



(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 I504405 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 10 月 21 日

(21)申請案號：099101707

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 01 月 22 日

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

C07K14/61 (2006.01)

C12N15/18 (2006.01)

(30)優先權：2009/01/22

歐洲專利局

09151108.9

(71)申請人：諾佛 農迪克保健股份公司 (瑞士) NOVO NORDISK HEALTH CARE AG (CH)
瑞士(72)發明人：歐森 歐爾 維斯泰德 OLSEN, OLE HVILSTED (DK)；布雷霍特 傑斯
BREINHOLT, JENS (DK)；史曲歐德特 克利斯汀 布魯恩 (DK)；丹穆斯 海
兒 DEMUTH, HELLE (DK)；諾斯寇福 羅瑞特森 萊夫 (DK)；席傑森 彼得
THYGESEN, PETER (DK)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

US 2003/0125232A1

US 2003/0162949A1

US 2005/0170404A1

WO 2006/048777A2

審查人員：黃文延

申請專利範圍項數：24 項 圖式數：3 共 80 頁

(54)名稱

穩定的生長激素化合物

STABLE GROWTH HORMONE COMPOUNDS

(57)摘要

本發明係關於一種穩定的生長激素(GH)化合物，其經由引入半胱胺酸殘基而具有雙硫橋，從而使該化合物抗蛋白水解性降解。

The present invention relates to stable growth hormone (GH) compounds, which through the introduction of cysteine residues have disulphide bridges, which make the compounds resistant to proteolytic degradation.

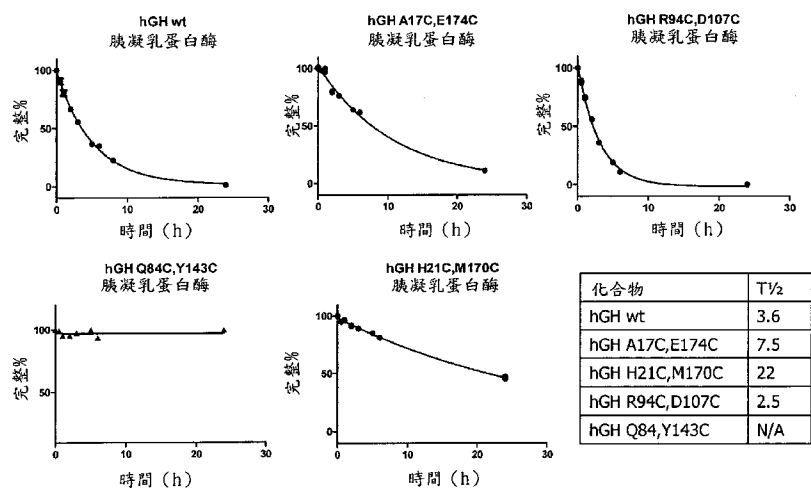


圖3A

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99101707

※申請日：99.1.22

※IPC 分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

穩定的生長激素化合物

STABLE GROWTH HORMONE COMPOUNDS

A61K 38/27 (2006.01)

C07K 14/61 (2006.01)

C12N 15/18 (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種穩定的生長激素 (GH) 化合物，其經由引入半胱胺酸殘基而具有雙硫橋，從而使該化合物抗蛋白水解性降解。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to stable growth hormone (GH) compounds, which through the introduction of cysteine residues have disulphide bridges, which make the compounds resistant to proteolytic degradation.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (3A 與 3B) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種抗蛋白水解性降解之穩定的生長激素（growth hormone，GH）化合物。

【先前技術】

生長激素（GH）為哺乳動物之前垂體所分泌的多肽激素。視物種而定，GH為由約190個胺基酸殘基組成之蛋白質，對應於約22 kDa之分子量。GH與細胞表面受體GH受體（GHR）結合且經由該等受體傳導信號。GH在促進生長、維持正常人體組成、合成代謝及脂質代謝方面起關鍵作用。其亦對中間代謝具有直接作用，諸如減少葡萄糖攝取、增加脂肪分解、增加胺基酸攝取及蛋白質合成。該激素亦對其他組織發揮作用，包括脂肪組織、肝、腸、腎、骨骼、結締組織及肌肉。已生產出重組hGH且以例如 Genotropin™（Pharmacia Upjohn）、Nutropin™ 及 Protropin™（Genentech）、Humatrope™（Eli Lilly）、Serostim™（Serono）、Norditropin（Novo Nordisk）、Omnitrope（Sandoz）、Nutropin Depot（Genentech and Alkermes）市售可得。另外，在N端具有另外的甲硫胺酸殘基之類似物亦以例如 Somatnorm™（Pharmacia Upjohn/Pfizer）銷售。

GH與蛋白質GH家族之其他成員催乳素（Prolactin，PRL）及胎盤生乳素（Placental Lactogen，PL）具有共同的拓撲結構。GH歸類為四螺旋束蛋白質（圖1），其展現「上-上-下-下」拓撲結構及兩個保守的雙硫鍵。特定言之，野

生型人類 GH(hGH)由 191 個胺基酸殘基組成且在位置 53、165、182 及 189 處具有四個半胱胺酸殘基，該 hGH 藉由形成兩個分別連接 C53 與 C165 及 C182 與 C189 之分子內雙硫鍵而使蛋白質之三維結構穩定(圖 1)。已由 X 射線結晶學以實驗方法確定 hGH 之結構，其呈自由形式(Chantalet L. 等人, (1995) Protein and Peptide Letters 3, 333-340)及與其結合蛋白(人類 GHR(hGHR)之胞外域)之複合體形式(Devos, A. M. 等人, (1992) Science 255, 306-312)。此等結構已寄存於蛋白質資料庫(Protein Data Bank, PDB)中且公開可用(PDB 寄存代碼分別為 1HGU 及 1HWG)。因此，自所公開之 hGH 結構可鑑別對 hGH 與 hGHR 之結合較重要的殘基。此外，已由核磁共振(NMR)光譜學研究 hGH 之動力學性質(Kasimova M.R. 等人, J. Mol. Biol. (2002) 318, 679-695)。X 射線合併 NMR 資料可區分 hGH 之結構明確且界限分明之區域與結構不太明確且動態之區域。預期 hGH 之結構不太明確且動態之區域特別易發生蛋白水解切裂，且使該等區域適當穩定會改善蛋白水解穩定性。

已對 hGH 進行廣泛突變誘發以試圖產生具有所要化學性質或生物性質之 hGH 類似物。特定言之，已描述用於達成若干目的之半胱胺酸突變體。

US 2003/0162949 揭示 GH 超基因家族成員之半胱胺酸變異體。提供一種產生此等蛋白質之具位點特異性及生物活性之結合物的一般方法。該方法包括在蛋白質之非必需區域中添加半胱胺酸殘基或使用定點突變誘發以半胱胺酸

殘基取代蛋白質中之非必需胺基酸，隨後使半胱胺酸反應性聚合物或其他類型之半胱胺酸反應性部分與蛋白質經由所添加之半胱胺酸殘基共價偶合。

WO 02/055532 描述具有至少一個共價連接之非多肽部分的經基因工程改造之 hGH 突變體，尤其為所引入之半胱胺酸殘基用於聚乙二醇化 (pegylation) 之 hGH 突變體。

US 5,951,972 描述具生理學活性且經衍生之天然及重組哺乳動物及人類蛋白質及多肽，其中蛋白質內至少一個天然存在之或所併入之半胱胺酸殘基經各種取代基進行衍生處理。

已詳細研究 hGH 之蛋白水解切裂。由殘基 128 至 154 組成之長環針對若干蛋白酶具有推定切裂位點，該等蛋白酶為諸如凝血酶、纖溶酶、膠原酶、枯草桿菌蛋白酶 (subtilisin) 及胰凝乳蛋白酶樣絲胺酸蛋白酶。因此，此 hGH 部分已顯示特別易發生蛋白水解切裂 (Lewis, U.J. Ann. Rev. Physiol. (1984) 46, 33-42)。據報導使 hGH 降解之酶包括凝血酶、纖溶酶、枯草桿菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶樣絲胺酸蛋白酶及激肽釋放酶 (kallikrein)。

已研究大鼠組織中 hGH 之降解 (Garcia-Barros 等人, J. Endocrinol. Invest. (2000) 23, 748-754)。

在大鼠甲狀腺胰凝乳蛋白酶樣蛋白酶中，最初發現大體積且親脂性的胺基酸殘基處之有利切裂使 Y143 與 S144 之間的肽鍵斷裂，產生雙鏈分子，接著使 Y42 與 S43 之間斷裂，釋放 N 端肽 F1-Y42。進一步藉由胰凝乳蛋白酶樣蛋

白酶使 F146 與 D147 之間斷裂及進一步藉由羧肽酶作用來加工雙鏈分子中之裂解環 (split loop)。

已報導若干用以產生對蛋白水解性降解穩定之 hGH 類似物的方法。

Alam 等人, J. Biotech. 65, 183-190 (1998)藉由特異性點突變而設計出抗凝血酶及纖溶酶之 hGH 突變體。凝血酶使 hGH 切裂, 尤其在 R134 與 T135 之間斷裂, 且雙重突變體 R134D, T135P 得到抗凝血酶切裂之 hGH 變異體, 且三重突變體 R134D, T135P, K140A 對纖溶酶產生抗性。此外, 後一 hGH 突變體歷經 7 天抗人類血漿蛋白水解。

EP534568 描述藉由使 R134 突變成丙胺酸、白胺酸、蘇胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸或組胺酸而對蛋白水解性降解穩定之 hGH 突變體。

WO2004022593/Nautilus 描述用以產生蛋白水解穩定性增加之經修飾細胞激素 (包括 GH 變異體) 的一般高產量定向演化法。

WO2006048777/Nautilus 特別描述蛋白水解穩定性改善之經修飾 hGH 類似物。該等類似物在位置 1-55、57、58、60-63、67-87、89-91、93、95-100、102-128、131-132、135-139、141、142、144、148-182、184、185 及 187-191 處含有 1 至 5 個突變。引入半胱胺酸殘基會潛在地形成非所要的經雙硫鍵鍵聯之二聚體, 且在 WO2006048777 中, 用半胱胺酸取代胺基酸殘基特別排除在該範圍以外; 在 WO2006048777 (第 65 頁) 中闡述:「明確避免用半胱胺酸

殘基置換胺基酸，因為此變化會潛在地形成分子間雙硫鍵」。

顯然需要開發抗蛋白水解性降解之 hGH 化合物。該等穩定之化合物對蛋白水解切裂應展現增加之穩定性，同時保留 hGH 之所要生物性質。該等 GH 分子會具有增加之穩定性、減緩之清除率及/或延長之活體內半衰期。

此外，蛋白質治療劑一般需要靜脈內或皮下投予，因為其一般不能經口充分利用。蛋白質之較低口服生體可用率部分歸因於在胃腸道中發生蛋白水解性降解。因此，亦需要開發可經口投予來治療 hGH 相關病症之 hGH 化合物。

【發明內容】

本發明係關於包含另外的雙硫鍵之 hGH 化合物。在本發明之 hGH 化合物中，已藉由使野生型 hGH 序列中之至少一個胺基酸突變成半胱胺酸而引入至少一個另外的半胱胺酸殘基。在本發明之 hGH 化合物中，突變位點係依以下方式選擇：(1) 所引入之半胱胺酸殘基在摺疊的蛋白質之三維結構中適當地放置以允許形成野生型蛋白質中不存在之另外的雙硫鍵；(2) 不會破壞 hGH 之原生結構；(3) hGH 化合物與野生型 hGH 相比對蛋白水解切裂展現增加之穩定性或展現其他增強之功能性；及 (4) hGH 化合物保留與野生型 hGH 相關之所要生物活性。可開發 hGH 化合物之抗胃腸道中的蛋白水解性降解之該等雙硫鍵變異體以作為供治療 hGH 相關病症用之經口投予藥物。

【實施方式】

本發明係關於具有另外的雙硫鍵之穩定 hGH 化合物。該等雙硫鍵在半胱胺酸對之間形成，該等半胱胺酸中之一或兩者係藉由在野生型 hGH 序列中進行點突變而引入。突變位點經選擇使得所引入之半胱胺酸殘基在摺疊的蛋白質之三維結構中適當地放置以允許形成雙硫鍵。若僅引入一個半胱胺酸，則其形成雙硫鍵之搭配物應包括野生型 hGH 中所存在之四個半胱胺酸殘基之一。具有另外的雙硫鍵之摺疊的蛋白質可藉由適合之宿主生物體表現 hGH 之呈可溶形式之適當半胱胺酸突變體來獲得，或使用熟習此項技術者所熟知的生長激素化合物之標準再摺疊條件自包涵體回收 (Cabrita 及 Bottomley, *Biotechnology Annual Review* 10, 31-50 (2004))。引入另外的雙硫鍵之候選位置的鑑別可由計算方法輔助，例如使用以實驗方法確定之呈與兩個結合蛋白複本之複合體形式的 hGH 三維結構 (PDB 寄存代碼 1HWG)。引入雙硫鍵之適當位置的選擇可基於 Dombkowski A., A., *Bioinformatics* 19, 1852-1853 (2003) 及 Petersen 等人, *Protein Eng.* 12, 535-548 (1999) 中所述之雙硫鍵之距離及幾何學準則。

半胱胺酸突變體經選擇使得所引入之雙硫鍵不會破壞蛋白質之原生結構且對與 hGH 相關之所要生物活性具有最小的負面影響。因此，該化合物經建構使得所引入之雙硫鍵不會削弱與 hGHR 之相互作用。已自 1HWG 鑑別出 hGH 中對受體相互作用較重要之區域。因此，引入對生物活性而言呈中性之雙硫鍵的適當位置之選擇可藉由分析 1HWG

結構來引導。

半胱氨酸突變體可經選擇使得所引入之雙硫鍵對蛋白水解切裂提供增加之穩定性。蛋白質對蛋白酶切裂之敏感性係部分由該蛋白質之一級胺基酸序列決定。蛋白酶可能相對不具特異性，或可能以可變程度之選擇性識別一級胺基酸序列中之特異性基元。然而，充當受質之蛋白質分子之三維結構及動力學高度影響蛋白水解穩定性。高度可撓且動態之環結構特別易受蛋白酶催化之切裂的攻擊，而結構明確之區域一般不太易受攻擊。因此，防止蛋白水解切裂之保護可藉由引入雙硫鍵使蛋白質之動態區域穩定來實現。

