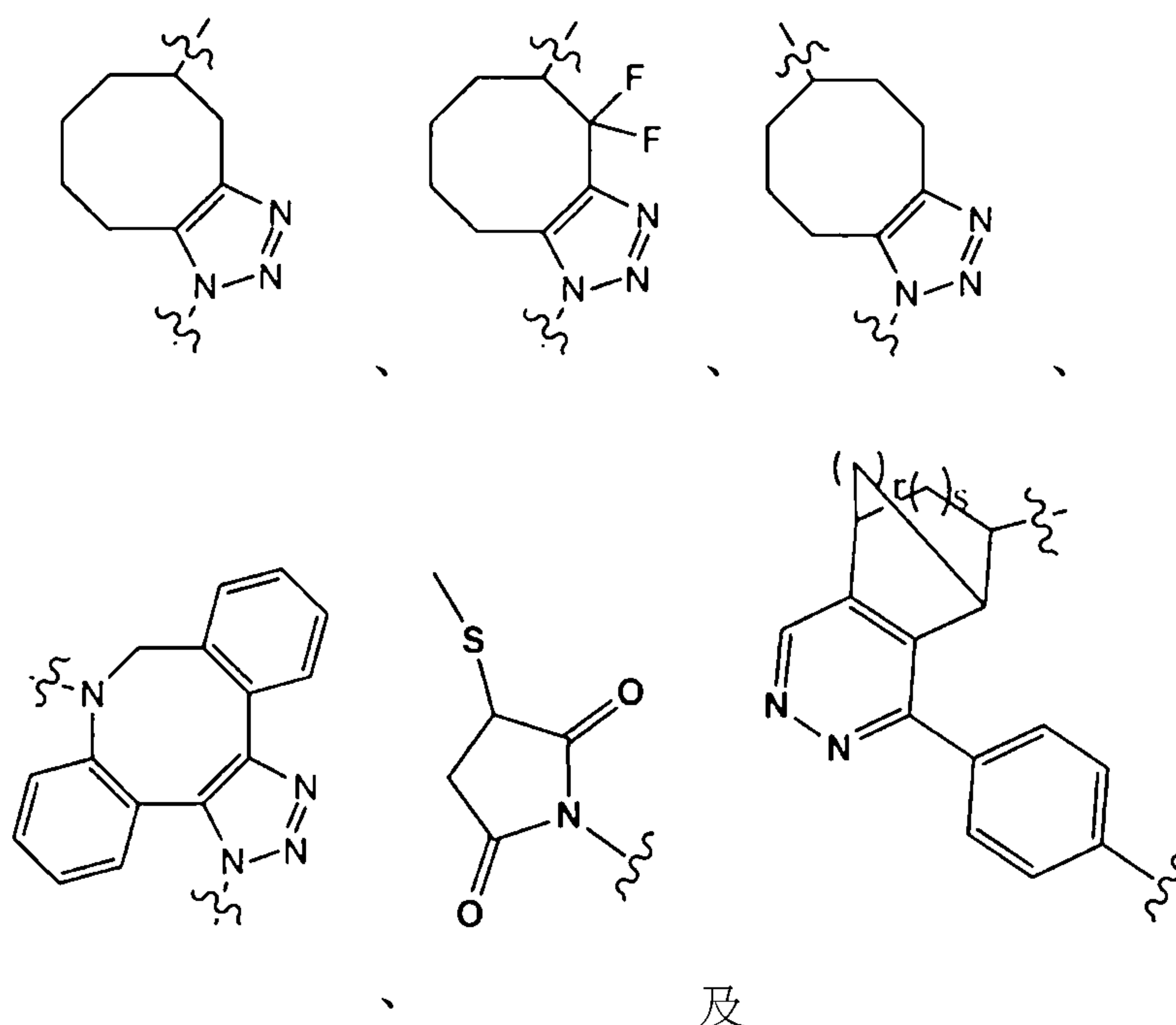
3. 如請求項1之共軛物，其中該脂肪酸係選自：



或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽。

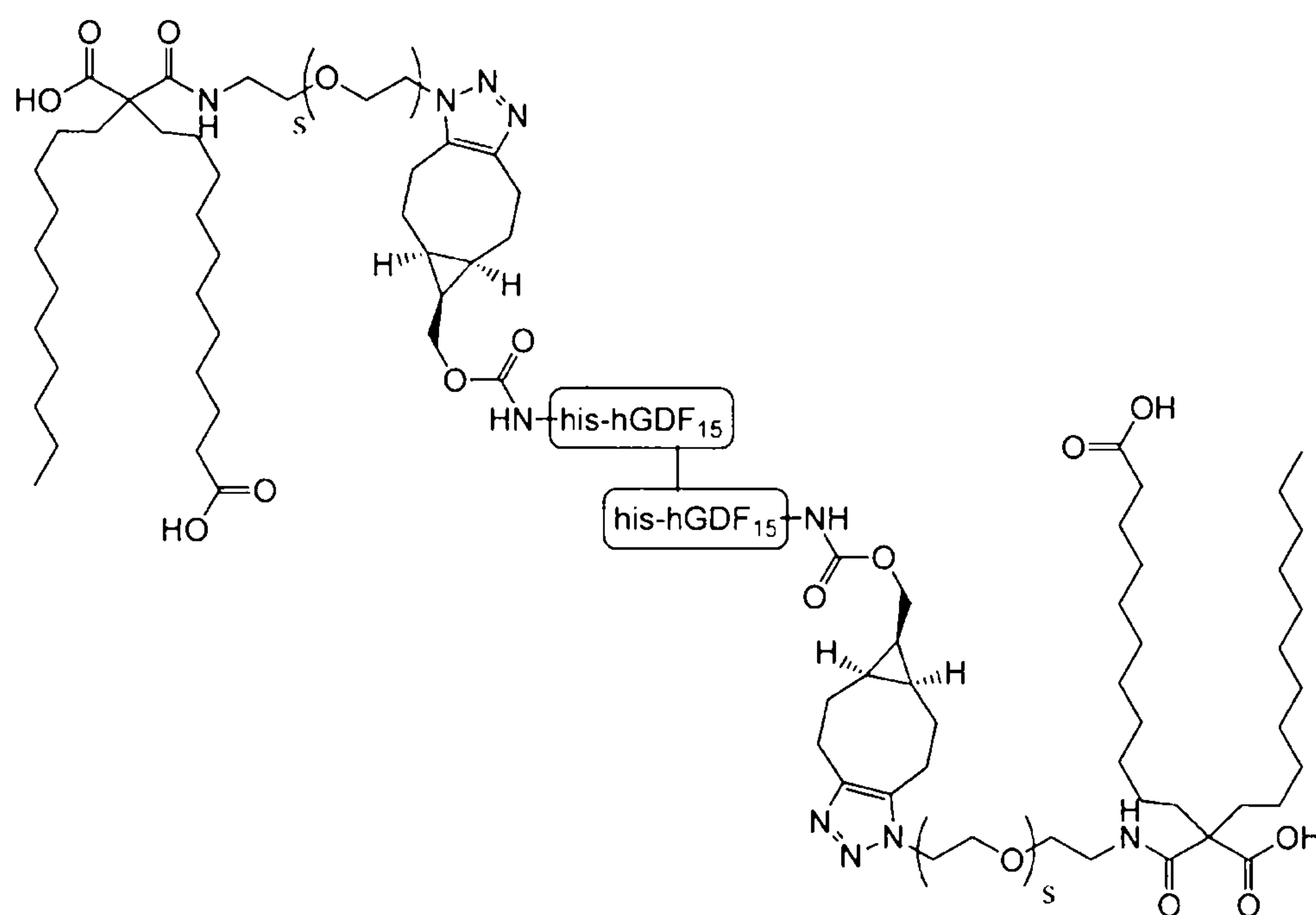
