



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102612376 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 25

(21) 申请号 201080035764. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 08. 06

*A61K 47/48* (2006. 01)

*A61P 5/06* (2006. 01)

(30) 优先权数据

09167350. 9 2009. 08. 06 EP

61/232967 2009. 08. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 02. 06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/061473 2010. 08. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02011/015649 EN 2011. 02. 10

(71) 申请人 诺沃 - 诺迪斯克保健股份有限公司

地址 瑞士苏黎世

(72) 发明人 N·L·约翰森 H·S·安德森

J·布夏特 C·贝伦斯

L·诺斯科夫 - 劳里特森 J·苏

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李进 刘健

权利要求书 6 页 说明书 66 页

序列表 2 页

(54) 发明名称

具有延长的体内功效的生长激素

(57) 摘要

本发明涉及针对皮下给药优化的多肽化合物,所述化合物由具有提供与白蛋白的非共价结合的接头的生长激素缀合物例示。

1. 一种生长激素缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,所述缀合物包含经由亲水间隔基与白蛋白结合残基连接的生长激素化合物 (GH)。

2. 权利要求 1 的缀合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物和前药,其中所述生长激素缀合物具有式 (I) :



其中

GH 表示生长激素化合物 ;

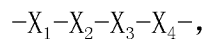
B 表示亲水间隔基 ;

W 为连接 A 和 B 的化学基团 ;和

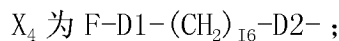
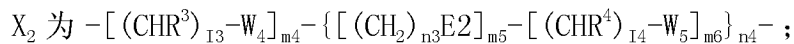
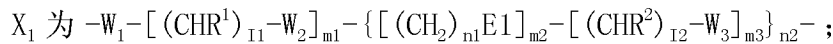
A 表示白蛋白结合残基。

3. 权利要求 1-2 中任一项的缀合物,其中 GH 为 hGH (SEQ ID NO :1)。

4. 权利要求 2-3 中任一项的缀合物,其中 B 具有下式 :



其中



I1、I2、I3、I4、I5 和 I6 独立选自 0-16 ;

m1、m3、m4、m6 和 m7 独立选自 0-10 ;

m2 和 m5 独立选自 0-25 ;

n1、n2、n3 和 n4 独立选自 0-16 ;

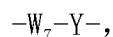
F 为芳基、杂芳基、吡咯烷 -2,5- 二酮或价键,其中所述芳基和杂芳基任选被以下基团取代 : 卤素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH<sub>2</sub>、-S(O)<sub>2</sub>OH 或 C<sub>1-6</sub>- 烷基 ;

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH<sub>2</sub>、-S(O)OH、-S(O)<sub>2</sub>OH、-NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>、C<sub>1-6</sub>- 烷基、芳基或杂芳基 ;其中所述烷基、芳基和杂芳基任选被以下基团取代 : 卤素、-C(O)OH、-C(O)NH<sub>2</sub>、-S(O)OH、-S(O)<sub>2</sub>OH、-CN 或 -OH ;

D1、D2、E1 和 E2 独立选自 -O-、-NR<sup>6</sup>-、-N(COR<sup>7</sup>)- 或价键 ;其中 R<sup>6</sup> 和 R<sup>7</sup> 独立表示氢或 C<sub>1-6</sub>- 烷基 ;

W<sub>1</sub>-W<sub>6</sub> 独立选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)- 或价键 ;其中 s2 为 0 或 1。

5. 权利要求 2-4 中任一项的缀合物,其中 W 具有下式 :



其中

Y 为 -(CH<sub>2</sub>)<sub>I7</sub>-C<sub>3-10</sub>- 环烷基 -W<sub>8</sub>- 或价键 ;

I7 为 0-6 ;

W<sub>7</sub> 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>C(O)-、-C(O)CH=

CH-、-CH = CHC(O)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)- 或价键；其中 s3 为 0 或 1；

W<sub>8</sub> 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>C(O)-、-C(O)CH = CH-、-CH = CHC(O)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>s4</sub>-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)- 或价键；其中 s4 为 0 或 1。

6. 权利要求 4-5 中任一项的缀合物，其中

I1、I2、I3、I4、I5 和 I6 独立为 0-6；

m1、m3、m4、m6 和 m7 独立为 0-6；

m2 和 m5 独立为 0-10；和

n1、n2、n3 和 n4 独立为 0-10。

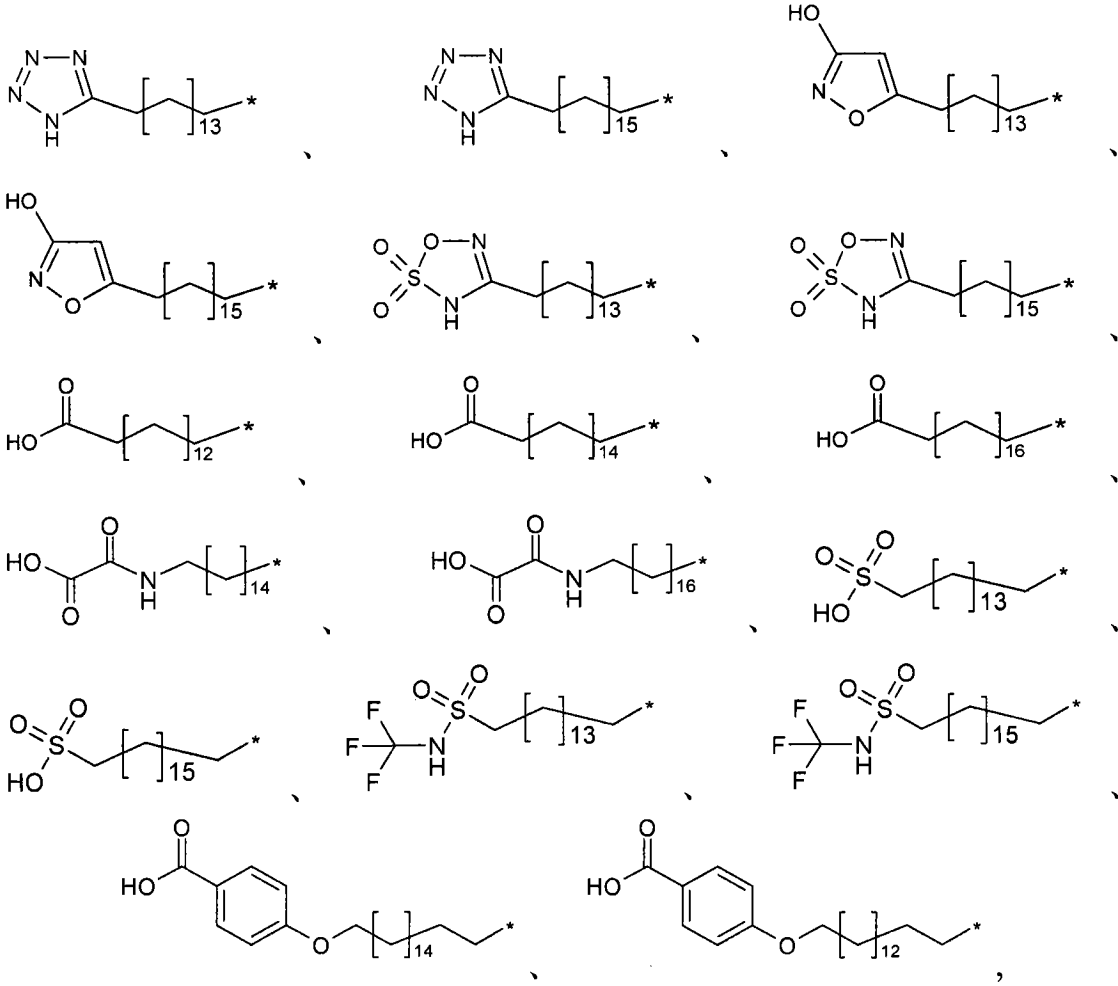
7. 权利要求 4-6 中任一项的缀合物，其中 D1 和 D2 独立选自 -O- 或 -NR<sup>6</sup>- 或价键。

8. 权利要求 4-7 中任一项的缀合物，其中 E1 和 E2 独立选自 -O- 或 -NR<sup>6</sup>- 或价键。

9. 权利要求 4-8 中任一项的缀合物，其中 W<sub>1</sub>-W<sub>8</sub> 独立选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- 或价键。

10. 权利要求 4-9 中任一项的缀合物，其中 R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH<sub>2</sub>、-S(O)<sub>2</sub>OH 或 C<sub>1-6</sub>-烷基；其中所述烷基任选被 -C(O)OH、-C(O)NH<sub>2</sub>、-S(O)<sub>2</sub>OH 取代。

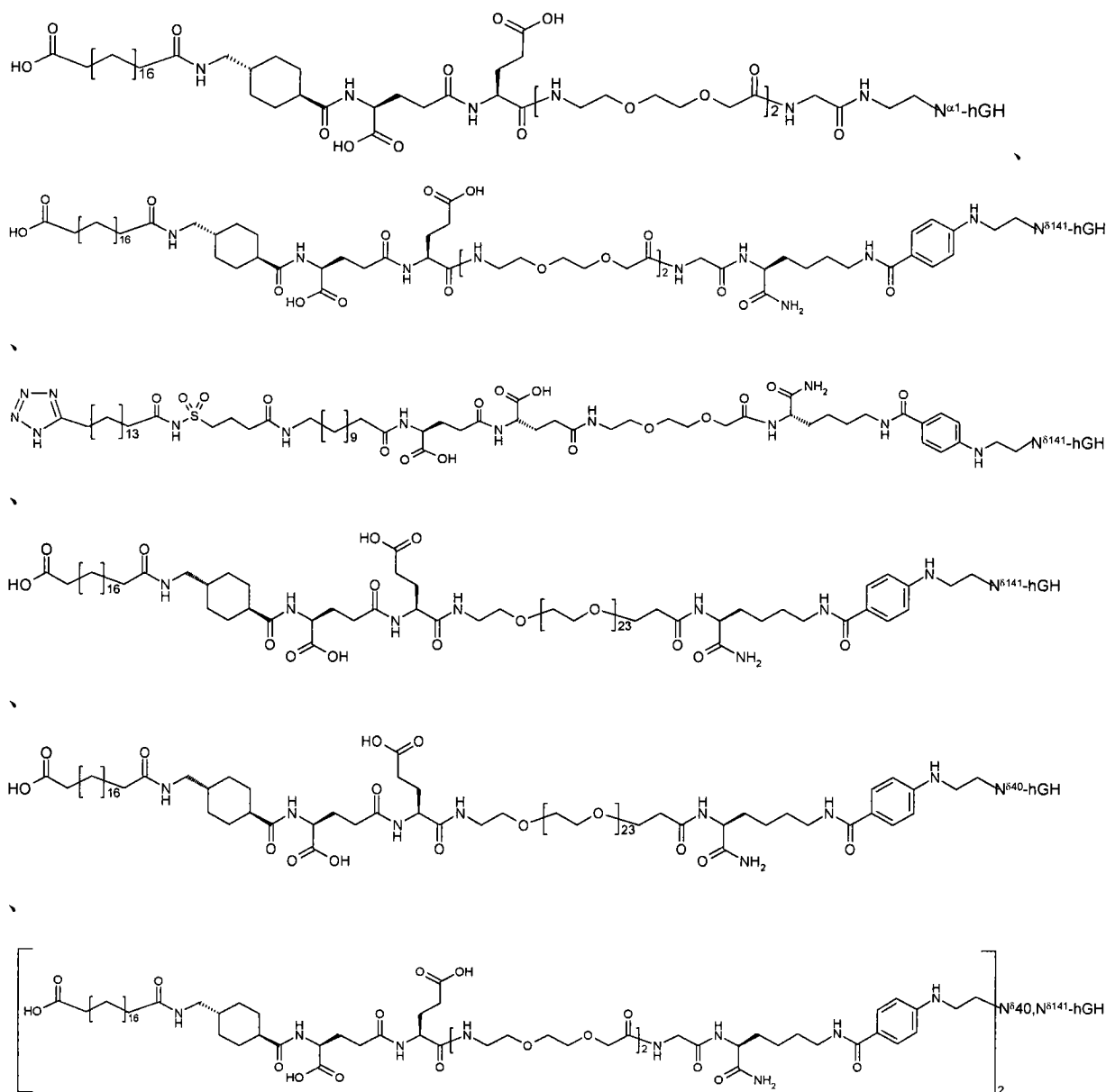
11. 权利要求 2-10 中任一项的缀合物，其中 A 选自：

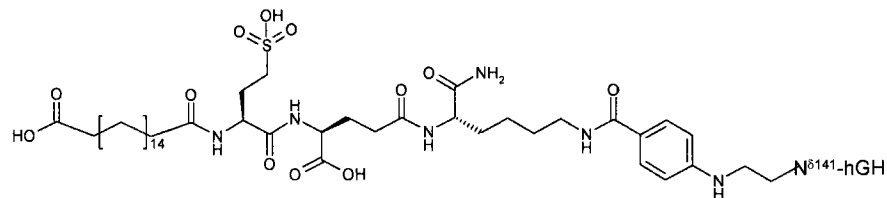
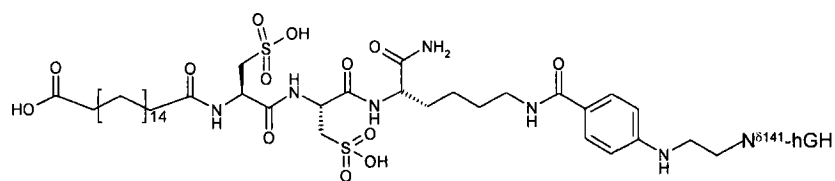
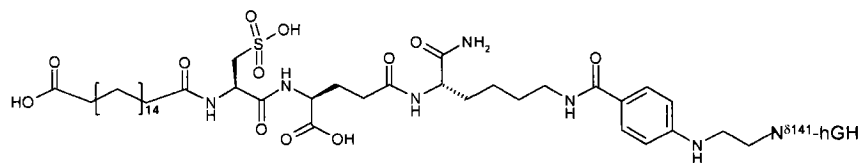
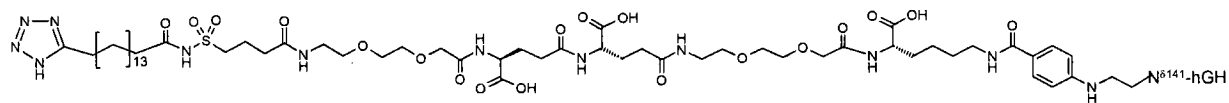
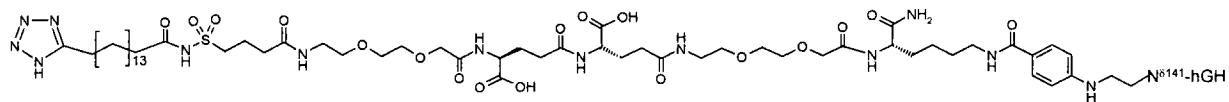
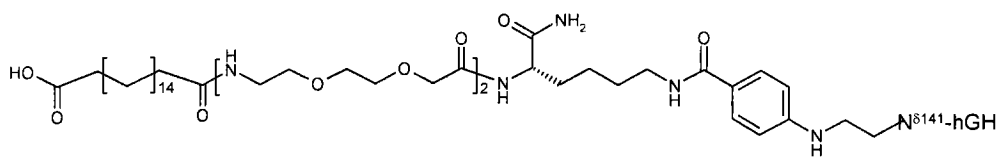
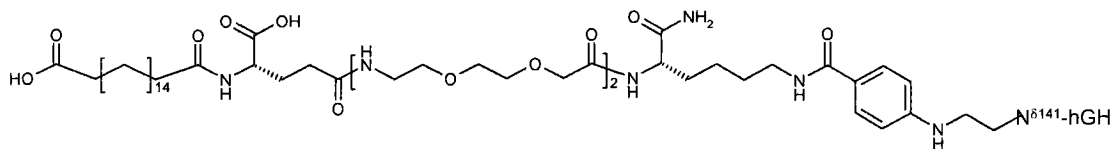
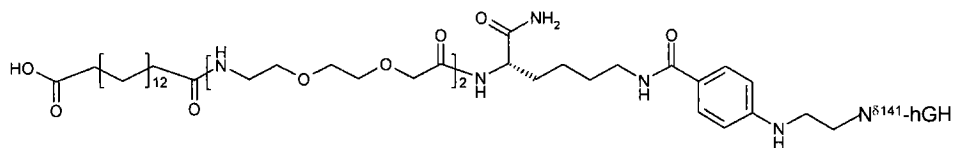
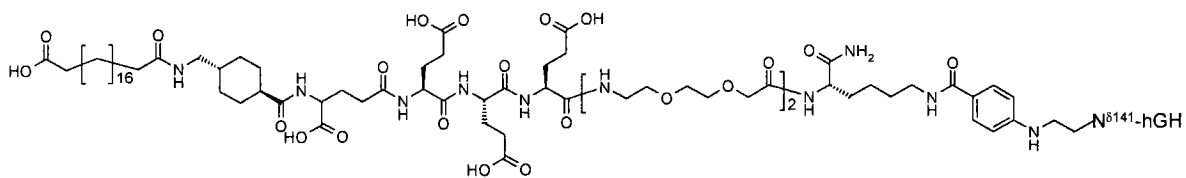


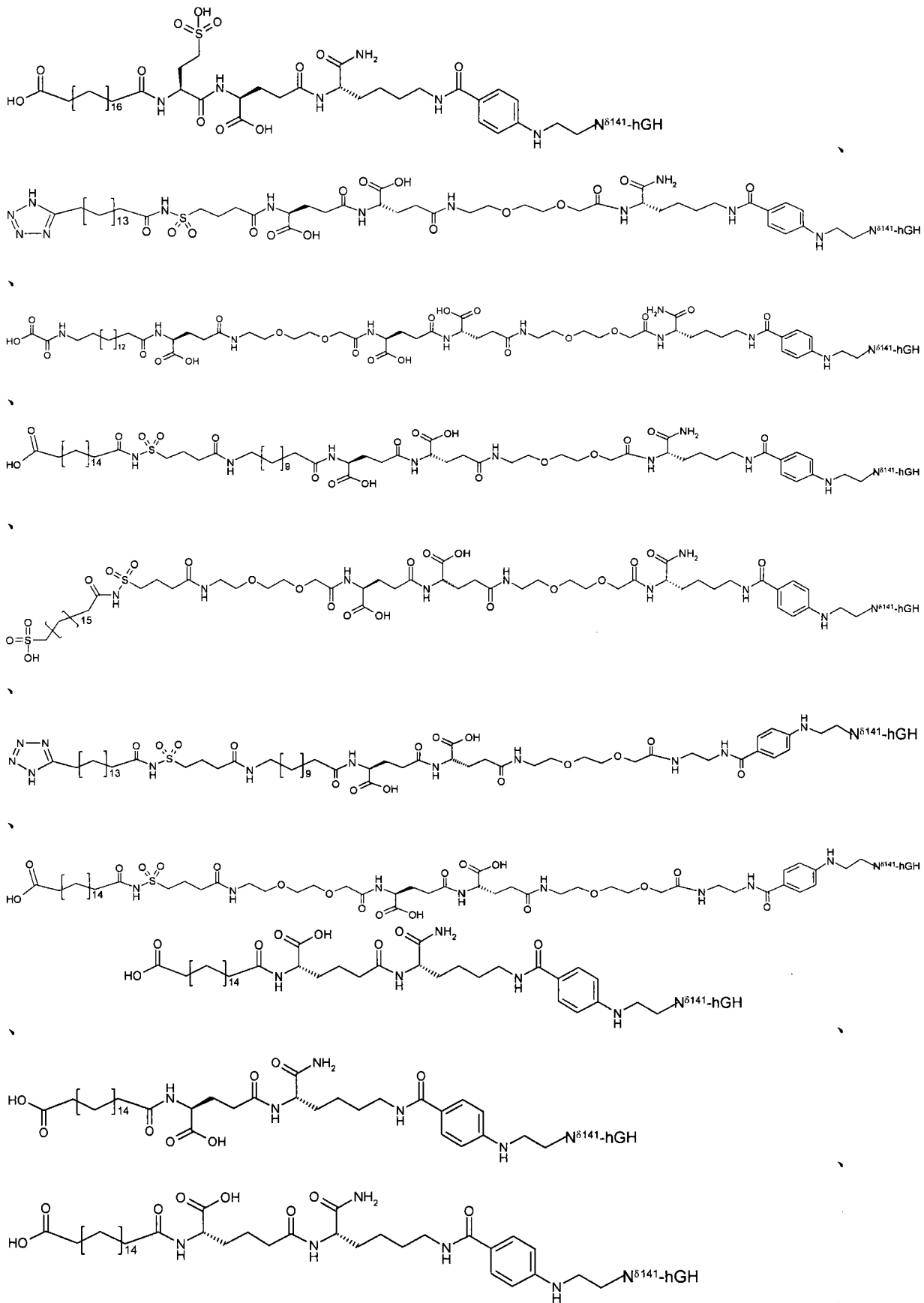
其中 \* 表示通过 W 连接至 B。

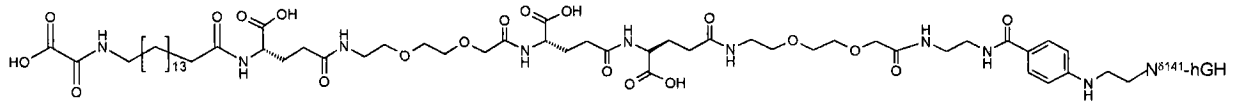
12. 权利要求 1-11 中任一项的缀合物,其中所述白蛋白结合残基经由亲水间隔基与所述生长激素化化合物的对应于 SEQ ID No. 1 的 40 位的位置的谷氨酰胺残基或对应于 SEQ ID No. 1 的 141 位的位置的谷氨酰胺残基或 N- 末端残基连接。

13. 前述权利要求中任一项的缀合物,其中所述化合物选自:









14. 一种药物组合物,所述组合物包含任选与药学上可接受的赋形剂组合的权利要求 1-13 中任一项的缀合物。

15. 权利要求 1-13 中任一项的缀合物在制备以下药物中的用途,所述药物用于治疗特纳综合征;普-韦综合征(PWS);努南综合征;唐氏综合征;慢性肾脏疾病、幼年型类风湿关节炎、囊性纤维化、接受 HAART 治疗的儿童 HIV 感染(HIV/HALS 儿童);小于胎龄(SGA)出生的矮小儿童;非 SGA 的以极低出生体重(VLBW)出生的儿童的身材矮小症;骨骼发育不良;软骨发育不良;软骨发育不全;特发性身材矮小症(ISS);成人 GHD;长骨骨折,所述长骨为例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨、跖骨和指骨;海绵骨例如头骨、手腕骨和脚底骨的骨折;例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者;进行或经历牵拉骨生成技术的患者;髌关节置换或关节盘置换、关节盘修复、脊柱融合或例如在膝、髌、肩、肘、腕或颞中的假体固定后的患者;其中已固定骨接合材料例如钉、螺钉和板的患者;骨折不愈合或畸形愈合的患者;例如胫骨或第一脚趾的骨解剖后的患者;移植物植入后的患者;创伤或关节炎引起的膝关节软骨退化;特纳综合征患者中的骨质疏松症;男性骨质疏松症;长期透析的成年患者(APCD);APCD 中营养不良相关的心血管疾病;APCD 中的恶病质逆转;APCD 中的癌症;APCD 中的慢性抽象性肺病;APCD 中的 HIV;APCD 老年人;APCD 中的慢性肝病、APCD 中的疲劳综合征;克罗恩病;肝功能受损;具有 HIV 感染的男性;短肠综合征;向心性肥胖;HIV 相关脂肪营养不良综合征(HALS);男性不育症;大选择性手术、酒精/药物解毒或神经创伤后的患者;老化;虚弱的老年人;骨关节炎;创伤性损伤的软骨;勃起功能障碍;纤维肌痛;记忆障碍;抑郁;外伤性脑损伤;蛛网膜下腔出血;极低出生体重;代谢综合征;糖皮质激素性肌病;糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症,加速肌肉组织、神经组织或伤口愈合;加速或改善流到损伤组织的血流;或降低损伤组织的感染率。

## 具有延长的体内功效的生长激素

### 发明领域

[0001] 本发明涉及经由亲水间隔基与白蛋白结合残基连接的生长激素化合物和制备及使用所述化合物的方法。这些化合物具有延长的作用特征并可用于治疗。

[0002] 发明背景

[0003] 通过让基团与肽缀合来改变肽的性质和特点是为众所周知的,所述缀合恰当改变肽的性质。所述缀合一般要求肽中的一些官能团与缀合基团中的另一官能团反应。通常将氨基(例如N-末端氨基或赖氨酸中的 $\epsilon$ -氨基)与合适的酰化试剂联用,例如WO2005/027978中对GLP-1所述的。或者,可让聚乙二醇(PEG)或其衍生物与蛋白质连接。综述参见Exp. Opin. Ther. Patent., 14, 859-894, (2004)。业已显示PEG与生长激素连接可对生长激素血浆半衰期有正面作用,见WO 03/044056。

[0004] 先前业已阐述利用羧肽酶来修饰肽的C-末端。WO 92/05271揭示了利用羧肽酶和亲核化合物来使C-末端羧基酰胺化,WO 98/38285揭示了特别合适该目的的羧肽酶Y的变体。

[0005] EP 243 929揭示了利用羧肽酶将多肽、报告基团或细胞毒素剂掺入蛋白质或多肽的C-末端。

[0006] WO 2005/035553阐述了通过在肽的C-末端酶法掺入官能团来选择性缀合肽的方法。

[0007] 先前业已使用转谷氨酰胺酶来改变肽的性质。在食品工业特别是在乳制品工业中,许多技术可用于例如使用转谷氨酰胺酶来交叉结合肽。其它文献揭示了用转谷氨酰胺酶来改变生理学活性肽的性质。EP950665、EP 785276和Sato, Adv. Drug Delivery Rev. 54, 487-504 (2002)揭示了在转谷氨酰胺酶存在时包含至少一个Gln的肽和胺-官能化PEG或类似配体之间的直接反应,Wada, Biotech. Lett. 23, 1367-1372 (2001)揭示了通过转谷氨酰胺酶让 $\beta$ -乳球蛋白与脂肪酸直接缀合。作为WO 2005/070468公布的国际专利申请揭示了利用转谷氨酰胺酶掺入柄(handle),所述柄可连接缀合基团。

[0008] 生长激素是不仅参与体细胞生长调控而且还参与蛋白质、碳水化合物和脂质新陈代谢调控的关键激素。生长激素的主要作用是促进生长。人类生长激素是具以下序列的191个氨基酸残基的蛋白质:FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFNANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKMDKVVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO :1)。

[0009] 利用给予人生长激素及其密切相关变体来治疗各种生长激素缺乏相关疾病。在胃肠外即借助针给予作为肽的生长激素。此外,生长激素特征为半衰期相对短,因此需要频繁给予,给患者带来相应的疼痛和不便。因此,仍然需要提供具有改进的药理学特性例如延长的半衰期的生长激素化合物。