本發明之一個態樣係關於一種在 SEQ ID No. 1 中包含另外的雙硫鍵之生長激素化合物。如下文所述，本發明之生長激素化合物之多肽較佳與 SEQ ID No. 1 所鑑別之人類生長激素具有高度一致性，且相應地，與 SEQ ID No. 1 所定義之人類生長激素相比，生長激素化合物包含一或多個另外的雙硫鍵。

因此，本發明之一個具體實例提供藉由引入另外的雙硫鍵而抗蛋白水解性降解的根據 SEQ ID No. 1 之穩定 GH 化合物。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物在至少一個胺基酸對之間包含另外的雙硫鍵，該等胺基酸對位於對應於以下之位置處：SEQ ID No. 1 中之 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、

N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、
F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、
I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、
P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、
R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、
Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、
P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、
V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或
V185C/S188C。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物在至少一個胺基酸對之間包含另外的雙硫鍵，該等胺基酸對位於對應於（但不限於）以下之位置處：SEQ ID No. 1 中之 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物在至少一個胺基酸對之間包含另外的雙硫鍵，該等胺基酸對位於對應於（但不限於）以下之位置處：SEQ ID No. 1 中之 A17C/E174C、H21C/M170C、S71C/S132C、Q84C/Y143C 及

R94C/D107C。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物在位於對應於 SEQ ID No. 1 中之 Q84C/Y143C 之位置處的胺基酸對之間包含另外的雙硫鍵。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於（但不限於）以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、

F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於（但不限於）以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 A17C/E174C、H21C/M170C、S71C/S132C、Q84C/Y143C 及 R94C/D107C。

在本發明之一個具體實例中，本發明之生長激素化合物包含一對對應於 SEQ ID No. 1 中之位置 Q84C/Y143C 之突變。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物之蛋白水解穩定性係藉由在環區段與螺旋結構之間引入雙硫鍵而實現。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物之蛋白水解穩定性係藉由在環區段內部引入雙硫鍵而實現。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物之蛋白水解穩定性係藉由在環區段之間引入雙硫鍵而實現。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物之蛋白水解穩定性係藉由在螺旋之間引入雙硫鍵而實現。

在本發明之一個具體實例中，至少一個所引入之雙硫鍵鍵聯生長激素化合物之兩個半胱胺酸殘基，其中至少一個該等半胱胺酸殘基不存在於野生型 hGH 中。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物中所引入之雙硫鍵位於使用 Dombkowski A., A., Bioinformatics 19, 1852-1853 (2003) 及 Petersen 等人, Protein Eng. 12(7),

535-548 (1999)中所述之距離及幾何學準則而選擇的半胱氨酸殘基之間：。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物中所引入之雙硫鍵使連接 H3 與 H4 之環（L3，殘基 128-154）穩定，亦即，所引入之雙硫鍵中至少一個半胱氨酸位於包含殘基 128-154 之區段中（圖 1 及圖 2）。

表 1

	藉由與 SEQ ID No. 1 進行序列排比而定義之第一胺基酸	藉由與 SEQ ID No. 1 進行序列排比而定義之第二胺基酸	經連接之二級結構區段 ^a
1.	16	117	H1-H3
2.	17	174	H1-H4
3.	21	170	H1-H4
4.	26	102	H1-L2
5.	26	103	H1-L2
6.	47	50	L1-L1
7.	49	161	L1-L1
8.	54	143	L1-L3
9.	54	144	L1-L3
10.	54	146	L1-L3
11.	55	143	L1-L3
12.	57	143	L1-L3
13.	58	141	L1-L3
14.	58	143	L1-L3
15.	58	144	L1-L3
16.	59	137	L1-L3
17.	61	66	L1-L1
18.	61	67	L1-L1
19.	71	132	L1-L3
20.	73	132	H2-L3
21.	73	139	H2-L3
22.	77	138	H2-L3
23.	77	139	H2-L3
24.	81	141	H2-L3
25.	81	143	H2-L3
26.	84	143	H2-L3
27.	84	144	H2-L3
28.	85	143	H2-L3
29.	85	144	H2-L3
30.	89	146	H2-L3
31.	92	146	H2-L3

	藉由與 SEQ ID No. 1 進行序列 排比而定義之第一胺基酸	藉由與 SEQ ID No. 1 進行序列 排比而定義之第二胺基酸	經連接之二級 結構區段 ^a
32.	92	148	H2-L3
33.	94	107	H2-H3
34.	102	105	L2-H3
35.	156	146	H4-L3
36.	156	148	H4-L3
37.	185	188	Ct-Ct

a) H1-H4 係指螺旋 1-4，L1-L3 係指環 1-3，且 Ct 係指 C 端區段。

如上所述，本發明係關於一種在多肽之環區段與螺旋區段之間或環區段內部或環區段之間或螺旋區段之間包含另外的雙硫鍵的生長激素化合物。任何該另外的雙硫鍵之定位均出於關於 SEQ ID No. 1 所定義之 hGH 之多肽而描述的本申請案之目的。

在一個具體實例中，本發明之生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及/或 V185C/S188C。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對

應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及/或 R94C/D107C。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 A17C/E174C、H21C/M170C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、F92C/T148C 及/或 R94C/D107C。

本發明之一個具體實例係關於一種包含另外的雙硫鍵之生長激素化合物，其中至少一個半胱胺酸存在於 L3 (SEQ ID NO. 1 中之 AA 128-154) 中，或諸如 AA 135-148 或相應胺基酸殘基所定義之環的中間區域中。

在一個具體實例中，生長激素化合物之另外的雙硫鍵之至少一個半胱胺酸存在於 L3 中對應於以下之位置處：SEQ ID No. 1 中之 AA141、AA142、AA143、AA144、AA145 或 AA146，較佳為 AA143 或 AA144。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、

R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C 及 /或 F92C/T148C。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C 及 /或 F92C/T148C。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及 /或 F92C/T148C。

本發明之一個具體實例係關於一種包含連接 L3 與 L1 之另外的雙硫鍵的生長激素化合物。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含連接對應於 SEQ ID No. 1 之 L3 中之 AA54、AA55、AA56、AA57、AA58 或 AA59 的胺基酸殘基與對應於 L1 中之 AA143 或 AA144 的胺基酸之另外的雙硫鍵。

在一個具體實例中，本發明之生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、

P59C/Q137C 及 / 或 S71C/S132C。

在一個具體實例中，生長激素包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C 及 / 或 S71C/S132C。

本發明之一個具體實例係關於一種包含連接 L3 與螺旋區段（諸如螺旋 2（H2））之另外的雙硫鍵的生長激素化合物。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含連接對應於 SEQ ID No. 1 之 H2 中之 AA84 或 AA85 的胺基酸殘基與對應於 L3 中之 AA143 或 AA144 的胺基酸之另外的雙硫鍵。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C 及 F92C/T148C。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C 及 / 或 F92C/T148C。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及 / 或 F92C/T148C。

本發明之一個具體實例係關於一種包含連接 L2 與螺旋 1 之另外的雙硫鍵的生長激素化合物。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對

應於 D26C/V102C 或 D26C/Y103C 之突變。

對於兩個半胱氨酸殘基之間的雙硫橋，可在上文所定義之任何區域或位置中引入或取代半胱氨酸殘基以視需要促進一或多個所引入之雙硫鍵形成。胺基酸殘基之取代及插入可由熟習此項技術者所知之標準技術來進行。

根據本發明，一或多個另外的雙硫鍵係藉由對照 SEQ ID No. 1，對至少兩個胺基酸進行胺基酸取代而獲得。在另一具體實例中，與 SEQ ID No. 1 相比，化合物精確包含一個另外的雙硫鍵。在一個具體實例中，與 SEQ ID No. 1 相比，本發明之化合物包含至少兩個胺基酸取代。在另一具體實例中，與 SEQ ID No. 1 相比，化合物精確包含兩個胺基酸取代。在一個具體實例中，與 SEQ ID No. 1 所定義之人類生長激素相比，本發明之生長激素化合物之多肽包含至少兩個另外的半胱氨酸。在另一具體實例中，與 SEQ ID No. 1 所定義之人類生長激素相比，多肽精確包含兩個另外的半胱氨酸。

在本發明之一個具體實例中，除包含另外的雙硫鍵以外，生長激素化合物亦經由使諸如（但不限於）PEG、碳水化合物、白蛋白結合物、脂肪酸、烷基鏈、親脂性基團、維生素、膽酸或間隔基（spacer）之部分與生長激素化合物之側鏈或主鏈連接而進行化學修飾。

在本發明之一個具體實例中，與 hGH 相比，生長激素化合物經化學修飾以促進穿過上皮轉運。

在本發明之一個具體實例中，本發明之生長激素化合

物經化學修飾以延長活體內作用之持續時間。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物經化學修飾以延長功能性活體內半衰期之持續時間。

在本發明之一個具體實例中，對生長激素化合物之化學修飾性質上亦可能為短暫的，亦即其易於在活體內移除。

在本發明之一個具體實例中，對生長激素化合物之修飾可在不干擾生長激素化合物與 hGHR 結合之任何胺基酸殘基處進行。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物對蛋白水解切裂具有增加之穩定性。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物對胰蛋白酶蛋白水解性降解具有增加之穩定性。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物對胃腸道中所發生之蛋白酶蛋白水解性降解具有增加之穩定性。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物對哺乳動物血漿中所存在之蛋白酶蛋白水解性降解具有增加之穩定性。

本發明之一個具體實例係關於一種包含一或多個另外的雙硫鍵且對蛋白酶降解穩定之生長激素化合物，該蛋白酶為諸如消化蛋白酶，諸如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、羧肽酶及/或彈性蛋白酶。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物對胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶及/或彈性蛋白酶蛋白水解性降解具有增加之穩定性。

在一個具體實例中，生長激素化合物對胰凝乳蛋白酶及/或彈性蛋白酶降解為穩定的。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及/或 S85C/S144C。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 H21C/M170C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C 及/或 S85C/Y143C。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 D26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及/或 R94C/D107C。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、F92C/T148C 及/或 R94C/D107C。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 S57C/Y143C、

Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及/或 S85C/S144C。

在一個具體實例中，生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 Q84C/Y143C 及/或 S85C/Y143C。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物具有增長之活體內半衰期。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物具有增長之保存期限。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物可為融合蛋白。

本發明之一個具體實例係關於一種生長激素化合物，其中多肽序列與 SEQ ID No. 1 所定義之 hGH 至少 80%一致，諸如 90%或諸如 95%一致。在其他具體實例中，多肽與 SEQ ID No. 1 所定義之 hGH 96%、97%、98%或 99%一致。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物為如下多肽，其包含與 SEQ ID No. 1 具有至少 20%、諸如至少 30%、例如至少 40%、諸如至少 50%、例如至少 60%、諸如至少 70%、例如至少 80%、諸如至少 90%之一致性、例如至少 95%、諸如至少 96%、例如至少 97%、諸如至少 98%、例如至少 99%之一致性的胺基酸序列，且該多肽在實施例 3 及實施例 3A（垂體切除大鼠）所述之檢定中之活性為 hGH 活性的至少 1%、諸如至少 5%、例如至少 10%、諸如至少 25%。勿庸置疑，本發明之生長激素化合物在此等檢定中之活性亦可能高於 hGH。若生長激素化合物係以某種方式進

行衍生處理，則應針對未經衍生之生長激素化合物量測生長激素相對於 hGH 之活性，因為衍生化可能顯著改變活性。舉例而言，在生長激素化合物經會延長該生長激素化合物之功能性活體內半衰期的性質修改基團進行衍生處理之情況下，經衍生之生長激素化合物的活性可能比 hGH 之活性低得多，此降低因滯留時間延長而抵消。在一個具體實例中，生長激素化合物為此類多肽之片段，該片段保留大部分上述生長激素活性。

在本發明之一個具體實例中，生長激素化合物為截斷型式之 hGH，亦即，一或多個胺基酸殘基已自對應於 SEQ No. 1 之 N 端及/或 C 端缺失，其中該化合物保留野生型 hGH 之所要生物性質。

本發明之一個具體實例係關於一種在 SEQ ID No. 1 中包含另外的雙硫鍵或與 SEQ ID No. 1 所定義之人類生長激素相比包含一或多個另外的雙硫鍵的生長激素化合物，其中該化合物具有與 SEQ ID No. 1 所定義之 hGH 之試管內活性相當的試管內活性。生長激素化合物之試管內活性較佳係在本文實施例 3 所述之 BAF 檢定中量測。在一個具體實例中，本發明之化合物可具有與 hGH 之試管內活性不同的試管內活性。如上所述，較低試管內活性可由其他活體內功能性來補償。在一具體實例中，試管內活性可為 hGH 活性的諸如至少 1%、諸如至少 5%、例如至少 10%、諸如至少 25%。在另一具體實例中，化合物相對於 SEQ ID No. 1 所定義之野生型 hGH 的 EC_{50} 比率不大於 10、不大於 8、不

大於 6、不大於 4、不大於 2。在一具體實例中，該化合物相比 SEQ ID No. 1 所定義之野生型 hGH 的 EC_{50} 比率為 5-0.01，或諸如 3-0.01，或諸如 2-0.01。在一替代具體實例中，根據本發明， EC_{50} 可由如實施例 4 所述之表面電漿共振分析 (Biacore) 來量測。在相應具體實例中，Biacore 所測定之試管內活性可為 hGH 活性的諸如至少 1%、諸如至少 5%、例如至少 10%、諸如至少 25%。在其他具體實例中，Biacore 所測定之化合物相對於 SEQ ID No. 1 所定義之野生型 hGH 的 EC_{50} 比率不大於 10、不大於 8、不大於 6、不大於 4、不大於 2。在一個具體實例中，該化合物相比 SEQ ID No. 1 所定義之野生型 hGH 的 EC_{50} 比率為 5-0.01，或諸如 3-0.01，或諸如 2-0.01。