4. 如請求項1之共軛物，其中該連接子進一步包括下式之雜環部分：



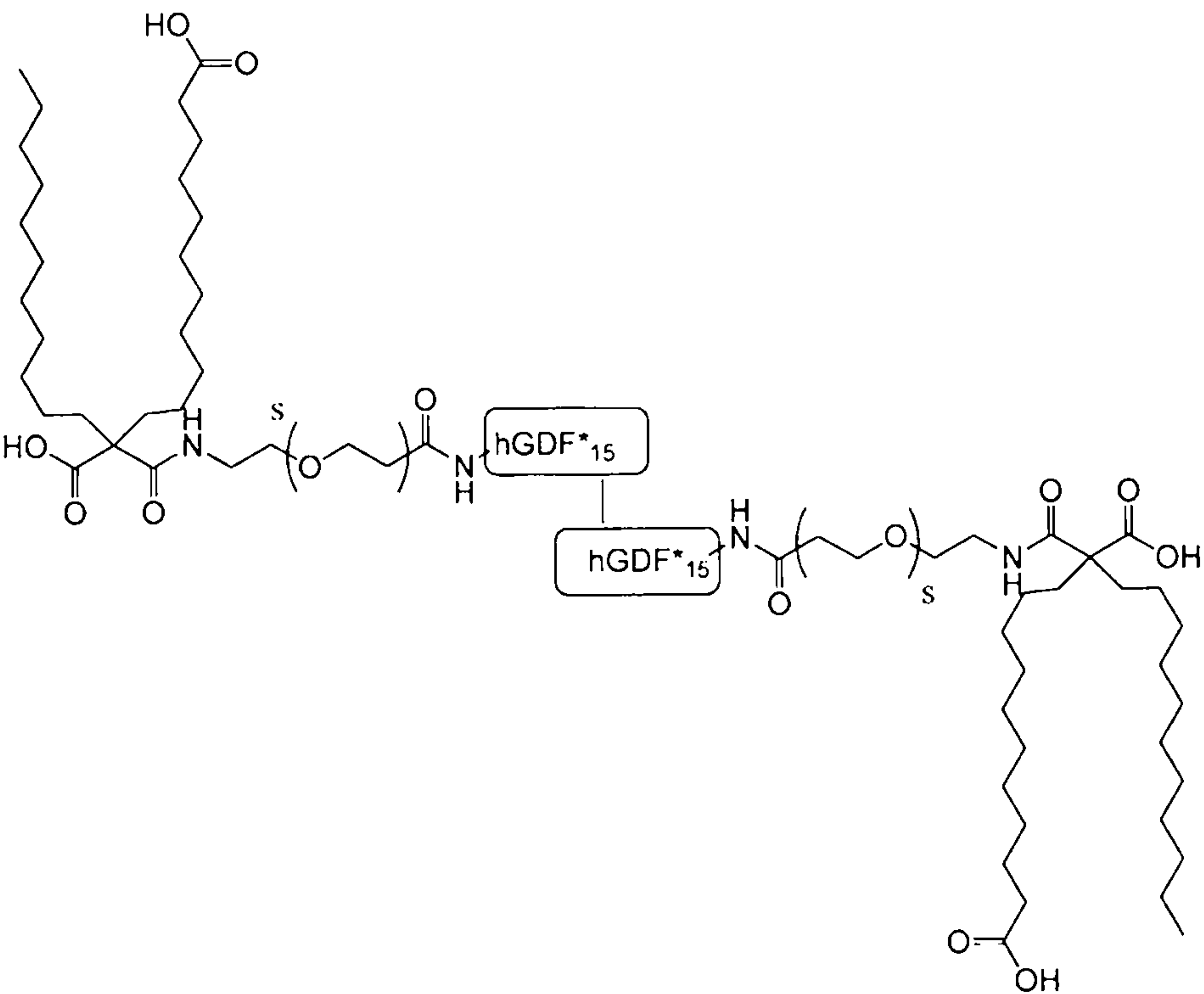


其中 r 係0至2之整數，且 s 係0至3之整數；或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽。