[0010] 本发明提供具有改进的药理学性质的新型生长激素缀合物及其生产方法。

[0011] 发明简述

[0012] 皮下给予药物化合物的生物利用度可与吸收率相关。化合物通过皮下毛细血管紧

密连接的能力可部分涉及其物理和化学性质以及化合物的分子大小或流体力学体积。蛋白质缀合物例如含 40kDa PEG 的聚乙二醇化 hGH (PEG-hGH) 具有 150-250kDa 的表观分子量。含共价结合的白蛋白的 hGH 分子具有 87kDa 的分子量, 而含非共价结合的白蛋白的 hGH 分子将因时间与白蛋白部分解离, 因此具有 22kDa 的分子量。

[0013] 预期呈解离状态所花的时间至少部分视白蛋白结合部分的亲和力而定。因此, 含非共价结合的白蛋白的 hGH 分子的吸收率可快于 PEG-hGH。当用对白蛋白具有较低亲和力的白蛋白结合部分时可获得增加的吸收率。

[0014] 另外, 为白蛋白结合部分与 hGH 提供连接的接头和 / 或间隔基的物理和化学性质将影响所述化合物的功能。

[0015] 本发明人令人惊讶地发现, 生长激素化合物 (GH) 可经由亲水间隔基选择性地与白蛋白结合残基连接, 以获得具有改进的药理学性质的 GH 缀合物, 所述亲水间隔基用化学部分隔开 GH 和白蛋白结合残基, 所述化学部分具有  $m\text{LogP} < 0$  或  $c\text{LogP} < 0.5$ 。

[0016] 此外, 本发明以可选择性进行将白蛋白结合残基经由亲水间隔基引入人生长激素 (hGH) (其中可保留大部分生物活性) 的观察为基础。优选在对应于具有 SEQ ID No. 1 序列的 hGH 的 1 位苯丙氨酸、40 位谷氨酰胺和 / 或 141 位谷氨酰胺的位置, 经由亲水间隔基引入白蛋白结合残基。转谷氨酰胺酶 (TG 酶) 尤其是来自茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraenae*) 或利迪链霉菌 (*Streptomyces lydicus*) 的 TG 酶的使用, 允许经由亲水间隔基在 40 和 / 或 141 位选择性引入白蛋白结合残基, 其余的 11 个谷氨酰胺残基保持不动, 尽管谷氨酰胺是转谷氨酰胺酶的底物这一事实。

[0017] 因此, 在本发明一个实施方案中, 生长激素化合物 (GH) 经由亲水间隔基与一个白蛋白结合残基连接。通常白蛋白结合残基经由亲水间隔基连接到 hGH 的 N- 末端、40 位或 141 位。在另一实施方案中, 两个或三个白蛋白结合残基经由亲水间隔基连接到 hGH 的 N- 末端、40 位和 / 或 141 位。

[0018] 在本发明另一实施方案中, 亲水间隔基具有下式

[0019]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0020] 其中

[0021]  $X_1$  为  $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ;

[0022]  $X_2$  为  $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ;

[0023]  $X_3$  为  $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$ ;

[0024]  $X_4$  为  $-F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$ ;

[0025]  $I1$ 、 $I2$ 、 $I3$ 、 $I4$ 、 $I5$  和  $I6$  独立选自 0-16;

[0026]  $m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$  和  $m7$  独立选自 0-10;

[0027]  $m2$  和  $m5$  独立选自 0-25;

[0028]  $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$  和  $n4$  独立选自 0-16;

[0029]  $F$  为芳基、杂芳基 (hetaryl)、吡咯烷 -2,5- 二酮或价键, 其中芳基和杂芳基任选被以下基团取代: 卤素、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  或  $C_{1-6}$ - 烷基;

[0030]  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  和  $R^5$  独立选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ - 烷基、芳基或杂芳基; 其中烷基、芳基和杂芳基任选被以下基团取代: 卤素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$  或  $-OH$ ;

[0031] D1、D2、E1 和 E2 独立选自  $-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-N(COR^7)-$  或价键；其中  $R^6$  和  $R^7$  独立表示氢或  $C_{1-6}$ -烷基；

[0032]  $W_1-W_6$  独立选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s1}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$  或价键；其中  $s1$  为 0 或 1。

[0033] 本发明又一目的是提供用于通过按照本发明方法缀合所述蛋白质来改进 GH 性质的方法。

[0034] 定义

[0035] 在本发明上下文中，本文所用术语“生长激素化合物”意指哺乳动物来源的生长激素（例如人、牛或猪生长激素）和重组生长激素（例如重组人、牛或猪生长激素）和所述生长激素的变体。本文所用“GH”和“生长激素化合物”可互换使用。当 GH 为哺乳动物来源的生长激素变体例如 hGH 和重组 hGH 时，所述变体应理解为通过以下步骤获得的化合物：用另一天然或非天然氨基酸取代生长激素例如 hGH 序列中的一个或多个氨基酸残基；和 / 或将一个或多个天然或非天然氨基酸添加到生长激素例如 hGH 序列中；和 / 或从生长激素例如 hGH 序列中缺失一个或多个氨基酸残基，其中这些步骤中的任何一个可任选后接一个或多个氨基酸残基的进一步衍生。具体而言，在一个氨基酸残基被来自相同组的另一氨基酸残基取代（即被另一具有相似特性的氨基酸残基取代）的情况下，这类取代为保守的。可基于其特性将氨基酸适宜地分为以下组别：碱性氨基酸（例如精氨酸、赖氨酸、组氨酸）、酸性氨基酸（例如谷氨酸和天冬氨酸）、极性氨基酸（例如谷氨酰胺、半胱氨酸和天冬酰胺）、疏水氨基酸（例如亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸）、芳族氨基酸（例如苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸）和小氨基酸（例如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸）。通常 GH 与 hGH 具有至少 80% 同一性，具有 hGH 的至少 20% 的生长激素活性，如本文测定 I 所测定。

[0036] 在本发明上下文中，本文所用术语“白蛋白结合残基”意指与人血清白蛋白非共价结合的残基。连接生长激素化合物 (GH) 的白蛋白结合残基通常对于人血清白蛋白具有低于约  $10 \mu M$  或甚至低于约  $1 \mu M$  的结合亲和力。已知一系列白蛋白结合残基属于含有 12-40 个碳原子的线性及分支的亲脂部分、含环戊烷并菲骨架的化合物和 / 或具有 10-45 个氨基酸残基的肽等。可通过表面等离子共振测量白蛋白结合特性，如 J. Biol. Chem. 277(38), 35035-35042, (2002) 中所述。

[0037] 本文所用术语“亲水间隔基”意指用化学部分隔开生长激素化合物和白蛋白结合残基的间隔基，所述化学部分包含至少 5 个非氢原子，其中非氢原子的 30-50% 为 N 或 O。

[0038] 在本发明上下文中，术语“转氨基作用”和相关术语意欲表示其中谷氨酰胺侧链的酰胺氮与另一化合物的氮（具体而言为来自另一含氮亲核体的氮）交换的反应。

[0039] 转谷氨酰胺酶 (E. C. 2. 3. 2. 13) 亦称为蛋白-谷氨酰胺- $\gamma$ -谷氨酰转移酶，其催化以下一般反应：

[0040]



[0041]  $Q-C(O)-NH_2$  (胺受体) 可代表含有谷氨酰胺残基的肽或蛋白质， $Q'-NH_2$  (胺供体)

代表含有胺的亲核体。或者,  $Q-C(O)-NH_2$  和  $Q'-NH_2$  可分别代表胺受体和含有赖氨酸的肽或蛋白质。然而, 在本发明中,  $Q-C(O)-NH_2$  代表含有谷氨酰胺残基的生长激素,  $Q'-NH_2$  代表如上所述的含有胺的亲核体。

[0042] 有用的转谷氨酰胺酶实例包括微生物转谷氨酰胺酶, 例如来自以下的转谷氨酰胺酶: 茂原链轮丝菌、肉桂链霉菌 (*Streptomyces cinnamoneum*) 和灰肉链霉菌 (*Streptomyces griseocarneum*) (全部揭示于 US 5, 156, 956 中, 其通过引用并入本文中) 和淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*) (揭示于 US 5, 252, 469 中, 其通过引用并入本文中) 和拉达卡链霉菌 (*Streptomyces ladakanum*) (JP 2003/199569, 其通过引用并入本文中)。应该注意, 从前的链轮丝菌属 (*Streptoverticillium*) 的成员现在包括在链霉菌属 (*Streptomyces*) 中 (Kaempfer, J. Gen. Microbiol. 137, 1831-1892 (1991))。其它有用的微生物转谷氨酰胺酶已分离自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (揭示于 US 5, 731, 183, 其通过引用并入本文中) 和各种黏菌 (*Myxomycetes*)。有用的微生物转谷氨酰胺酶其它实例为揭示于 WO 96/06931 (例如来自 *Bacillus lydicus* 的转谷氨酰胺酶) 和 WO 96/22366 中的转谷氨酰胺酶, 二者都通过引用并入本文中。有用的非微生物转谷氨酰胺酶包括豚鼠肝转谷氨酰胺酶和来自各种海产来源如扁鱼真鲷 (*Pagrus major*) (揭示于 EP-0555649, 其通过引用并入本文中) 和日本牡蛎长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) (揭示于 US5, 736, 356, 其通过引用并入本文中) 的转谷氨酰胺酶。

[0043] 在本发明上下文中, 术语“不可接近的”意欲表示某物不存在或从其不能被触及的意义而言实际上不存在。当表明待缀合的蛋白质的官能团不可接近的时, 意欲表示该蛋白质中不存在所述官能团, 或若存在的话在某种程度上其被阻止参与反应。举例而言, 所述官能团可埋在蛋白质结构深处, 因而被屏蔽而不能参与反应。要认识到的是, 官能团是否可接近视反应条件而定。可设想的是, 例如在变性剂存在下或在高温下, 蛋白质可展开而暴露出本来不可接近的官能团。应该理解, “不可接近的”意指“在选择用于特定目的的反应的反应条件下不可接近的”。

[0044] 术语“烷烃”或“烷基”意欲表示饱和、线性、分支和 / 或环状烃。除非用另一碳原子数目规定, 否则术语意欲表示具 1-30 (包括端值) 个碳原子的烃, 例如 1-20 (包括端值) 个、例如 1-10 (包括端值) 个、例如 1-5 (包括端值) 个。术语烷基和亚烷基分别是指相应的自由基和二价自由基。

[0045] 术语“ $C_{1-6}$  烷基”是指具有 1-6 个碳原子的直链或分支饱和烃。所述基团实例包括但不限于甲基、2-丙基、1-丁基、2-丁基、2-甲基-2-丙基、2-甲基-1-丁基和正己基。

[0046] 术语“ $C_{3-10}$  环烷基”通常是指环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环壬基和环癸基。

[0047] 术语“烯烃”意欲表示包含至少一个碳碳双键的线性、分支和 / 或环状烃。除非用另一碳原子数目规定, 否则术语意欲表示具 2-30 (包括端值) 个碳原子的烃, 例如 2-20 (包括端值) 个、例如 2-10 (包括端值) 个、例如 2-5 (包括端值) 个。术语烯基和亚烯基分别是指相应的自由基和二价自由基。

[0048] 术语“炔烃”意欲表示包含至少一个碳碳三键的线性、分支和 / 或环状烃, 其可任选包含一个或多个碳碳双键。除非用另一碳原子数目规定, 否则术语意欲表示具 2-30 (包括端值) 个碳原子的烃, 例如 2-20 (包括端值) 个、例如 2-10 (包括端值)、例如 2-5 (包括

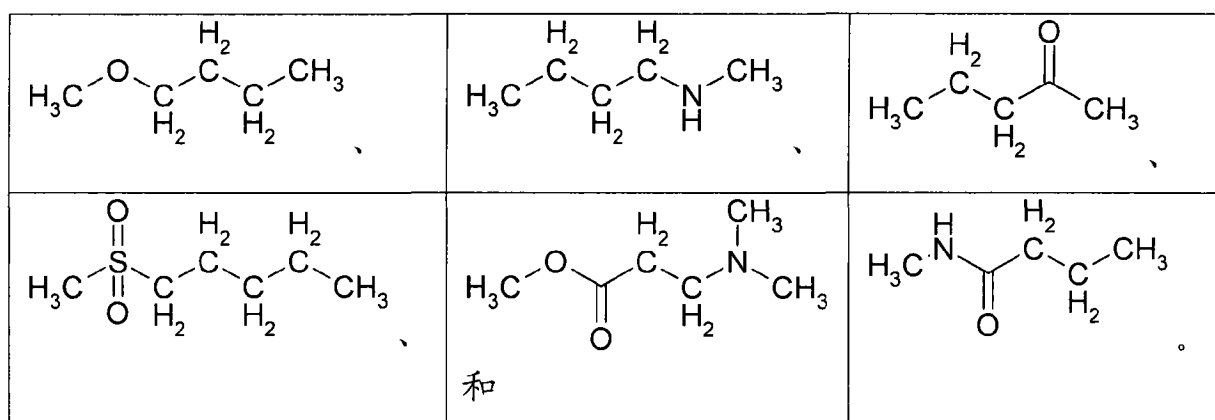
端值)个。术语炔基和亚炔基分别是指相应的自由基和二价自由基。

[0049] 术语“同素环状芳族化合物”意欲表示芳族烃,例如苯和萘。

[0050] 术语“杂环化合物”意欲表示包含 5、6 或 7 个环原子的环状化合物,所述环原子中的 1、2、3 或 4 个为选自 N、O 和 / 或 S 的杂原子。实例包括杂环芳族化合物,例如噻吩、呋喃、吡喃、吡咯、咪唑、吡唑、异噻唑、异噁唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪以及其部分或完全氢化的等同物,例如哌啶、吡唑烷 (pirazolidine)、吡咯烷、吡咯啉 (pyrroline)、咪唑烷、咪唑啉、哌嗪和吗啉。

[0051] 术语“杂烷烃”、“杂烯烃”和“杂炔烃”意欲表示其中一个或多个杂原子或基团已插入到所述部分的结构中的如上所定义的烷烃、烯烃和炔烃。杂基团和原子的实例包括 -O-、-S-、-S(O)-、-S(O)<sub>2</sub>-、-C(O)-C(S)- 和 -N(R\*)-, 其中 R\* 表示氢或 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-烷基。杂烷烃实例包括:

[0052]



[0053] 术语“自由基”或“二价自由基”意欲表示其中分别移除一个或两个氢原子的化合物。当明确指出时,自由基亦可表示通过自化合物形式上移除较大原子基团(例如羟基)形成的部分。

[0054] 术语“卤素”意欲表示周期表的第 7 主族成员,例如 F、Cl、Br 和 I。

[0055] 在本发明上下文中,术语“芳基”意欲表示碳环芳环自由基或稠合芳环系统自由基(其中至少一个环为芳族的)。典型的芳基包括苯基、联苯基、萘基等等。

[0056] 本文单独或联合所用术语“杂芳基 (heteroaryl 或 hetaryl)”,是指含有选自氮、氧或硫杂原子的一个或多个杂原子作为环原子的具有例如 5-7 个环原子的芳环自由基或具有例如 7-18 个环原子的稠合芳环系统自由基(其中至少一个环为芳族的),其中 N-氧化物和硫一氧化物和硫 dioxide 为允许的杂芳族取代物。实例包括呋喃基、噻吩基、苯硫基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、噻二唑基、异噻唑基、吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、嘧啶基、喹啉基、异喹啉基、苯并呋喃基、苯并苯硫基、吲哚基和吲唑基等等。

[0057] 术语“缀合(物)”作为名词意欲表示经修饰的蛋白质,即含为了修改所述蛋白质的性质而与其键合的部分的蛋白质;作为动词,该术语意欲表示让部分与蛋白质键合以修改所述蛋白质性质的过程。

[0058] 本文所用术语“前药”表示可生物水解的酰胺和可生物水解的酯,亦包括:a) 其中在这类前药中的可生物水解官能团包含在本发明化合物中的化合物;和 b) 可在给定官能

团处生物氧化或还原以产生本发明药物物质的化合物。这些官能团实例包括 1,4-二氢吡啶、N-烷基羰基-1,4-二氢吡啶、1,4-环己二烯、叔丁基等等。

[0059] 本文所用术语“可生物水解的酯”为药物物质（在本情形中为本发明化合物）的酯，其 a) 不干扰母体物质的生物活性，但赋予该物质有利的体内特性，例如作用持续时间、起效等等；或 b) 生物学上无活性，但易于并受试者在体内转化为生物活性组分。优点为例如增加溶解性，或可生物水解的酯经口服从肠道吸收，在血浆中转化为本发明化合物。此类可生物水解的酯的很多实例为本领域已知，举例而言包括低级烷基酯（例如 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>）、低级酰氧基烷基酯、低级烷氧基酰氧基烷基酯、烷氧基酰氧基酯、烷基酰基氨基烷基酯和胆碱酯。

[0060] 本文所用术语“可生物水解的酰胺”为药物物质（在本情形中为本发明化合物）的酰胺，其 a) 不干扰母体物质的生物活性，但赋予该物质有利的体内特性，例如作用持续时间、起效等等；或 b) 生物学上无活性，但易于被受试者在体内转化为生物活性组分。优点为例如增加溶解性，或可生物水解的酰胺经口服从肠道吸收，在血浆中转化为本发明化合物。此类可生物水解的酰胺的很多实例为本领域已知，举例而言包括低级烷基酰胺、α-氨基酸酰胺、烷氧基酰基酰胺和烷基氨基烷基羰基酰胺。

[0061] 在本发明上下文中，术语“药学上可接受的盐”意欲表示对患者无害的盐。所述盐包括药学上可接受的酸加成盐、药学上可接受的金属盐、铵盐和烷化铵盐。酸加成盐包括无机酸以及有机酸的盐。合适的无机酸的代表性实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硫酸、硝酸等等。合适的有机酸的代表性实例包括蚁酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、丙酸、苯甲酸、肉桂酸、柠檬酸、富马酸、乙醇酸、乳酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、草酸、苦味酸、丙酮酸、水杨酸、琥珀酸、甲磺酸、乙磺酸、酒石酸、抗坏血酸、扑酸、双亚甲基水杨酸、乙二磺酸、葡糖酸、柠檬酸、天冬氨酸、硬脂酸、棕榈酸、EDTA、乙醇酸、对氨基苯甲酸、谷氨酸、苯磺酸、对甲苯磺酸等等。药学上可接受的无机酸或有机酸加成盐的另外实例包括 J. Pharm. Sci. 66, 2, (1977) 中所列举的药学上可接受的盐，其通过引用并入本文中。金属盐的实例包括锂盐、钠盐、钾盐、镁盐等等。铵盐和烷化铵盐的实例包括铵盐、甲基铵盐、二甲基铵盐、三甲基铵盐、乙基铵盐、羟基乙基铵盐、二乙基铵盐、丁基铵盐、四甲基铵盐等等。

[0062] 本文所用化合物的“治疗有效量”，意指足以治愈、减缓或部分阻止给定疾病及其并发症的临床表现的量。将足以实现此的量定义为“治疗有效量”。对于每一目的，有效量应视疾病或损伤的严重程度以及受试者的体重和一般状态而定。应该理解，可用常规实验通过构建值的矩阵并测定矩阵中的不同点来实现合适剂量的确定，这完全在训练有素的医生或兽医的普通技术范围内。

[0063] 本文所用术语“治疗”意指为以与病况例如疾病或病症斗争为目的而管理及护理患者。所述术语意欲包括对患者罹患的给定病况的全方位治疗，例如给予活性化合物，以减轻症状或并发症，延迟疾病、病症或病况的进展，减轻或减缓症状及并发症，和/或治愈或消除疾病、病症或病况，以及预防病况，其中预防应理解为以与疾病、病况或病症斗争为目的而管理及护理患者，并包括给予活性化合物以防止症状或并发症发作。待治疗的患者优选为哺乳动物；具体而言为人，但其亦可包括动物，例如狗、猫、牛、绵羊及猪。

[0064] 发明说明

[0065] 本发明在其最广泛的方面涉及生长激素缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药，所述缀合物包含经由亲水间隔基与白蛋白结合残基选择性连接的生长激素化合物

(GH)。

[0066] 在本发明一个实施方案中,亲水间隔基具有  $m\text{LogP} < 0$ 。

[0067] 可通过其  $\log\text{P}$  值来阐述亲水间隔基的溶解性。亦称为分配系数的  $\text{LogP}$ ,是平衡时化合物在两种不混溶溶剂混合物的两相中的浓度比的对数。通常溶剂之一为水,而第二种溶剂选自辛-1-醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP)。主要由于氢键合作用,在这些不同溶剂中测量的  $\text{LogP}$  值显示差异。辛醇可提供和接受氢键,而环己烷为惰性的。氯仿可提供氢键,而 PGDP 仅可接受氢键。

[0068] 在本发明另一实施方案中,亲水间隔基在辛-1-醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP) 中具有低于  $-0.5$  的  $\text{LogP}$ 。

[0069] 在再一实施方案中,亲水间隔基在辛-1-醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP) 中具有低于  $-1$  的  $\log\text{P}$ 。

[0070] 或者,对于白蛋白结合剂部分或亲水间隔基部分,可用以下公开的算法将  $\text{LogP}$  值计算为  $m\text{LogP}$  和 / 或  $c\text{LogP}$ : J. Am. Chem. Soc., 86(1964)5175-5180 " A New Substituent Constant,  $\epsilon$ , Derived from Partition Coefficients(来源于分配系数的新的取代基常数  $\epsilon$ )"; C. A. Lipinski 等. Advanced Drug Delivery Reviews, 23(1997)3-25, " Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings(在药物发现及开发环境中估测溶解性和渗透性的实验和计算方法)" ;和 I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, Chem. and Pharm. Bull., 42(1994)976-978 " Comparison of Reliability of  $\log\text{P}$  Values for Drugs Calculated by Several Methods(由若干方法计算的药物  $\log\text{P}$  值的可靠性比较)"。在本发明的一个实施方案中,亲水间隔基具有  $c\text{LogP} < 0.5$ 。

[0071] 在再一实施方案中,生长激素化合物 (GH) 经由亲水间隔基与一个白蛋白结合残基连接。

[0072] 在另一实施方案中,生长激素化合物 (GH) 经由一个或两个亲水间隔基与两个白蛋白结合残基连接。因此,在一个实例中,一个白蛋白结合残基经由一个亲水间隔基与 40 位谷氨酰胺连接,另一个白蛋白结合残基经由一个亲水间隔基与 141 位谷氨酰胺连接;或作为备选,两个白蛋白结合残基经由一个亲水间隔基与 40 或 141 位谷氨酰胺或 N-末端连接。在再一实施方案中,生长激素化合物 (GH) 经由一个或多个亲水间隔基与三个白蛋白结合残基连接。

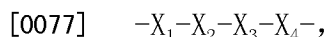
[0073] 在一个实施方案中,亲水间隔基包含至少一个 OEG 基序,基团 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸,即  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ 。在另外的具体实施方案中,亲水间隔基包含至少两个 OEG 基序。在一个实施方案中所述 OEG 基序的定向使得  $-\text{C}(\text{O})-$  最接近生长激素化合物但不与生长激素化合物和白蛋白结合剂接头连接,  $-\text{NH}-$  最接近白蛋白结合残基。在包含两个 OEG 基序的另外的实施方案中,两个基序具有相同定向或不同定向。在一个实施方案中,两个所述 OEG 基序彼此邻近定位,而在备选实施方案中,所述 OEG 基序由一个或多个共价连接的原子分开。

[0074] 在一个实施方案中,亲水间隔基包含至少一个谷氨酸残基。氨基酸谷氨酸包含两个羧酸基团。可将其  $\gamma$ -羧基用于与赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基或与 OEG 分子的氨基(若存在的

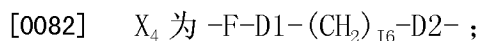
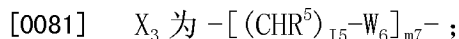
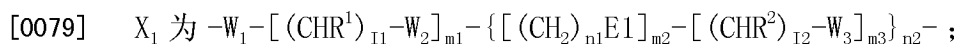
话)或与另一 Glu 残基的氨基(若存在的话)形成酰胺键。可备选地将  $\alpha$ -羧基用于与赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基或与 OEG 分子的氨基(若存在的话)或与另一 Glu 残基的氨基(若存在的话)形成相似的酰胺键。Glu 的氨基可进而与白蛋白结合残基的羧基或与 OEG 基序的羧基(若存在的话)或与另一 Glu 的  $\gamma$ -羧基或  $\alpha$ -羧基(若存在的话)形成酰胺键。可将一个 Glu 的氨基与第二个 Glu 的  $\gamma$ -羧基的连接称为“ $\gamma$ -Glu”基序。

[0075] 在一个实施方案中,亲水间隔基包含至少一个联合的 OEG-Glu 基序  $(-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OH})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-)$ ,或至少一个联合的 Glu-OEG 基序  $(-\text{NH}-\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OH})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-)$ 或其组合,其中可通过一个或多个共价连接的原子将所述 Glu-OEG 和 OEG-Glu 基序隔开,或可通过形成  $\gamma$ -Glu 的 Glu 酰胺键彼此直接键合所述 Glu-OEG 和 OEG-Glu 基序。

[0076] 在生长激素缀合物的又一实施方案中,亲水间隔基具有下式



[0078] 其中



[0083]  $I1, I2, I3, I4, I5$  和  $I6$  独立选自  $0-16$ ;

[0084]  $m1, m3, m4, m6$  和  $m7$  独立选自  $0-10$ ;

[0085]  $m2$  和  $m5$  独立选自  $0-25$ ;

[0086]  $n1, n2, n3$  和  $n4$  独立选自  $0-16$ ;

[0087]  $F$  为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键,其中芳基和杂芳基任选被以下基团取代:卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$  或  $\text{C}_{1-6}$ -烷基;

[0088]  $R^1, R^2, R^3, R^4$  和  $R^5$  独立选自氢、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、 $\text{C}_{1-6}$ -烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、芳基和杂芳基任选被以下基团取代:卤素、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$  或  $-\text{OH}$ ;

[0089]  $\text{D}1, \text{D}2, \text{E}1$  和  $\text{E}2$  独立选自  $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^6-$ 、 $-\text{N}(\text{COR}^7)-$  或价键;其中  $R^6$  和  $R^7$  独立表示氢或  $\text{C}_{1-6}$ -烷基;

[0090]  $W_1-W_6$  独立选自  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{s1}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$  或价键;其中  $s1$  为  $0$  或  $1$ 。

[0091] 在一个实施方案中,  $\text{D}1$  选自  $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^6-$ 、 $-\text{N}(\text{COR}^7)-$  或价键,  $\text{D}2$  为  $-\text{NR}^6-$ ,  $\text{E}1$  和  $\text{E}2$  独立选自  $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^6-$ 、 $-\text{N}(\text{COR}^7)-$  或价键,  $R^6$  和  $R^7$  独立表示氢或  $\text{C}_{1-6}$ -烷基。

[0092] 在再一方面,本发明涉及式 (I) 生长激素缀合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物和前药:  $\text{A}-\text{W}-\text{B}-\text{GH}$  (I)