可引入另外的雙硫橋之 GH 化合物的其他實例包括以下文獻中所揭示者：WO 92/09690 (Genentech)、US 6,004,931 (Genentech)、US 6,143,523 (Genentech)、US 6,136,536 (Genentech)、US 6,057,292 (Genentech)、US 5,849,535 (Genentech)、WO 97/11178 (Genentech)、WO 90/04788 (Genentech)、WO 02/055532 (Maxygen APS 及 Maxygen Holdings)、US 5,951,972 (American Cyanamid 公司)、US 2003/0162949 (Bolder Biotechnologies 公司)，該等文獻以引用的方式併入本文中。進一步包括 hGH 之天然變異體，諸如 Masuda, N 等人, Biochim. Biophys. Acta 949 (1), 125-131 (1988) 所述之 20 kDa 變異體。

在本文所述之所有具體實例中，另一選擇為生長激素

化合物在對應於 SEQ ID No. 1 之位置 120 的位置處具有 Gly 殘基。

在本發明上下文中，詞語「人類生長激素(human growth hormone, hGH)」、「hGH wt」及「野生型 hGH (wthGH)」可互換使用且均係指具有 SEQ ID No. 1 之胺基酸序列的蛋白質。

在本發明上下文中，術語「肽」及「多肽」可互換使用且欲表示同一物質。術語「肽」或「多肽」欲表示具有兩個或兩個以上經由肽鍵接合之胺基酸的序列，其中該等胺基酸可為天然或非天然胺基酸。組成胺基酸可來自遺傳密碼所編碼之胺基酸之群，且其可為並非由遺傳密碼編碼之天然胺基酸，以及合成胺基酸。並非由遺傳密碼編碼之天然胺基酸為例如 Hyp (羥基脯胺酸)、 γ -羧基麩胺酸、Orn (鳥胺酸)、磷絲胺酸、D-丙胺酸及 D-麩醯胺酸。合成胺基酸包含藉由化學合成而製造之胺基酸，諸如遺傳密碼所編碼之胺基酸之 D-異構體(諸如 D-丙胺酸及 D-白胺酸)、Aad (α -胺基己二酸)、Aib (α -胺基異丁酸)、Abu (α -胺基丁酸)、Agl (α -胺基甘胺酸)、Asu (α -胺基辛二酸)、Cha (β -環戊基丙胺酸)、Chg (環己基甘胺酸)、Dab (α,γ -二胺基丁酸)、Dap (α,β -二胺基丙酸)、Hcy (高半胱胺酸)、Hpr (高脯胺酸)、Nle (正白胺酸)、Phg (苯甘胺酸)、Hph (高苯丙胺酸)、1Nal (β -(1-萘基)-丙胺酸)、2Nal (β -(2-萘基)-丙胺酸)、2Pal (β -(2-吡啶基)-丙胺酸)、3Pal (β -(3-吡啶基)-丙胺酸)、Pip (4-胺基-哌啶-4-甲酸)、Pra (呋丙基甘胺酸)、Pyr (焦

麩胺酸)、Gla(γ -羧基-麩胺酸)、Hci(高瓜胺酸)、Nva(正纈胺酸)、Tle(第三丁基甘胺酸)、 β -丙胺酸、3-胺基甲基苯甲酸及鄰胺苯甲酸。

術語亦涵蓋術語「蛋白質」，其可由一條多肽鏈組成，或由兩條或兩條以上經由非共價或共價相互作用(諸如半胱胺酸橋鍵)保持在一起之多肽鏈組成。

應瞭解，術語亦欲包括肽，其除了包含另外的雙硫鍵以外，亦藉由例如使諸如(但不限於)PEG、碳水化合物、脂肪酸、白蛋白結合物、烷基鏈、親脂性基團、維生素、膽酸或間隔基之部分與該肽之側鏈或主鏈連接來進行衍生處理。除非上下文另外說明或相矛盾，否則術語肽包括任何適合之肽且可與術語多肽及蛋白質同義使用，只要讀者認識到含有各種類型之各別胺基酸聚合物的分子可能與顯著差異相關聯且從而形成本發明之個別具體實例(舉例而言，由多條多肽鏈組成之肽(諸如抗體)與例如單鏈抗體、肽免疫黏附素或單鏈免疫原性肽顯著不同)。因此，術語肽在本文中一般應理解為提及具有任何適合大小及組成(就蛋白質分子中胺基酸之數目及相關鏈之數目而言)之任何適合的肽。此外，除非上下文另外說明或相矛盾，否則本文所述之肽可包含非天然存在之胺基酸殘基及/或非L-胺基酸殘基。

除非上下文另外說明或相矛盾(且若論述為術語多肽及/或蛋白質之個別具體實例)，否則術語肽亦涵蓋經衍生之肽分子。除非上下文另外說明或相矛盾，否則經衍生之肽

分子為如下肽分子，其中該肽之一或多個胺基酸殘基已經化學修飾（例如藉由烷基化、醃化、酯形成或醃胺形成）或與一或多個非胺基酸有機及/或無機原子取代基或分子取代基（例如聚乙二醇（PEG）基團、親脂性取代基（視情況可經由諸如 β -丙胺酸、 γ -胺基丁酸（GABA）、L/D-麩胺酸、丁二酸及其類似物之間隔殘基或基團與肽之胺基酸序列鍵聯）、螢光團、生物素、放射性核種等）締合，且亦可包含或替代性地包含非必需胺基酸殘基、非天然存在之胺基酸殘基及/或非 L-胺基酸殘基（然而，應再次認識到該等衍生物就其本身而言可視為本發明之獨立特徵，且為便於描述本發明而非暗示裸肽與該等衍生物之間任何類別的等效性，該等分子包括在肽含義內）。

該等胺基酸殘基之非限制性實例包括例如 2-胺基己二酸、3-胺基己二酸、 β -丙胺酸、 β -胺基丙酸、2-胺基丁酸、4-胺基丁酸、6-胺基己酸、2-胺基庚酸、2-胺基異丁酸、3-胺基異丁酸、2-胺基庚二酸、2,4-二胺基丁酸、鎖鏈素（desmosine）、2,2'-二胺基庚二酸、2,3-二胺基丙酸、N-乙基甘胺酸、N-乙基天冬醃胺、羥基離胺酸、別羥基離胺酸、3-羥基脯胺酸、4-羥基脯胺酸、異鎖鏈素、別異白胺酸、N-甲基甘胺酸、N-甲基異白胺酸、6-N-甲基離胺酸、N-甲基纈胺酸、正纈胺酸、正白胺酸、鳥胺酸、炔丙基-甘胺酸及抑胃酶胺酸（statine）鹵化胺基酸。

本發明所述之「化合物」可為「蛋白質」或「肽」或「多肽」，其可為「類似物」或「衍生物」或「變異體」，

不管對其進行修飾之方式如何，其均保留類似於 wthGH 之所要生物活性。

如本文所用之術語「類似物」或「變異體」當指代多肽時，意謂該肽之經修飾型式，其中該肽之一或多個胺基酸殘基已由其他胺基酸殘基取代，及/或其中一或多個胺基酸殘基已自該肽缺失，及/或其中一或多個胺基酸殘基已添加至該肽中。胺基酸殘基之該取代或添加或缺失可在肽之 N 端及/或肽之 C 端及/或肽之 N 端與 C 端之間發生。未指明光學異構體之所有胺基酸皆應理解為意謂 L-異構體。

術語「雙硫鍵」或「雙硫橋」可互換使用且欲表示同一事物。蛋白質中之「雙硫鍵」或「雙硫橋」在半胱胺酸殘基之硫醇基之間形成。

術語「另外的半胱胺酸」或「所引入之半胱胺酸」可互換使用且欲表示同一物質。該等術語欲包括野生型 hGH 中不存在之半胱胺酸殘基。為使結構變化最小，通常藉由取代胺基酸殘基來引入該半胱胺酸殘基，藉以維持 hGH 之長度。可容許在環部分中或螺旋邊界處插入另外的半胱胺酸 (cys) 殘基，而在螺旋內部引入半胱胺酸殘基吸引力較小。

術語「另外的雙硫鍵」或「所引入之雙硫鍵」可互換使用且欲表示同一事物。該等術語欲包括在兩個半胱胺酸殘基之間形成的雙硫鍵，該兩個半胱胺酸殘基中之至少一者不存在於野生型 hGH 中。

如本文所用之術語「衍生物」係指肽或多肽，其中該

肽之一或多個胺基酸殘基已藉由在生長激素化合物之側鏈或主鏈中引入聚合物（諸如 PEG）、碳水化合物部分、白蛋白結合物、脂肪酸、親脂性基團、維生素、膽酸或間隔基而進行化學修飾。該等化學修飾性質上亦可能為短暫的，亦即其易於在活體內移除。化學修飾可例如由細胞本身或藉由在表現後對肽進行化學修飾而在轉譯後引入。

此項技術中已知之術語「一致性」係指藉由比較兩個或兩個以上肽序列而確定之該等序列之間的關係。在此項技術中，「一致性」亦意謂由兩個或兩個以上胺基酸殘基串（string）之間的匹配數目而確定之肽之間的序列相關程度。「一致性」採用特定數學模型或電腦程式（亦即「演算法」）所定址之空隙排比（若需要）來衡量兩個或兩個以上序列之間的一致性匹配百分比。相關肽之一致性可易於由已知方法計算。該等方法包括（但不限於）以下文獻中所述之方法：Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 編, Oxford University Press, New York, 1988；Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 編, Academic Press, New York, 1993；Computer Analysis of Sequence Data, 第 1 部分, Griffin, A. M. 及 Griffin, H. G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994；Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987；Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 及 Devereux, J. 編, M. Stockton Press, New York, 1991；及 Carillo 等人, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)。

用以確定一致性之較佳方法經設計以得出所測試序列之間的最大匹配。用以確定一致性之方法描述於公開可用之電腦程序中。用以確定兩個序列之間的一致性之較佳電腦程式法包括 GCG 程式包，包括 GAP(Devereux 等人, Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984) ; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)、BLASTP、BLASTN 及 FASTA (Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))。BLASTX 程式自國家生物技術資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 及其他來源 (BLAST Manual, Altschul 等人, NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894 ; Altschul 等人, 同上) 公開可用。亦可使用所熟知的史密斯-沃特曼演算法 (Smith Waterman algorithm) 來確定一致性。

舉例而言，使用電腦演算法 GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)，對兩個待確定序列一致性百分比之肽進行排比以使其各別胺基酸最佳匹配 (「匹配跨度 (matched span)」，如演算法所確定)。空隙開放罰分 (gap opening penalty) (計算為 $3 \times$ 平均對角線；「平均對角線 (average diagonal)」為所用比較矩陣之對角線的平均值；「對角線 (diagonal)」為特定比較矩陣賦予各完美胺基酸匹配之評分或數值) 及空隙擴展罰分 (gap extension penalty) (通常為 { 分數 ($1/10$) } $\times$ 空隙開放罰分) 以及比較矩陣 (諸如 PAM 250 或 BLOSUM 62) 與演算法結合使用。標準比較矩陣 (關於 PAM 250 比較矩陣，參見 Dayhoff

等人, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5, (1978); 關於 BLOSUM 62 比較矩陣, 參見 Henikoff 等人, PNAS USA 89, 10915-10919 (1992)) 亦為演算法所用。

肽序列比較之較佳參數包括以下參數：

演算法：Needleman 等人, J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970); 比較矩陣：BLOSUM 62, 來自 Henikoff 等人, PNAS USA 89, 10915-10919 (1992); 空隙罰分：12; 空隙長度罰分：4; 相似性臨限值。

上述參數適用於 GAP 程式。前述參數為使用 GAP 演算法進行肽比較之預設參數（且末端空隙不計罰分）。

術語「蛋白酶」欲包括具有催化肽鍵水解斷裂之能力的所有酶。蛋白酶可為細胞內、細胞外或膜結合蛋白酶（protease, proteinase）或肽酶，且包括哺乳動物腸內腔中之蛋白酶及哺乳動物血漿中所存在之蛋白酶。蛋白酶可具有兩種類型，內切蛋白酶與外切蛋白酶。蛋白酶可為（但不限於）以下類型：絲胺酸蛋白酶、半胱胺酸蛋白酶、天冬胺酸蛋白酶或金屬蛋白酶。蛋白酶之特定實例為胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、彈性蛋白酶、因子 VIIa、因子 Xa、蛋白酶 K、羧肽酶、DPPIV、中性內肽酶、顆粒酶 B (Granzyme B)、脯胺酸內肽酶、葡萄球菌肽酶 I、嗜熱菌蛋白酶、凝血酶、Arg-C 蛋白酶、Asp-N 內肽酶、卡斯蛋白酶 1-10、梭菌蛋白酶 (Clostripain)、腸激酶、麩胺醯基內肽酶、顆粒酶 B、LysC、LysN、脯胺酸內肽酶及葡萄球菌肽酶 I。

術語「抗蛋白水解性降解」或「對蛋白水解性降解之穩定性增加」或「對蛋白水解切裂之穩定性增加」或「蛋白水解穩定性改善」或「蛋白水解穩定性」可互換使用且欲表示同一情況。該等術語與本發明之 hGH 化合物結合使用時欲指示與野生型 hGH 相比，在特定條件下蛋白酶使該 hGH 化合物之多肽鏈斷裂的速率較慢。

蛋白質之蛋白水解切裂之速率可由熟習此項技術者所知之若干技術來量測。量測 hGH 或 hGH 化合物之降解速率之檢定的實例描述於實施例 5 中。

本發明亦關於適用於改善 hGH 化合物之藥理學性質的方法。此等藥理學性質可為例如功能性活體內半衰期增加、血漿活體內半衰期增加、平均滯留時間增加、腎清除率降低。

術語「功能性活體內半衰期」以其常用含義使用，亦即肽（例如生長激素化合物）之生物活性為 50% 的時間，其中該生長激素化合物仍存在於身體/目標器官中；或肽（例如生長激素化合物）之活性為初始值之 50% 的時間。作為確定功能性活體內半衰期之替代方案，可確定「活體內血漿半衰期」及長期作用，亦即在清除之前，50% 之肽在血流中循環之時間。確定血漿半衰期通常比確定功能性半衰期簡單，且血漿半衰期之量值通常為功能性活體內半衰期之量值的良好指標。