5. 如請求項1之共軛物，其中該連接子進一步包括一或多個獨立地選自組胺酸、甲硫胺酸、丙胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸及甘胺酸之胺基酸；或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽。
6. 如請求項1之共軛物，其中該經由連接子鍵聯至脂肪酸之生物分子具有下式中之一者：

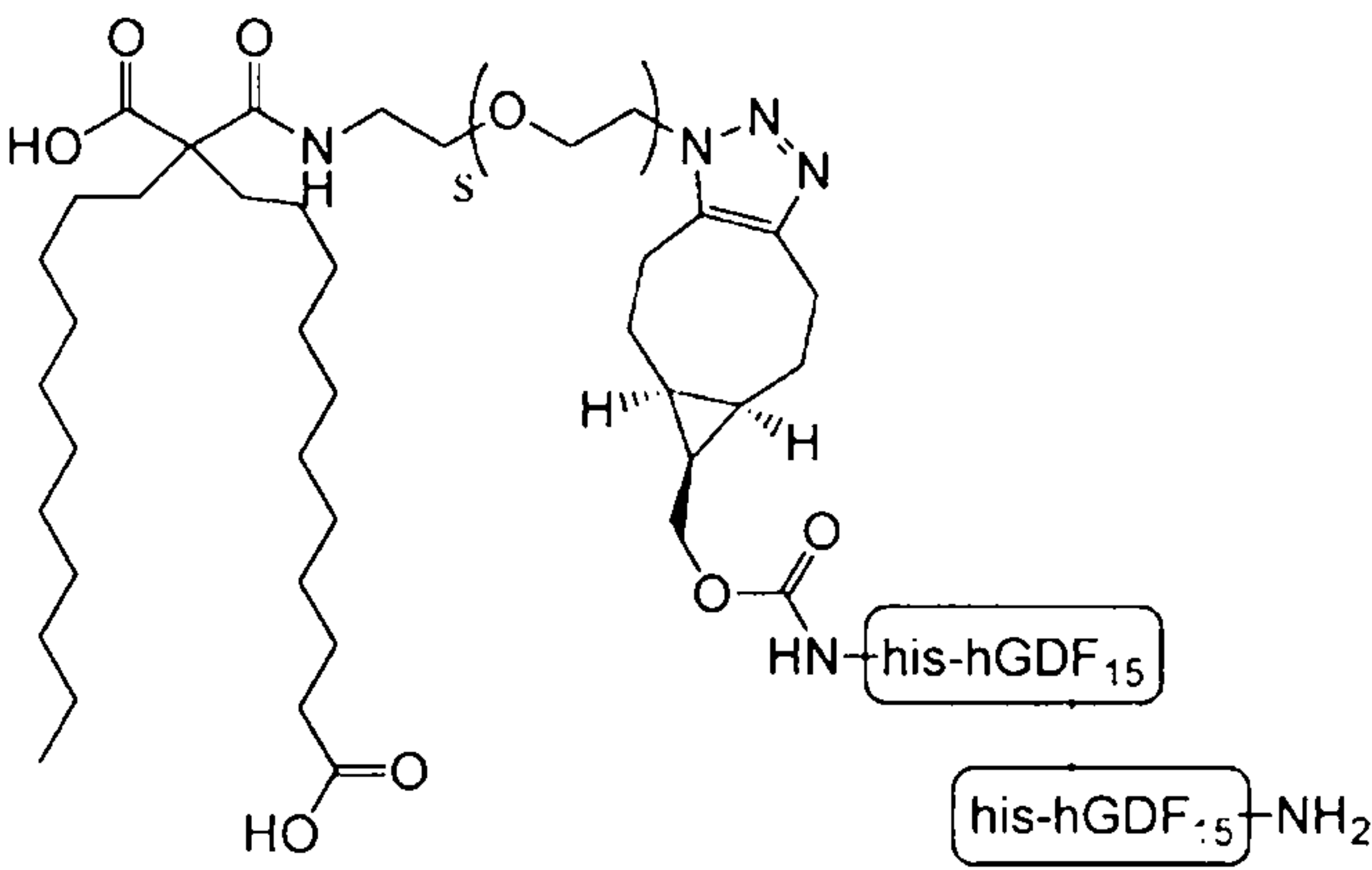


式C：