[0093] 其中

[0094]  $\text{GH}$  表示生长激素化合物;

[0095]  $\text{B}$  表示亲水间隔基;

[0096]  $\text{W}$  为连接  $\text{A}$  和  $\text{B}$  的化学基团;和

[0097] A 表示白蛋白结合残基。

[0098] 如上所述,生长激素化合物 (GH) 可经由亲水间隔基与两个白蛋白结合残基连接,因此,在又一方面,本发明涉及式 (II) 生长激素缀合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物和前药:

[0099]  $A-W-B-GH-B'-W'-A'$  (II)

[0100] 其中

[0101] GH 表示生长激素化合物;

[0102] W 为连接 A 和 B 的化学基团;

[0103] W' 为连接 A' 和 B' 的化学基团;

[0104] A 和 A' 独立表示白蛋白结合残基;

[0105] B 和 B' 独立为亲水间隔基。

[0106] 在式 (II) 缀合物中,W' 选自与 W 相同的基团,A' 选自与 A 相同的基团,B' 选自与 B 相同的基团,应该理解,W 和 W'、A 和 A' 及 B 和 B' 独立选自下文定义的各自基团中的任何一种。因此,下文中 W、A 和 B 的任何实施方案亦为 W'、A' 和 B' 的实施方案。此外,合适时本文所述的任一个实施方案独立是指式 (I) 和 (II) 两种缀合物以及其广大方面及实施方案。

[0107] 除非规定实施方案涉及本发明的某个方面或某些方面,否则应该将以上实施方案以及下文所述实施方案看作是指本文所述方面中的任一个以及本文所述实施方案中的任一个。

[0108] 在一个实施方案中, GH 为 hGH 变体,其中变体应理解为通过以下步骤获得的化合物:hGH 序列中的一个或多个氨基酸残基被另一天然或非天然氨基酸取代;和/或将一个或多个天然或非天然氨基酸添加到 hGH 序列中;和/或从 hGH 序列中缺失一个或多个氨基酸残基,其中这些步骤中的任一步可任选后接进一步衍生一个或多个氨基酸残基。具体而言,所述取代在一个氨基酸残基被来自同一组别的另一氨基酸残基(即被具相似性质的另一氨基酸残基)取代的情况中为保守的。氨基酸可基于其性质适宜地分为以下组别:碱性氨基酸(例如精氨酸、赖氨酸、组氨酸)、酸性氨基酸(例如谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(例如谷氨酰胺、半胱氨酸和天冬酰胺)、疏水氨基酸(例如亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸(例如苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸)和小氨基酸(例如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸)。

[0109] 在再一实施方案中, GH 表示包含与人生长激素 (hGH) 氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的生长激素化合物。在另外实施方案中, GH 与 hGH 具有至少 80%、例如至少 85%、例如至少 95% 同一性。在另外的实施方案中,所述与 hGH 的同一性与至少 20%、例如至少 40%、例如至少 60%、例如至少 80% 的 hGH 生长激素活性结合,所述活性如本文测定 I 所测定。序列同一性实施方案中的任一个可与活性实施方案中的任一个结合,例如与 hGH 具有至少 80% 同一性的 GH 与至少 60% hGH 生长激素活性相结合;与 hGH 具有至少 90% 同一性的 GH 与至少 40% hGH 生长激素活性相结合;与 hGH 具有至少 95% 同一性的 GH 与至少 80% hGH 生长激素活性相结合;等等。

[0110] 在又一实施方案中, GH 为 hGH (SEQ ID NO:1)。

[0111] 在式 (I) 或 (II) 缀合物的再一实施方案中,亲水间隔基 B 具有下式

- [0112]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$
- [0113] 其中
- [0114]  $X_1$  为  $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ;
- [0115]  $X_2$  为  $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ;
- [0116]  $X_3$  为  $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$ ;
- [0117]  $X_4$  为  $-F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$ ;
- [0118]  $I1, I2, I3, I4, I5$  和  $I6$  独立选自 0-16;
- [0119]  $m1, m3, m4, m6$  和  $m7$  独立选自 0-10;
- [0120]  $m2$  和  $m5$  独立选自 0-25;
- [0121]  $n1, n2, n3$  和  $n4$  独立选自 0-16;
- [0122]  $F$  为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键, 其中芳基和杂芳基任选被卤素、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  或  $C_{1-6}$ -烷基取代;
- [0123]  $R^1, R^2, R^3, R^4$  和  $R^5$  独立选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ -烷基、芳基或杂芳基; 其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$  或  $-OH$  取代;
- [0124]  $D1, D2, E1$  和  $E2$  独立选自  $-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-N(COR^7)-$  或价键; 其中  $R^6$  和  $R^7$  独立表示氢或  $C_{1-6}$ -烷基;
- [0125]  $W_1-W_6$  独立选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$  或价键; 其中  $s2$  为 0 或 1。
- [0126] 在再一实施方案中,  $W_1$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$  或价键。通常  $W_1$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。
- [0127] 在再一实施方案中,  $W_2$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$  或价键。通常  $W_2$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。
- [0128] 在再一实施方案中,  $W_3$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$  或价键。通常  $W_3$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。
- [0129] 在再一实施方案中,  $W_4$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$  或价键。通常  $W_4$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。
- [0130] 在再一实施方案中,  $W_5$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$  或价键。通常  $W_5$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。
- [0131] 在再一实施方案中,  $W_6$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$  或价键。通常  $W_6$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。
- [0132] 在再一实施方案中,  $R^1$  选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  或  $C_{1-6}$ -烷基; 其中烷基任选被  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  取代。通常  $R^1$  选自  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$  或  $C_{1-6}$ -烷基; 其中烷基任选被  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$  或  $-S(O)_2OH$  取代。
- [0133] 在再一实施方案中,  $R^2$  选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  或  $C_{1-6}$ -烷基; 其中烷基任选被  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  取代。通常  $R^2$  选自  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$  或  $C_{1-6}$ -烷基; 其中烷基任选被  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$  或  $-S(O)_2OH$  取代。
- [0134] 在再一实施方案中,  $R^3$  选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  或  $C_{1-6}$ -烷基; 其中烷

基任选被  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  取代。通常  $R^3$  选自  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$  或  $C_{1-6}$ -烷基；其中烷基任选被  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$  或  $-S(O)_2OH$  取代。

[0135] 在再一实施方案中， $R^4$  选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  或  $C_{1-6}$ -烷基；其中烷基任选被  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  取代。通常  $R^4$  选自  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$  或  $C_{1-6}$ -烷基；其中烷基任选被  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$  或  $-S(O)_2OH$  取代。

[0136] 在再一实施方案中， $R^5$  选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  或  $C_{1-6}$ -烷基；其中烷基任选被  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  取代。通常  $R^5$  选自  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$  或  $C_{1-6}$ -烷基；其中烷基任选被  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$  或  $-S(O)_2OH$  取代。

[0137] 在再一实施方案中，E1 和 E2 独立选自  $-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-N(COR^7)-$  或价键。 $R^6$  和  $R^7$  独立表示氢或  $C_{1-6}$ -烷基。

[0138] 在再一实施方案中，E1 选自  $-O-$  或  $-NR^6-$  或价键。通常 E1 选自  $-O-$ 。

[0139] 在再一实施方案中，E2 选自  $-O-$  或  $-NR^6-$  或价键。通常 E2 选自  $-O-$ 。

[0140] 在再一实施方案中，E1 和 E2 二者都为  $-O-$ 。

[0141] 在再一实施方案中，E1 和 E2 二者都为  $-NR^6-$ 。

[0142] 在再一实施方案中，F 为苯基、吡咯烷-2,5-二酮或价键。

[0143] 在再一实施方案中，D1 选自  $-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-N(COR^7)-$  或价键。

[0144] 在再一实施方案中，D1 选自  $-O-$  或  $-NR^6-$  或价键。通常 D1 选自  $-NR^6-$ 。

[0145] 在再一实施方案中，D2 选自  $-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-N(COR^7)-$  或价键。

[0146] 在再一实施方案中，D2 选自  $-O-$  或  $-NR^6-$  或价键。通常 D2 选自  $-NR^6-$ 。

[0147]  $R^6$  和  $R^7$  独立表示氢或  $C_{1-6}$ -烷基。

[0148] 在再一实施方案中，I1 为 0-6，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0149] 在再一实施方案中，I2 为 0-6，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0150] 在再一实施方案中，I3 为 0-6，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0151] 在再一实施方案中，I4 为 0-6，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0152] 在再一实施方案中，I5 为 0-6，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0153] 在再一实施方案中，I6 为 0-6，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0154] 在再一实施方案中，m1 为 0-6，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0155] 在再一实施方案中，m2 为 0-10，例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

[0156] 在再一实施方案中，m3 为 0-5，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0157] 在再一实施方案中，m4 为 0-5，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0158] 在再一实施方案中，m5 为 0-10，例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

[0159] 在再一实施方案中，m6 为 0-5，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0160] 在再一实施方案中，m7 为 0-5，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0161] 在再一实施方案中，n1 为 0-10，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0162] 在再一实施方案中，n2 为 0-10，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

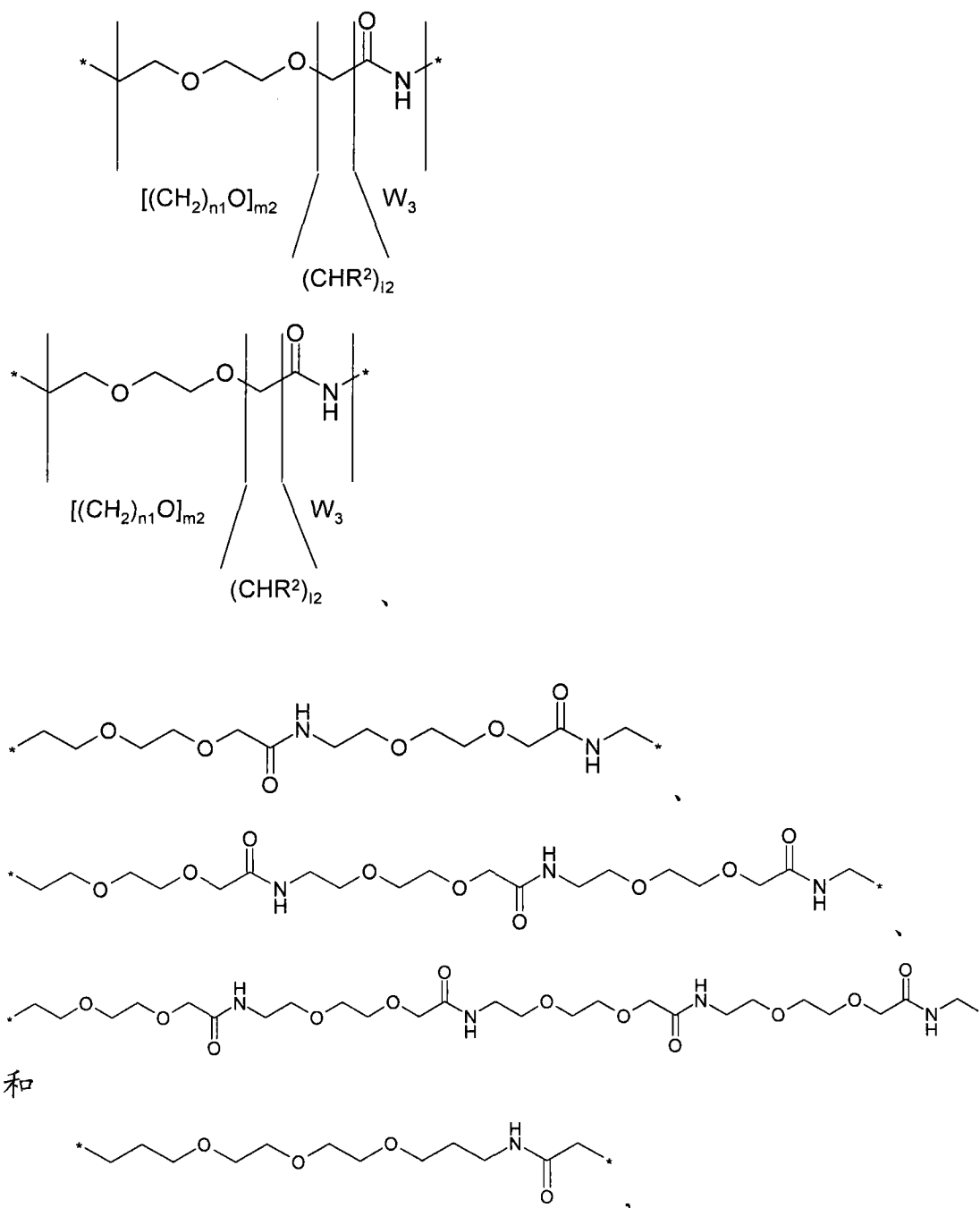
[0163] 在再一实施方案中，n3 为 0-10，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0164] 在再一实施方案中，n4 为 0-10，例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0165] 在再一实施方案中， $X_1$  为  $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ， $X_2$  为  $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ，其中  $-[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}$

$n_2$ - 和  $-[(CH_2)_{n_3}O]_{m_5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m_6}n_4-$  选自：

[0166]



和

[0167] 其中 \* 意欲表示连接点,即打开的键。

[0168] 在再一实施方案中,所述亲水间隔基的分子量介于 80 道尔顿 (D)-1500D 范围内或介于 500D-1100D 范围内。

[0169] 在又一实施方案中, W 具有式

[0170]  $-W_7-Y-$ ,

[0171] 其中

[0172] Y 为  $-(CH_2)_{17}-C_{3-10}$ - 环烷基  $-W_8-$  或价键；

[0173] 17 为 0-6；

[0174]  $W_7$  选自  $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)$

NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)- 或价键；其中 s3 为 0 或 1。

[0175] W<sub>8</sub> 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>s4</sub>-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)- 或价键；其中 s4 为 0 或 1。

[0176] 在 W 的实施方案中，Y 为 -(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>- 环己基 -W<sub>8</sub>-。

[0177] 在再一实施方案中，Y 为价键。

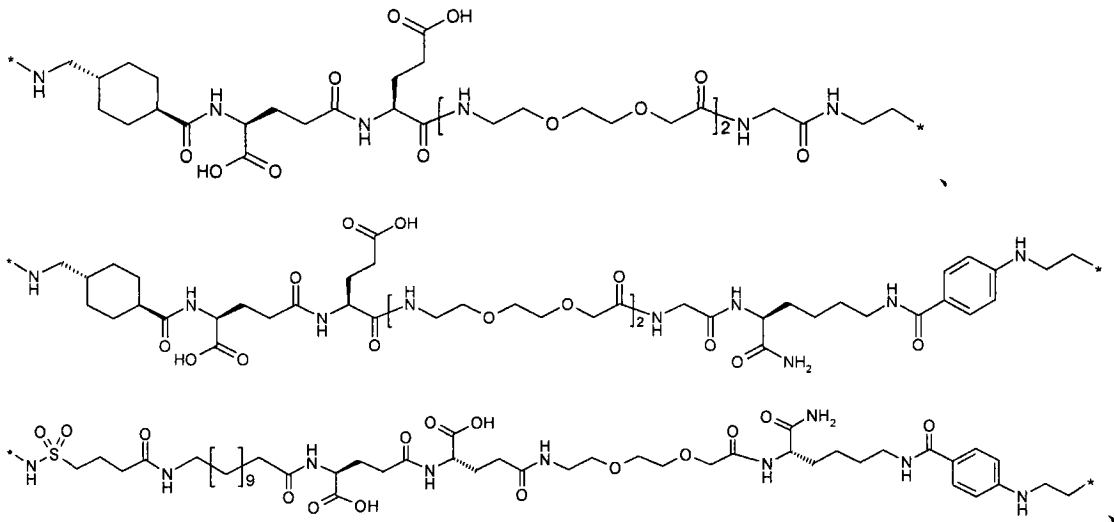
[0178] 在一个实施方案中，W<sub>7</sub> 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- 或价键。通常 W<sub>7</sub> 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>。

[0179] 在再一实施方案中，W<sub>8</sub> 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- 或价键。通常 W<sub>8</sub> 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>。

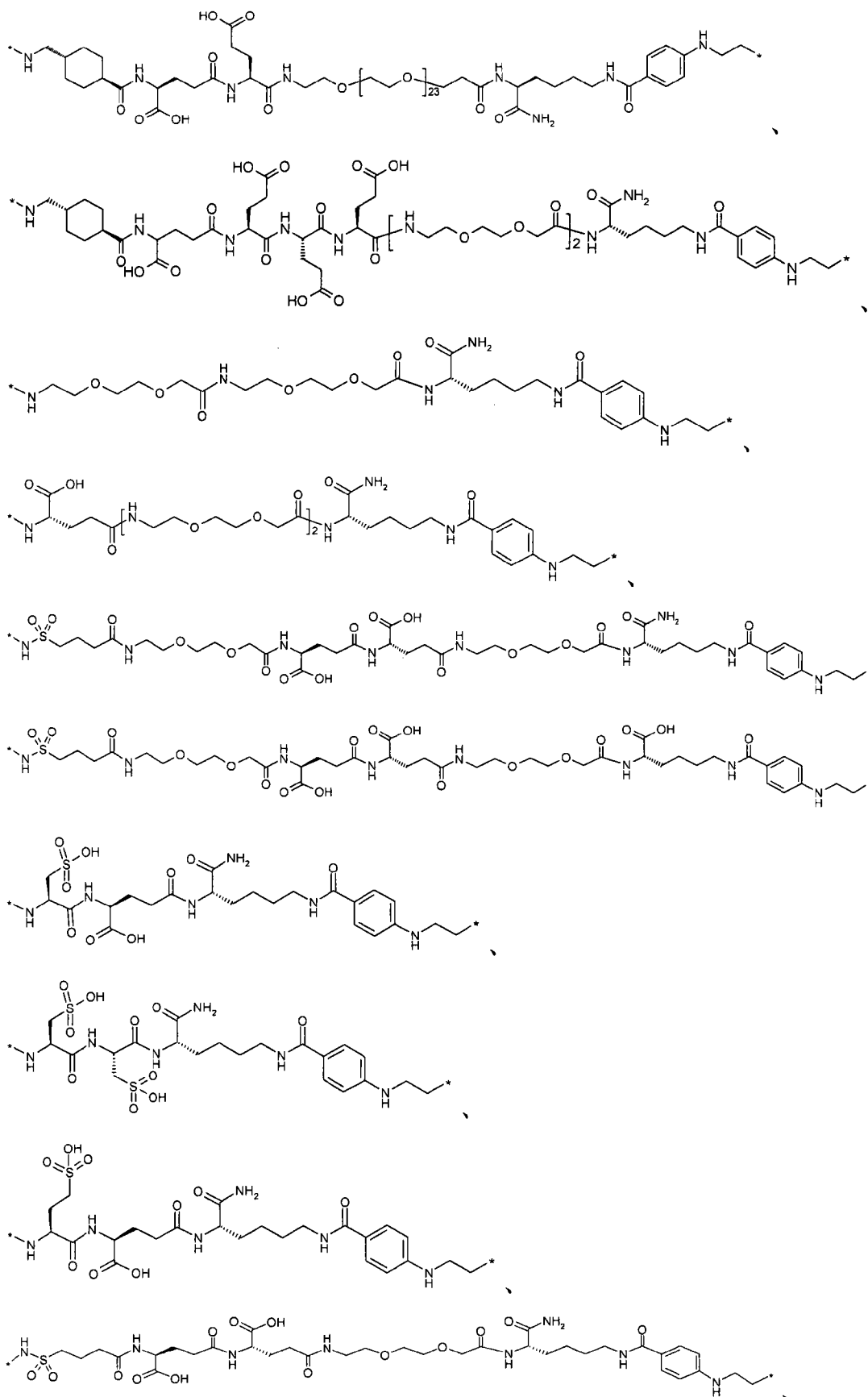
[0180] 在再一实施方案中，I7 为 0 或 1。

[0181] 在再一实施方案中，本发明亲水间隔基 B 选自：

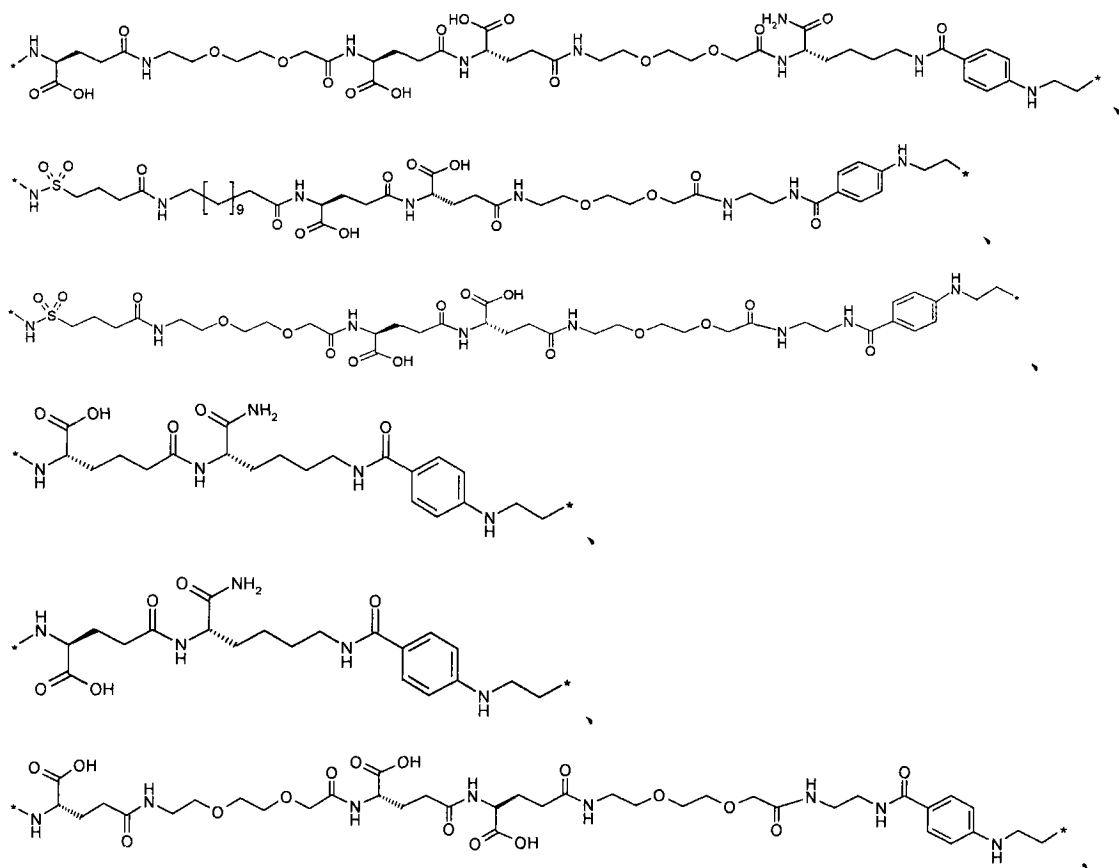
[0182]



[0183]



[0184]



[0185] 其中 \* 意欲表示连接点,即打开的键。

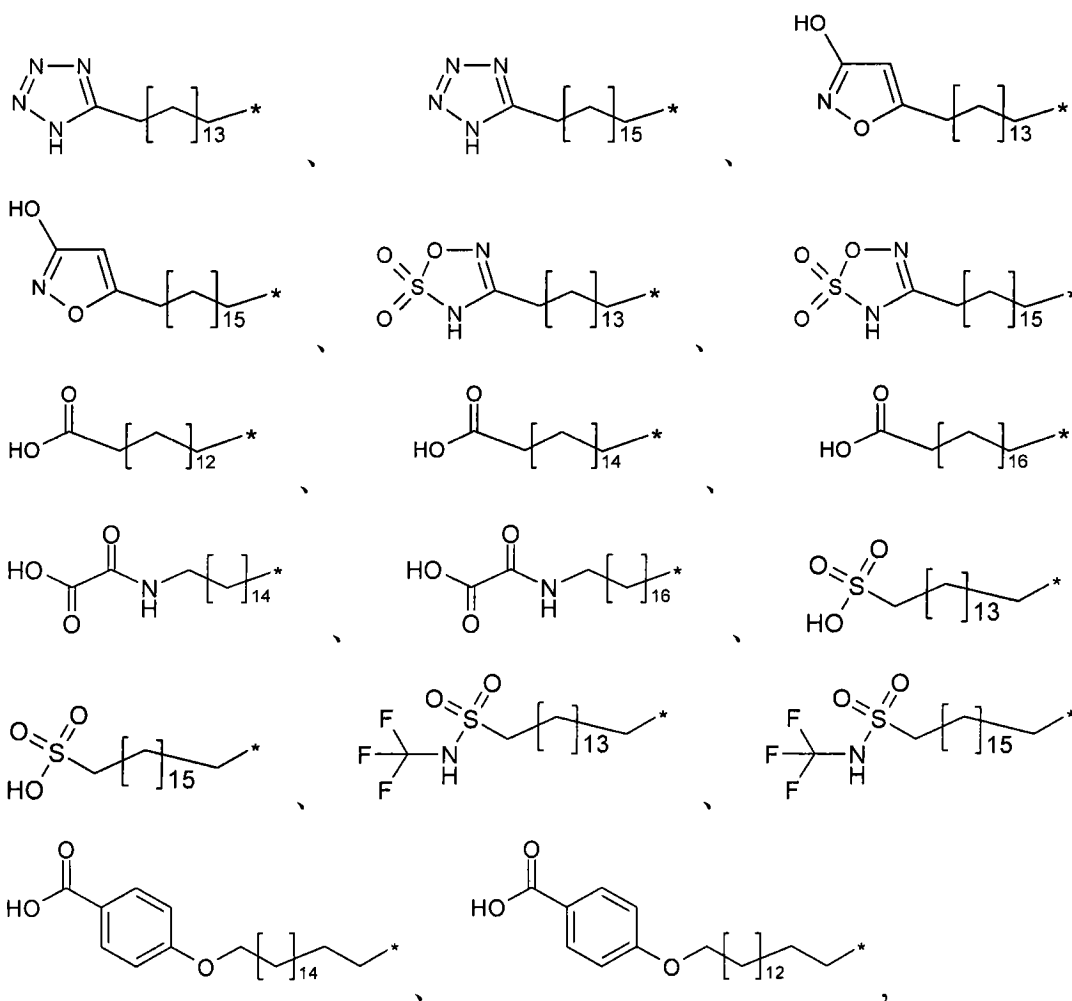
[0186] 与本发明生长激素化合物连接的白蛋白结合残基(上式(I)或(II)中的取代基A)为亲脂残基,其与白蛋白非共价结合。通常白蛋白结合残基在生理 pH 下带负电荷,并对人血清白蛋白具有低于约 10  $\mu$ M 或甚至低于约 1  $\mu$ M 的结合亲和力。

[0187] 在本发明生长激素化合物的再一实施方案中,白蛋白结合残基选自直链烷基、分支烷基、具有  $\omega$ -羧基团或  $\omega$ -羧酸等排体(isoster)的基团。通常白蛋白结合残基具有 6-40 个碳原子。在再一实施方案中,白蛋白结合残基具有 8-26 个碳原子。在再一实施方案中,白蛋白结合残基具有 8-20 个碳原子。