本發明亦針對醫藥組成物，其包含如本文所定義及描述之生長激素化合物。

在一個具體實例中，本發明之醫藥組成物可以若干劑型投予，該等劑型為例如溶液、懸浮液、乳液、微乳液、多乳液、泡沫劑、油膏、糊劑、硬膏、軟膏、錠劑、包衣錠劑、與吸收增強化合物共同調配之錠劑、洗劑、膠囊（例如硬明膠膠囊及軟明膠膠囊）、包衣膠囊、栓劑、滴劑、凝膠、噴霧劑、散劑、微粒、奈米粒子、氣霧劑、吸入劑、注射溶液、就地轉型溶液（例如就地凝膠化、就地定型、就地沈澱、就地結晶）、輸注溶液及植入物。

在本發明之一個具體實例中，醫藥組成物可經由經口、經皮下、肌肉內、經鼻及靜脈內投藥來投予。

在本發明之一個具體實例中，口服醫藥組成物可經由若干投藥途徑投予，該等途徑為例如經舌、舌下、經頰、於口中、於胃腸中。

在一個具體實例中，本發明之醫藥組成物適用於使用例如定劑量吸入器、乾粉吸入器及噴霧器（所有皆為熟習此項技術者所熟知之裝置）經肺投予肽結合物（諸如 GH 結合物）的固體、半固體、散劑及溶液組成物。

在一個具體實例中，本發明之醫藥組成物可進一步經由例如共價相互作用、疏水性相互作用及靜電相互作用而混配於藥物載劑、藥物傳遞系統及高級藥物傳遞系統中或與之連接，以進一步增強 GH 結合物之穩定性、增加生體可用率、增加溶解性、減少副作用、實現熟習此項技術者所熟知之時相療法（chronotherapy）及增加患者順應性或其任何組合。載劑、藥物傳遞系統及高級藥物傳遞系統之實例

包括（但不限於）聚合物，例如纖維素及衍生物；多醣，例如聚葡萄糖及衍生物、澱粉及衍生物；聚(乙烯醇)；丙烯酸酯及甲基丙烯酸酯聚合物；聚乳酸及聚乙醇酸及其嵌段共聚物；聚乙二醇；載體蛋白，例如白蛋白；凝膠，例如熱膠凝系統，例如熟習此項技術者所熟知之嵌段共聚系統；微膠粒；脂質體；微球體；奈米微粒；液晶及其分散體；L2相及其分散體，此為熟習脂質-水系統中相行為之技術者所熟知；聚合微膠粒；多乳液；自乳化物；自微乳化物；環糊精及其衍生物；及樹枝狀聚合物（dendrimer）。

以引用的方式併入本文中之供口服調配物用之傳遞系統的各種實例包括據知增強親水性化合物之穿透的非離子型界面活性劑。非離子型界面活性劑之實例為癸酸鈉、酒石酸、Brij56、Brij58、Brij35、Brij30、脂肪酸糖、牛磺去氧膽酸鈉（sodium taurodeoxycholate）、十二烷基硫酸鈉、對第三辛基酚聚氧乙烯-9.5（Triton X-100），如 Takatsuka 等人，Eur. J. Pharm. Biopharm. 62, 52-58 (2006)所述。經口傳遞系統亦可包括蛋白酶抑制劑及黏液溶解物質。蛋白酶抑制劑之實例為大豆胰蛋白酶抑制劑、抑肽酶（aprotinin）及抑凝乳蛋白酶素（chymostatin）。黏液溶解物質之實例為二硫蘇糖醇及 N-乙醯基半胱胺酸。藉由同時使用溶真菌劑（mycolytic agent）與非離子型界面活性劑可增強吸收不良之親水性化合物的腸吸收。又，Emisphere 開發出 5-CNAC 及類似化合物（WO2008101240、WO200811283687、WO2008027854、WO2008014430、US20080095837）。

口服調配物之傳遞系統亦可包括克勞丁調節劑 (claudine modulator)，其充當上皮細胞之特定緊密接合開放劑。此等克勞丁調節劑短暫或非短暫起作用，且干擾蛋白質複合體將上皮細胞緊密保持在一起形成緊密接合 (Kondoh 等人, *Mol Pharmacology* 67, 749-756 (2005))。供口服調配物用之傳遞系統的其他實例包括黏膜黏附劑 (mucoadhesive agent)，舉例而言，含硫醇添加劑 (共調配物) 或經共價連接之側鏈可增強對黏膜層之黏附；聚葡萄糖 (chitosan) 及卡波姆分子 (carbomer molecule)；聚丙烯酸酯；PEG 及其衍生物 (Palmberger 等人, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 405-412 (2007)；Leitner, V.M 等人, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 207-214 (2003)；H.L. Leußen 等人, *Parm. Res.* 13, 1668-1672 (1996)；H.L. Leußen 等人, *Int. J. Pharmaceuticals* 141, 39-52 (1996)；Takatsuka 等人, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 62, 52-58 (2006))。供口服調配物用之傳遞系統的其他實例包括質膜微囊/脂筏 (cavelolar/Lipid raft)、SMVT (鈉依賴性多維生素轉運體)。用於經口傳遞之調配物的其他實例包括受體介導之穿胞運輸 (trancytosis)，諸如使用維生素 B12 (鈷胺素 (Cobalamin)) 作為受質之 IRF (內在因子受體)、FcRn (新生兒 Fc 受體) 及轉鐵蛋白 (Transferrin) (M. Gumbleton, *Adv. Drug. Del. Rev.* 49, 281-300 (2001)；K.C. Partlow 等人, *Biomaterials* 29, 3367-3375 (2008)；Lee 等人, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 46, 211-217 (2007)；S.Y. Chae 等人, *Bioconjugate Chem.* 19,

334-341 (2008); Russell-Jones G.: Membrane Transporters as Drug Targets, 第 17 章 (1999); Said and Mohammed Curr. Opin. Gastroent. 22, 140-146 (2006); Chalasani 等人, J.Con.Release 117, 421-429 (2007); H. Li 及 Z.M. Qian Med. Res. Rev. 22, 225-250 (2002); Liang 及 Yang Biochem. Biophys. Res. Comm. 225, 734-738 (2005))。

在一個具體實例中，本發明之 GH 化合物發揮生長激素活性，且可用於治療會受益於循環生長激素之量增加的疾病或病況。該等疾病或病況包括生長激素缺乏症 (GHD); 特納症候群 (Turner Syndrome); 普萊德-威利症候群 (Prader-Willi syndrome, PWS); 努南症候群 (Noonan syndrome); 唐氏症候群 (Down syndrome); 慢性腎病; 幼年型類風濕性關節炎; 囊腫性纖維化; 接受 HAART 治療之兒童 HIV 感染 (HIV/HALS 兒童); 胎齡不足 (SGA) 所致之兒童矮小; 出生體重極輕 (VLBW) 且胎齡不足所致之兒童身材矮小; 骨骼發育不良; 軟骨生成減退 (hypochondroplasia); 軟骨發育不全 (achondroplasia); 特發性身材矮小 (ISS); 成人 GHD; 長骨內骨折或長骨骨折，該等長骨為諸如脛骨、腓骨、股骨、肱骨、橈骨、尺骨、鎖骨、手骨 (metacarpal)、足骨 (metatarsal) 及趾/指骨 (digit); 海綿樣骨 (spongy bone) 內骨折或海綿樣骨骨折，該等海綿樣骨為諸如頭骨、手基部及足基部; 對例如手、膝或肩進行腱或韌帶手術後之患者; 已歷經或正經歷牽引成骨術 (distraction osteogenesis) 之患者; 歷經髖

或盤置換術、半月板修復術、脊柱融合術或假體固定術（諸如膝、髖、肩、肘、腕或頷中）後之患者；固定有諸如釘、螺釘及板之接骨材料的患者；骨折未癒合或癒合不良之患者；自例如脛骨或大腳趾進行切骨術後之患者；移植物植入後之患者；創傷或關節炎所致之膝關節軟骨退化；特納症候群患者之骨質疏鬆症；男性骨質疏鬆症；長期透析之成人患者（APCD）；APCD 營養不良相關心血管疾病；APCD 惡病質逆轉；APCD 癌症；APCD 慢性阻塞性肺病；APCD HIV；APCD 老齡化；APCD 慢性肝病；APCD 疲勞症候群；克羅恩氏病（Chron's disease）；肝功能受損；男性 HIV 感染；短腸症候群；中心型肥胖；HIV 相關脂質營養不良症候群（HALS）；男性不育症；大型選擇性手術（major elective surgery）、酒精/藥物解毒或神經性創傷後之患者；衰老；老年虛弱；骨關節炎；創傷性軟骨損傷；勃起困難；肌肉纖維疼痛；記憶障礙；抑鬱症；創傷性腦損傷；蛛膜下出血；出生體重極低；代謝症候群；糖皮質激素肌病；或糖皮質激素治療所致之兒童身材矮小。生長激素亦用於加速肌肉組織、神經組織或傷口癒合；加速或改善血流流向受損組織；或降低受損組織之感染率。

在一個具體實例中，本發明係關於一種治療疾病之方法，其中生長激素化合物活性可用於治療會受益於循環生長激素化合物之量增加的疾病或病況，該方法包含向患者投予有效量之 SEQ ID No. 1 之生長激素化合物或其結合物的醫藥組成物。

在一個具體實例中，本發明係關於一種包含向有需要之患者投予治療有效量之本發明生長激素化合物的方法。因此，本發明提供一種治療此等疾病或病況之方法，該方法包含向有需要之患者投予治療有效量之本發明生長激素化合物。

如本文所用之本發明化合物之「治療有效量」意謂足以治癒、減輕或部分遏止既定疾病及其併發症之臨床表現的量。足以達成此目的之量即定義為「治療有效量」。用於達成各目的之有效量會視例如疾病或損傷之嚴重性以及個體之體重、性別、年齡及一般狀況而定。應瞭解，可使用常規實驗來確定適當劑量，該常規實驗完全處於受訓醫師或獸醫之一般技術範圍內。

在一個具體實例中，本發明提供生長激素化合物或其結合物之用途，其係用於製造供治療以上所提及之疾病或病況用之醫藥品。

本文所定義及描述之本發明生長激素化合物欲用作治療蛋白質。

多肽之製備在此項技術中已為熟知。舉例而言，可藉由經典的肽合成來製備多肽，例如使用 *tert*-Boc 或 Fmoc 化學法或其他制定完善之技術進行固相肽合成，參見例如 Greene 及 Wuts, 「Protective Groups in Organic Synthesis」, John Wiley & Sons, 2006。

亦可由包含以下之方法來產生多肽：在適合之營養基中、於允許表現肽之條件下培養含有編碼多肽之 DNA 序列

且能夠表現多肽的宿主細胞。對於包含非天然胺基酸殘基之多肽，應例如藉由使用 tRNA 突變體對重組細胞進行修飾以便將非天然胺基酸併入多肽中。

亦可使用無細胞試管內轉錄/轉譯系統產生多肽。亦可使用框移抑制系統或無義抑制系統產生含有新穎的非天然胺基酸之多肽，該等系統描述於例如 J. Am. Chem. Soc. 125, 11782-11783 (2003); Science 301, 964-967 (2003); Science 292, 498-500 (2001); Science 303, 371-373 (2004)及其中之參考文獻中。

用於培養細胞之培養基可為適於使宿主細胞生長之任何習用培養基，諸如含有適當補充劑之基本培養基或複合培養基。適合之培養基可購自供應商或可根據公開配方（例如美國菌種保存中心（American Type Culture Collection）目錄中之配方）製備。隨後可由習用程序自培養基中回收細胞所產生之肽，該等程序包括藉由離心或過濾自培養基分離宿主細胞。對於細胞外產物，視相關多肽之類型而定，藉由過濾、管柱層析或沈澱（例如微濾、超濾、等電沈澱）來分離上清液之蛋白組份，由多種層析程序（例如離子交換層析、疏水性相互作用層析、凝膠過濾層析、親和層析或其類似層析）進行純化。對於細胞內或周質產物，使自培養基分離之細胞崩解或滲透，並進行提取以回收產物多肽或其前驅物。

編碼多肽之 DNA 序列宜源於基因組或 cDNA，例如藉由製備基因組或 cDNA 文庫且根據標準技術使用特異性

DNA 或 RNA 探針進行雜交來篩選編碼整個或一部分肽之 DNA 序列而獲得（參見，例如 Sambrook, J, Fritsch, EF 及 Maniatis, T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989）。編碼多肽之 DNA 序列亦可由已制定之標準方法以合成方式製備，該等方法為例如 Beaucage 及 Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, 1859-1869 (1981)所述之亞磷醯胺法（phosphoramidite method）或 Matthes 等人, *EMBO Journal* 3, 801-805 (1984)所述之方法。DNA 序列亦可藉由使用特異性引子進行聚合酶鏈反應來製備，例如 US 4,683,202 或 Saiki 等人, *Science* 239, 487-491 (1988)中所述。

可將編碼欲表現之肽的 DNA 序列插入任何宜進行重組 DNA 程序之載體中，且載體之選擇通常將視載體欲引入當中之宿主細胞而定。因此，載體可為自主複製載體，亦即呈染色體外實體形式之載體，其複製與染色體複製無關，例如質體。或者，載體可為當引入宿主細胞中時整合於宿主細胞基因組中且與其已整合於當中之染色體一起複製的載體。

載體可為編碼多肽之 DNA 序列可操作地連接於 DNA 轉錄所需之其他區段（諸如啟動子）的表現載體。啟動子可為在所選宿主細胞中顯示轉錄活性之任何 DNA 序列，且可來源於編碼與宿主細胞同源或異源之蛋白質的基因。適於引導編碼欲在多種宿主細胞中表現之肽的 DNA 轉錄之啟動子的實例在此項技術中已為熟知，參見例如 Sambrook 等