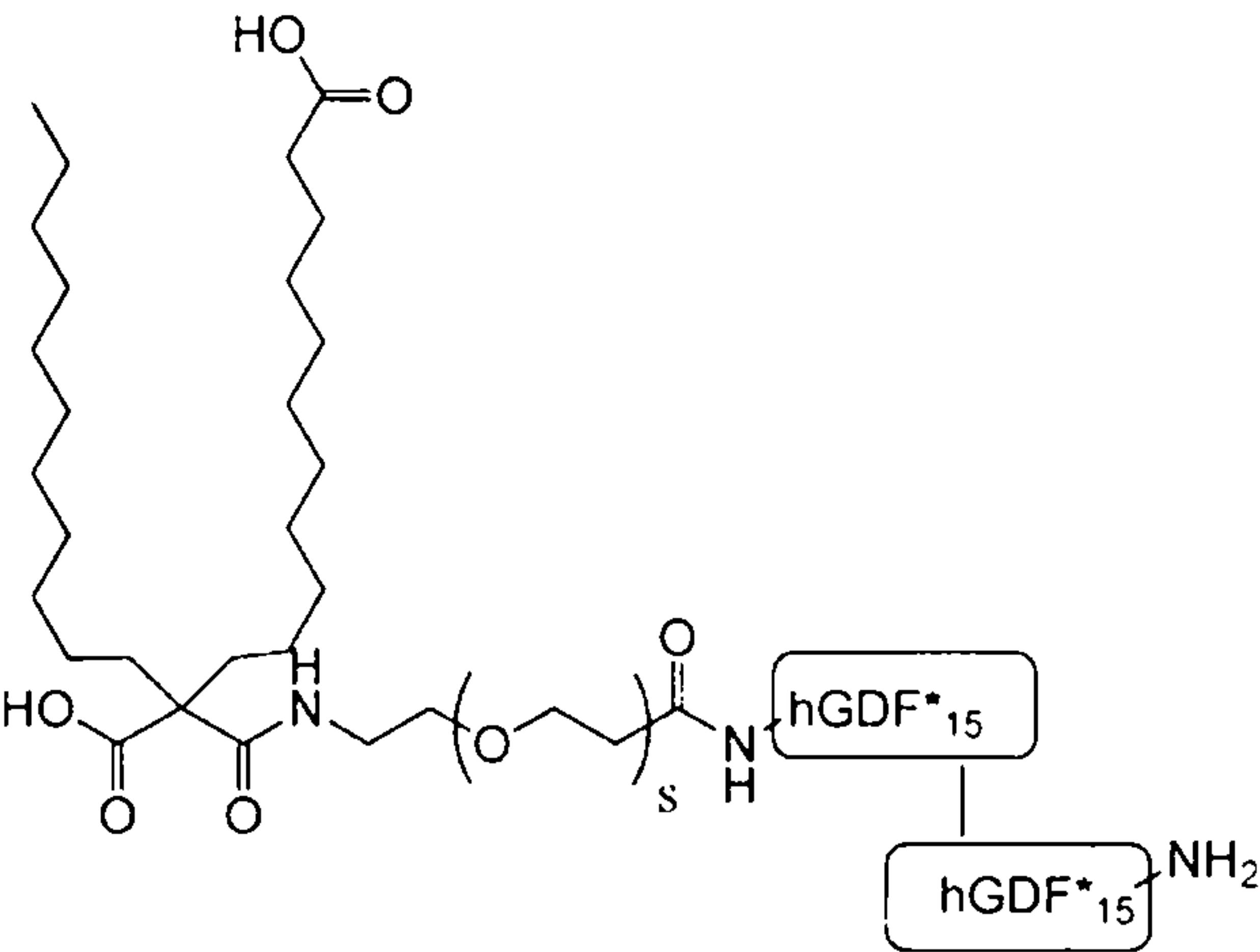


式D：

其中在式C及D中，his-hGDF15或hGDF15*之單體單元之N端均經由連接子鍵聯至該脂肪酸部分；或者



式E：



式F：

其中在式E及F中，his-hGDF15或hGDF15*之單體單元中僅有一者之N端經由連接子鍵聯至該脂肪酸部分；且

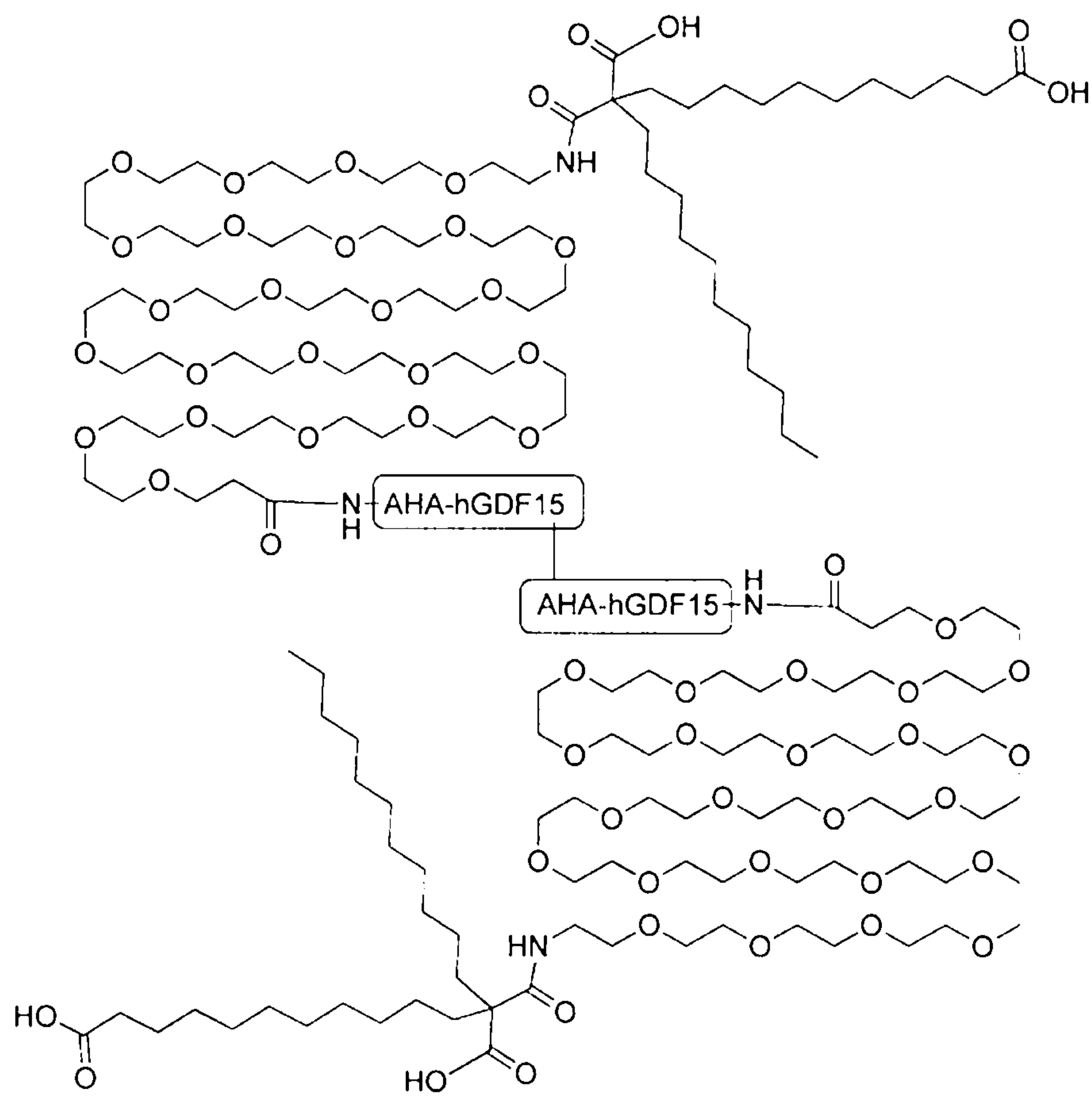
其中hGDF15*係N端之2或3個胺基酸分別經胺基酸序列XH-或XHX'-置換之hGDF15，