[0188] 在再一实施方案中,A 具有 14-26 个碳原子,并包含  $\omega$ -羧基团。在再一实施方案中,A 具有 14-26 个碳原子,并包含  $\omega$ -羧酸等排体,例如四唑(tetrazol)。

[0189] 在再一实施方案中,A 选自:

[0190]



[0191] 其中 \* 表示通过 W 连接至 B。

[0192] 优选以选择性方式将亲水间隔基 (B) 引入到生长激素化合物 (GH) 的某位置上, 以便能够控制是否应该将一个、两个或三个白蛋白结合残基 (A) 掺入到生长激素化合物中。可让亲水间隔基 (B) 与 GH 化合物的氨基酸侧链连接。所述氨基酸侧链可为经化学修饰的 GH 化合物的氨基酸侧链。另一种这类氨基酸侧链可为酶修饰的 GH 化合物的氨基酸侧链。优选用转谷氨酰胺酶将亲水间隔基引入对应于 SEQ ID No. 1 的 40 或 141 位的位置上的谷氨酰胺残基中。另一选择性引入亲水间隔基的方式在于生长激素化合物例如 hGH (SEQ ID No. 1) 的 N-末端残基。

[0193] 在式 (I) 生长激素缀合物中, 片段 A-W-B 可为线性或分支的。在一个实施方案中, A-W-B 不是线性肽。

[0194] 在再一实施方案中, 白蛋白结合残基经由亲水间隔基与对应于 SEQ ID No. 1 的 40 位的位置上的谷氨酰胺残基连接。

[0195] 在再一实施方案中, 白蛋白结合残基经由亲水间隔基与对应于 SEQ ID No. 1 的 141 位的位置上的谷氨酰胺残基连接。

[0196] 在再一实施方案中, 白蛋白结合残基经由亲水间隔基与生长激素化合物例如 hGH (SEQ ID No. 1) 的 N-末端残基连接。

[0197] 在再一实施方案中, 白蛋白结合残基经由亲水间隔基与对应于 SEQ ID No. 1 的 40 位的位置上的谷氨酰胺残基连接并与对应于 SEQ ID No. 1 的 141 位的位置上的谷氨酰胺残

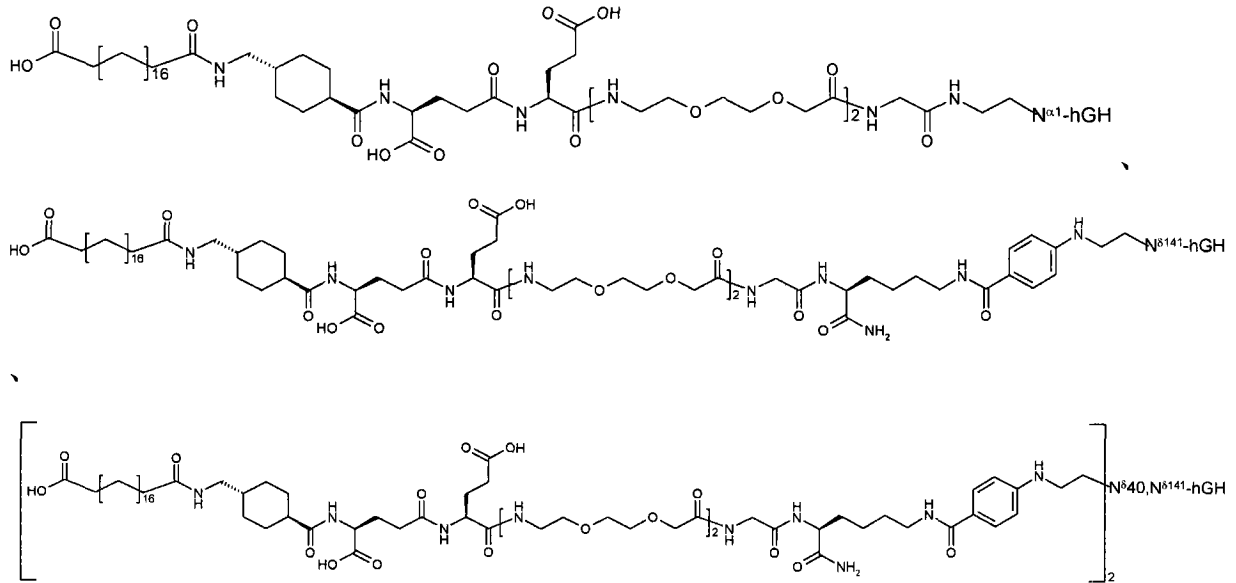
基连接。

[0198] 在再一实施方案中,白蛋白结合残基经由亲水间隔基与对应于生长激素化合物例如 hGH(SEQ ID No. 1) 的 40 位的位置上的谷氨酰胺残基连接并与生长激素化合物例如 hGH(SEQ ID No. 1) 的 N-末端残基连接。

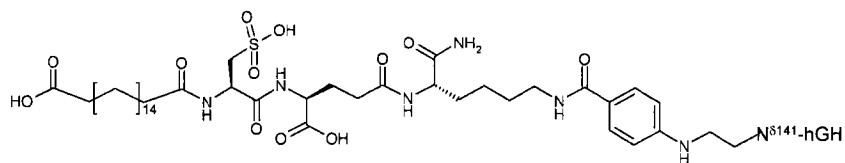
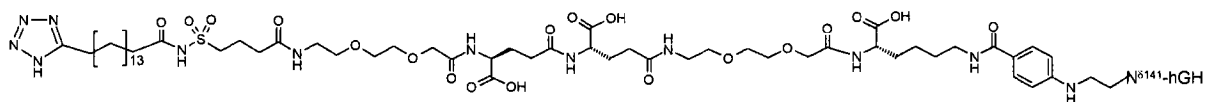
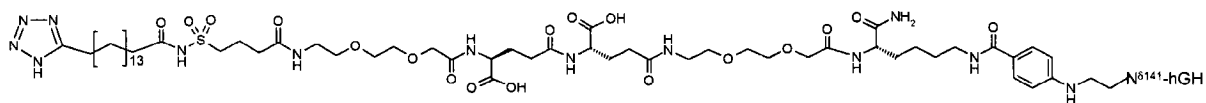
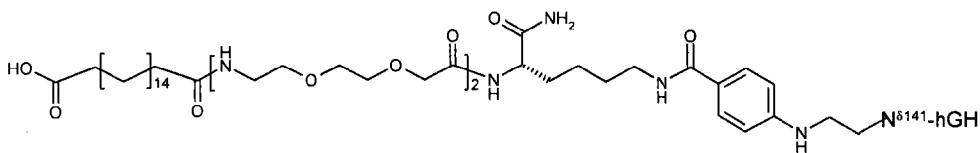
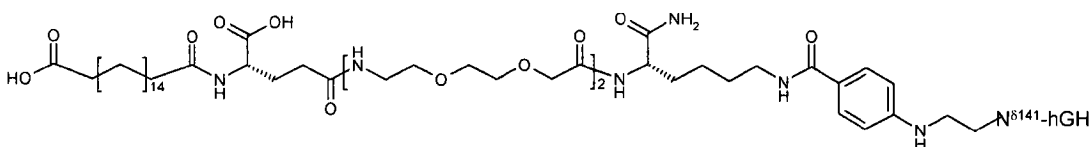
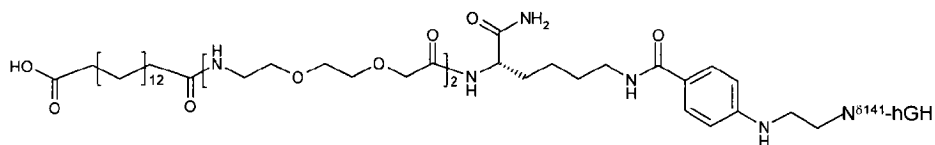
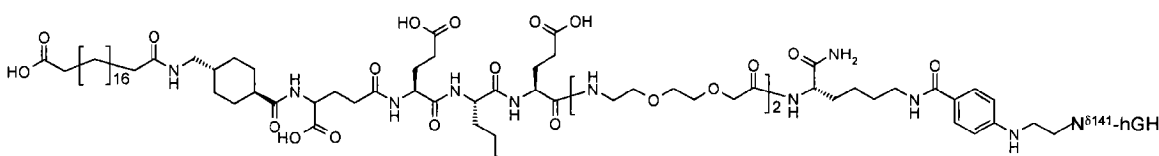
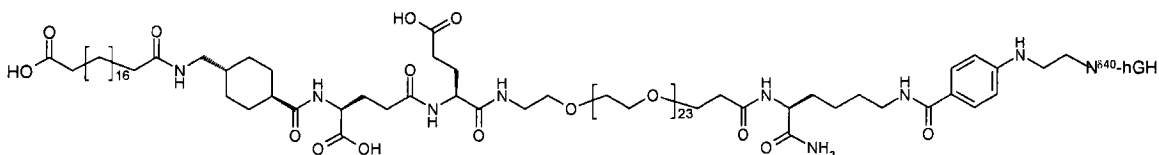
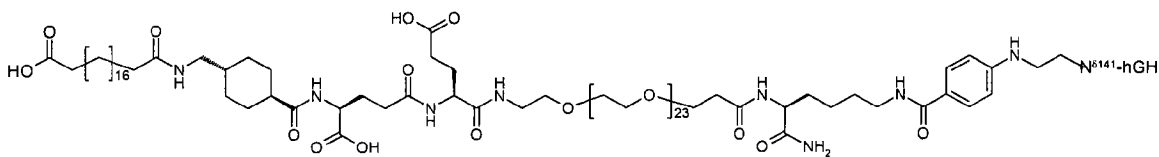
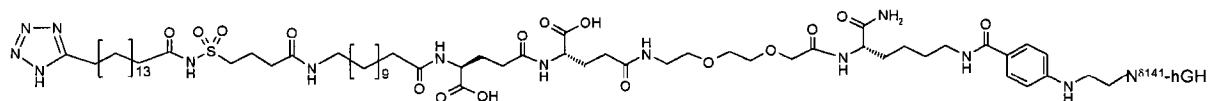
[0199] 在再一实施方案中,白蛋白结合残基经由亲水间隔基与对应于生长激素化合物例如 hGH(SEQ ID No. 1) 的 141 位的位置上的谷氨酰胺残基连接并与生长激素化合物例如 hGH(SEQ ID No. 1) 的 N-末端残基连接。

[0200] 本发明生长激素缀合物选自:

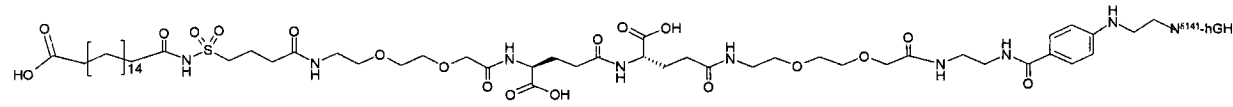
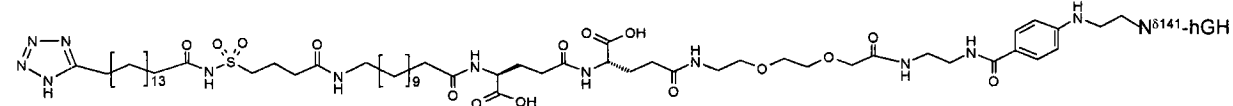
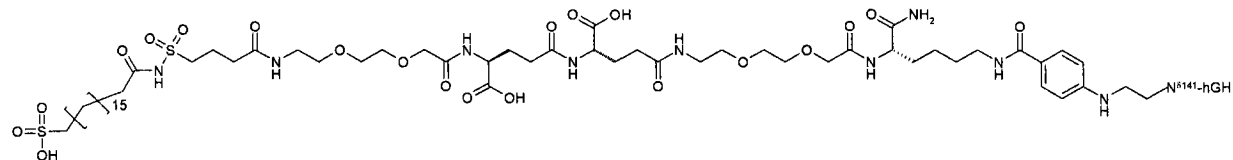
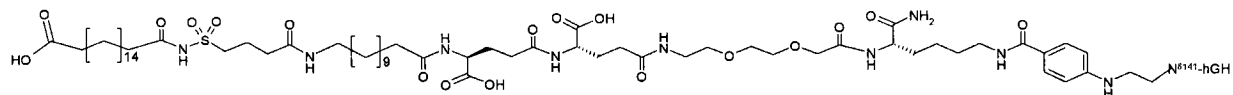
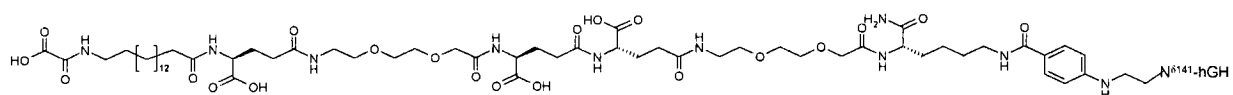
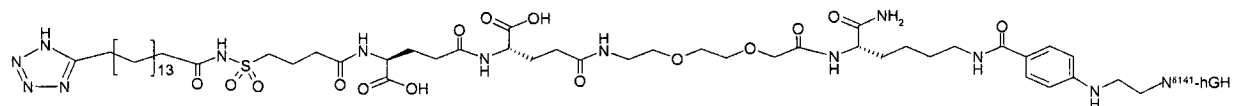
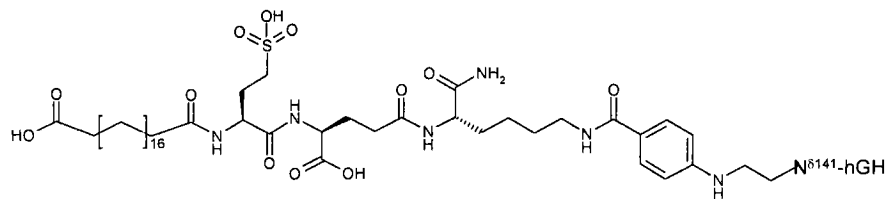
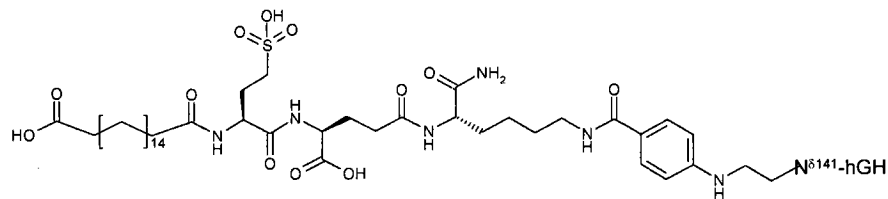
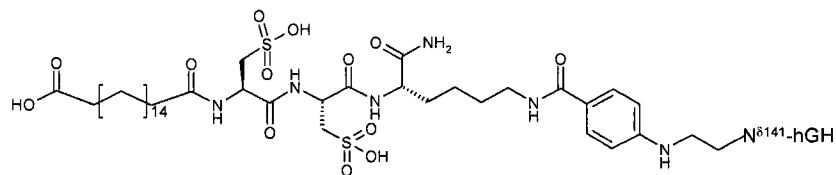
[0201]



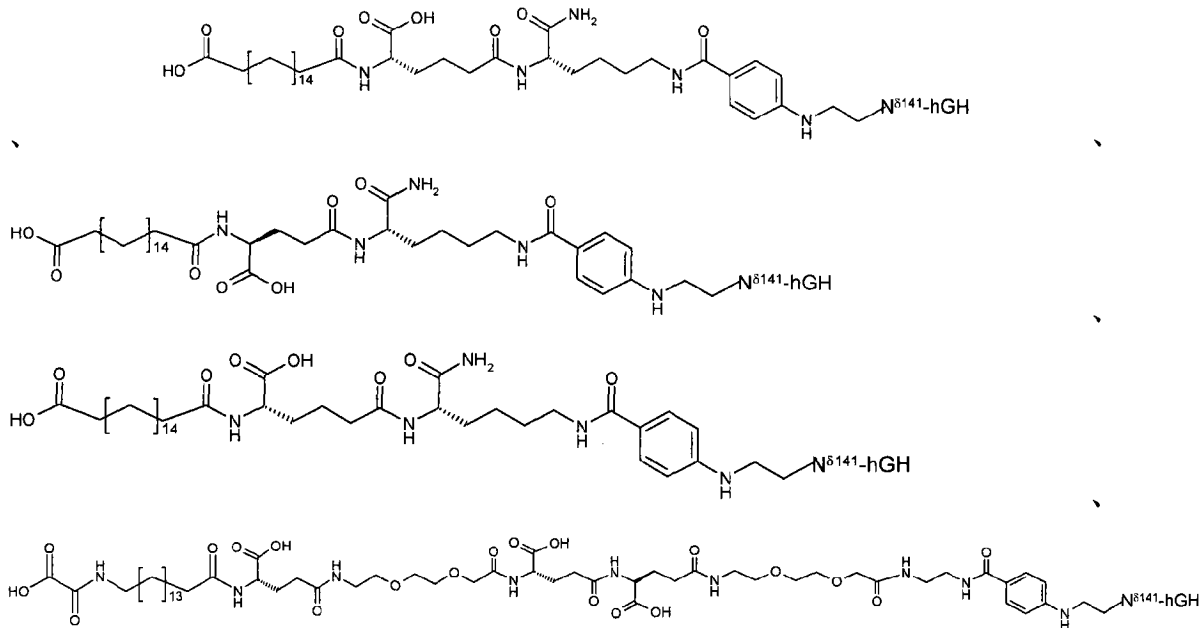
[0202]



[0203]



[0204]



[0205] 在另一方面,本发明涉及用于治疗的生长激素缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,所述缀合物包含经由亲水间隔基与白蛋白结合残基连接的生长激素化合物(GH)。此外,在本发明生长激素缀合物中,GH、白蛋白结合残基和亲水间隔基选自任何一个以上实施方案,具体而言,生长激素缀合物具有式(I)或(II)。

[0206] 在另一方面,本发明涉及药物组合物,所述药物组合物包含任选与药学上可接受赋形剂结合的生长激素缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,所述缀合物包含经由亲水间隔基与白蛋白结合残基连接的生长激素化合物(GH)。

[0207] 如本领域已知的术语“同一性”,是指两种或更多种蛋白质的序列之间的关系,其通过比较序列来测定。在本领域中,“同一性”亦意指蛋白质之间的序列相关程度,其通过两个或更多个氨基酸残基串之间匹配的数目来确定。“同一性”衡量由特定数学模型或计算机程序(即“算法”)得出的两个或更多个具有空位比对(如果有的话)的序列中较小者之间的相同匹配百分比。可用已知方法容易地计算相关蛋白质的同一性。所述方法包括但不限于以下文献中所阐述的方法:Computational Molecular Biology(计算分子生物学),Lesk, A. M. 编辑, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects(生物计算:信息学和基因组项目), Smith, D. W. 编辑, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data(序列数据的计算机分析), 第一部分, Griffin, A. M., 和 Griffin, H. G. 编辑, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology(分子生物学中的序列分析), von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer(序列分析引物), Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑, M. Stockton Press, New York, 1991; 和 Carillo 等, SIAM J. Applied Math., 48, 1073, (1988)。

[0208] 设计确定同一性的优选方法以在待测序列之间获得最大匹配。在可公开获得的计算机程序中阐述了测定同一性的方法。在两个序列之间测定同一性的优选计算机程序方法包括 GCG 程序包(包括 GAP)(Devereux 等, Nucl. Acid. Res., 12, 387, (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)、BLASTP、BLASTN 和

FASTA(Altschul 等, J. Mol. Biol., 215, 403-410, (1990))。BLASTX 程序可公开获自国家生物技术信息中心 (NCBI) 和其它来源 (BLAST Manual, Altschul 等, NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894 ; Altschul 等, 上述)。亦可使用众所周知的 Smith Waterman 算法来测定同一性。

[0209] 例如, 使用计算机算法 GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), 比对待测定序列同一性百分比的两种蛋白质以最佳匹配其各自的氨基酸 (“匹配跨度 (matched span)”, 其由算法确定)。与算法一起使用空位开放罚分 (其计算为 3 乘以平均对角线; “平均对角线” 为待使用的比较矩阵的对角线的平均值; “对角线” 为由特定比较矩阵分配给每个完全氨基酸匹配的数或数字) 和空位延伸罚分 (其通常为 { 分数 (1/10) } 乘以空位开放罚分) 以及比较矩阵例如 PAM250 或 BLOSUM 62。算法亦使用标准比较矩阵 (关于 PAM 250 比较矩阵参见 Dayhoff 等, Atlas of Protein Sequence and Structure (蛋白质序列和结构图集), 第 5 卷, 增补本 3 (1978); 关于 BLOSUM 62 比较矩阵参见 Henikoff 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10915-10919, (1992))。

[0210] 蛋白质序列比较的优选参数包括以下:

[0211] 算法: Needleman 等, J. Mol. Biol., 48, 443-453, (1970); 比较矩阵: 来自 Henikoff 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10915-10919, (1992) 的 BLOSUM 62; 空位罚分: 12, 空位长度罚分: 4, 类似性阈值: 0。

[0212] 具有以上参数的 GAP 程序为有用的。前述参数为用 GAP 算法进行蛋白质比较的默认参数 (连同末端空位没有罚分)。

[0213] 与对应的未缀合的生长激素相比, 本发明化合物具有改进的药理学性质, 所述未缀合的生长激素亦称为母体化合物。所述药理学性质实例包括体内功能半衰期、免疫原性、肾过滤、蛋白酶保护和白蛋白结合。

[0214] 术语“体内功能半衰期”以其常规含义使用, 即 GH 或 GH 缀合物的 50% 生物活性仍存在于身体 / 靶器官中时的时间, 或 GH 或 GH 缀合物的活性是其初始值的 50% 时的时间。作为测定体内功能半衰期的备选, 可测定“体内血浆半衰期”, 即在被清除前 50% 的 GH 或 GH 缀合物循环于血浆或血流中时的时间。测定血浆半衰期通常比测定功能半衰期更简单, 且血浆半衰期大小通常很好地指示体内功能半衰期的大小。血浆半衰期的替代术语包括血清半衰期、循环半衰期、循环的半衰期、血清清除率、血浆清除率和清除半衰期。

[0215] 与体内功能半衰期或血浆半衰期联用的术语“增加的”, 用于表明相对于母体 GH, GH 缀合物的有关半衰期统计学上显著增加, 其在可比较的条件下测定。例如, 有关半衰期可增加至少约 25%, 例如至少约 50%, 例如至少约 100%、150%、200%、250% 或 500%。在一个实施方案中, 本发明的化合物表现出相对于母体 GH 的半衰期, 半衰期增加至少约 5 小时, 优选至少约 24 小时, 更优选至少约 72 小时和最优选至少约 7 天。

[0216] 可以如文献所述的多种方法测量体内血浆半衰期。体内血浆半衰期的增加可量化为清除率 (CL) 降低或平均停留时间 (MRT) 增加。认为如下本发明缀合的 GH 具有增加的体内血浆半衰期, 即如在合适测定中所测定, 其 CL 下降至小于母体 GH 的 CL 的 70%, 例如小于 50%、例如小于 20%、例如小于 10%。认为如下本发明缀合的 GH 具有增加的体内血浆半衰期, 即在合适测定中其 MRT 增加到多于母体 GH MRT 的 130%, 例如多于 150%, 例如多于 200%, 例如多于 500%。可在标准药代动力学研究中使用合适的试验动物评估清除率和平均停留时间。为给定蛋白质选择合适的试验动物在本领域技术人员的能力范围内。当然在

人中的试验代表最终测试。合适的本文动物包括标准 Sprague-Dawley 雄性大鼠、小鼠和食蟹猴 (cynomolgus monkey)。通常以单次皮下推注来注射小鼠和大鼠,而可以单次皮下推注或以单次静脉剂量来注射猴子。注射量视试验动物而定。随后酌情经一到五天来采取血液样品用于评估 CL 和 MRT。通过 ELISA 技术适宜地分析血液样品。

[0217] 术语化合物的“免疫原性”是指当将化合物给予人时引起有害免疫反应(不论是体液的、细胞的还是二者)的能力。在任何人亚群中,可能有对特定给予的蛋白质表现出敏感性的个体。可通过用本领域已知常规方法量化敏感个体中存在的生长激素抗体和/或生长激素响应性 T-细胞来测定免疫原性。在一个实施方案中,相对于母体 GH 对敏感个体的免疫原性,本发明缀合的 GH 在敏感个体中的免疫原性减少至少约 10%,优选至少约 25%,更优选至少约 40%和最优选至少约 50%。

[0218] 本文所用术语“蛋白酶保护”或“蛋白酶保护的”,意欲表示本发明缀合的 GH 比母体 GH 更能抵抗血浆肽酶或蛋白酶。已知存在于血浆中的蛋白酶和肽酶参与循环蛋白质的降解,所述循环蛋白质例如循环肽激素,例如生长激素。

[0219] 生长激素可对例如凝血酶、纤溶酶、枯草杆菌蛋白酶和胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白酶引起的降解易感。测定这些蛋白酶降解的试验阐述于 J. Biotech., 65, 183, (1998) 中。在一个实施方案中, GH 缀合物的水解速率小于母体 GH 的 70%,例如小于 40%,例如小于 10%。

[0220] 哺乳动物物种循环血液中最丰富的蛋白质组分是血清白蛋白,其正常以每 100 毫升全血大约 3 至 4.5 克的浓度存在。血清白蛋白是大约 70,000 道尔顿的血液蛋白质,其在循环系统中具有若干重要功能。其作为在血液中发现的多种有机分子的转运蛋白起作用,作为经由血液的不同代谢物例如脂肪酸和胆红素的主要转运蛋白起作用,并由于其丰富性,作为循环血液的渗透调节剂起作用。血清白蛋白半衰期超过一周,增加蛋白质血浆半衰期的一种方法是让所述蛋白质与结合血清白蛋白的基团缀合。可如 J. Med. Chem., 43, 1986, (2000) 所述来测定白蛋白结合特性,所述文献通过引用并入本文。

[0221] 式 (I) 或 (II) 的生长激素缀合物具有生长激素活性,并因此可用于从循环生长激素量的增加获益的疾病或病态的治疗。具体而言,本发明提供用于治疗以下的方法:生长激素缺乏 (GHD);特纳综合征;普-韦综合征 (Prader-Willi syndrome, PWS);努南综合征;唐氏综合征;慢性肾脏疾病、幼年型类风湿关节炎、囊性纤维化、接受 HAART 治疗的儿童 HIV 感染 (HIV/HALS 儿童);小于胎龄 (SGA) 出生的矮小儿童 (short children);非 SGA 的以极低出生体重 (VLBW) 出生的儿童的身材矮小症;骨骼发育不良;软骨发育不良;软骨发育不全;特发性身材矮小症 (ISS);成人 GHD;长骨骨折,所述长骨例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨 (metacarpae)、跖骨 (metatarsae) 和指骨 (digit);海绵骨例如头骨 (skull)、手腕骨 (base of hand) 和脚底骨 (base of foot) 的骨折;例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者;进行或经历牵拉骨生成技术 (distraction osteogenesis) 的患者;髋关节置换或关节盘置换 (disc replacement)、关节盘修复、脊柱融合或例如在膝、髋、肩、肘、腕或颞中的假体固定后的患者;其中已固定骨接合材料(例如钉、螺钉和板)的患者;骨折不愈合或畸形愈合的患者;例如胫骨或第一脚趾的骨解剖 (osteotomy) 后的患者;移植物植入后的患者;创伤或关节炎引起的膝关节软骨退化;特纳综合征患者中的骨质疏松症;男性骨质疏松症;长期透析的成年患者 (APCD);APCD 中营养不良相关的