人，同上。

必要時，亦可使編碼欲表現之肽的 DNA 序列可操作地連接於適合之終止子、聚腺苷酸化信號、轉錄強化子序列及轉譯強化子序列。本發明之重組載體可進一步包含使載體能夠在相關宿主細胞中複製之 DNA 序列。

載體亦可包含可選擇標記，例如產物補充宿主細胞中之缺陷的基因，或賦予對例如胺苄青黴素（ampicillin）、康黴素（kanamycin）、四環素（tetracyclin）、氯黴素（chloramphenicol）、新黴素（neomycin）、潮黴素（hygromycin）或甲胺喋呤（methotrexate）之藥物的耐藥性之基因。對於大規模製造，可選擇標記可能例如不具抗生素抗性，例如，當使用載體進行大規模製造時，可能切除載體中之抗生素抗性基因。自載體去除抗生素抗性基因之方法在此項技術中為已知的，參見例如 US 6,358,705，其以引用的方式併入本文中。

為將欲表現之肽引導至宿主細胞之分泌路徑中，可在重組載體中提供分泌信號序列（亦稱為前導序列、前原序列或前序列）。分泌信號序列與編碼肽之 DNA 序列在正確閱讀框架中連接。分泌信號序列通常位於編碼肽之 DNA 序列之 5'端。分泌信號序列可能通常與肽締合或可能來自編碼另一分泌蛋白之基因。

用於分別接合編碼欲表現之肽的 DNA 序列、促進劑及視情況選用之終止子及/或分泌信號序列的程序及用於將其插入含有複製所必需之資訊的適合載體中之程序為熟習此

項技術者所熟知（參見例如 Sambrook 等人，同上）。

DNA 序列或重組載體引入當中之宿主細胞可為能夠產生本發明肽之任何細胞且包括細菌、酵母、真菌及高級真核細胞。此項技術中所熟知及使用之適合宿主細胞之實例為（但不限於）大腸桿菌、釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）或哺乳動物 BHK 或 CHO 細胞系。亦可藉由使用此項技術中通常已知之試管內轉錄/轉譯系統來產生欲表現之肽。

本文所引用之所有參考文獻（包括公開案、專利申請案及專利）以全文引用的方式併入本文中，且引用之程度就如同各參考文獻個別地且特定地以引用的方式併入且在本文中以全文闡述一般（達到法律所允許之最大程度）。

所有標題及子標題在本文中僅出於方便之目的使用且不應解釋為以任何方式限制本發明。

除非另外主張，否則使用任何及所有實施例或本文所提供之例示性語言（例如「諸如」）僅欲更好地說明本發明且不對本發明之範疇施加限制。說明書中之任何語言皆不應解釋為指示任何非主張之要素對本發明之實施必不可少。

本文中對專利文獻之引用及併入僅出於方便之目的且並不反映該等專利文獻之有效性、專利性及/或執行性的任何觀點。

本發明包括隨附申請專利範圍中所述之標的物的為適用法律所允許的所有修改及等效物。

如本文所述之本發明由以下具體實例進一步描述，但本發明不限於該等具體實例。

具體實例 1. 一種生長激素化合物，其在 SEQ ID No. 1 中包含另外的雙硫鍵。

具體實例 2. 如具體實例 1 之生長激素化合物，其在至少一個胺基酸對之間包含另外的雙硫鍵，該等胺基酸對位於對應於以下之位置處：SEQ ID No. 1 中之 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C。

具體實例 3. 如具體實例 2 之生長激素化合物，其中該生長激素化合物在至少一個胺基酸對之間包含另外的雙硫鍵，該等胺基酸對位於對應於以下之位置處：SEQ ID No. 1 中之 A17C/E174C、H21C/M170C、Q84C/Y143C、S71C/S132C 及 / 或 R94C/D107C。

具體實例 4. 如具體實例 1 之生長激素化合物，其中該生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、

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

具體實例 5. 如具體實例 4 之生長激素化合物，其中該生長激素化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 A17C/E174C、H21C/M170C、S71C/S132C、Q84C/Y143C 及 R94C/D107C。

具體實例 6. 一種生長激素化合物，其與 SEQ ID No. 1 所定義之人類生長激素相比包含一或多個另外的雙硫鍵。

具體實例 7. 如前述具體實例中任一項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物在環區段與螺旋區段之間或環區段內部或環區段之間或螺旋區段之間包含另外的雙硫鍵。

具體實例 8. 如具體實例 6 或 7 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、

L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、
L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、
S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、
F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、
L156C/T148C 及/或 V185C/S188C。

具體實例 9. 如具體實例 8 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及/或 R94C/D107C。

具體實例 10. 如具體實例 9 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 A17C/E174C、H21C/M170C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、F92C/T148C 及/或 R94C/D107C。

具體實例 11. 如前述具體實例中任一項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物包含另外的雙硫鍵，其中至少一個半胱氨酸存在於對應於 SEQ ID No. 1 中之 AA 128-154 之 L3 中，或諸如對應於 SEQ ID No. 1 中之 AA 135-148 之區域中。

具體實例 12. 如具體實例 11 之生長激素化合物，其中

該另外的雙硫鍵之至少一個半胱氨酸存在於 L3 中對應於以下之位置處：SEQ ID No. 1 中之 AA141、AA142、AA143、AA144、AA145 或 AA146，較佳為 AA143 或 AA144。

具體實例 13. 如具體實例 12 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C 及/或 F92C/T148C。

具體實例 14. 如具體實例 13 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C 及/或 F92C/T148C。

具體實例 15. 如具體實例 14 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及/或 F92C/T148C。

具體實例 16. 如前述技術方案中任一項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物包含連接 L3 與 L1 之另外的

雙硫鍵。

具體實例 17. 如具體實例 16 之生長激素化合物，其中該化合物包含連接對應於 SEQ ID No. 1 之 L3 中之 AA54、AA55、AA56、AA57、AA58 或 AA59 的胺基酸殘基與對應於 L1 中之 AA143 或 AA144 的胺基酸之另外的雙硫鍵。

具體實例 18. 如具體實例 16 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C 及/或 S71C/S132C。

具體實例 19. 如具體實例 18 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C 及/或 S71C/S132C。

具體實例 20. 如具體實例 1 至 15 中任一項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物包含連接 L3 與螺旋區段之另外的雙硫鍵。

具體實例 21. 如具體實例 20 之生長激素化合物，其中該生長激素化合物包含連接 L3 與螺旋 2 之另外的雙硫鍵。

具體實例 22. 如具體實例 21 之生長激素化合物，其中該化合物包含連接對應於 SEQ ID No. 1 之 H2 中之 AA84 或 AA85 的胺基酸殘基與對應於 L3 中之 AA143 或 AA144 的胺基酸之另外的雙硫鍵。

具體實例 23. 如具體實例 21 之生長激素化合物，其中

該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No.1 中之 L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C 及 F92C/T148C。

具體實例 24. 如具體實例 23 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C 及 / 或 F92C/T148C。

具體實例 25. 如具體實例 24 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及 / 或 F92C/T148C。

具體實例 26. 如具體實例 1 至 10 中任一項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物包含連接 L2 與螺旋 1 之另外的雙硫鍵。

具體實例 27. 如具體實例 26 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於 D26C/V102C 或 D26C/Y103C 之突變。

具體實例 28. 如前述具體實例中任一項之生長激素化合物，其中多肽序列與 SEQ ID No. 1 所定義之 hGH 至少 80% 一致，諸如 90%、諸如 95%、諸如 96%、諸如 97%、諸如 98% 或 諸如 99% 一致。

具體實例 29. 如前述具體實例中任一項之生長激素化

合物，其中該化合物之試管內活性為 SEQ ID No. 1 所定義之野生型 hGH 之活性的至少 5%。

具體實例 30. 如前述具體實例中任一項之生長激素化合物，其中多肽之功能性活體內半衰期為人類生長激素之 2 倍或 2 倍以上。

具體實例 31. 如前述具體實例中任一項之生長激素化合物，其中多肽之功能性活體內半衰期介於人類生長激素之 2 倍與 10 倍之間。

具體實例 32. 如前述具體實例中任一項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物對蛋白酶降解為穩定的，該蛋白酶為諸如消化蛋白酶，諸如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、羧肽酶及/或彈性蛋白酶。

具體實例 33. 如具體實例 32 之生長激素化合物，其中該化合物對胰凝乳蛋白酶及/或彈性蛋白酶降解為穩定的。

具體實例 34. 如具體實例 33 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 及/或 S85C/S144C。

具體實例 35. 如具體實例 33 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 H21C/M170C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、

S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C 及 / 或 S85C/Y143C。

具體實例 36. 如具體實例 33 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 D26C/V102C 、 D26C/Y103C 、 S57C/Y143C 、 I58C/S144C 、 P59C/Q137C 、 S71C/S132C 、 Q84C/Y143C 、 S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及 / 或 R94C/D107C。

具體實例 37. 如具體實例 33 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 I58C/S144C 、 P59C/Q137C 、 S71C/S132C 、 Q84C/Y143C、S85C/Y143C、F92C/T148C 及 / 或 R94C/D107C。

具體實例 38. 如具體實例 33 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 S57C/Y143C 、 Q84C/Y143C 、 S85C/Y143C 及 / 或 S85C/S144C 。

具體實例 39. 如具體實例 33 之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 Q84C/Y143C 及 / 或 S85C/Y143C 。

具體實例 40. 如前述具體實例中任一項之生長激素化合物，其中一或多個另外的雙硫鍵係藉由對照 SEQ ID No. 1，對至少兩個胺基酸進行胺基酸取代而獲得。

具體實例 41. 如前述具體實例中任一項之生長激素化合物，其中該化合物與 SEQ ID No. 1 相比精確包含一個另外的雙硫鍵。

具體實例 42. 如前述具體實例中任一項之生長激素化

合物，其中該化合物與 SEQ ID No. 1 相比精確包含兩個胺基酸取代。

具體實例 43. 如前述具體實例中任一項之生長激素化合物，其與 SEQ ID No. 1 所定義之人類生長激素相比包含至少兩個另外的半胱胺酸。

具體實例 44. 如前述具體實例中任一項之生長激素化合物，其與 SEQ ID No. 1 所定義之人類生長激素相比精確包含兩個另外的半胱胺酸。

具體實例 45. 如前述具體實例中任一項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物係經由聚乙二醇化，使聚合物，諸如（但不限於）糖部分、脂肪酸、親脂性基團、白蛋白結合物、維生素、膽酸、間隔基與肽之側鏈或主鏈連接來進行化學修飾。

具體實例 46. 如具體實例 45 之生長激素化合物，其中對生長激素化合物之化學修飾性質上為短暫的，亦即其易於在活體內移除。

具體實例 47. 如具體實例 45 至 46 中任一項之生長激素化合物，其中對胺基酸殘基之化學修飾可在肽之 N 端、肽之 C 端及/或肽之 N 端與 C 端之間進行。

具體實例 48. 如具體實例 45 至 47 中任一項之生長激素化合物，其中化學修飾在胺基酸殘基 Phe1、Gln40、Gln141 或 Phe191 處進行。

具體實例 49. 如具體實例 45 至 48 中任一項之生長激素化合物，其中化學修飾係經由 PEG 進行，且其中 PEG 介

於 500 Da 與 50 kDa 之間。

具體實例 50. 如具體實例 1 至 49 中任一項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物經化學修飾以促進穿過上皮轉運。

具體實例 51. 如具體實例 1 至 49 中任一項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物經化學修飾以相較 wthGH 促進穿過上皮轉運。

具體實例 52. 如具體實例 1 至 49 中任一項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物經化學修飾以相較 wthGH 獲得延長之功能性活體內半衰期。

具體實例 53. 如具體實例 52 之生長激素化合物，其中該生長激素化合物之功能性活體內半衰期為 hGH 之 2 倍或 2 倍以上。

具體實例 54. 如具體實例 53 之生長激素化合物，其中功能性活體內半衰期介於 hGH 之 2 倍與 10 倍之間。

具體實例 55. 如具體實例 45 至 49 中任一項之生長激素化合物，其中化學修飾在不干擾該生長激素化合物與 hGHR 結合之胺基酸殘基處進行。

具體實例 56. 如具體實例 49 至 55 中任一項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物對蛋白酶蛋白水解性降解為穩定的，該蛋白酶為諸如消化蛋白酶，諸如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、羧肽酶及/或彈性蛋白酶。

具體實例 57. 一種製備對蛋白水解性降解之穩定性增加之生長激素化合物的方法，該方法包含以下步驟：

a. 在 hGH 中引入另外的雙硫鍵。

具體實例 58. 一種製備如具體實例 1 至 14 中任一項之對蛋白水解性降解之穩定性增加之生長激素化合物的方法，該方法包含以下步驟：

a. 藉由用一或多個半胱胺酸取代 hGH 中之一或多個胺基酸殘基而在 hGH 中引入另外的雙硫鍵。

具體實例 59. 一種製備如具體實例 1 至 14 之對蛋白水解性降解之穩定性增加之生長激素化合物的方法，該方法包含以下步驟：

a. 藉由添加一或多個半胱胺酸殘基而在 hGH 中引入另外的雙硫鍵。

具體實例 60. 一種醫藥組成物，其包含如具體實例 1 至 56 中任一項之生長激素化合物及醫藥學上可接受之載劑。

具體實例 61. 如具體實例 60 之醫藥組成物，其中該組成物可經舌、舌下、經頰、於口中、經口、於胃腸內、經鼻、經肺、經表皮 (epidermal)、經真皮 (dermal)、穿真皮 (transdermal) 及非經腸投予患者。

具體實例 62. 如具體實例 60 或 61 之醫藥組成物，其中該組成物為經口投予之組成物。

具體實例 63. 一種製備醫藥組成物之方法，其中該組成物包含如具體實例 1 至 56 中任一項之生長激素化合物及醫藥學上可接受之載劑。

具體實例 64. 一種治療疾病之方法，其中生長激素活

性可用於治療會受益於循環生長激素化合物之量增加的疾病或病況，該方法包含向患者投予有效量之如具體實例 1 至 56 中任一項之生長激素化合物或如具體實例 60 至 62 中任一項之醫藥組成物。