其中H係組胺酸，且X及X'係獨立地選自M及A；且

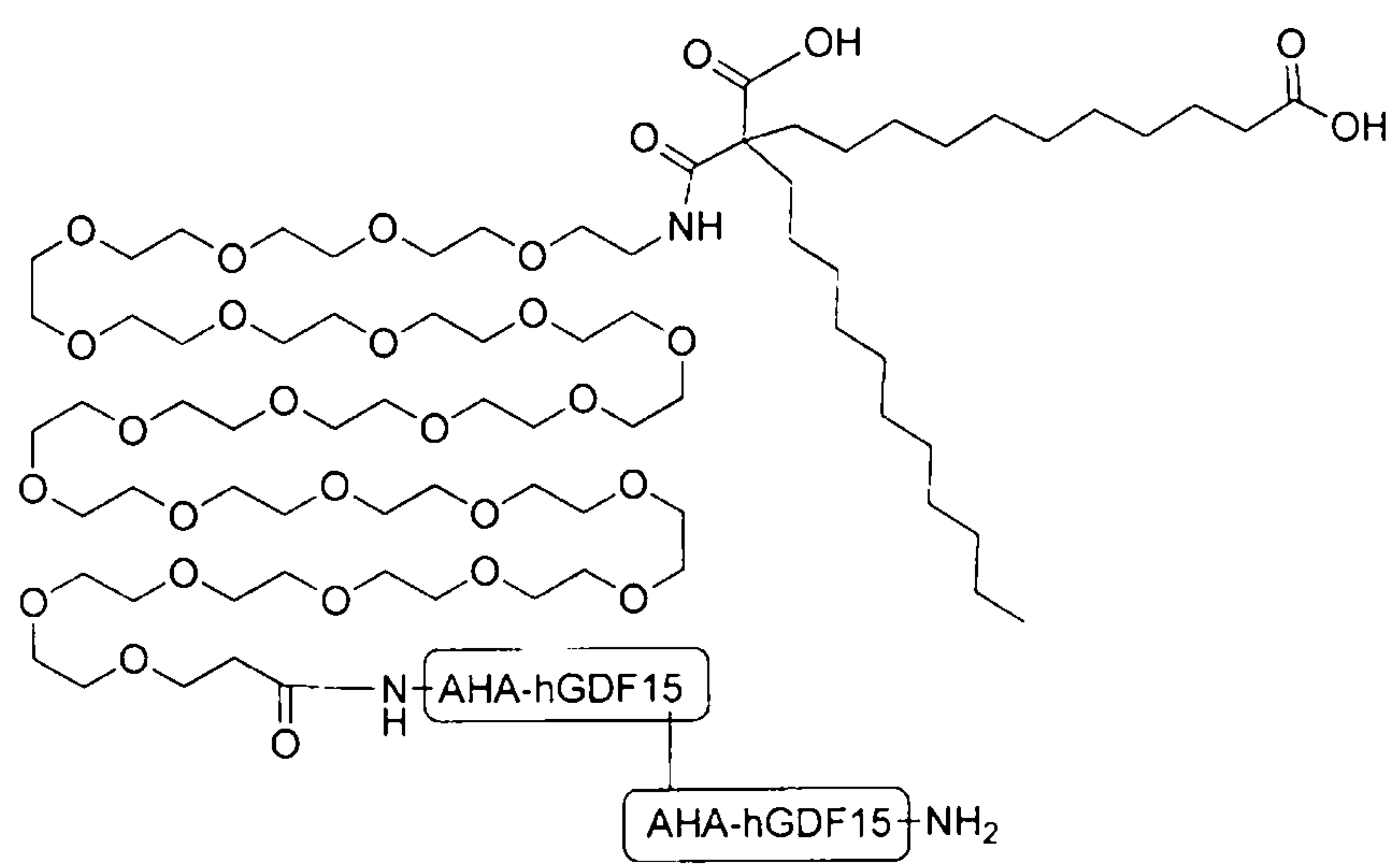
其中his-hGDF15係hGDF15之N端添加包含1至6個組胺酸胺基酸及視情況1或2個甲硫胺酸胺基酸之標記之hGDF15；且s係20至30間之整數；且