心血管疾病;APCD中的恶病质逆转;APCD中的癌症;APCD中的慢性抽象性肺病(chronic abstractive pulmonal disease);APCD中的HIV;APCD老年人(elderly with APCD);APCD中的慢性肝病、APCD中的疲劳综合征;克罗恩病;肝功能受损;具有HIV感染的男性;短肠综合征;向心性肥胖;HIV相关脂肪营养不良综合征(HALS);男性不育症;大选择性手术、酒精/药物解毒或神经创伤后的患者;老化;虚弱的老年人;骨关节炎;创伤性损伤的软骨;勃起功能障碍;纤维肌痛;记忆障碍;抑郁;外伤性脑损伤;蛛网膜下腔出血;极低出生体重;代谢综合征;糖皮质激素性肌病;或糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症,所述方法包括给予有需要的患者治疗有效量的式(I)或(II)的生长激素缀合物。

[0222] 在另一方面,本发明提供以下方法,其用于加速肌肉组织、神经组织或伤口愈合;加速或改善流到损伤组织的血流;或降低损伤组织的感染率,所述方法包括给予有需要的患者治疗有效量的式(I)或(II)生长激素缀合物。

[0223] 在再一实施方案中,本发明涉及式(I)或(II)生长激素缀合物在制备疾病用药中的用途,所述疾病自生长激素血浆水平的提高而受益,例如上述疾病。

[0224] 典型的胃肠外剂量介于每次给予 $10^{-9}$ mg/kg-约100mg/kg体重。典型的给药剂量为每次给予约0.0000001-约10mg/kg体重。准确剂量将视以下因素而定,例如适应症、药剂、给药频率和方式、待治疗受试者的性别、年龄和一般情况、待治疗的疾病或病况的性质和严重性、期需的治疗效果和对本领域技术人员显而易见的其它因素。

[0225] 典型的给药频率为每天两次、每天一次、两天一次、每周两次、每周一次或甚至更长的给药间隔。由于本发明融合蛋白的长半衰期,长给药间隔的给药方案是本发明的特别实施方案,所述长给药间隔为例如每周两次、每周一次或甚至更长的给药间隔。

[0226] 许多疾病在治疗中使用同时给予或序贯给予的不止一种药物治疗。因此,将式(I)或(II)生长激素缀合物与一种或多种其它治疗活性化合物联合用于治疗上述疾病之一的治疗方法中在本发明范围内,所述其它治疗活性化合物通常用于治疗所述疾病。依次类推,亦在本发明范围内的是,将式(I)或(II)生长激素缀合物连同通常用于治疗上述疾病之一的其它治疗活性化合物用于制备用于所述疾病的药物中。

[0227] 通用制备方法

[0228] 酶缀合:

[0229] 在制备本发明生长激素缀合物中,通常通过使用酶来制备在制备式(I)A-W-B-GH缀合物中建立的至少一个共价键,正如在以下实施例中所阐明。所述酶可例如选自转谷氨酰胺酶、丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶。通常所述酶为转谷氨酰胺酶。所述转谷氨酰胺酶可例如选自微生物转谷氨酰胺酶、组织转谷氨酰胺酶和因子XIII及其变体。在另一实施方案中,所述酶为半胱氨酸蛋白酶。所述半胱氨酸蛋白酶可例如选自木瓜蛋白酶、分选酶A和分选酶B。在再一实施方案中,所述酶为丝氨酸蛋白酶。所述丝氨酸蛋白酶可例如选自羧肽酶Y(CPY)(PCT申请W02005/035553含有使用CPY的蛋白质修饰的一般公开内容)、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶。

[0230] 可用许多不同的方法制备本发明生长激素缀合物,非限制性实例如下所示。

[0231] 本发明亦提供用于制备式(I)A-W-B-GH缀合物的方法。

[0232] 转谷氨酰胺酶

[0233] 如上所述,可通过使用转谷氨酰胺酶来制备在制备A-W-B-GH缀合物中建立的至

少一个共价键。转谷氨酰胺酶可包括微生物转谷氨酰胺酶,例如分离自以下的转谷氨酰胺酶:链霉菌属物种;茂原链霉菌、肉桂链霉菌、灰肉链霉菌(US5156956,通过引用并入本文中)、淡紫色链霉菌(US5252469,通过引用并入本文中)和拉达卡链霉菌(JP2003/199569,通过引用并入本文中)。其它有用的微生物转谷氨酰胺酶分离自枯草芽孢杆菌(揭示于US5731183,其通过引用并入本文中)和不同的粘菌。有用的微生物转谷氨酰胺酶其它实例为揭示于W096/06931(例如来自 *Bacillus lydicus* 的转谷氨酰胺酶)和W096/22366中的转谷氨酰胺酶,二者皆通过引用并入本文中。有用的非微生物转谷氨酰胺酶包括豚鼠肝转谷氨酰胺酶和来自不同海洋来源如扁鱼真鲷(揭示于EP0555649,其通过引用并入本文中)和日本牡蛎长牡蛎(揭示于US5736356,其通过引用并入本文中)的转谷氨酰胺酶,。其功能性类似物和衍生物亦可为有用的。

[0234] 通常在本发明方法中使用的TG酶是微生物转谷氨酰胺酶。在一个实施方案中,TG酶来自茂原链霉菌或其变体,例如如W02007/020290和W02008/020075中所阐述。在另一个实施方案中,TG酶来自拉达卡链霉菌或其变体,例如如W02008/020075中所阐述。

[0235] 可通过TG酶介导的修饰实现按照本发明的hGH与A-W-B的缀合,所述修饰视所用底物而定导致在GH化合物序列中的特定赖氨酸(Lys)或谷氨酰胺(Gln)位置处的选择性改变。使用胺作为底物将导致谷氨酰胺修饰,而使用伯酰胺将导致赖氨酸修饰。hGH(SEQ ID No. 1)在38、41、70、115、140、145、158、168和172位有9个赖氨酸残基,在22、29、40、46、49、68、69、84、91、122、137、141和181位有13个谷氨酰胺残基。不是所有这些残基都可容易地用于修饰,也不是所有这些残基都适于修饰,因为这将导致对生长激素结合蛋白的结合效力减少,因此导致生物活性降低。hGH与其结合蛋白(pdb:3HHR)之间的x-射线蛋白质晶体结构显示,至少4个赖氨酸(38、41、168和172)参与与结合蛋白的结合,而可能仅有一个谷氨酰胺(Gln 46)参与。这使得谷氨酰胺作为选择性引入白蛋白结合剂接头的靶标更具吸引力。这些结构考虑得到以下发现的进一步支持,该发现由N. Chêne等在Reprod. Nutr. Develop. 29, 1-25(1989)中综述,其中得出的结论是发现影响赖氨酸的化学修饰对体内生物活性及对与GH肝受体的结合能力有负面影响。

[0236] 化学 I

[0237] 一方面本发明涉及式(VI)生长激素缀合物的制备,其中用特性修饰基团(property-modifying group)衍生的醛或酮处理GH化合物,产生胺、亚胺或半缩醛胺。

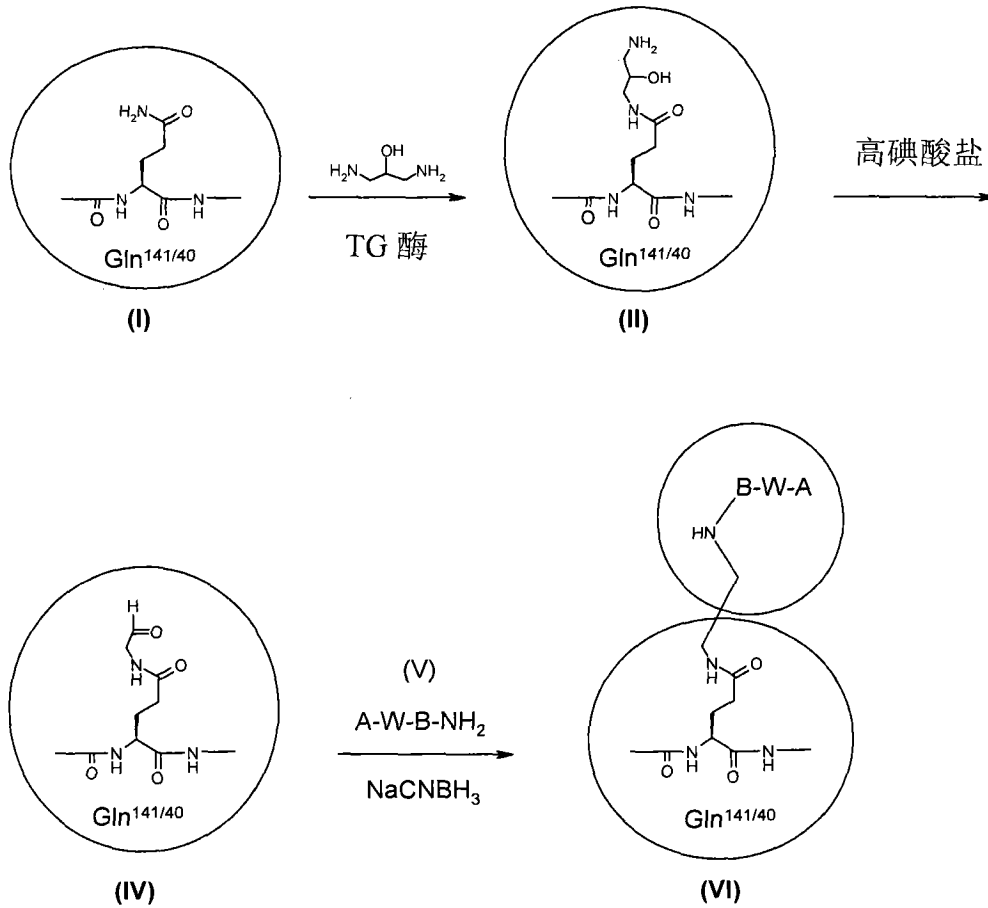
[0238] 另一方面本发明涉及式(VI)生长激素缀合物的制备,其包含用特性修饰基团衍生的苯胺或杂芳基胺处理源自GH化合物的醛或酮,以产生胺、亚胺或半缩醛胺。

[0239] 在一个实施方案中,用特性修饰基团衍生的苯胺或杂基族胺(V)处理源自GH化合物的醛(IV)。

[0240] 术语“GH化合物衍生的醛(或酮)”或“源自GH化合物的醛或酮”,意欲表示醛或酮官能团已经与其共价连接的GH化合物,或其上已经产生醛或酮官能团的GH化合物。GH化合物衍生的醛例如以下所述的化合物(IV)的制备,为本领域技术人员所熟知,任何这些已知的方法都可用于制备对实现本文揭示的发明所需的GH化合物衍生的醛(IV)。

[0241] 在一个实施方案中,缀合物A-W-B-hGH(VI)如以下所述制备:

[0242]

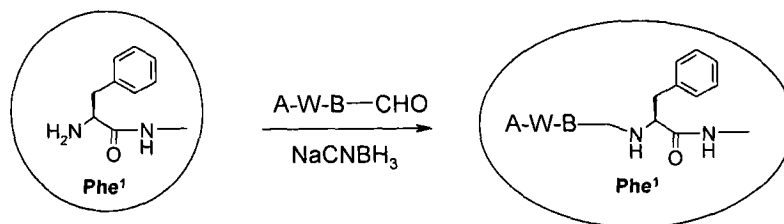


[0243] TG酶介导的与GH(I)的酶促反应导致得到GH(II)的141和/或40位的Gln修饰。经由还原烷基化进行高碘酸盐氧化的GH(II)与A-W-B-NH<sub>2</sub>(V)的缀合。还原烷基化在本文中例示了并为本领域公认的,其导致在Gln(141)和/或40位置修饰的GH化合物(VI)。

[0244] 化学 II

[0245] 在一个实施方案中,缀合物A-W-B-hGH如以下所述制备:

[0246]



[0247] 如上所示的衍生过程产生在Phe(1)位置与hGH化合物连接的白蛋白结合接头。

[0248] 通常认为与天然肽的密切关系对于治疗干预是优点,所述治疗干预包括给予该天然肽的变体或类似物,因为这使例如产生任何不想要的抗体的风险最小化。

[0249] 已知可纳入到本发明方法的肽中的很多亲核化合物, $\alpha$ -氨基酸是所述亲核化合物类型之一。然而,对于本发明目的,优选选择亲核化合物以使形成的转酰基化合物本身不是所施用的酶的底物。换言之,优选施用有效阻断酶的任何进一步反应的亲核化合物。所述化合物的一个实例是 $\alpha$ -氨基酸的酰胺,因为羧基酰胺化肽不是羧基酶的底物。

[0250] 认为化合物是否为给定酶的底物,原则上视发生反应的条件(例如时间范围)而

定。实际上,给予充足的时间,很多化合物是酶的底物,但它们在正常条件下却并不被如此认为。当据上述转酰基化合物本身不应该是酶的底物时,其意欲表示就本发明方法中的后续反应不被扰乱这一方面而言,所述转酰基化合物本身不是所述酶的底物。事实上,若转酰基化合物是酶的底物,则可在转酰基反应后,除去该酶或例如通过酶抑制剂使其失活。

[0251] 药物组合物

[0252] 另一个目的是提供包含本发明生长激素缀合物例如式 (I) 或 (II) 生长激素缀合物的药物组合物,所述缀合物以  $10^{-15}$ mg/mL-200mg/mL 例如  $10^{-10}$ mg/mL-5mg/mL 的浓度存在,其中所述组合物具有 2.0-10.0 的 pH。组合物可进一步包含药物赋形剂 (exhibient),例如缓冲系统、防腐剂、张度剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在本发明一个实施方案中,药物组合物为水性组合物,即包含水的组合物。所述组合物通常为溶液或悬液。在本发明另一实施方案中,药物组合物为水溶液。术语“水性组合物”定义为包含至少 50% w/w 水的组合物。同样地,术语“水溶液”定义为包含至少 50% w/w 水的溶液,术语“水性悬液”定义为包含至少 50% w/w 水的悬液。

[0253] 在另一实施方案中,药物组合物为冻干组合物,医生或患者在使用之前向其中添加溶剂和 / 或稀释剂。

[0254] 在另一实施方案中,药物组合物为无需任何预先溶解便可即时使用的干燥组合物(例如冻干的或喷雾干燥的)。

[0255] 另一方面本发明涉及包含生长激素缀合物的水溶液和缓冲剂的药物组合物,所述生长激素缀合物例如式 (I) 或 (II) 生长激素缀合物,其中所述 GH 缀合物以 0.1-100mg/mL 或更高浓度存在,其中所述组合物具有约 2.0-约 10.0 的 pH。

[0256] 在本发明另一实施方案中,组合物的 pH 选自 2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 和 10.0。

[0257] 在本发明再一实施方案中,缓冲剂选自:乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、甘氨酸甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟基甲基)-氨基甲烷、N-二(羟乙基)甘氨酸、曲辛(tricine)、苹果酸、琥珀酸盐、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些特定缓冲剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。

[0258] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含药学上可接受的防腐剂。在本发明再一实施方案中,防腐剂选自苯酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯乙醇、苯甲醇、氯代丁醇和硫柳汞、溴硝丙二醇、苯甲酸、咪唑、氯己定、脱氢乙酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苄索氯铵、氯苯甘醚(chlorphenesine)(3对-氯苯氧丙烷-1,2-二醇)或其混合物。在本发明再一实施方案中,防腐剂以 0.1mg/mL-20mg/mL 的浓度存在。在本发明再一实施方案中,防腐剂以 0.1mg/mL-5mg/mL 的浓度存在。在本发明再一实施方案中,防腐剂以 5mg/mL-10mg/mL 的浓度存在。在本发明再一实施方案中,防腐剂以 10mg/mL-20mg/mL 的浓度存在。这些特定防腐剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。药物组合物中防腐剂的使用为技术人员所熟知。为了方便,作出对 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, 2000 的引用。

[0259] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含等渗剂。在本发明再一实施方案中,等渗剂选自盐(例如氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(例如L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、糖醇(例如丙三醇(甘油)、1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)、聚乙二醇(例如PEG 400)或其混合物。可使用任何糖,例如单糖、二糖或多糖,或水溶性葡聚糖,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、葡聚糖、普鲁兰、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素钠。在一个实施方案中,糖添加剂为蔗糖。糖醇被定义为具有至少一个-OH基团的C4-C8烃,包括例如甘露醇、山梨醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿拉伯糖醇。在一个实施方案中,糖醇添加剂为甘露醇。可单独地或联合使用上述糖或糖醇。对用量没有固定的限制,只要糖或糖醇在液体制剂中可溶且对用本发明方法获得的稳定作用不产生不利作用即可。在一个实施方案中,糖或糖醇浓度为约1mg/mL-约150mg/mL。在本发明再一实施方案中,等渗剂以1mg/mL-50mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,等渗剂以1mg/mL-7mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,等渗剂以8mg/mL-24mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,等渗剂以25mg/mL-50mg/mL的浓度存在。这些特定的等渗剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。药物组合物中等渗剂的使用为技术人员所熟知。为了方便,作出对Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2000的引用。

[0260] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含螯合剂。在本发明再一实施方案中,螯合剂选自乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸和天冬氨酸的盐及其混合物。在本发明再一实施方案中,螯合剂以0.1mg/mL-5mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,螯合剂以0.1mg/mL-2mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,螯合剂以2mg/mL-5mg/mL的浓度存在。这些特定的螯合剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。药物组合物中螯合剂的使用为技术人员所熟知。为了方便,作出对Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2000的引用。

[0261] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含稳定剂。药物组合物中稳定剂的使用为技术人员所熟知。为了方便,作出对Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2000的引用。

[0262] 更具体地,本发明组合物为稳定的液体药物组合物,其治疗活性成分包括在以液体药物组合物储存期间可能表现出聚集物形成的蛋白质。“聚集物形成”意指蛋白质分子之间的物理相互作用,其造成寡聚物的形成,该寡聚物可保持可溶性或从溶液中沉淀出来的可见的大聚集物。“储存期间”意指液体药物组合物或组合物在制备后没有立即给予受试者。相反,其在制备后以液体形式、冷冻状态或干燥形式包装储存,用于以后重构成液体形式或适于给予受试者的其它形式。“干燥形式”意指液体药物组合物或组合物通过冻干(即冷冻干燥;参见例如Williams和Polli, J. Parenteral Sci. Technol. 38, 48-59, (1984)、喷雾干燥(参见Masters(1991),载于Spray-Drying Handbook(第5版;Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.),第491-676页;Broadhead等(1992)Drug Devel. Ind. Pharm. 18, 1169-1206, (1992);和Mumenthaler等, Pharm. Res. 11, 12-20(1994))或风干(Carpenter和Crowe, Cryobiology 25, 459-470, (1988);和Roser, Biopharm. 4, 47-53, (1991))来干燥。在液体药物组合物储存期间蛋白质聚集物形成可不

利地影响该蛋白质的生物活性,造成药物组合物治疗功效损失。此外,聚集物形成可引起其它问题,例如当用输注系统给予含有蛋白质的药物组合物时管道、膜或泵的堵塞。

[0263] 本发明药物组合物可进一步包含足以降低组合物储存期间蛋白质聚集物形成的量的氨基酸碱(amino acid base)。“氨基酸碱”意指氨基酸或氨基酸组合,其中任何给定氨基酸以其游离碱形式或以其盐形式存在。当使用氨基酸组合时,所有氨基酸可以以其游离碱形式存在,所有氨基酸可以以其盐形式存在,或一些可以以其游离碱形式存在而其它以其盐形式存在。在一个实施方案中,用于制备本发明组合物的氨基酸为携带带电侧链的氨基酸,例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。只要特定氨基酸或有机碱以其游离碱形式或其盐形式存在,特定氨基酸(甲硫氨酸、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸及其混合物)的任何立体异构体(即L或D异构体或其混合物)或这些立体异构体的组合或者甘氨酸或有机碱(例如但不限于咪唑),都可存在于本发明药物组合物中。在一个实施方案中,使用氨基酸的L-立体异构体。在一个实施方案中,使用L-立体异构体。本发明组合物也可用这些氨基酸的类似物配制。“氨基酸类似物”意指天然存在的氨基酸的衍生物,其导致减少本发明液体药物组合物储存期间蛋白质聚集物形成的所需作用。合适的精氨酸类似物包括例如氨基胍、鸟氨酸和N-单乙基L-精氨酸,合适的甲硫氨酸类似物包括乙硫氨酸和丁硫氨酸(buthionine),合适的半胱氨酸类似物包括S-甲基-L-半胱氨酸。至于其它氨基酸,以其游离碱形式或其盐形式将氨基酸类似物掺入到组合物中。在本发明再一实施方案中,以足以防止或延缓蛋白质聚集的浓度使用氨基酸或氨基酸类似物。

[0264] 在本发明再一实施方案中,当作为治疗剂起作用的蛋白质为包含至少一个对氧化易感的甲硫氨酸残基的蛋白质时,可添加甲硫氨酸(或其它含硫氨基酸或氨基酸类似物)以抑制将甲硫氨酸残基氧化为甲硫氨酸亚砷。“抑制”意指随着时间的推移甲硫氨酸氧化物质的积聚最小化。抑制甲硫氨酸氧化导致蛋白质以其适合的分子形式得到更大的保留。可使用甲硫氨酸的任何立体异构体(L或D异构体)或其任何组合。添加的量应为足以抑制甲硫氨酸残基氧化的量,使得甲硫氨酸亚砷的量可被监管机构接受。通常这意味着组合物含不多于约10% - 约30%甲硫氨酸亚砷。通常这可通过添加甲硫氨酸使得添加的甲硫氨酸与甲硫氨酸残基的比率范围为约1:1-约1000:1例如10:1-约100:1来实现。

[0265] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含选自高分子量聚合物或低分子化合物的稳定剂。在本发明再一实施方案中,稳定剂选自聚乙二醇(例如PEG 3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基纤维素/羟基纤维素或其衍生物(例如HPC、HPC-SL、HPC-L和HPMC)、环糊精、含硫物质如单硫代甘油、巯基乙酸和2-甲硫基乙醇及不同的盐(例如氯化钠)。这些特定的稳定剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。

[0266] 药物组合物也可包含另外的稳定剂,所述稳定剂进一步提高其中治疗活性蛋白质的稳定性。对于本发明而言特别有兴趣的稳定剂包括但不限于:甲硫氨酸和EDTA,它们保护蛋白质对抗甲硫氨酸氧化;非离子表面活性剂,其保护蛋白质对抗与冻融或机械剪切相关的聚集。

[0267] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含表面活性剂。在本发明再一实施方案中,表面活性剂选自:洗涤剂、乙氧基化蓖麻油、聚乙二醇化(polyglycolyzed)甘油酯、乙酰化单甘油酯、山梨糖醇酐脂肪酸酯、聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物(例如泊洛沙姆例

如 Pluronic®F68、泊洛沙姆 188 和 407、Triton X-100)、聚氧乙烯化山梨糖醇酐脂肪酸酯、聚氧乙烯和聚乙烯衍生物例如烷基化和烷氧基化衍生物(吐温例如 Tween-20、Tween-40、Tween-80 和 Brij-35)、单甘油酯或其乙氧基化衍生物、二甘油酯或其聚氧乙烯衍生物、醇类、甘油、凝集素类和磷脂类(例如磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、双磷脂酰甘油和鞘磷脂)、磷脂衍生物(例如二棕榈酰磷脂酸)和溶血磷脂衍生物(例如棕榈酰溶血磷脂酰-L-丝氨酸和乙醇胺、胆碱、丝氨酸或苏氨酸的 1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酯)及溶血磷脂酰胆碱和磷脂酰胆碱的烷基、烷氧基(烷基酯)、烷氧基(烷基醚)衍生物,例如溶血磷脂胆碱的月桂酰和肉豆蔻酰衍生物、二棕榈酰磷脂酰胆碱以及极性头基团(即胆碱类、乙醇胺类、磷脂酸、丝氨酸类、苏氨酸类、甘油、肌醇)的修饰物,和带正电的 DODAC、DOTMA、DCP、BISHOP、溶血磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰苏氨酸以及甘油磷酸酯类(例如脑磷脂)、甘油糖脂类(例如吡喃型半乳糖苷(galactopyransoide))、鞘糖脂类(例如神经酰胺、神经节苷脂)、十二烷基磷酸胆碱、鸡蛋溶血卵磷脂、梭链孢酸衍生物(例如牛磺二氢梭链孢酸钠等)、长链脂肪酸及其 C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> 盐(例如油酸和辛酸)、酰基肉毒碱类及衍生物、赖氨酸、精氨酸或组氨酸的 N<sup>α</sup>-酰化衍生物、或者赖氨酸或精氨酸的侧链酰化衍生物、包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸与中性或酸性氨基酸的任何组合的二肽的 N<sup>α</sup>-酰化衍生物、包括一个中性氨基酸与两个带电氨基酸的任何组合的三肽的 N<sup>α</sup>-酰化衍生物、DSS(多库酯钠, CAS 登记号 [577-11-7])、多库酯钙, CAS 登记号 [128-49-4])、多库酯钾, CAS 登记号 [7491-09-0])、SDS(十二烷基硫酸钠或月桂基硫酸钠)、辛酸钠、胆酸或其衍生物、胆汁酸及其盐、甘氨酸或牛磺酸缀合物、熊脱氧胆酸、胆酸钠、脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸钠、N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵基-1-丙磺酸盐、阴离子(烷基-芳基-磺酸盐类)一价表面活性剂、两性离子表面活性剂(例如 N-烷基-N,N-二甲基铵基-1-丙磺酸盐、3-氯酰氨基-1-丙基二甲基铵基-1-丙磺酸盐、阳离子表面活性剂(季铵碱)(例如溴化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基吡啶鎓)、非离子型表面活性剂(例如十二烷基 β-D-吡喃葡萄糖苷)、poloxamine(例如 Tetronic' s),其为衍生自依次将环氧丙烷和环氧乙烷加成至乙二胺的四官能嵌段共聚物,或者所述表面活性剂可选自咪唑啉衍生物或其混合物。这些特定的表面活性剂中的每一种构成本发明备选实施方案。

[0268] 药物组合物中表面活性剂的使用为技术人员所熟知。为了方便,作出对 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, 2000 的引用。

[0269] 可能的是,在本发明药物组合物中可存在其它成分。所述另外的成分可包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张度改性剂、螯合剂、金属离子、油性载体、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶或蛋白质)和两性离子(例如氨基酸,例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。所述另外的成分当然应该对本发明药物组合物的总体稳定性没有不利作用。