具體實例 65. 如具體實例 63 或 64 之治療疾病之方法，其中疾病係選自生長激素缺乏症 (GHD)；特納症候群；普萊德-威利症候群 (PWS)；努南症候群；唐氏症候群；慢性腎病；幼年型類風濕性關節炎；囊腫性纖維化；接受 HAART 治療之兒童 HIV 感染 (HIV/HALS 兒童)；胎齡不足 (SGA) 所致之兒童矮小；出生體重極輕 (VLBW) 且胎齡不足所致之兒童身材矮小；骨骼發育不良；軟骨生成減退；軟骨發育不全；特發性身材矮小 (ISS)；成人 GHD；長骨內骨折或長骨骨折，該等長骨為諸如脛骨、腓骨、股骨、肱骨、橈骨、尺骨、鎖骨、手骨、足骨及趾/指骨；海綿樣骨內骨折或海綿樣骨骨折，該等海綿樣骨為諸如頭骨、手基部及足基部；對例如手、膝或肩進行腱或韌帶手術後之患者；已歷經或正經歷牽引成骨術之患者；歷經髖或盤置換術、半月板修復術、脊柱融合術或假體固定術（諸如膝、髖、肩、肘、腕或頷中）後之患者；固定有諸如釘、螺釘及板之接骨材料的患者；骨折未癒合或癒合不良之患者；自例如脛骨或大腳趾進行切骨術後之患者；移植物植入後之患者；創傷或關節炎所致之膝關節軟骨退化；特納症候群患者之骨質疏鬆症；男性骨質疏鬆症；長期透析之成人患者 (APCD)；APCD 營養不良相關心血管疾病；APCD 惡病質

逆轉；APCD 癌症；APCD 慢性阻塞性肺病；APCD HIV；APCD 老齡化；APCD 慢性肝病；APCD 疲勞症候群；克羅恩氏病；肝功能受損；男性 HIV 感染；短腸症候群；中心型肥胖；HIV 相關脂質營養不良症候群（HALS）；男性不育症；大型選擇性手術、酒精/藥物解毒或神經性創傷後之患者；衰老；老年虛弱；骨關節炎；創傷性軟骨損傷；勃起困難；肌肉纖維疼痛；記憶障礙；抑鬱症；創傷性腦損傷；蛛膜下出血；出生體重極低；代謝症候群；糖皮質激素肌病；或糖皮質激素治療所致之兒童身材矮小。

具體實例 66. 如具體實例 1 至 56 中任一項之生長激素，其係用作醫藥品。

具體實例 67. 一種如具體實例 1 至 56 中任一項之生長激素的用途，其係用作醫藥品。

具體實例 68. 一種如具體實例 1 至 56 中任一項之生長激素化合物的用途，其係用於治療疾病。

具體實例 69. 如具體實例 67 或具體實例 68 之用途，其中疾病係選自生長激素缺乏症（GHD）；特納症候群；普萊德-威利症候群（PWS）；努南症候群；唐氏症候群；慢性腎病；幼年型類風濕性關節炎；囊腫性纖維化；接受 HAART 治療之兒童 HIV 感染（HIV/HALS 兒童）；胎齡不足（SGA）所致之兒童矮小；出生體重極輕（VLBW）且胎齡不足所致之兒童身材矮小；骨骼發育不良；軟骨生成減退；軟骨發育不全；特發性身材矮小（ISS）；成人 GHD；長骨內骨折或長骨骨折，該等長骨為諸如脛骨、腓骨、股骨、肱骨、

橈骨、尺骨、鎖骨、手骨、足骨及趾/指骨；海綿樣骨內骨折或海綿樣骨骨折，該等海綿樣骨為諸如頭骨、手基部及足基部；對例如手、膝或肩進行腱或韌帶手術後之患者；已歷經或正經歷牽引成骨術之患者；歷經髖或盤置換術、半月板修復術、脊柱融合術或假體固定術（諸如膝、髖、肩、肘、腕或頷中）後之患者；固定有諸如釘、螺釘及板之接骨材料的患者；骨折未癒合或癒合不良之患者；自例如脛骨或大腳趾進行切骨術後之患者；移植物植入後之患者；創傷或關節炎所致之膝關節軟骨退化；特納症候群患者之骨質疏鬆症；男性骨質疏鬆症；長期透析之成人患者（APCD）；APCD 營養不良相關心血管疾病；APCD 惡病質逆轉；APCD 癌症；APCD 慢性阻塞性肺病；APCD HIV；APCD 老齡化；APCD 慢性肝病；APCD 疲勞症候群；克羅恩氏病；肝功能受損；男性 HIV 感染；短腸症候群；中心型肥胖；HIV 相關脂質營養不良症候群（HALS）；男性不育症；大型選擇性手術、酒精/藥物解毒或神經性創傷後之患者；衰老；老年虛弱；骨關節炎；創傷性軟骨損傷；勃起困難；肌肉纖維疼痛；記憶障礙；抑鬱症；創傷性腦損傷；蛛膜下出血；出生體重極低；代謝症候群；糖皮質激素肌病；或糖皮質激素治療所致之兒童身材矮小。

具體實例 70. 一種如具體實例 1 至 56 中任一項之生長激素化合物的用途，其係用於製造供治療以下疾病用之醫藥品：生長激素缺乏症（GHD）；特納症候群；普萊德-威利症候群（PWS）；努南症候群；唐氏症候群；慢性腎病；幼

年型類風濕性關節炎；囊腫性纖維化；接受 HAART 治療之兒童 HIV 感染（HIV/HALS 兒童）；胎齡不足（SGA）所致之兒童矮小；出生體重極輕（VLBW）且胎齡不足所致之兒童身材矮小；骨骼發育不良；軟骨生成減退；軟骨發育不全；特發性身材矮小（ISS）；成人 GHD；長骨內骨折或長骨骨折，該等長骨為諸如脛骨、腓骨、股骨、肱骨、橈骨、尺骨、鎖骨、手骨、足骨及趾/指骨；海綿樣骨內骨折或海綿樣骨骨折，該等海綿樣骨為諸如頭骨、手基部及足基部；對例如手、膝或肩進行腱或韌帶手術後之患者；已歷經或正經歷牽引成骨術之患者；歷經髌或盤置換術、半月板修復術、脊柱融合術或假體固定術（諸如膝、髌、肩、肘、腕或頷中）後之患者；固定有諸如釘、螺釘及板之接骨材料的患者；骨折未癒合或癒合不良之患者；自例如脛骨或大腳趾進行切骨術後之患者；移植物植入後之患者；創傷或關節炎所致之膝關節軟骨退化；特納症候群患者之骨質疏鬆症；男性骨質疏鬆症；長期透析之成人患者（APCD）；APCD 營養不良相關心血管疾病；APCD 惡病質逆轉；APCD 癌症；APCD 慢性阻塞性肺病；APCD HIV；APCD 老齡化；APCD 慢性肝病；APCD 疲勞症候群；克羅恩氏病；肝功能受損；男性 HIV 感染；短腸症候群；中心型肥胖；HIV 相關脂質營養不良症候群（HALS）；男性不育症；大型選擇性手術、酒精/藥物解毒或神經性創傷後之患者；衰老；老年虛弱；骨關節炎；創傷性軟骨損傷；勃起困難；肌肉纖維疼痛；記憶障礙；抑鬱症；創傷性腦損傷；蛛膜下出血；

出生體重極低；代謝症候群；糖皮質激素肌病；或糖皮質激素治療所致之兒童身材矮小。

實施例

本發明將參考以下實施例進一步詳細說明，該等實施例描述本文所述之各種化合物的製備與特性鑑定以及檢定其生物活性之方法。熟習此項技術者顯而易見的是，在不脫離本發明範疇的情況下，可對材料與方法作出許多修改。

實施例中所用之 TGase 為根據 US5156956 自茂原鏈輪絲菌 (*Streptovercillium mobaraense*) 獲得之微生物轉麩胺醯胺酶 (transglutaminase)。

實施例 1：製備 hGH 化合物之一般方法

將編碼生長激素化合物之基因以重組方式插入質體載體中。藉由使用 QuikChange 定點突變誘發套組 (Stratagene) 引入半胱胺酸突變。隨後使用質體載體轉型適合之大腸桿菌菌株。使蛋白質表現為具有富含 N 端組胺酸之肽標籤且適於固定化金屬親和層析純化的可溶性蛋白質。

在 50% 甘油中製備細胞儲備液且儲存於 -80°C 下。將甘油儲備液菌株接種於 LBA 板中，隨後在 37°C 下培育隔夜。用 LB 培養基洗滌各板之內含物，且在 500 ml LB+AMP 培養基中稀釋以供表現。在 37°C 、於 220 rpm 振盪下培育培養物直至 OD_{600} 達到 0.6 為止。在 30°C 下使用 0.2 mM IPTG 進行後續誘導，歷時 6 小時，最終 OD_{600} 為 2.0。最後藉由

離心收集細胞。

隨後將細胞懸浮於 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) 中，且使用細胞破碎機在 30 kPSI 下破碎細胞。藉由離心收集上清液，隨後對其進行層析純化。

使用固定化金屬親和層析作為捕捉步驟進行純化，接著使用來自 Unizyme 之二胺基肽酶移除肽標籤。藉由離子交換層析實現最後純化。亦可使用（但不限於）離子交換層析、疏水性相互作用層析、親和層析、尺寸排阻層析及熟習此項技術者所知的基於膜之分離技術來實現純化。

藉由使 hGH 化合物與 2 當量例如 Peg-5000-醛（RAPP Polymere, 12 5000-6）反應，使 PEG 基團連接於 N 端。藉由分 10 步添加於 0.5 ml MeCN 中之 NaCNBH_3 來引發反應。使反應混合物靜置 20 小時。

首先藉由利用微生物轉麩胺醯胺酶作為催化劑使 hGH 化合物與 1,3-二胺基-2-丙醇（Fluka 33262）反應，使 PEG 基團連接於 Q40。

使經轉胺化且經氧化之 hGH 化合物（I）與 mPEG 基團偶合
製備以下溶液：

緩衝液 A：將三乙醇胺（119 mg，0.8 mmol）溶解於水（40 mL）中，且調整 pH 值至 8.5。

緩衝液 B：20 mM 三乙醇胺；0.2 M NaCl。

（A）用 1,3-二胺基-2-丙醇使 hGH（III）轉胺化

在攪拌下，將 hGH (8.64 g) 溶解於緩衝液 A (500 mL) 中。向此溶液中緩慢添加 1,3-二胺基-2-丙醇 (DAP) (8.1 g, Fluka 33262) 於緩衝液 A (50 mL) 中之混合物。藉由添加鹽酸水溶液調整所得混合物之 pH 值至 8.5。添加 mTGase (2.8 mL, 1.3 mg/mL)，同時混合。在室溫下，攪拌最終混合物隔夜。

用緩衝液 A (1.2 L) 稀釋反應混合物，且藉由離子交換層析純化產物。100 mL/min - 200 mL/frac。

步驟緩衝液 B 40% - 梯度 40-100% 緩衝液 B，經 15 CV = 225 min。

(B) 氧化經轉胺化之 hGH

緩衝液 A：將三乙醇胺 (119 mg, 0.8 mmol) 溶解於水 (40 mL) 中，且調整 pH 值至 8.5。

緩衝液 B：將 3-甲硫基-1-丙醇 (725 mg, 7.1 mmol) 溶解於緩衝液 A (10 mL) 中。

緩衝液 C：將 HEPES (5.96 g) 溶解於水 (1.0 L) 中，且調整 pH 值至 7.0。

過碘酸鹽：將 NaIO_4 (48.1 mg, 0.225 mmol) 溶解於水 (1.0 mL) 中。

向與 DAP 反應之 hGH (10 mg, 0.5 μmol) 之溶液中添加緩衝液 B (0.2 mL)，接著添加過碘酸鹽溶液 (0.03 mL)。冷培育 20 分鐘後，用緩衝液 C 對混合物透析 4 次。濃縮殘

餘物至 1 mL。

(C) 用 PEG 試劑對經氧化之 hGH 進行還原胺化

將 (B) 之最終溶液 (1 mL, 0.45 μmol) 與 PEG-胺溶液 (2 mL, 0.3 μmol) 一起於 25 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) 中混合, 且在室溫下緩慢旋轉所得混合物 1 小時。1 小時後, 逐份 (10 $\times$) 添加 NaCNBH_3 (100 μL 之 NaCNBH_3 (20 mg) 於水 (0.5 mL) 中之溶液)。將混合物在黑暗中於室溫下保持 18-24 小時。在 MonoQ 上純化混合物, 更換緩衝液且濃縮。mPEG-胺試劑市售可得。

實施例 2: 鑑定經純化之生長激素化合物進行蛋白質化學之特性

使用 MALDI-MS 分析完整的純化蛋白質。所觀測之質量與由胺基酸序列推斷出之理論質量一致。

藉由使用胰蛋白酶及 AspN 消化進行肽定位 (peptide mapping), 接著對 DTT 還原雙硫鍵前後的消化液進行 MALDI-MS 分析來展示各化合物中三個雙硫鍵之預期鍵聯。

實施例 3: 分析經純化之生長激素化合物的生物活性

在基於細胞之受體效能增殖檢定 (亦即 BAF 檢定) 中量測 hGH 化合物之生物活性。該方法普遍用於 hGH 化合物。

BAF-3 細胞 (一種來源於骨髓之鼠類前驅 B 淋巴樣細胞系) 之生長及存活依賴於 IL-3。IL-3 活化作為相同介體

之 JAK-2 及 STAT。GH 在刺激後即活化。

用含有 hGH 受體之質體轉染 BAF-3 細胞。經 hGH 刺激後即能夠增殖之純系變成 hGH 依賴性細胞系，下文稱為 BAF3-GHR。該等細胞系以劑量相關生長模式對 GH 作出反應，且因此可用於評估增殖檢定中不同 hGH 化合物之作用。

使 BAF-3GHR 細胞在 37°C、5% CO₂ 下於饑餓培養基(不含 GH 之培養基)中生長 24 小時。對細胞離心，移除培養基且將細胞再懸浮於饑餓培養基中至 2.22×10^5 個細胞/毫升。將數份 90 μ l 細胞上清液接種於微量滴定板(96 孔 NUNC-clone)中。向細胞中添加不同濃度之生長激素化合物，且在 37°C、5% CO₂ 下將板培育 72 小時。