其中his-hDGF15之2個單體單元或hGDF15*之2個單體單元間之直線代表二硫鍵。

- 7 如請求項1之共軛物，其中該生物分子係MH(199-308)hGDF15、MHA(200-308)hGDF15、AHA(200-308)hGDF15、AH(199-308)GDF15、MHHHHHMH-hGDF15或MHHHHHHH-hGDF15，或其二聚體。
8. 如請求項6之共軛物，其中該經由連接子鍵聯至脂肪酸之生物分子具有式G或式H：



式G；



式H

其中AHA-hGDF15係SEQ ID NO:7，且該脂肪酸經由連接子鍵聯於一個或兩個單體單元之N端，且其中兩個AHA-hGDF15單元間之直線代表二硫鍵。

9. 如請求項1至8中任一項之共軛物，或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽，其係用作藥劑。

10. 如請求項1至8中任一項之共軛物，或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽，其係用於治療或預防代謝病症或疾病、糖尿病、第2型糖尿病、肥胖症、胰臟炎、異常血脂症、酒精性及非酒精性脂肪肝病/脂肪肝炎及其他進行性肝病、胰島素抗性、高胰島素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、動脈粥樣硬化、周邊動脈疾病、中風、心臟衰竭、冠心病、糖尿病併發症、神經病、胃輕癱及其他代謝病症。
11. 一種混合物，其包含如請求項6之具有式C之共軛物及如請求項6之具有式E之共軛物。
12. 一種混合物，其包含如請求項6之具有式D之共軛物及如請求項6之具有式F之共軛物。
13. 一種混合物，其包含如請求項8之具有式G之共軛物及如請求項8之具有式H之共軛物。
14. 如請求項13之混合物，其中該混合物係莫耳比為1:1之式G之共軛物及式H之共軛物。
15. 如請求項11至14中任一項之混合物，其係用作藥劑。
16. 如請求項11至14中任一項之混合物，其係用於治療或預防代謝病症或疾病、糖尿病、第2型糖尿病、肥胖症、胰臟炎、異常血脂症、酒精性及非酒精性脂肪肝病/脂肪肝炎及其他進行性肝病、胰島素抗性、高胰島素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、動脈粥樣硬化、周邊動脈疾病、中風、心臟衰竭、冠心病、糖尿病併發症、神經病、胃輕癱及其他代謝病症。
17. 一種如請求項1至8中任一項之共軛物、或如請求項11至14中任一項之共軛物之混合物、或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽之用途，其係用於製備用以治療或預防有需要個體之選自以下之疾

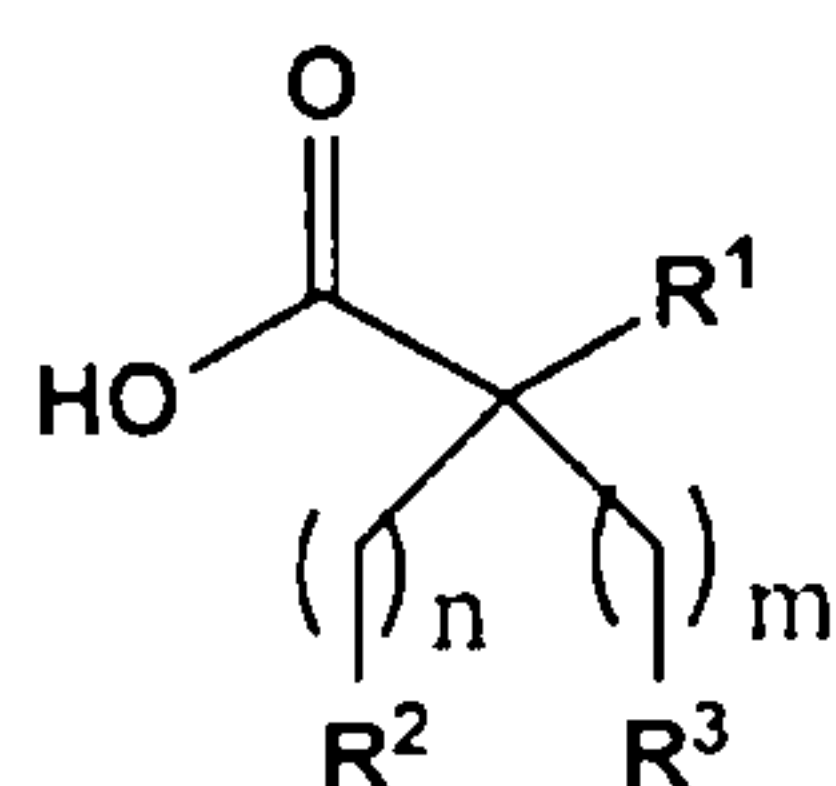
病或病症之藥劑：代謝病症或疾病、第2型糖尿病、肥胖症、胰臟炎、異常血脂症、酒精性及非酒精性脂肪肝病/脂肪肝炎及其他進行性肝病、胰島素抗性、高胰島素血症、葡萄糖不耐症、高血糖症、代謝症候群、高血壓、心血管疾病、動脈粥樣硬化、周邊動脈疾病、中風、心臟衰竭、冠心病、糖尿病併發症、神經病、胃輕癱及其他代謝病症。