[0270] 可在若干位点将包含本发明生长激素缀合物的药物组合物给予需要这类治疗的患者,所述位点例如在局部位点,例如皮肤和粘膜位点;在旁路吸收位点,例如在动脉中、静脉中、心脏中给予;和参与吸收的位点,例如在皮肤、皮下、肌肉内或腹内给予。

[0271] 本发明药物组合物的给予可通过数种给药途径给予需要这种治疗的患者,所述给药途径例如舌部给药、舌下给药、含服给药、口腔内给药、口服给药、胃肠内给药、鼻部给药、肺部给药例如通过细支气管和肺泡或其组合、表皮给药、皮肤给药、透皮给药、阴道给

药、直肠给药、眼部给药例如通过结膜、输尿管给药和经胃肠外给药。

[0272] 本发明的组合物可以以若干剂型给予,例如作为溶液剂、混悬剂、乳剂、微乳剂、复合型乳剂、泡沫剂、药膏、糊剂、硬膏、软膏、片剂、包衣片剂、冲洗剂、胶囊例如硬胶囊和软胶囊、栓剂、直肠用胶囊、滴剂、凝胶剂、喷雾剂、散剂、气雾剂、吸入剂、滴眼剂、眼用软膏、眼用冲洗剂、阴道栓剂、阴道环、阴道软膏、注射液、原位转化溶液剂例如原位胶凝剂、原位沉降剂、原位沉淀剂、原位结晶剂、输液剂和埋植剂。

[0273] 为了进一步提高生长激素缀合物的稳定性、增加生物利用度、增加溶解性、降低不良作用、实现本领域技术人员熟知的按时疗法 (chronotherapy) 和增加患者依从性或其任何组合,可让本发明组合物进一步例如通过共价、疏水和静电互相作用与药物载体、药物递送系统和改良药物递送系统复合或连接。载体、药物递送系统和改良药物递送系统的实例包括但不限于:聚合物例如纤维素及衍生物、多糖例如葡聚糖及衍生物、淀粉及衍生物、聚(乙烯醇)、丙烯酸酯聚合物和甲基丙烯酸酯聚合物、聚乳酸和聚乙醇酸及其嵌段共聚物、聚乙二醇、载体蛋白例如白蛋白、凝胶例如热胶凝体系,例如本领域技术人员熟知的嵌段共聚物体系、胶束、脂质体、微球、纳米颗粒、液晶及其分散体、脂质-水体系中相特性领域的技术人员熟知的 L2 相及其分散体、聚合胶束、复合型乳剂、自乳化、自微乳化、环糊精及其衍生物,以及树枝状大分子 (dendrimer)。

[0274] 本发明组合物可用于固体、半固体、粉末和溶液组合物中,用于肺部给予生长激素缀合物,肺病给予使用例如定量吸入器、干粉吸入器和雾化器,所有装置都为本领域技术人员所熟知。

[0275] 本发明组合物尤其可用于控释、持续释放、延释、阻释和缓释药物递送系统组合物中。更具体地但不限于,组合物可用于本领域技术人员所熟知的胃肠外控释和持续释放系统(二种系统都导致给药次数减少许多倍)组合物中。甚至更优选皮下给予的控释和持续释放系统。在不限制本发明范围下,有用的控释系统和组合物的实例为水凝胶、油凝胶、液晶、聚合胶束、微球、纳米粒。

[0276] 制备可用于本发明组合物的控释系统的方法包括但不限于:结晶、冷凝、共结晶、沉淀、共沉淀、乳化、分散、高压匀浆化、包囊化、喷雾干燥、微胶囊化、凝聚、相分离、溶剂蒸发以制备微球、挤压和超临界流体法。对以下文献作出整体参考:药物控释手册 (Handbook of Pharmaceutical Controlled Release) (Wise, D. L., 编辑, Marcel Dekker, New York, 2000) 及药物和药物科学 (Drug and the Pharmaceutical Sciences), 第 99 卷:蛋白质组合物和递送 (Protein Composition and Delivery) (MacNally, E. J., 编辑, Marcel Dekker, New York, 2000)。

[0277] 肠胃外给药可通过注射器、任选笔型 (pen-like) 注射器经皮下注射、肌肉注射、腹膜内注射或静脉注射来进行。或者,肠胃外给药可以依靠输液泵进行。另一个选择可为溶液剂或混悬剂的组合物,用于以鼻用喷雾或肺部喷雾形式给予生长激素缀合物。作为又一个选择,含有本发明生长激素缀合物的药物组合物还可以适合于透皮给药,例如通过无针注射或贴剂(任选离子电渗贴剂)来进行;或跨粘膜给药例如含服给药。

[0278] 术语“稳定化组合物”是指物理稳定性增加、化学稳定性增加或物理和化学稳定性增加的组合物。

[0279] 本文所用关于蛋白组合物的术语“物理稳定性”是指由于蛋白暴露至热-机械应

力和 / 或与失稳的界面和表面 (例如疏水表面和界面) 的相互作用, 所述蛋白形成蛋白的生物失活和 / 或不溶性聚集体的趋势。在将装于合适的容器 (例如药筒或小瓶) 中的组合物于不同温度下暴露于机械 / 物理应力 (例如搅拌) 中达各种时期后, 通过目视检查和 / 或浊度测定评估水性蛋白组合物的物理稳定性。组合物的目视检查在黑暗背景下于聚焦强光中进行。组合物的浊度通过将浊度分级为例如 0 至 3 等级的目视评分来表征 (未呈现混浊的组合物对应于目视评分 0, 而在日光中呈现可视混浊的组合物对应于目视评分 3)。当其在日光中呈现可视混浊时, 将组合物分类为关于蛋白聚集的物理不稳定。或者, 可通过技术人员熟知的简易浊度测量来评估组合物的浊度。水性蛋白组合物的物理稳定性还可通过使用蛋白构象状态的光谱剂或光谱探测物来评估。所述探测物优选为优先结合至蛋白的非天然构象异构体的小分子。蛋白结构的小分子光谱探测物的一个实例为硫磺素 T (Thioflavin T)。硫磺素 T 为已广泛用于检测淀粉状原纤维的荧光染料。在存在原纤维以及也可能其它蛋白构型下, 硫磺素 T 当结合至原纤维蛋白形式时在约 450nm 下产生新的激发极值并在约 482nm 下发射增强。未结合的硫磺素 T 在所述波长下基本无荧光。

[0280] 其它小分子可用作蛋白结构从天然状态向非天然状态变化的探测物。例如优先结合至蛋白的外露疏水补丁 (hydrophobic patch) 的“疏水补丁”探测物。所述疏水补丁通常埋藏于处于其天然状态的蛋白三级结构之内, 但随着蛋白开始解折叠或变性而暴露。这些小分子光谱探测物的实例为芳族疏水染料, 例如葱 (anthracene)、吖啶、菲咯啉等。其它光谱探测物为金属-氨基酸络合物, 例如疏水氨基酸 (例如苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸) 的钴金属络合物等。

[0281] 本文所用关于蛋白组合物的术语“化学稳定性”是指蛋白结构的化学共价变化, 所述变化导致形成与天然蛋白结构相比具有潜在较小生物效力和 / 或潜在增加的免疫原性的化学降解产物。根据天然蛋白的类型和性质以及所述蛋白所暴露的环境, 可形成各种化学降解产物。如本领域技术人员所熟知, 几乎不可能完全避免化学降解的消除, 并且在储存和使用蛋白组合物期间常常见到化学降解产物的量不断增加。多数蛋白容易发生脱酰胺作用, 其中谷氨酰胺或天冬酰胺残基的侧链酰胺基被水解而形成游离羧酸的过程。其它降解途径涉及高分子量转化产物的形成, 其中两个或更多个蛋白分子通过转酰胺基作用和 / 或二硫化物相互作用相互共价结合, 导致形成共价结合的二聚体、寡聚体和多聚体降解产物 (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T. J. 和 Manning M. C., Plenum Press, New York 1992)。可提及作为化学降解另一种变体的氧化 (例如甲硫氨酸残基的氧化)。可通过在暴露至不同环境条件 (可通常通过例如增加温度来加速降解产物的形成) 下之后的各个时间点测量化学降解产物的量, 来评估蛋白组合物的化学稳定性。通常通过利用各种色谱技术 (例如 SEC-HPLC 和 / 或 RP-HPLC) 根据分子大小和 / 或电荷将降解产物分离来测量各种降解产物的量。

[0282] 因此, 如上文所概述, “稳定化组合物”是指物理稳定性增加、化学稳定性增加或物理和化学稳定性增加的组合物。总之, 组合物在使用和储存 (依照推荐的使用和储存条件) 期间必须稳定直至达到失效期。

[0283] 在本发明的一个实施方案中, 包含式 (I) 或 (II) 生长激素缀合物的药物组合物对于超过 6 周的使用和超过 3 年的储存为稳定的。

[0284] 在本发明另一实施方案中, 包含式 (I) 或 (II) 生长激素缀合物的药物组合物对于

超过 4 周的使用和超过 3 年的储存为稳定的。

[0285] 在本发明再一实施方案中,包含式 (I) 或 (II) 生长激素缀合物的药物组合物对于超过 4 周的使用和超过 2 年的储存为稳定的。

[0286] 在本发明又一实施方案中,包含式 (I) 或 (II) 生长激素缀合物的药物组合物对于超过 2 周的使用和超过 2 年的储存为稳定的。

[0287] 本文引用的包括出版物、专利申请和专利在内的所有参考文献在此通过引用结合中,其引用程度如同每一参考文献单独和明确地指出通过引用结合且在本文中以其整体提出一样。

[0288] 所有标题和小标题仅为了方便而在本文中使用时,不应该理解为以任何方式限制本发明。

[0289] 除非本文另外指出或另外明显地与上下文矛盾,否则呈其所有可能变化的上述要素的任何组合都包括在本发明中。

[0290] 除非本文另外指出或另外明显地与上下文矛盾,否则在阐述本发明的情形中所用的术语“一个”和“一种”和“该”和相似对象,应理解为包括单数和复数两者。

[0291] 除非本文另外指出,否则本文对数值范围的陈述仅意欲作为单独提及落在该范围内的每一单独值的速记方法,且如同本文单独列举每一单独值一样将每一单独值包括在本说明书中。除非另外指出,否则本文提供的所有准确值代表对应的大约值(例如,合适时,可以认为关于特定因子或测量提供的所有准确例示性数值,亦提供了由“约”修饰的对应的大约测量)。

[0292] 除非本文另外指出或另外明显地与上下文矛盾,否则可以以任何合适次序实施本文所述的所有方法。

[0293] 除非另外指出,否则本文提供的任何和所有实例或例示性语言(例如“例如”)的使用,仅意欲更好地阐明本发明,并不构成对本发明范围的限制。除非同样明确指出,否则本说明书中的语言都不应被理解为表示任何要素对实施本发明是必不可少的。

[0294] 本文引用和并入专利文献,只是为了方便,并不反映关于所述专利文献的有效性、专利性和/或可执行性的任何看法。

[0295] 本发明进一步通过但不限于以下所列出的实施方案来阐述。

[0296] 1. 生长激素缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,所述缀合物包含经由亲水间隔基与白蛋白结合残基连接的生长激素化合物 (GH)。

[0297] 2. 实施方案 1 的缀合物,其中亲水间隔基具有  $m\text{LogP} < 0$  或  $c\text{LogP} < 0.5$ 。

[0298] 3. 实施方案 1 或 2 的缀合物,其中生长激素化合物 (GH) 经由亲水间隔基与一个白蛋白结合残基连接。

[0299] 4. 实施方案 1 或 2 的缀合物,其中生长激素化合物 (GH) 经由亲水间隔基与两个或三个白蛋白结合残基连接。

[0300] 5. 实施方案 1-4 中任一个的缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,其中亲水间隔基具有下式

[0301]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0302] 其中

[0303]  $X_1$  为  $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ;

- [0304]  $X_2$  为  $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$  ;
- [0305]  $X_3$  为  $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$  ;
- [0306]  $X_4$  为  $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$  ;
- [0307] I1、I2、I3、I4、I5 和 I6 独立选自 0-16 ;
- [0308] m1、m3、m4、m6 和 m7 独立选自 0-10 ;
- [0309] m2 和 m5 独立选自 0-25 ;
- [0310] n1、n2、n3 和 n4 独立选自 0-16 ;
- [0311] F 为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键,其中芳基和杂芳基任选被卤素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH<sub>2</sub>、-S(O)<sub>2</sub>OH 或 C<sub>1-6</sub>-烷基取代 ;
- [0312] R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH<sub>2</sub>、-S(O)OH、-S(O)<sub>2</sub>OH、-NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>、C<sub>1-6</sub>-烷基、芳基或杂芳基 ;其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH<sub>2</sub>、-S(O)OH、-S(O)<sub>2</sub>OH、-CN 或 -OH 取代 ;
- [0313] D1、D2、E1 和 E2 独立选自 -O-、-NR<sup>6</sup>-、-N(COR<sup>7</sup>)- 或价键 ;其中 R<sup>6</sup> 和 R<sup>7</sup> 独立表示氢或 C<sub>1-6</sub>-烷基 ;
- [0314] W<sub>1</sub>-W<sub>6</sub> 独立选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>s1</sub>-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)- 或价键 ;其中 s1 为 0 或 1。
- [0315] 6. 式 (I) 的生长激素缀合物和其药学上可接受的盐、溶剂化物和前药 :
- [0316] A-W-B-GH (I)
- [0317] 其中
- [0318] GH 表示生长激素化合物 ;
- [0319] B 表示亲水间隔基 ;
- [0320] W 为连接 A 和 B 的化学基团 ;和
- [0321] A 表示白蛋白结合残基。
- [0322] 7. 实施方案 6 的缀合物,其中 GH 表示包含与人生长激素 (hGH) 氨基酸序列 (SEQ ID NO :1) 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的生长激素化合物。
- [0323] 8. 实施方案 6 或 7 的缀合物,其中 GH 为 hGH (SEQ ID NO :1)。
- [0324] 9. 实施方案 6-8 中任一个的缀合物,其中 B 具有下式
- [0325]  $-X_1-X_2-X_3-X_4-$
- [0326] 其中
- [0327]  $X_1$  为  $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$  ;
- [0328]  $X_2$  为  $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$  ;
- [0329]  $X_3$  为  $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$  ;
- [0330]  $X_4$  为  $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$  ;
- [0331] I1、I2、I3、I4、I5 和 I6 独立选自 0-16 ;
- [0332] m1、m3、m4、m6 和 m7 独立选自 0-10 ;
- [0333] m2 和 m5 独立选自 0-25 ;
- [0334] n1、n2、n3 和 n4 独立选自 0-16 ;
- [0335] F 为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键,其中芳基和杂芳基任选被卤

素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH<sub>2</sub>、-S(O)<sub>2</sub>OH 或 C<sub>1-6</sub>-烷基取代；

[0336] R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH<sub>2</sub>、-S(O)OH、-S(O)<sub>2</sub>OH、-NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>、C<sub>1-6</sub>-烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH<sub>2</sub>、-S(O)OH、-S(O)<sub>2</sub>OH、-CN 或 -OH 取代；

[0337] D1、D2、E1 和 E2 独立选自 -O-、-NR<sup>6</sup>-、-N(COR<sup>7</sup>)- 或价键；其中 R<sup>6</sup> 和 R<sup>7</sup> 独立表示氢或 C<sub>1-6</sub>-烷基；

[0338] W<sub>1</sub>-W<sub>6</sub> 独立选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>s2</sub>-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)- 或价键；其中 s2 为 0 或 1。

[0339] 10. 实施方案 6-9 中任一个的缀合物，其中 W 具有式

[0340] -W<sub>7</sub>-Y-

[0341] 其中

[0342] Y 为 -(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>-C<sub>3-10</sub>-环烷基 -W<sub>8</sub>- 或价键；

[0343] I7 为 0-6；

[0344] W<sub>7</sub> 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>s3</sub>-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)- 或价键；其中 s3 为 0 或 1；

[0345] W<sub>8</sub> 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>s4</sub>-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)- 或价键；其中 s4 为 0 或 1。

[0346] 11. 实施方案 6-10 中任一个的缀合物，其中 I1、I2、I3、I4、I5 和 I6 独立为 0-6。

[0347] 12. 实施方案 6-11 中任一个的缀合物，其中 m1、m3、m4、m6 和 m7 独立为 0-6。

[0348] 13. 实施方案 6-12 中任一个的缀合物，其中 m2 和 m5 独立为 0-10。

[0349] 14. 实施方案 6-13 中任一个的缀合物，其中 n1、n2、n3 和 n4 独立为 0-10，例如 0-6。

[0350] 15. 实施方案 6-14 中任一个的缀合物，其中 D1 和 D2 独立选自 -O- 或 -NR<sup>6</sup>- 或价键。

[0351] 16. 实施方案 6-15 中任一个的缀合物，其中 D1 为 -NR<sup>6</sup>-。

[0352] 17. 实施方案 6-16 中任一个的缀合物，其中 D2 为 -NR<sup>6</sup>-。

[0353] 18. 实施方案 6-17 中任一个的缀合物，其中 D1 和 D2 二者都为 -O-。

[0354] 19. 实施方案 6-18 中任一个的缀合物，其中 D1 和 D2 二者都为 -NR<sup>6</sup>-。

[0355] 20. 实施方案 6-19 中任一个的缀合物，其中 E1 和 E2 独立选自 -O- 或 -NR<sup>6</sup>- 或价键。

[0356] 21. 实施方案 6-20 中任一个的缀合物，其中 E1 为 -NR<sup>6</sup>-。

[0357] 22. 实施方案 6-21 中任一个的缀合物，其中 E2 为 -NR<sup>6</sup>-。

[0358] 23. 实施方案 6-22 中任一个的缀合物，其中 E1 和 E2 二者都为 -O-。

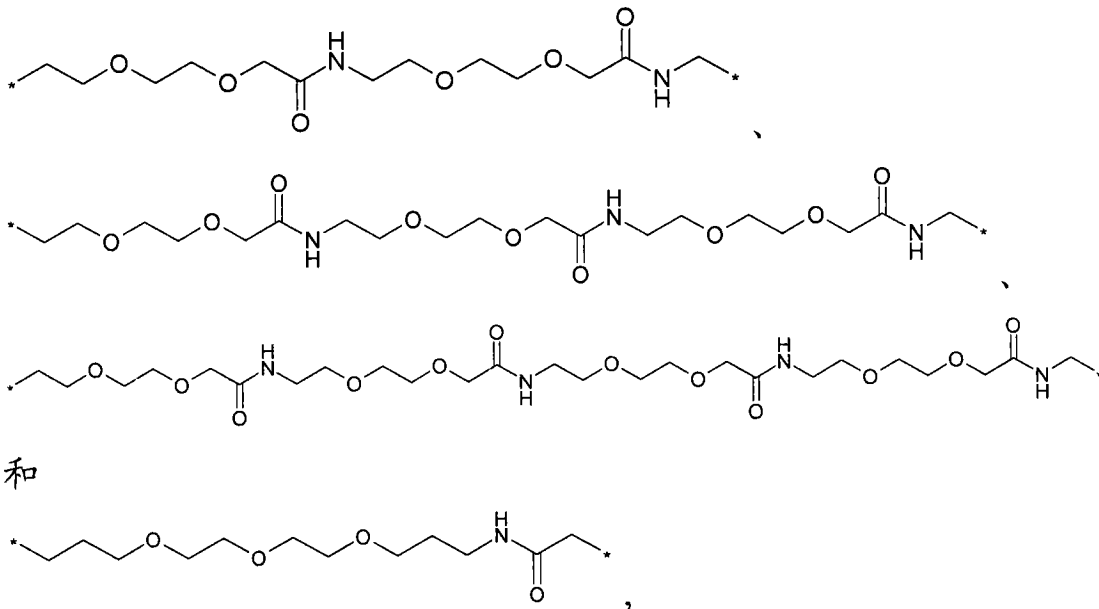
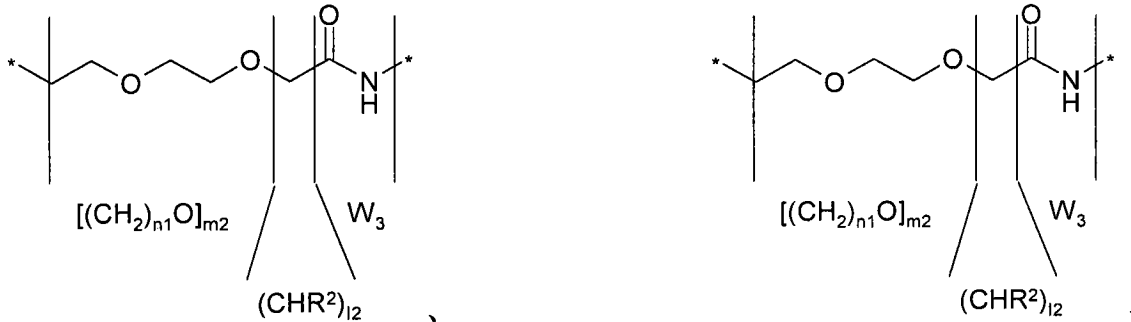
[0359] 24. 实施方案 6-23 中任一个的缀合物，其中 E1 和 E2 二者都为 -NR<sup>6</sup>-。

[0360] 25. 实施方案 6-24 中任一个的缀合物，其中 W<sub>1</sub>-W<sub>8</sub> 独立选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH<sub>2</sub>-、-CH<sub>2</sub>NHC(O)-、-C(O)NHS(O)<sub>2</sub>-、-S(O)<sub>2</sub>NHC(O)- 或价键。

[0361] 26. 实施方案 6-25 中任一个的缀合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  和  $R^5$  独立选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  或  $C_{1-6}$ -烷基; 其中烷基任选被  $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$  取代。

[0362] 27. 实施方案 6-26 中任一个的缀合物, 其中  $-[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}$ 、 $-[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}$ 、 $-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}$  和  $-[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}$  (其中  $E1$  和  $E2$  为  $O$ ) 选自:

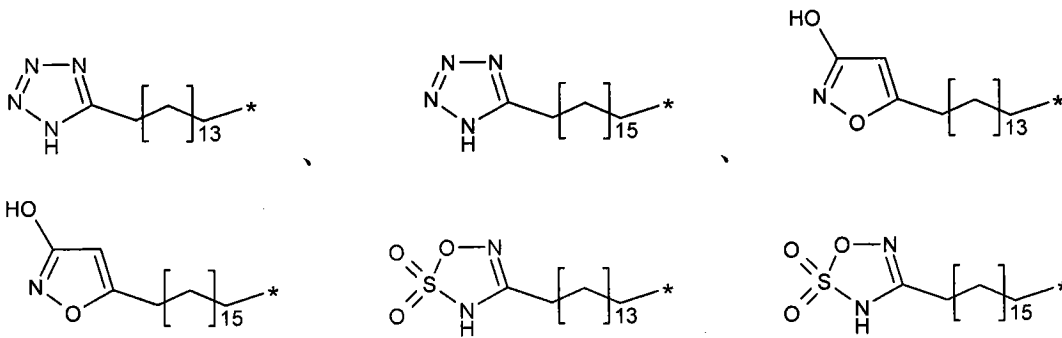
[0363]



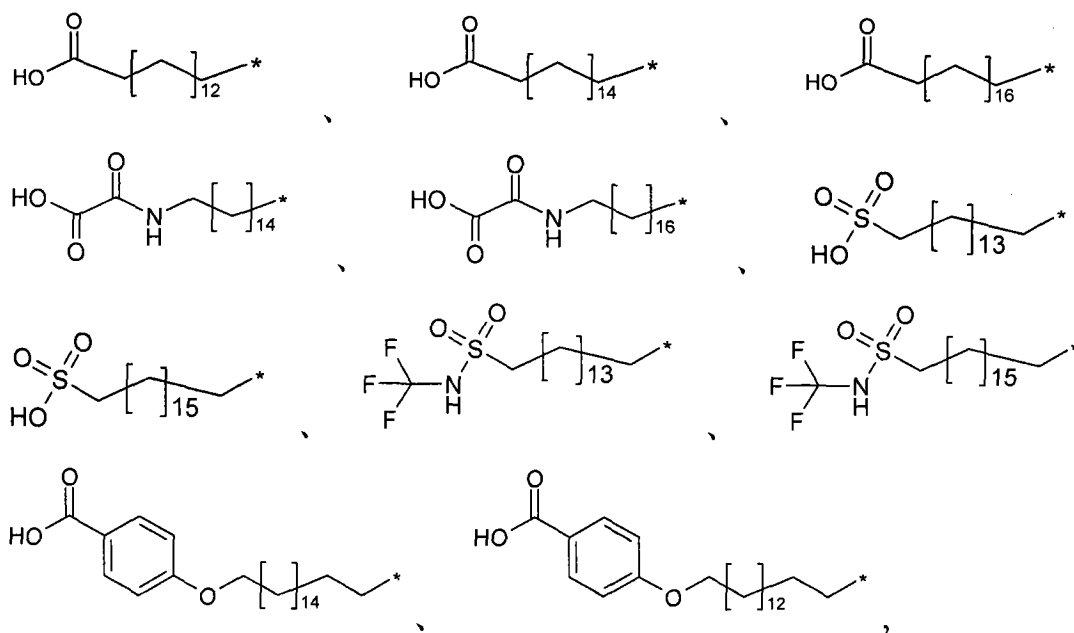
[0364] 其中 \* 意欲表示连接点, 即打开的键。

[0365] 28. 实施方案 6-27 中任一个的缀合物, 其中 A 选自:

[0366]



[0367]



[0368] 其中 \* 表示通过 W 连接至 B。

[0369] 29. 实施方案 1-28 中任一个的缀合物, 其中白蛋白结合残基经由亲水间隔基与对应于 SEQ ID No. 1 中 40 位的位置的谷氨酰胺残基连接。

[0370] 30. 实施方案 1-29 中任一个的缀合物, 其中白蛋白结合残基经由亲水间隔基与对应于 SEQ ID No. 1 中 141 位的位置的谷氨酰胺残基连接。

[0371] 31. 实施方案 1-30 中任一个的缀合物, 其中白蛋白结合残基经由亲水间隔基与生长激素化合物例如 hGH (SEQ ID No. 1) 的 N-末端残基连接。

[0372] 32. 下式 (II) 的生长激素缀合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物和前药:

[0373]  $A-W-B-GH-B'-W'-A'$  (II)

[0374] 其中

[0375] GH 表示生长激素化合物;

[0376] W 为连接 A 和 B 的化学基团;

[0377] W' 为连接 A' 和 B' 的化学基团;

[0378] A 和 A' 独立表示白蛋白结合残基;

[0379] B 和 B' 独立为亲水间隔基。

[0380] 33. 实施方案 32 的缀合物, 其中 GH 表示包含与人生长激素 (hGH) 氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1) 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的生长激素化合物。

[0381] 34. 实施方案 33 的缀合物, 其中 GH 为 hGH (SEQ ID NO: 1)。

[0382] 35. 实施方案 32-34 中任一个的缀合物, 其中 W' 选自 W, A' 选自 A, B' 选自 B。

[0383] 36. 实施方案 32-35 中任一个的缀合物, 其中 W 和 W'、A 和 A' 及 B 和 B' 独立选自实施方案 6-31 中任一个的其各自定义。