AlamarBlue 為氧化還原指示劑。AlamarBlue® (BioSource, 目錄號 Dal 1025) 被細胞代謝所固有之反應還原，且因此提供活細胞數目之間接量度。將 AlamarBlue® 稀釋 6 次 (5 μ l AlamarBlue® + 25 μ l 饑餓培養基)，且向各孔中添加 30 μ l 經稀釋之 AlamarBlue®。隨後再培育細胞 4 小時。最後，在螢光板讀取器中使用 544 nM 之激發濾光片及 590 nM 之發射濾光片來量測細胞之代謝活性。

既定化合物之結果定為平行操作之該化合物之 EC₅₀ 與 wthGH 之 EC₅₀ 的比率。其他結果於下表 6 中給出。

表 2

hGH 化合物之 EC₅₀ 值相對 hGH 之 EC₅₀ 值

半胱胺酸化合物	平均值	偏差
A17C-E174C	0.6	0.1
H21C-M170C	0.4	0.3
R94C-D107C	0.8	0.4
Q84C-Y143C	0.3	0.1
S71C-S132C	0.24	0.02

所測試之所有 hGH 化合物之效能皆等於或大於 wthGH。

表 2A

具有 PEG 基團之 hGH 化合物之 EC₅₀ 值相對 hGH 之 EC₅₀ 值

化合物	EC ₅₀ BAF 比率 (hGH 化合物/hGH wt)
hGH	1,0
hGH (q84c,Y143C) Q40-PEG5000	0,75
hGH (q84c,Y143C) N-term PEG750	0,475
hGH (q84c,Y143C) N-term PEG5000	1,1475

實施例 3A：垂體切除之史泊格多利大鼠 (Sprague Dawley rat) 之活體內劑量-反應研究 (檢定 3A)

在垂體切除之雄性史泊格多利大鼠中研究活體內劑量-反應關係。垂體切除大鼠為所熟知且公認的生長激素缺乏症動物模型，在該模型中，在手術移除垂腺後不產生生長激素。此亦導致胰島素樣生長因子-1 (IGF-1) (人類生長激



素缺乏症之另一重要臨床特徵)之循環量較低。

對重 90-100 g 之 4 週齡雄性大鼠進行垂體切除。手術後 3-4 週重 100-110 g 之動物進入研究。手術後 3-4 週期間體重增加超過 10% 之動物不允許進入研究。

將 70 隻垂體切除之史泊格多利大鼠隨機分配成 7 個給藥組，每組 10 隻動物。一個組僅接受媒劑且充當未經處理對照組。三個組分別接受 33 nmol、3.3 nmol 及 0.33 nmol 之測試化合物 (hGH Q84C,Y143C)，且三個組分別接受 50 nmol、5.0 nmol 及 0.5 nmol 之作為比較劑 (comparator) 之 hGH。化合物與媒劑均以單次皮下給藥方式於頸部投予。每天在 8-10 am 之間量測體重，歷時 1 週。

當比較第 0 天之體重與第 7 天之體重時，hGH Q84C,Y143C 與 hGH 均誘導體重以劑量依賴性方式增加。

藉由非線性回歸分析將 S 形劑量-反應方程式與實驗數據 (第 0 天至第 7 天之間的體重增加) 進行擬合，以計算 $E_{\max}$ 、 E_0 及 ED_{50} 之參數估算值。該方程式為 Windows 用 4.00 版 GraphPad Prism (GraphPad Software 公司, San Diego, USA) 中之 S 形劑量-反應內建式方程式。包括參數估算值及 95% 信賴區間之數據呈現於表 3 中。

hGH Q84C,Y143C 與 hGH 之 E_0 及 $E_{\max}$ 之參數估算值之間未觀測到差異。然而，與 hGH 相比，hGH Q84C,Y143C 之 ED_{50} 顯著較低，表明 hGH Q84C,Y143C 之活體內效能增加。

表 3

將與第 0 天相比第 7 天體重增加之反應與 S 形劑量-反應方程式進行擬合以估算 $E_{\max}$ 、 E_0 及 ED_{50} 。

	hGH Q84C,Y143C	hGH wt
E_0 (g)	0.0 (-1.9 - 1.8)	0.2 (-1.7 - 2.0)
ED_{50} (nmol)	0.29 (0.20 - 0.41)	0.70 (0.50 - 0.99)
$E_{\max}$ (g)	26.3 (24.8 - 27.9)	27.5 (25.9 - 29.1)

平均值 (95%信賴區間)

實施例 4：藉由表面電漿共振分析研究受體相互作用

使用表面電漿共振分析法來分析 hGH 化合物之受體相互作用。該方法普遍用於 hGH 化合物且由 Q84C/Y143C hGH 化合物例示。

藉由使用 Biacore T100 儀器 (GE Healthcare, Sweden) 進行表面電漿共振來研究 hGH 及類似物與 hGH 結合蛋白 (hGHBP) 之相互作用。根據製造商之說明書，典型地以 5000 RU 之程度將抗 hGH mAb (Fitzgerald Industries International, USA, 10G05B 號) 固定於 CM-5 晶片上。在操作緩衝液 (10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 30 mM EDTA, 0.05% 界面活性劑 P20, pH 7.4) 中捕捉 10-25 $\mu\text{g/ml}$ wthGH 或類似物，得到 250-400 RU 經捕捉配位體。隨後，以 30 $\mu\text{l/min}$ 在表面上注射濃度為 0-800 nM 之 hGHBP。使用固定有抗 hGH mAb 但未捕捉 hGH 之表面作為參照。

用 Biacore™ 評估軟體 2.0 與 1:1 朗繆爾結合模型 (Langmuir binding model) 分析動力學數據。

分析顯示 (表 4) hGH Q84C,Y143C 對生長激素結合蛋白之親和力類似於或稍高於 wthGH。

表 4

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
hGH wt	1.9x10 ⁵	6.1x10 ⁻⁴	3.3
hGH Q84C,Y143C	2.0x10 ⁵	4.8x10 ⁻⁴	2.5

分析顯示(表 4A)在實驗誤差範圍內，hGH Q84C,Y143C 與野生型 hGH 等效。

表 4A

	EC ₅₀ ± 標準偏差 (nM)
hGH wt	0.7 ± 0.3
hGH Q84C, Y143C	0.3 ± 0.1

實施例 5：量測野生型 hGH 及 hGH 化合物之蛋白酶降解速率的檢定

在適當緩衝液（例如 PBS 或碳酸氫銨）中於 37℃ 下用相關蛋白酶（胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、彈性蛋白酶、因子 VIIa、因子 Xa、蛋白酶 K、羧肽酶、DPPIV、中性內肽酶、顆粒酶 B、脯胺酸內肽酶、葡萄球菌肽酶 I、嗜熱菌蛋白酶、凝血酶、Arg-C 蛋白酶、Asp-N 內肽酶、卡斯蛋白酶 1-10、梭菌蛋白酶、腸激酶、麩胺醯基內肽酶、

顆粒酶 B、LysC、LysN、脯胺酸內肽酶及葡萄球菌肽酶 I 或組織提取物)消化相關化合物，歷時長達 24 小時。由 HPLC 檢定來評估蛋白水解性降解。

一般方法

蛋白水解性消化：

在 37°C 下用酶降解 100 μ L 於碳酸氫銨緩衝液中之 1 mg/ml 測試化合物，歷時長達 24 小時。在各個時間點採集子樣品，且藉由在 1% TFA 中稀釋 10 倍使樣品酸化來終止蛋白水解反應。由逆相 HPLC 分析此等經稀釋之樣品以估算蛋白水解性消化之程度。

HPLC 法：

將 10 μ L 上述溶液注射於逆相 Vydac C4 2 $\times$ 150 mm 管柱上，經 30 分鐘，以 0.2 ml/min 之流速，用 0.1% TFA 之水溶液至含有 0.1% TFA 之 100% 乙腈的線性梯度進行洗提。在 214 nm UV 吸收下進行峰偵測。由時間點 $t = T$ 時之峰面積 (A_T) 及 $t = 0$ 時之峰面積 (A_0) 以 $(A_T/A_0) \times 100\%$ 計算時間點 $t = T$ 時之完整化合物%。4 小時 (在上述方程式中， $T = 4$) 後，獲得下表 6 中所提供之結果。

使用 5.01 版 GraphPad Prims 軟體繪製完整化合物%對時間之曲線。亦由 GraphPad Prism 軟體以單相衰減 (one phase decay) 計算 $T_{1/2}$ 。

實施例中所用之酶為彈性蛋白酶 (Sigma，來自豬胰臟) 及胰凝乳蛋白酶 (Roche 測序級)。緩衝液為 50 mM 碳酸氫

鉍 (pH 8.5) 。

實施例 5.1

在 100 μ L 含 13 ng 胰凝乳蛋白酶之緩衝液中培育 100 μ g wthGH。 $T_{1/2} = 3.6$ 小時。

實施例 5.2

在 100 μ L 含 135 ng 彈性蛋白酶之緩衝液中培育 100 μ g wthGH。 $T_{1/2} = 1.6$ 小時。

實施例 5.3

在 100 μ L 含 135 ng 彈性蛋白酶之緩衝液中培育 100 μ g hGH Q84C,Y143C。 $T_{1/2} = 6.2$ 小時。

實施例 5.4

在 100 μ L 含 13 ng 胰凝乳蛋白酶之緩衝液中培育 100 μ g hGH A17C,E174C。 $T_{1/2} = 7.5$ 小時。

實施例 5.5

在 100 μ L 含 13 ng 胰凝乳蛋白酶之緩衝液中培育 100 μ g hGH H21C,M170C。 $T_{1/2} = 22$ 小時。

實施例 5.6

在 100 μ L 含 13 ng 胰凝乳蛋白酶之緩衝液中培育 100

μg hGH R94C,D107C。 $T_{1/2} = 2.5$ 小時。

實施例 5.7

在 $100\ \mu\text{L}$ 含 $13\ \text{ng}$ 胰凝乳蛋白酶之 $50\ \text{mM}$ 碳酸氫銨緩衝液 (pH 8.5) 中培育 $100\ \mu\text{g}$ hGH Q84C,Y143C。因未觀測到降解，故不能計算 $T_{1/2}$ 。

化合物	$T_{1/2}$
hGH wt	3.6
hGH A17C,E174C	7.5
hGH H21C,M170C	22
hGH R94C,D107C	2.5
hGH Q84,Y143C	N/A

表 4 胰凝乳蛋白酶降解野生型 hGH 及化合物之 $T_{1/2}$ (小時)

化合物	$T_{1/2}$
hGH wt	1.6
hGH Q84C,Y143C	6.2

表 5 野生型 hGH 及 hGH Q84C,Y143C 化合物由彈性蛋白酶降解之 $T_{1/2}$ (小時)

實施例 6：如實施例 3 及實施例 5 所述藉由 BAF 檢定及蛋白水解性消化來分析所選化合物

化合物	EC ₅₀ BAF 比率 (hGH 化 合 物 /hGH)	胰凝乳蛋白 酶穩定性 完整化合物 (%)	彈性蛋白酶 穩定性 完整化合物 (%)	經由另外的雙 硫鍵鍵聯之域
hGH	1,0	42	25	
hGH (A17C E174C)	0,6	45	10	H1-H4
hGH (H21C M170C)	0,5	72	10	H1-H4
hGH (D26C,V102C)	0,5	55	65	H1-L2
hGH (D26C,Y103C)	0,5	55	45	H1-L2
hGH (F54C,Y143C)	0,6	55	20	L1-L3
hGH (F54C,S144C)	0,5	60	20	L1-L3
hGH (F54C, F146C)	0,6	40	25	L1-L3
hGH (S55C,Y143C)	0,5	90	25	L1-L3
hGH (S57C,Y143C)	0,3	75	50	L1-L3
hGH (I58C Q141C)	0,7	70	25	L1-L3
hGH (I58C,Y143C)	0,6	55	20	L1-L3
hGH (I58C,S144C)	1,2	65	30	L1-L3
hGH (P59C Q137C)	0,7	72	35	L1-L3
hGH (S71C S132C)	0,2	90	45	L1-L3
hGH (L81C,Y143C)	0,7	85	15	H2-L3
hGH (Q84C Y143C)	0,5	100	80	H2-L3
hGH (S85C Y143C)	0,5	80	70	H2-L3
hGH (S85C, S144C)	0,7	81	60	H2-L3
hGH (F92C,T148C)	0,6	40	55	H2-L3
hGH (R94C D107C)	0,8	38	70	H2-H3

表 6. 對包含另外的雙硫鍵之生長激素化合物的分析

【圖式簡單說明】

圖 1

與兩個 hGH 結合蛋白複本結合之 hGH 的結構 (PDB 1HWG)。hGH 中之四個主要螺旋以暗灰色展示，且標記為 *H1-H4*。方向 (N→C 端) 由箭頭指示。hGH 之 N 端及 C 端分別標記為 N 及 C。兩個分別連接 C53 與 C165 及 C182 與 C189 之雙硫鍵由黑色棒與球表示。亦標記出 L128 及 D154，兩者分別表示在連接 H3 與 H4 之長可撓性環中的第一殘基及最末殘基。

圖 2

hGH 之野生型胺基酸序列，其中強調並標記四個主要螺旋 (H1-H4)。亦標記出三個連接主要螺旋之環 (L1-L3)。螺旋定義係指呈與結合蛋白之複合體形式的 hGH (PDB 1HWG)。

圖 3

蛋白水解性消化野生型 hGH 及具有另外的雙硫鍵之 hGH 化合物的時程。所用蛋白酶為胰凝乳蛋白酶 (圖 A) 及彈性蛋白酶 (圖 B)。如實施例 5 所述進行檢定。繪製完整蛋白質之量 (以相對於 $t = 0$ 時之百分比表示) 對培育時間之曲線。將數據擬合成單指數 (single exponential) 所得之 $T_{1/2}$ (小時) 列於表中。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> 諾佛 儂迪克股份有限公司
 丹穆斯, 海兒
 史曲歐德特, 克利斯汀 B
 布雷霍特, 傑斯
 歐森, 歐爾 H
 席傑森, 彼得
 諾斯寇福-羅瑞特森, 萊夫