18. 如請求項17之用途，其中GDF15突變體係選自MH(199-308)hGDF15、MHA(200-308)hGDF15、AHA(200-308)hGDF15、AH(199-308)GDF15、MHHHHHMH-hGDF15及MHHHHHHH-hGDF15或其二聚體。
19. 一種組合，其包含治療有效量之如請求項1至8中任一項之共軛物，或如請求項11至14中任一項之共軛物之混合物，或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽，；及一或多種治療活性助劑(co-agent)。
20. 如請求項19之組合，其中該助劑係選自抗糖尿病劑、降血脂劑、抗肥胖劑、抗高血壓劑及過氧化體增殖劑-活化劑受體之促效劑。
21. 如請求項20之組合，其中該助劑係選自胰島素、胰島素衍生物及擬似物；胰島素促泌素；格列本脲(glyburide)、瑪爾胰(Amaryl)；促胰島素磺醯基脲受體配體；噻唑烷二酮類，吡格列酮(pioglitazone)、巴格列酮(balaglitazone)、來格列酮(rivoglitazone)、萘格列酮(netoglitazone)、曲格列酮(troglitazone)、恩格列酮(englitazone)、環格列酮(ciglitazone)、阿達格列酮(adaglitazone)、達格列酮(darglitazone)、膽固醇酯轉移蛋白(CETP)抑制劑、GSK3 (肝糖合成酶激酶-3)抑制劑；RXR配體；鈉依賴性葡萄糖共運送體抑制劑；肝糖磷酸化酶A抑制劑；雙胍類； α -葡萄

糖苷酶抑制劑、GLP-1 (升糖素樣肽-1)、GLP-1類似物、GLP-1擬似物；DPPIV (二肽基肽酶IV)抑制劑、3-羥基-3-甲基-戊二醯基輔酶A (HMG-CoA)還原酶抑制劑；角鯊烯合成酶抑制劑；FXR (類法尼醇X受體)、LXR (肝X受體)配體；考來烯胺(cholestyramine)；纖維酸酯類(fibrates)；菸鹼酸、阿司匹林(aspirin)；奧利司他(orlistat)或利莫那班(rimonabant)；亨氏環利尿劑、呋塞米(furosemide)、托拉塞米(torsemide)；血管收縮素轉化酶(ACE)抑制劑；Na-K-ATP酶膜泵之抑制劑；中性內肽酶(NEP)抑制劑；ACE/NEP抑制劑；第II型血管收縮素拮抗劑；腎素抑制劑； β -腎上腺髓素受體阻斷劑；強心劑、多巴酚丁胺(dobutamine)、甲氰吡酮(milrinone)；鈣離子通道阻斷劑；醛固酮受體拮抗劑；醛固酮合成酶抑制劑；非諾貝特(fenofibrate)、吡格列酮、羅格列酮(rosiglitazone)、替格列扎(tesaglitazar)、BMS-298585及L-796449。

22. 一種醫藥組合物，其包含治療有效量之如請求項1至8中任一項之共軛物，或如請求項11至14中任一項之共軛物之混合物，或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽，及一或多種醫藥上可接受的載劑。