[0384] 37. 前述实施方案中任一个的缀合物, 其中所述亲水间隔基的分子量介于 80D-1500D 范围或介于 500D-1100D 范围。

[0385] 38. 前述实施方案中任一个的缀合物, 其中所述白蛋白结合残基为亲脂残基。

[0386] 39. 前述实施方案中任一个的缀合物, 其中所述白蛋白结合残基与白蛋白非共价结合。

[0387] 40. 前述实施方案中任一个的缀合物,其中所述白蛋白结合残基在生理 pH 下带负电荷。

[0388] 41. 前述实施方案中任一个的缀合物,其中所述白蛋白结合残基对人血清白蛋白具有低于约 10  $\mu$  M 或低于约 1  $\mu$  M 的结合亲和力。

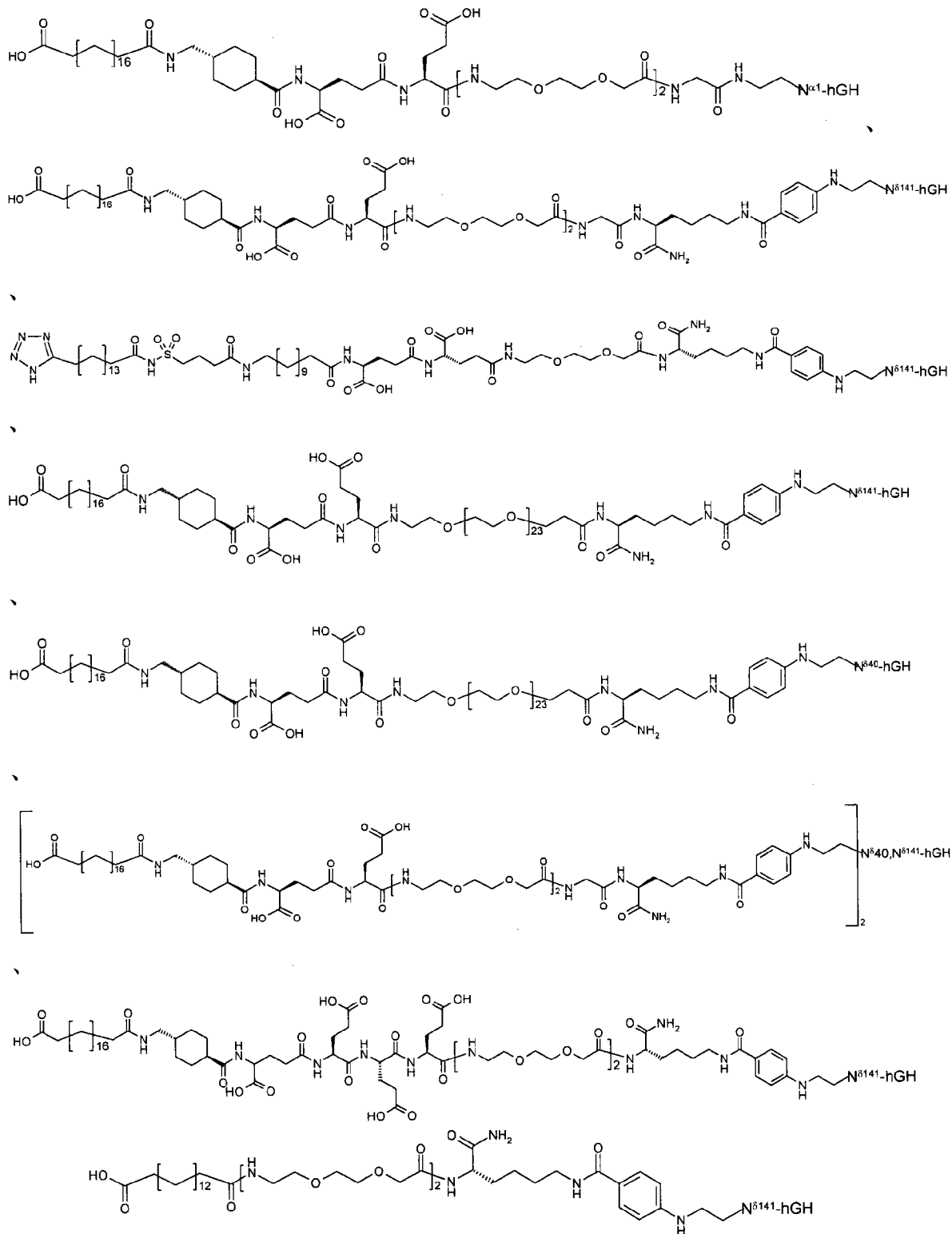
[0389] 42. 前述实施方案中任一个的缀合物,其中所述白蛋白结合残基选自直链烷基、分支烷基、具有  $\omega$ -羧基团或  $\omega$ -羧酸等排体的基团。

[0390] 43. 前述实施方案中任一个实施方案的缀合物,其中所述白蛋白结合残基具有 6-40 个碳原子、8-26 个碳原子或 8-20 个碳原子。

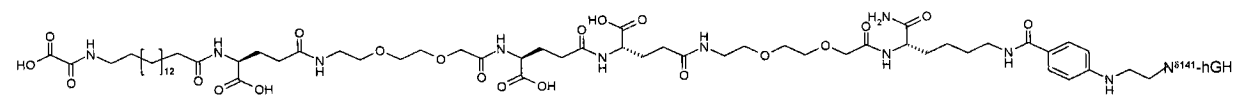
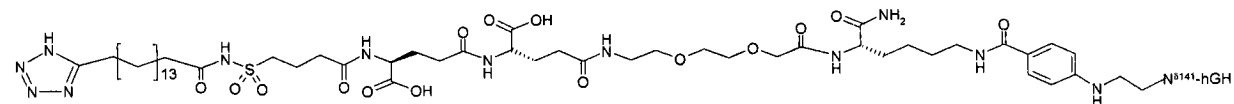
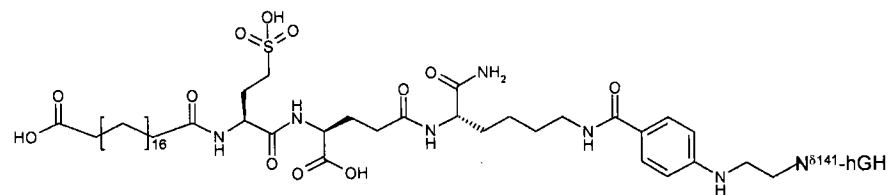
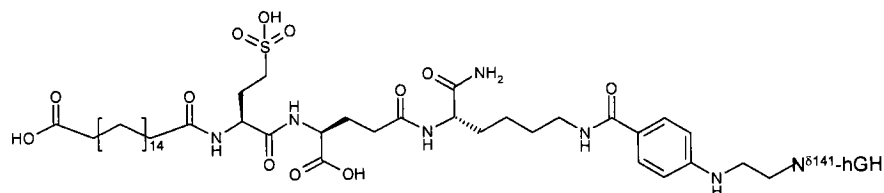
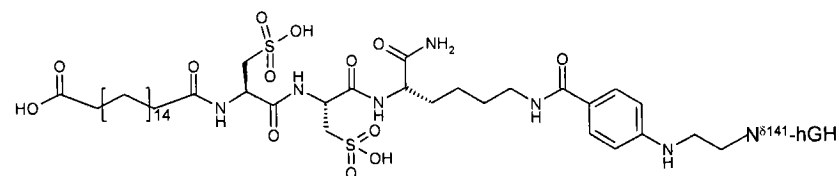
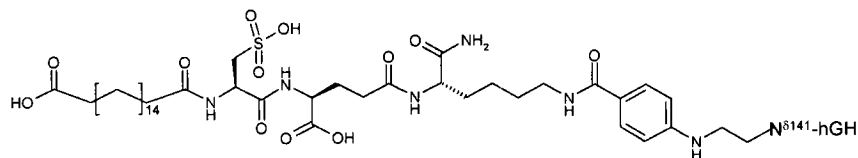
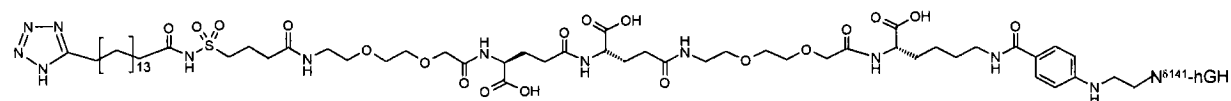
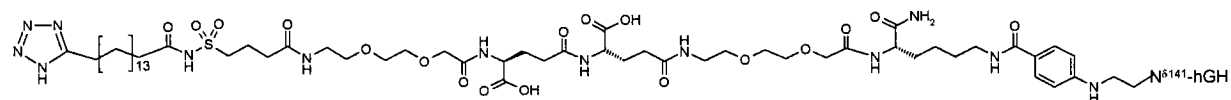
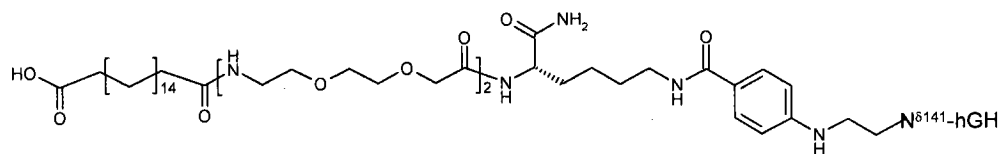
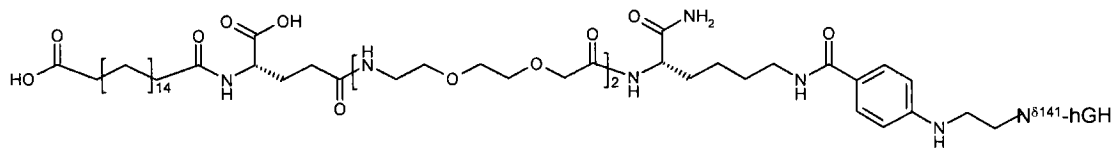
[0391] 44. 前述实施方案中任一个的缀合物,其中所述白蛋白结合残基为肽,例如包含少于 40 个氨基酸残基的肽。

[0392] 45. 前述实施方案中任一个的缀合物,其中所述化合物选自:

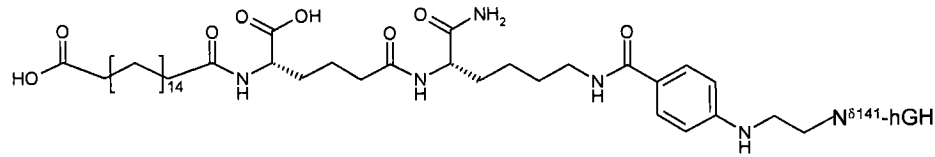
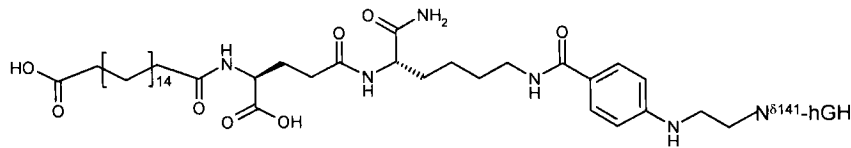
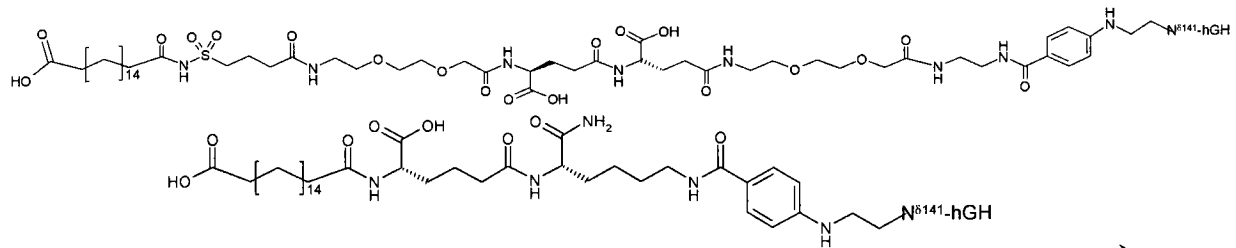
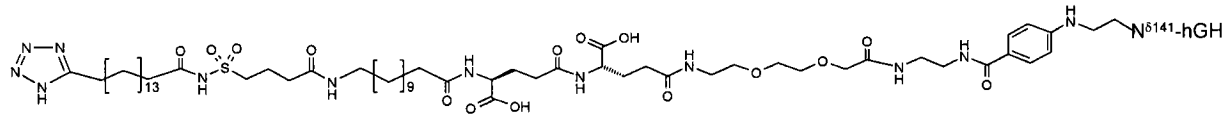
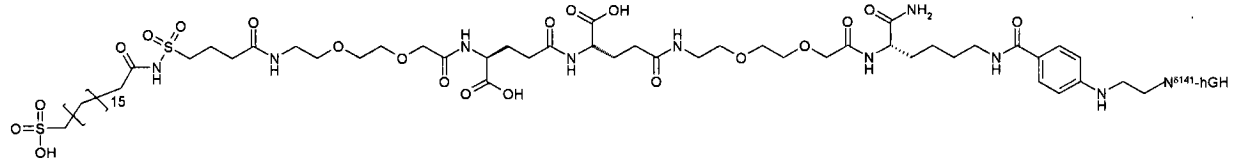
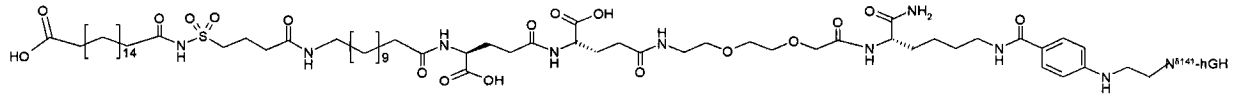
[0393]



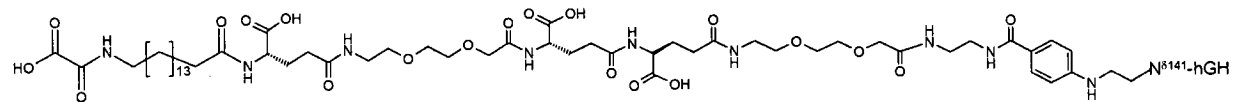
[0394]



[0395]



和



[0396] 46. 用于治疗的实施方案 1-45 中任一个的缀合物。

[0397] 47. 在以下方法中使用的实施方案 1-45 中任一个的缀合物,所述方法治疗特纳综合征;普-韦综合征(PWS);努南综合征;唐氏综合征;慢性肾脏疾病、幼年型类风湿关节炎、囊性纤维化、接受 HAART 治疗的儿童 HIV 感染(HIV/HALS 儿童);小于胎龄(SGA)出生的矮小儿童;非 SGA 的以极低出生体重(VLBW)出生的儿童的身材矮小症;骨骼发育不良;软骨发育不良;软骨发育不全;特发性身材矮小症(ISS);成人 GHD;长骨骨折,所述长骨例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨、跖骨和指骨;海绵骨例如头骨、手腕骨和脚底骨的骨折;例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者;进行或经历牵拉骨生成技术的患者;髌关节置换或关节盘置换、关节盘修复、脊柱融合或例如在膝、髌、肩、肘、腕或颌中的假体固定后的患者;其中已固定骨接合材料(例如钉、螺钉和板)的患者;骨折不愈合或

畸形愈合的患者 ;例如胫骨或第一脚趾的骨解剖后的患者 ;移植物植入后的患者 ;创伤或关节炎引起的膝关节软骨退化 ;特纳综合征患者中的骨质疏松症 ;男性骨质疏松症 ;长期透析的成年患者 (APCD) ;APCD 中营养不良相关的心血管疾病 ;APCD 中的恶病质逆转 ;APCD 中的癌症 ;APCD 中的慢性抽象性肺病 ;APCD 中的 HIV ;APCD 老年人 ;APCD 中的慢性肝病、APCD 中的疲劳综合征 ;克罗恩病 ;肝功能受损 ;具有 HIV 感染的男性 ;短肠综合征 ;向心性肥胖 ;HIV 相关脂肪营养不良综合征 (HALS) ;男性不育症 ;大选择性手术、酒精 / 药物解毒或神经创伤后的患者 ;老化 ;虚弱的老年人 ;骨关节炎 ;创伤性损伤的软骨 ;勃起功能障碍 ;纤维肌痛 ;记忆障碍 ;抑郁 ;外伤性脑损伤 ;蛛网膜下腔出血 ;极低出生体重 ;代谢综合征 ;糖皮质激素性肌病 ;糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症,加速肌肉组织、神经组织或伤口愈合 ;加速或改善流到损伤组织的血流 ;或降低损伤组织的感染率。

[0398] 48. 药物组合物,其包含任选与药学上可接受的赋形剂组合的实施方案 1-45 中任一个的缀合物。

[0399] 49. 制备实施方案 1-45 中任一个的缀合物的方法,所述方法包括通过 TG 酶方法将白蛋白结合剂接头引入重组产生的生长激素或生长激素类似物。

[0400] 50. 治疗生长激素缺乏 (GHD) 的方法,所述方法包括给予有需要的患者治疗有效量的实施方案 1-45 中任一个的缀合物。

[0401] 51. 一种方法,所述方法治疗特纳综合征 ;普 - 韦综合征 (PWS) ;努南综合征 ;唐氏综合征 ;慢性肾脏疾病、幼年型类风湿关节炎、囊性纤维化、接受 HAART 治疗的儿童 HIV 感染 (HIV/HALS 儿童) ;小于胎龄 (SGA) 出生的矮小儿童 ;非 SGA 的以极低出生体重 (VLBW) 出生的儿童的身材矮小症 ;骨骼发育不良 ;软骨发育不良 ;软骨发育不全 ;特发性身材矮小症 (ISS) ;成人 GHD ;长骨骨折,所述长骨例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨、跖骨和指骨 ;海绵骨例如头骨、手腕骨和脚底骨的骨折 ;例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者 ;进行或经历牵拉骨生成技术的患者 ;髋关节置换或关节盘置换、关节盘修复、脊柱融合或例如在膝、髋、肩、肘、腕或颞中的假体固定后的患者 ;其中已固定骨接合材料 (例如钉、螺钉和板) 的患者 ;骨折不愈合或畸形愈合的患者 ;例如胫骨或第一脚趾的骨解剖后的患者 ;移植物植入后的患者 ;创伤或关节炎引起的膝关节软骨退化 ;特纳综合征患者中的骨质疏松症 ;男性骨质疏松症 ;长期透析的成年患者 (APCD) ;APCD 中营养不良相关的心血管疾病 ;APCD 中的恶病质逆转 ;APCD 中的癌症 ;APCD 中的慢性抽象性肺病 ;APCD 中的 HIV ;APCD 老年人 ;APCD 中的慢性肝病、APCD 中的疲劳综合征 ;克罗恩病 ;肝功能受损 ;具有 HIV 感染的男性 ;短肠综合征 ;向心性肥胖 ;HIV 相关脂肪营养不良综合征 (HALS) ;男性不育症 ;大选择性手术、酒精 / 药物解毒或神经创伤后的患者 ;老化 ;虚弱的老年人 ;骨关节炎 ;创伤性损伤的软骨 ;勃起功能障碍 ;纤维肌痛 ;记忆障碍 ;抑郁 ;外伤性脑损伤 ;蛛网膜下腔出血 ;极低出生体重 ;代谢综合征 ;糖皮质激素性肌病 ;糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症,加速肌肉组织、神经组织或伤口愈合 ;加速或改善流到损伤组织的血流 ;或降低损伤组织的感染率,所述方法包括给予有需要的患者治疗有效量的实施方案 1-45 中任一个的缀合物。

[0402] 52. 实施方案 1-45 中任一个的缀合物在制备用于治疗生长激素缺乏 (GHD) 的药物中的用途。

[0403] 53. 实施方案 1-45 中任一个的缀合物在制备以下药物中的用途,所述药物用于

治疗特纳综合征；普-韦综合征 (PWS)；努南综合征；唐氏综合征；慢性肾脏疾病、幼年型类风湿关节炎、囊性纤维化、接受 HAART 治疗的儿童 HIV 感染 (HIV/HALS 儿童)；小于胎龄 (SGA) 出生的矮小儿童；非 SGA 的以极低出生体重 (VLBW) 出生的儿童的身材矮小症；骨骼发育不良；软骨发育不良；软骨发育不全；特发性身材矮小症 (ISS)；成人 GHD；长骨骨折，所述长骨例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨、跖骨和指骨；海绵骨例如头骨、手腕骨和脚底骨的骨折；例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者；进行或经历牵拉骨生成技术的患者；髋关节置换或关节盘置换、关节盘修复、脊柱融合或例如在膝、髋、肩、肘、腕或颞中的假体固定后的患者；其中已固定骨接合材料（例如钉、螺钉和板）的患者；骨折不愈合或畸形愈合的患者；例如胫骨或第一脚趾的骨解剖后的患者；移植物植入后的患者；创伤或关节炎引起的膝关节软骨退化；特纳综合征患者中的骨质疏松症；男性骨质疏松症；长期透析的成年患者 (APCD)；APCD 中营养不良相关的心血管疾病；APCD 中的恶病质逆转；APCD 中的癌症；APCD 中的慢性抽象性肺病；APCD 中的 HIV；APCD 老年人；APCD 中的慢性肝病、APCD 中的疲劳综合征；克罗恩病；肝功能受损；具有 HIV 感染的男性；短肠综合征；向心性肥胖；HIV 相关脂肪营养不良综合征 (HALS)；男性不育症；大选择性手术、酒精/药物解毒或神经创伤后的患者；老化；虚弱的老年人；骨关节炎；创伤性损伤的软骨；勃起功能障碍；纤维肌痛；记忆障碍；抑郁；外伤性脑损伤；蛛网膜下腔出血；极低出生体重；代谢综合征；糖皮质激素性肌病；糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症，加速肌肉组织、神经组织或伤口愈合；加速或改善流到损伤组织的血流；或降低损伤组织的感染率。

[0404] 除非另外指出或明显与上下文矛盾，否则使用关于一个或多个要素的术语（例如“包含”、“具有”、“包括”或“含有”）的本发明任何方面或实施方案的本文描述，旨在为“由”或“基本上由”具体一个或多个要素“组成”或者“基本包含”所述要素的本发明类似方面或实施方案提供支持（例如除非另外说明或明显与上下文矛盾，否则在本文描述为包含特定要素的组合物应理解为还描述了由该要素组成的组合物）。

[0405] 本发明包括在本文提出的方面或权利要求中所述主题的适用法律所允许的最大程度的所有修改及等同物。

[0406] 本发明进一步由以下实施例阐明，然而，该实施例不应理解为限制保护范围。揭示于前述说明和以下实施例中的特征单独或以其任意组合都可为用于以其多种形式实现本发明的素材。

## 实施例

[0407] 缩写：

[0408] amu = 原子质量单位

[0409] hr(s) = 小时

[0410] Hz = 赫兹

[0411] L = 升

[0412] M = 摩尔

[0413] mbar = 毫巴

[0414] mg = 毫克

[0415] min = 分钟

- [0416] mL = 毫升
- [0417] mM = 毫摩尔的
- [0418] mm = 毫米
- [0419] mmol = 毫摩尔
- [0420] nmol = 纳摩尔
- [0421] mol = 摩尔
- [0422] N = 标准
- [0423] nm = 纳米
- [0424] sec = 秒
- [0425] ppm = 百万分之几
- [0426] ESI = 电喷雾离子化
- [0427] i. v. = 静脉内
- [0428] m/z = 质荷比
- [0429] MS = 质谱
- [0430] HPLC = 高压液相色谱
- [0431] RP = 反相
- [0432] HPLC-MS = 高压液相色谱 - 质谱
- [0433] NMR = 核磁共振谱法
- [0434] p. o. = 口服
- [0435] rt 或 RT = 室温
- [0436] s. c. = 皮下
- [0437] tr = 保留时间
- [0438] Boc = 叔丁氧基羰基
- [0439] OtBu = 叔丁酯
- [0440] tBu = 叔丁基
- [0441] Boc-4-ABZ-OH = 4-叔丁氧基羰基氨基 - 苯甲酸
- [0442] DCM = 二氯甲烷、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、亚甲基氯
- [0443] DIC = 二异丙基碳二亚胺
- [0444] DIPEA = N, N-二异丙基乙胺
- [0445] DMF = N, N-二甲基甲酰胺
- [0446] DMSO = 二甲基亚砷
- [0447] DTT = 二硫苏糖醇
- [0448] EDAC = 盐酸 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺
- [0449]  $\text{Et}_2\text{O}$  = 二乙醚
- [0450] EtOAc = 乙酸乙酯
- [0451] Fmoc = 9H-芴-9-基甲氧基羰基
- [0452] Fmoc-Glu-O-t-Bu = N-Fmoc-谷氨酸-1-叔丁酯
- [0453] Fmoc-Lys(Mtt)-OH = (S)-6-[(二苯基-对甲苯基-甲基)-氨基]-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-己酸

- [0454] Fmoc-OEG-OH = (2[2-(Fmoc-氨基)乙氧基]乙氧基)乙酸
- [0455] H<sub>2</sub>O = 水
- [0456] HOBT = 1-羟基苯并三唑
- [0457] MeCN = 乙腈
- [0458] MeOH = 甲醇
- [0459] NaCl = 氯化钠
- [0460] NaOH = 氢氧化钠
- [0461] NMP = N-甲基吡咯烷-2-酮
- [0462] OEG = (2[2-(氨基)乙氧基]乙氧基)乙酸
- [0463] TFA = 三氟乙酸
- [0464] THF = 四氢呋喃
- [0465] TIS = 三异丙基甲硅烷
- [0466] CDCl<sub>3</sub> = 氘代氯仿
- [0467] CD<sub>3</sub>OD = 四氘代甲醇
- [0468] DMSO-d<sub>6</sub> = 六氘代二甲基亚砜
- [0469] 实施例亦利用以下通用方法：
- [0470] 用于制备 hGH 化合物的通用方法
- [0471] 将编码生长激素化合物的基因重组插入到质粒载体中。随后用质粒载体转化合适的大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株。hGH 或 GH 变体可含 N-末端甲硫氨酸或作为 MEAE 融合体表达，随后从该融合体切去 MEAE 序列。
- [0472] 在 25% 甘油中制备细胞储液，贮存在 -80°C。将甘油储液菌株接种到 LB 板中，随后在 37°C 培养过夜。用 LB 培养基洗涤每块板的内容物，并稀释到 500mL LB 培养基中用于表达。让培养物在 37°C 以 220rpm 振荡培养，直到 OD<sub>600</sub> 达到 0.6。用 0.2mM IPTG 在 25°C 连续诱导 6 小时。最后通过离心收获细胞。
- [0473] 随后让细胞悬浮在含有 0.05% Tween 20、2.5mM EDTA、10mM 半胱胺和 4M 脲的 10mM Tris-HCl, pH = 9.0 中，用细胞破碎仪以 30kPSI 破碎。通过离心收集上清液，随后进行色谱纯化。
- [0474] 用离子交换色谱和疏水作用实施纯化，接着用从 CHO 细胞表达的人二肽基肽酶 I (hDPPI) 去掉肽标签。最后通过等电点沉淀 (isoprecipitation) 和离子交换色谱来实现最后的纯化。亦可通过使用但不限于以下方法来实现纯化：离子交换色谱、疏水作用色谱、亲和色谱、大小排阻色谱和本领域技术人员已知的基于膜的分离技术。
- [0475] 纯化的生长激素化合物的蛋白质化学表征
- [0476] 用 MALDI-MS 分析完整的纯化的蛋白质。所观察到的质量对应于根据氨基酸序列推断的理论质量。
- [0477] 可通过肽作图法显示预期的二硫键连接，肽作图法用胰蛋白酶和 AspN 消化，接着在用 DTT 还原二硫键之前及之后对消化物进行 MALDI-MS 分析。
- [0478] 毛细管电泳
- [0479] 用 Agilent Technologies 3DCE 系统 (Agilent Technologies) 进行毛细管电泳。用 Agilent Technologies 3DCE ChemStation 进行数据获取和信号处理。毛细管为