<120> 穩定的生長激素化合物

<130> 7878.20-TW

<160> 1

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 191

<212> PRT

<213> 人類生長激素

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (6)..(35)

<223> 螺旋1

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (36)..(71)

<223> 環1

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (72)..(98)

<223> 螺旋2

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (99)..(106)

<223> 環2

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (107)..(127)

<223> 螺旋3

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (128)..(154)

<223> 環3

<220>

<221> 雜項特徵

<222> (155)..(184)

<223> 螺旋4

<400> 1

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

七、申請專利範圍：

1.一種生長激素化合物，其與 SEQ ID No. 1 所定義之 hGH 相比包含另外的雙硫鍵且該另外的雙硫鍵係在一環區段與一螺旋區段之間、或在一環區段內、或在環區段之間、或在螺旋區段之間，其中該生長激素化合物對蛋白酶降解為穩定的。

2.如申請專利範圍第 1 項之生長激素化合物，其中該生長激素之多肽序列與 SEQ ID No. 1 所定義之 hGH 至少 90% 一致。

3.如申請專利範圍第 2 項之生長激素化合物，其中該生長激素之多肽序列與 SEQ ID No. 1 所定義之 hGH 至少 95% 一致。

4.如申請專利範圍第 1 或 2 項之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 及 / 或 V185C/S188C。

5.如申請專利範圍第 4 項之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及 / 或 R94C/D107C。

6.如申請專利範圍第 1 或 2 項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物包含另外的雙硫鍵，其中至少一個半胱胺酸存在於對應於 SEQ ID No. 1 中之 AA 128-154 之環 3 (L3) 中。

7.如申請專利範圍第 6 項之生長激素，其中該生長激素化合物包含另外的雙硫鍵，其中至少一個半胱胺酸存在於對應於 SEQ ID No. 1 中之 AA 135-148 之區域中。

8.如申請專利範圍第 6 項之生長激素化合物，其中該化合物包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C 及 / 或 F92C/T148C。

9.如申請專利範圍第 6 項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物包含連接 L3 與螺旋 2 (H2) 或環 1 (L1) 之

另外的雙硫鍵。

10.如申請專利範圍第 9 項之生長激素化合物，其中該化合物包含連接對應於 SEQ ID No. 1 之 H2 中的 AA84 或 AA85 的胺基酸殘基與對應於 L3 中的 AA143 或 AA144 的胺基酸的另外的雙硫鍵。

11.如申請專利範圍第 1 或 2 項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物對選自消化蛋白酶的蛋白酶之降解為穩定的。

12.如申請專利範圍第 11 項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物對選自胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、羧肽酶及/或彈性蛋白酶的蛋白酶之降解為穩定的。

13.如申請專利範圍第 11 項之生長激素化合物，其中該多肽包含至少一對對應於以下者之突變：SEQ ID No. 1 中之 H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 及/或 R94C/D107C。

14.如申請專利範圍第 1 或 2 項之生長激素化合物，其與 SEQ ID No. 1 所定義之人類生長激素相比精確包含兩個另外的半胱胺酸。

15.如申請專利範圍第 1 或 2 項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物為融合蛋白。

16.如申請專利範圍第 1 或 2 項之生長激素化合物，其

中該生長激素化合物經化學修飾。

17.如申請專利範圍第 1 或 2 項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物經由使一些部分 (moiety) 與該生長激素化合物之側鏈或主鏈連接而化學修飾。

18.如申請專利範圍第 1 項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物保有生物活性。

19.如申請專利範圍第 1 項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物在 BAF 檢定中具有活性。

20.如申請專利範圍第 1 項之生長激素化合物，其中該生長激素化合物在垂體切除之大鼠中有活性。

21.一種製備對蛋白水解性降解之穩定性增加之生長激素化合物的方法，該方法包含以下步驟：

a.在 SEQ ID No. 1 所定義之 hGH 中引入另外的雙硫鍵。

22.一種醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1 至 20 項中任一項之生長激素化合物及醫藥學上可接受之載劑。

23.一種如申請專利範圍第 1 至 20 項中任一項之生長激素化合物或如申請專利範圍第 22 項之醫藥組成物的用途，其係用於製造供治療疾病或狀態用之醫藥品，在該疾病或狀態中患者會受益於循環生長激素化合物之量增加。

24.一種如申請專利範圍第 1 至 20 項中任一項之生長激素化合物的用途，其係用於製造供治療生長激素缺乏症 (GHD)；特納症候群 (Turner Syndrome)；普萊德-威利症候群 (Prader-Willi syndrome, PWS)；努南症候群 (Noonan syndrome)；唐氏症候群 (Down syndrome)；慢性腎病；幼

年型類風濕性關節炎；囊腫性纖維化；接受 HAART 治療之兒童 HIV 感染（HIV/HALS 兒童）；胎齡不足（SGA）所致之兒童矮小；出生體重極輕（VLBW）且 SGA 所致之兒童身材矮小；骨骼發育不良；軟骨生成減退（hypochondroplasia）；軟骨發育不全（achondroplasia）；特發性身材矮小（ISS）；成人 GHD；長骨內骨折或長骨骨折；海綿樣骨（spongy bone）內骨折或海綿樣骨骨折；腱或韌帶手術後之患者；已歷經或正經歷牽引成骨術（distraction osteogenesis）之患者；歷經髖或盤置換術、半月板修復術、脊柱融合術或假體固定術後之患者；固定有接骨材料的患者；骨折未癒合或癒合不良之患者；切骨術後之患者；移植物植入後之患者；創傷或關節炎所致之膝關節軟骨退化；特納症候群患者之骨質疏鬆症；男性骨質疏鬆症；長期透析之成人患者（APCD）；APCD 營養不良相關心血管疾病；APCD 惡病質逆轉；APCD 癌症；APCD 慢性阻塞性肺病；APCD HIV；APCD 老齡化；APCD 慢性肝病；APCD 疲勞症候群；克羅恩氏病（Chron's disease）；肝功能受損；男性 HIV 感染；短腸症候群；中心型肥胖；HIV 相關脂質營養不良症候群（HALS）；男性不育症；大型選擇性手術（major elective surgery）、酒精/藥物解毒或神經性創傷後之患者；衰老；老年虛弱；骨關節炎；創傷性軟骨損傷；勃起困難；肌肉纖維疼痛；記憶障礙；抑鬱症；創傷性腦損傷；蛛膜下出血；出生體重極低；代謝症候群；糖皮質激素肌病；或糖皮質激素治療所致之兒童身材矮小

用之醫藥品。

八、圖式：

(如次頁)

公告本

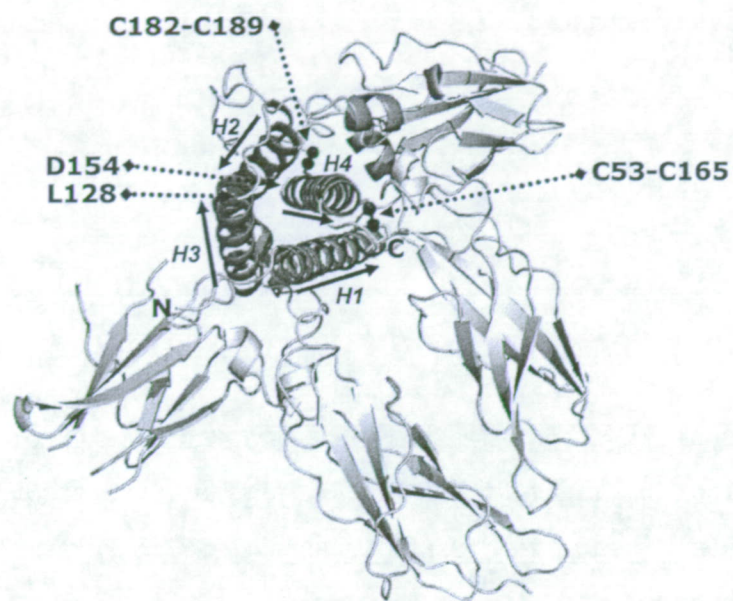


圖 1

圖 2

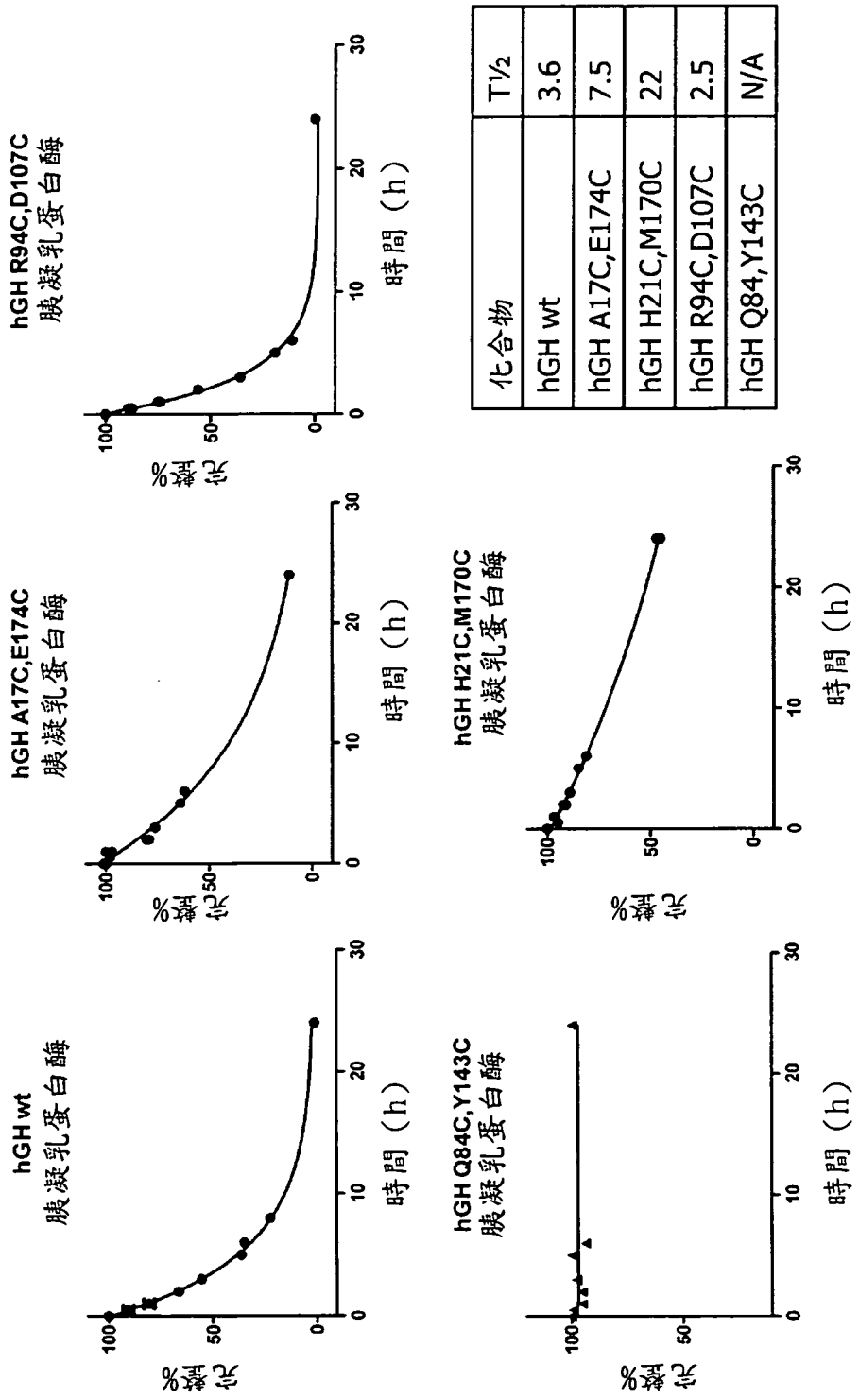
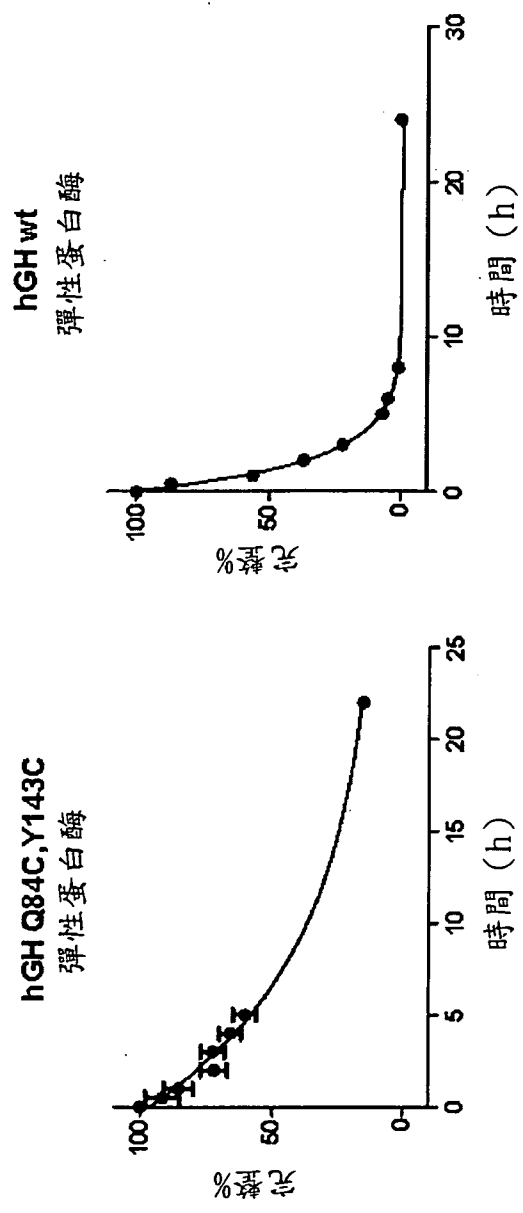


圖 3A



化合物	T½
hGH wt	1.6
hGH Q84C,Y143C	6.2

圖 3B