23. 一種下式之化合物：



A1 ,

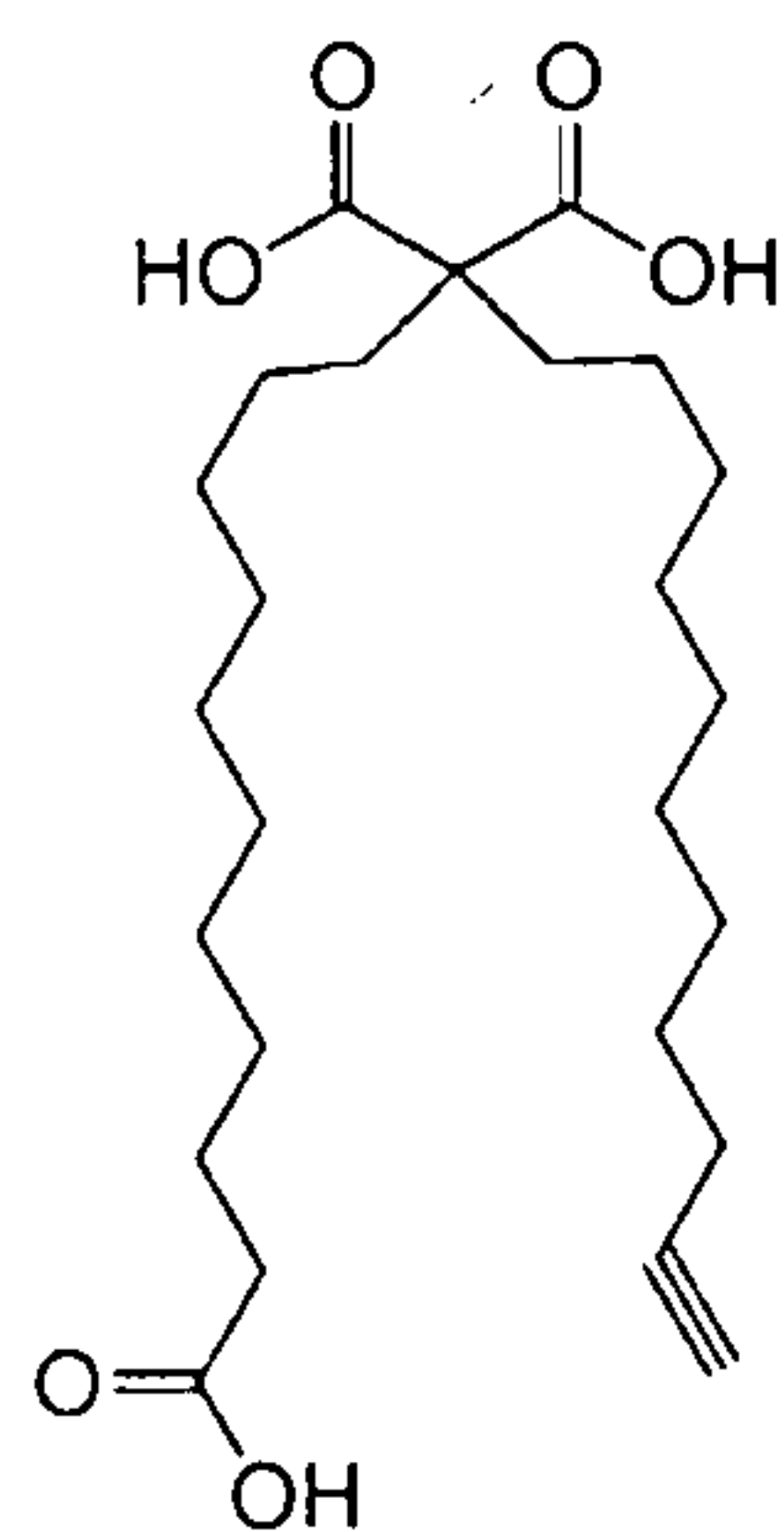
R^1 係 CO_2H ；

R^2 及 R^3 彼此獨立地為H、OH、 CO_2H 、 $-CH=CH_2$ 或 $-C=CH$ ；限

n及m彼此獨立地為6與30間之整數；或其醯胺、酯或醫藥上可接受的鹽。

The image displays three chemical structures, labeled (a), (b), and (c), representing different long-chain fatty acids. Each structure consists of a glycerol backbone esterified with two long-chain fatty acids. The fatty acid chains are depicted as zigzag lines. Structure (a) shows a saturated fatty acid chain. Structure (b) shows a saturated fatty acid chain. Structure (c) shows an unsaturated fatty acid chain with a terminal double bond.

及



9

圖式

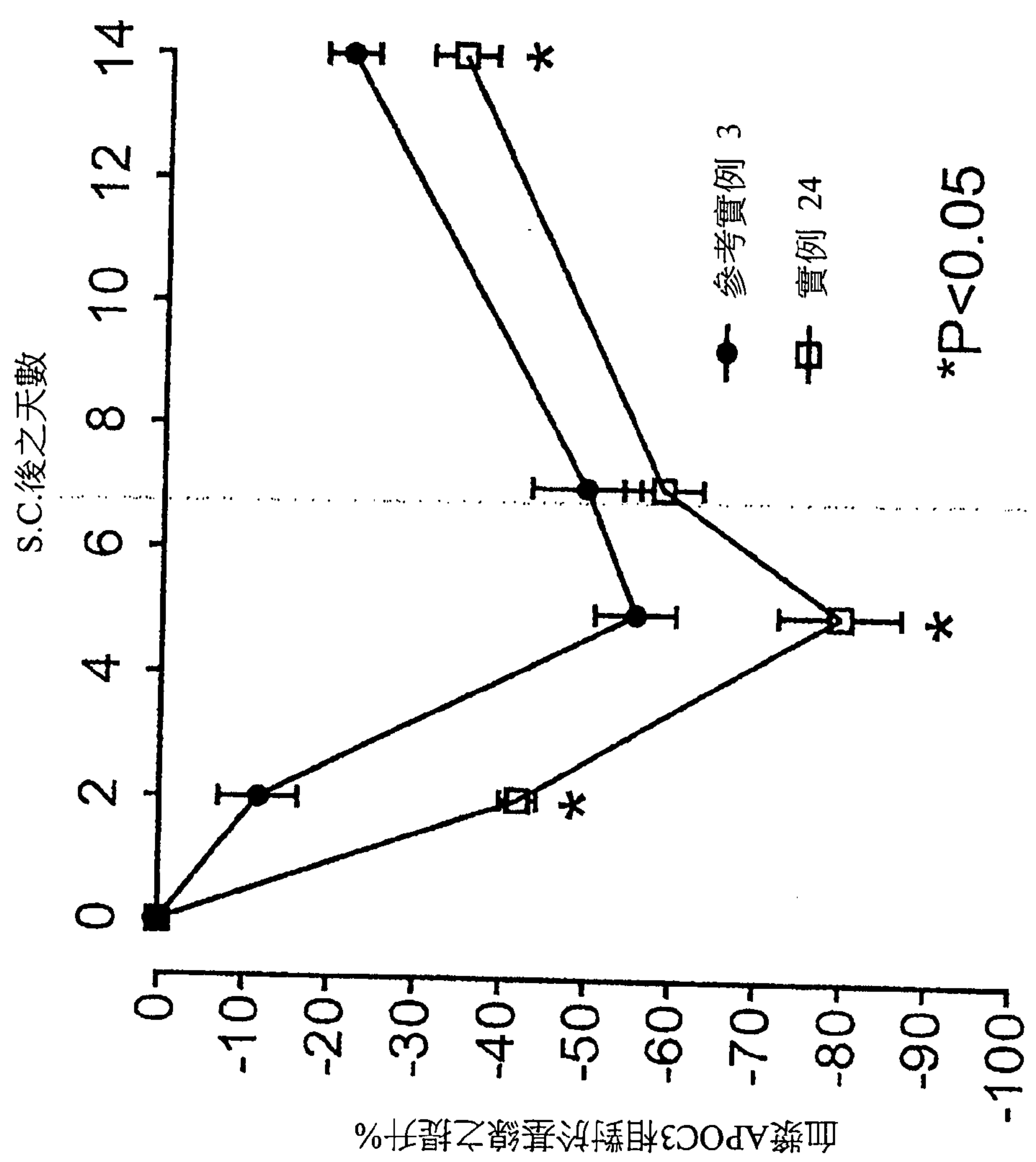


圖1