64.5cm(56.0cm有效长度)50 $\mu$ m内径的来自Agilent的“延长光路径毛细管(Extended Light Path Capillary)”。在200nm(16nm Bw,参考380nm和50nm Bw)处实施UV检测。允许电解液为磷酸缓冲液50mM pH 7(方法A)。将毛细管用0.1M NaOH调适3min,然后用Milli-Q水调适2min,用电解液调适3min。在每次运行后,用milli-Q水冲洗毛细管2min,然后用磷酸冲洗2min,用milli-Q水冲洗2min。液力注射在50mbar下持续4.0秒完成。电压为+25kV。毛细管温度为30 $^{\circ}$ C,运行时间为10.5min。

[0480] MALDI-ToF 质谱

[0481] 用Autoflex MALDI-ToF仪器(Bruker)测定分子量。用 $\alpha$ -氰基-4-羟基-肉桂酸作为基质制备样品。

[0482] RP-HPLC

[0483] 在Agilent 1100系统上用Vydac 218TP54 4.6mm x 250mm 5 $\mu$ m C-18二氧化硅柱(The Separations Group, Hesperia)实施RP-HPLC分析。通过UV在214nm、254nm、280nm和301nm处检测。用0.1%三氟乙酸/H<sub>2</sub>O来平衡柱,通过0-90%乙腈对0.1%三氟乙酸/H<sub>2</sub>O的合适梯度洗脱样品。

[0484] LC-MS

[0485] 在PE-Sciex API 100或150质谱仪上实施LC-MS分析,所述质谱仪配备有两个Perkin Elmer Series 200微型泵、Perkin Elmer Series 200自动进样器、Applied Biosystems 785A UV检测仪和Sedex 75蒸发性光(Evaporative Light)散射检测仪。以1.5ml/min在室温洗脱Waters Xterra 3.0mm x 50mm 5 $\mu$ m C-18二氧化硅柱。其用5% MeCN/0.1% TFA/H<sub>2</sub>O平衡,并用5% MeCN/0.1% TFA/H<sub>2</sub>O洗脱1.0min,然后经7min用到90% MeCN/0.1% TFA/H<sub>2</sub>O的线性梯度洗脱。通过在214nm处UV检测和蒸发性光散射来检测。将柱洗出液流分引入到PE-Sciex API 100质谱仪的离子喷雾界面。在运行期间每2秒扫描一次300-2000amu质量范围。

[0486] 蛋白质定量

[0487] 通过用NanoDrop ND-1000UV-分光光度计测量280nm处的吸光度来估测蛋白质浓度。

[0488] 用于确定衍生位点的酶促肽作图法

[0489] 用Asp-N消化还原和烷基化的蛋白质来实施肽作图法。首先按照标准程序将蛋白质用DTT和碘乙酰胺处理。用HPLC纯化烷基化产物。随后用内切蛋白酶Asp-N(Boehringer)以1:100的酶:底物比率过夜消化烷基化的纯化产物。用C-18柱和标准TFA/MeCN缓冲系统HPLC分离消化物。将得到的肽图与未衍生的hGH的肽图比较,收集不同保留时间的流分,用MALDI-toF质谱进一步分析。

[0490] SDS page

[0491] 用NuPAGE 4%-12% Bis-Tris凝胶(Invitrogen NP0321BOX)实施SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳。银染(Invitrogen LC6100)或考马斯染色(Invitrogen LC6065)凝胶,其中如M. M. Kurfurst在Anal. Biochem. 200(2), 244-248, (1992)中所述还在相应位置用碘化钡染色用于PEG。蛋白质色谱法

[0492] 在Äkta Explorer色谱系统和来自GE Health Care的柱上实施蛋白质色谱法。用Q-Sepharose HP 26/10柱进行阴离子交换。起始缓冲液为20mM三乙醇胺缓冲液pH 8.5,

洗脱缓冲液为起始缓冲液 +0.2MNaCl。通常用 0-75%洗脱缓冲液的梯度经 15 个柱体积洗脱化合物。

[0493] 用 HiPrep 26/10 柱实施脱盐和缓冲液更换。

[0494] 实施例中所用 TG 酶为来自 US5156956 的茂原链轮丝菌的微生物转谷氨酰胺酶。

[0495] LogP 计算

[0496] 白蛋白结合剂部分和 / 或亲水间隔基部分的 LogP 值可用公开算法计算为 mLogP 和 / 或 cLogP(J. Am. Chem. Soc., 86(1964)5175-5180 " A New Substituent Constant,  $\epsilon$ , Derived from Partition Coefficients(来源于分配系数的新的取代常数  $\epsilon$ "); C. A. Lipinski 等 Advanced Drug Delivery Reviews, 23(1997)3-25, " Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings(在药物发现及开发环境中估测溶解性及渗透性的实验和计算方法)" ;和 I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, Chem. and Pharm. Bull., 42(1994)976-978 " Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods(由若干方法计算的药物 logP 值的可靠性比较)" 。本文中用来自 clogP 算法的 Tripos(<http://www.tripos.com>) 4.2 版本的 Sybyl 7.0 及其相关片段数据库的 22 版本计算 clogP-Pomona College logP(辛醇 / 水分配系数), 所述 22 版本由 BioByte Corp(<http://www.biobyte.com/>) 提供。

[0497] 测定 (I) 确定生长激素活性的 BAF-3GHR 测定

[0498] 对于生长和存活而言, BAF-3 细胞(源自骨髓的鼠前-B 淋巴样细胞系)最初为 IL-3 依赖性的。IL-3 激活 JAK-2 和 STAT, 它们为在刺激后 GH 激活的相同的介体。在人生长激素受体转染后, 细胞系变为生长激素依赖的细胞系。可将该克隆用于评估不同生长激素样品对 BAF-3GHR 存活的影响。

[0499] 让 BAF-3GHR 细胞于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下在饥饿培养基(无生长激素的培养基)中生长 24 小时。

[0500] 将细胞洗涤, 重新悬浮在饥饿培养基中, 接种到板上。将 10  $\mu$ l 不同浓度的生长激素化合物或人生长激素或对照加到细胞中, 让板在 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 中孵育 68 小时。

[0501] 将 AlamarBlue <sup>®</sup> 加到各孔中, 然后让细胞再孵育 4 小时。AlamarBlue <sup>®</sup> 为氧化还原指示剂, 通过细胞代谢固有的反应还原, 因此提供活细胞数的间接测量。

[0502] 最后, 在荧光板读数器中测量细胞的代谢活性。样品的吸光度表示为未用生长激素化合物刺激的细胞或对照的%, 可根据浓度-反应曲线计算活性(刺激 50% 细胞的化合物的量)。

[0503] 用于测量蛋白酶降解 GH 和 hGH 化合物缀合物的速率的测定

[0504] 用相关蛋白酶(胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、弹性蛋白酶、因子 VIIa、因子 Xa、蛋白酶 K、羧肽酶、DPPIV、中性肽链内切酶、粒酶 B、脯氨酸-肽链内肽酶、葡萄球菌肽酶 I、嗜热菌蛋白酶、凝血酶、Arg-C 蛋白酶、Asp-N 肽链内切酶、胰天蛋白酶 1-10、梭菌蛋白酶、肠激酶、谷氨酰基肽链内切酶、粒酶 B、LysC、LysN、脯氨酸-肽链内切酶和葡萄球菌肽酶 I 或组织提取物)在合适缓冲液(例如 PBS 或碳酸氢铵)中于 37°C 消化目的化合物直到 24 小时。通过 HPLC 测定评估蛋白水解降解。

[0505] 蛋白水解消化:

[0506] 通过酶在 37°C 降解碳酸氢铵缓冲液中的 1mg/mL 的 100  $\mu$ L 测试化合物溶液直至 24 小时。在不同时间点取子样品,通过 10 倍稀释到 1% TFA 中酸化样品来终止蛋白水解反应。通过反相 HPLC 分析这些稀释的样品,以评估蛋白水解消化的程度。

[0507] HPLC 方法:

[0508] 将 10  $\mu$ L 上述溶液注射入反相 Vydac C42 $\times$ 150mm 柱,经 30min 时间从 0.1% TFA/水至含 0.1% TFA 的 100% 乙腈的线性梯度洗脱,流速 0.2ml/min。在 214nm 处 UV 吸收检测峰。根据时间点  $t = T(A_T)$  的峰面积和  $t = 0(A_0)$  时的峰面积,将时间点  $t = T$  时完整化合物的百分比 (%) 计算为  $(A_T/A_0) \times 100\%$ 。用 GraphPad Prims 软件 5.01 版本将完整化合物百分比 (%) 对时间作图。亦通过 GraphPad Prism 软件按照单相衰减 (one phase decay) 计算半衰期 ( $T_{1/2}$ )。可使用的酶实例为弹性蛋白酶 (Sigma, 来自猪胰腺) 和胰凝乳蛋白酶 (Roche, 测序级)。缓冲液实例为 50mM 碳酸氢铵, pH = 8.5。

[0509] 药代动力学

[0510] 在雄性 Spraque Dawley 大鼠中经静脉 (i. v.) 和 / 或皮下 (s. c.) 单剂量给药后进行实施例中化合物的药代动力学研究。

[0511] 将试验化合物在稀释缓冲液中稀释至终浓度 1mg/mL, 所述稀释缓冲液由甘氨酸 20mg/mL、甘露醇 2mg/mL、NaHCO<sub>3</sub> 2.5mg/mL 组成, pH 调整至 8.2。

[0512] 试验化合物在重 250g 的雄性 Spraque Dawley 大鼠中研究。以 60nmol/kg 体重剂量用 25G 针在尾静脉 i. v. 单次注射或颈部 s. c. 单次注射给予试验化合物。

[0513] 对于每种试验化合物,按照表 1 中提出的以下方案进行血液取样。

[0514] 表 1. 每种试验化合物的血液取样方案

[0515]

动物 编号	RoA	前剂 量	取样时间(h)											
			0.08	0.25	0.5	1	2	4	6	8	18	24	48	72
1	s.c.							X	X	X		X	X	X
2								X	X	X		X	X	X
3				X	X	X	X							
4				X	X	X	X							
5			X									X		
6			X									X		
7	i.v.				X	X			X	X		X	X	X
8					X	X			X	X		X	X	X
9		X	X									X		
10		X	X									X		

[0516] 在每一取样时间,用 25G 针从尾静脉抽取 0.25mL 血液。将血液取样到 EDTA 覆盖的试验管中,并储存在冰上,直至 4°C 1200x G 离心 10min。将血浆转移至 Micronic 管并储存于 -20°C 直至分析。

[0517] 用豚鼠抗 hGH 多克隆抗体作为捕集物,用生物素化的 hGH 结合蛋白 (人 GH 受体的可溶部分) 作为检测物,通过夹心 ELISA 测定试验化合物的浓度。测定检测限为 0.2nM。

[0518] 用 WinNonlin Professional (Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA) 对每种试验化合物的平均浓度 - 时间曲线进行非房室型药代动力学分析。计算终末半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 和平均停留时间 (MRT) 的药代动力学参数估计值。

[0519] 在切除垂体的 Sprague Dawley 大鼠中的体内剂量 - 反应研究

[0520] 在切除垂体的雄性 Sprague Dawley 大鼠中研究体内剂量 - 反应关系。切除垂体的大鼠是熟知且公认的生长激素缺乏动物模型, 其中在手术移去脑垂体后没有出现生长激素的产生。这也导致低循环水平的胰岛素样生长因子-1 (IGF-1), 其为人生长激素缺乏的另一重要的临床特征。

[0521] 对 4 周龄、重 90-100g 的雄性大鼠切除垂体。手术后 3-4 周重 100-110g 的动物进入研究。手术后 3-4 周期间体重增加多于 10% 的动物不允许进入研究。

[0522] 通常用 1-150nmol/ 大鼠的 5 个剂量水平的试验化合物进行剂量反应研究。

[0523] 清除

[0524] 可在猪中测定清除速率, 通常至少 5 头杂种 LYD 母猪。将猪称重、禁食, 穿上特殊的“猪外套”以便携带  $\gamma$  计数器和发射器, 并在研究开始以前放入单栏饲养。所有猪开始研究前禁食 18 小时。

[0525] 分别用带有固定黑色针塞的 Novopen3<sup>®</sup> 和 NovoFine<sup>®</sup> 28G 针在颈部左侧和右侧为动物皮下给药 (60nmol)。注射深度为 5mm。在缓冲液中稀释试验溶液 (包括化合物), 所述缓冲液由甘氨酸 20mg/mL、甘露醇 2mg/mL、NaHCO<sub>3</sub> 2.4mg/mL 组成, 调整 pH 至 8.2。

[0526] 由 Chemistry&Isotope Lab. Novo Nordisk A/S 实施用 <sup>125</sup>I 进行的碘化。终放射活性制剂具有 3  $\mu$  Ci/mL 的放射活性比活, 并提供在 3mL 笔芯 (Penfills) 中。溶液储存于 2-8°C 直至使用。

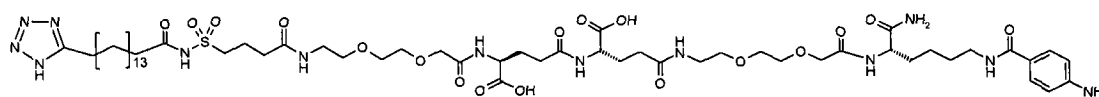
[0527] 通过便携式设备测量放射活性贮库的消失达约 24-48 小时。

[0528] 白蛋白结合剂的制备

[0529] 实施例 1

[0530] 四唑 OEG 接头 (I) :

[0531]

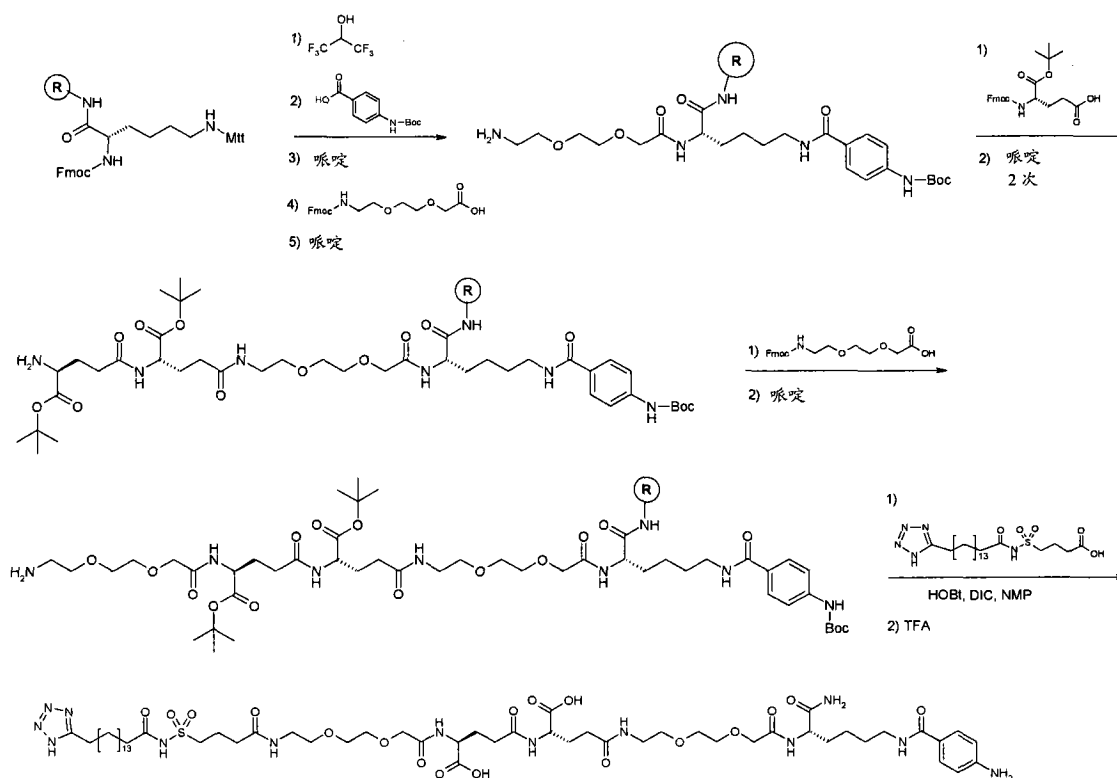


(I)

[0532] 按照流程 1 合成四唑 OEG 接头 (I)。

[0533] 流程 1

[0534]



[0535] 将 2g Rink- 酰胺 - 树脂 (2g, 0.6mmol/g) 称入到烧瓶中。用 NMP (3×30mL) 溶胀树脂 2 小时。

[0536] Fmoc 基团的去除:将树脂与含 25%哌啶的 NMP (30mL) 一起振摇 10min。将树脂排干并用含 25%哌啶的 NMP (30mL) 处理 1 小时,接着排干并用 NMP (6×30mL) 洗涤。

[0537] 将 Fmoc-Lys (Mtt)-OH 和 HOBT 称入烧瓶中,溶解于含溴酚蓝的 NMP (30mL, 0.5mM) 中。将该溶液加至上述排干的树脂,接着加入 DIC。将反应物在环境温度下振摇 21 小时。将树脂排干并用 NMP (6×30mL) 洗涤,接着用 DCM (3×30mL) 洗涤。

[0538] 将树脂用六氟异丙醇 (20mL) 处理 10min。振摇 10min。将树脂排干并用 DCM (3×30mL) 洗涤。再次将树脂用六氟异丙醇 (20mL) 处理 10min,并振摇 10min。将树脂排干并用 DCM (3×30mL) 洗涤,接着排干并用 NMP (3×30mL) 洗涤。

[0539] 将 Boc-4-ABZ-OH 和 HOBT 称入烧瓶中,溶解于含溴酚蓝的 NMP (30mL, 0.5mM) 中。将该溶液加至上述排干的树脂,接着加入 DIC。将反应物在环境温度下振摇。将树脂排干并用 NMP (6×30mL) 洗涤。

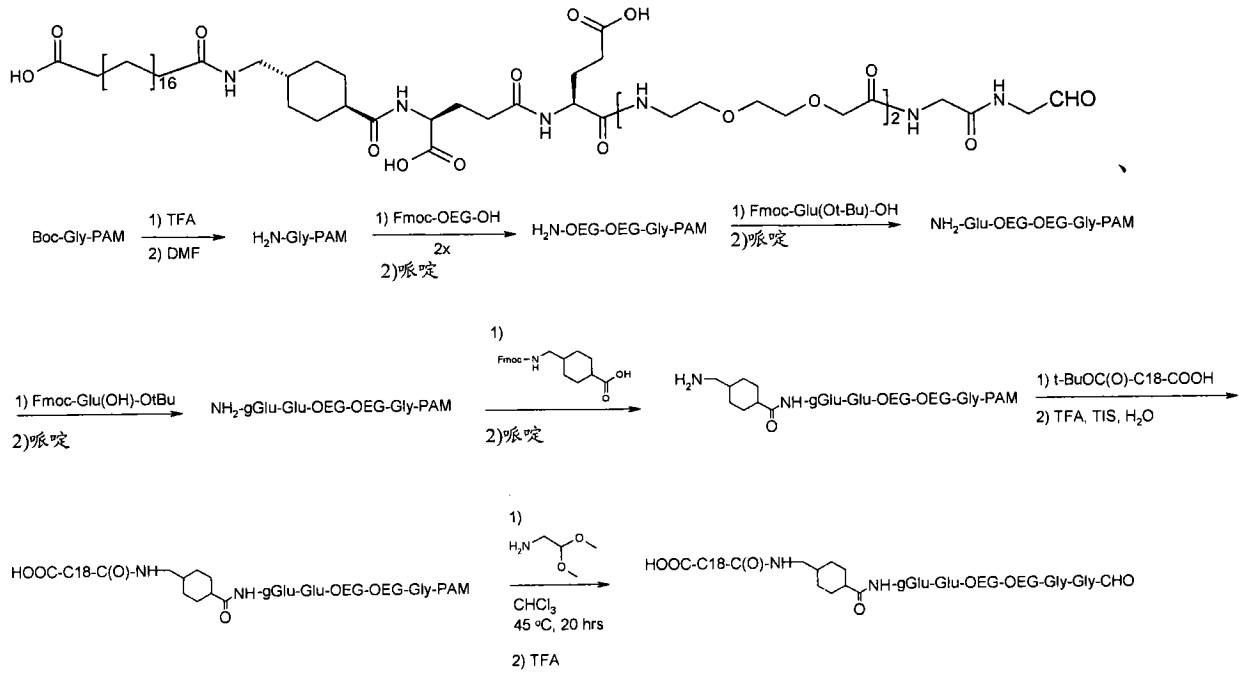
[0540] Fmoc 基团的去除:将树脂与含 25%哌啶的 NMP (10mL) 一起振摇 10min。将树脂排干并用含 25%哌啶的 NMP (10mL) 处理 1 小时,接着排干并用 NMP (6×15mL) 洗涤。

[0541] 将 Fmoc-OEG-OH 和 HOBT 称入烧瓶中,溶解于含溴酚蓝的 NMP (15mL, 0.5mM) 中。将该溶液加至所述排干的树脂,接着加入 DIC。将反应物在环境温度下振摇 23 小时。将树脂排干并用 NMP (6×15mL) 洗涤。

[0542] Fmoc 基团的去除:将树脂与含 25%哌啶的 NMP (10mL) 一起振摇 10min。将树脂排干并用含 25%哌啶的 NMP (10mL) 处理 1 小时,接着排干并用 NMP (6×15mL) 洗涤。

[0543] 将 Fmoc-Glu-O-t-Bu 和 HOBT 称入烧瓶中,溶解于含溴酚蓝的 NMP (15mL, 0.5mM)



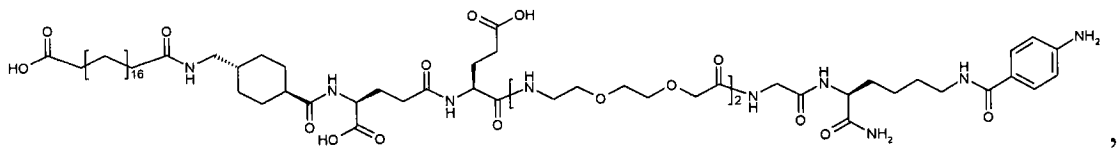


[0560] TOF-MS :质量 1128. 38

[0561] 实施例 4

[0562] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺 (amid) 树脂制备以下化合物。

[0563]

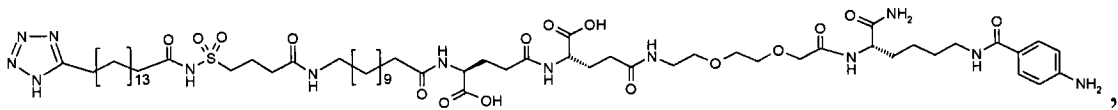


[0564] TOF-MS :质量 1333. 64

[0565] 实施例 5

[0566] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0567]

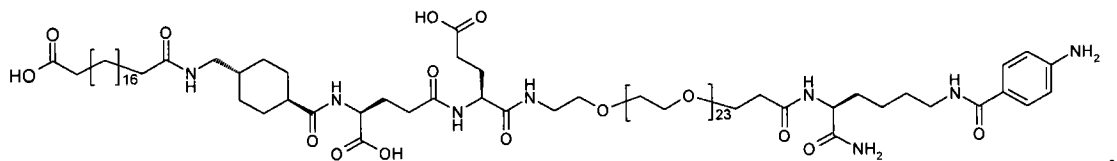


[0568] TOF-MS :质量 1320. 67

[0569] 实施例 6

[0570] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0571]

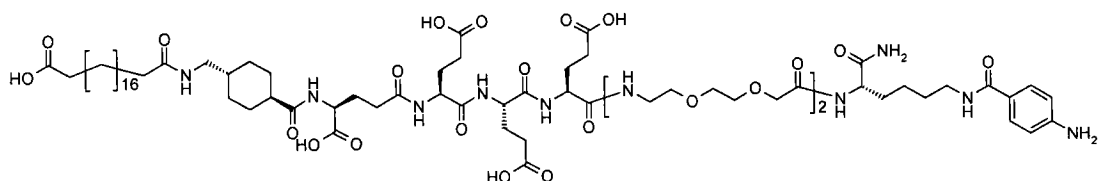


[0572] TOF-MS :质量 2114. 64

[0573] 实施例 7

[0574] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0575]

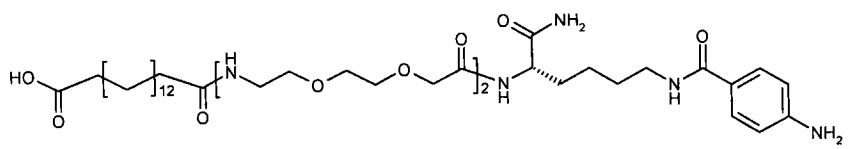


[0576] TOF-MS :质量 1534. 82

[0577] 实施例 8

[0578] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0579]

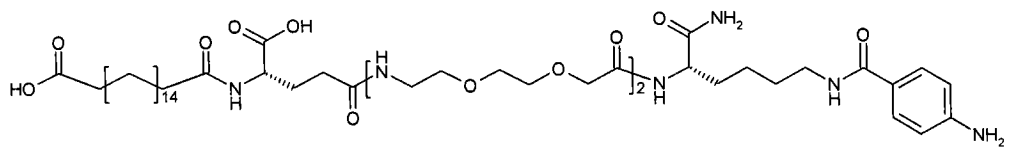


[0580] TOF-MS :质量 823. 05

[0581] 实施例 9

[0582] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Wang 树脂制备以下化合物。

[0583]

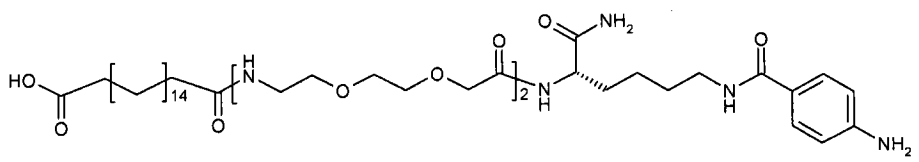


[0584] TOF-MS :质量 980. 22

[0585] 实施例 10

[0586] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0587]

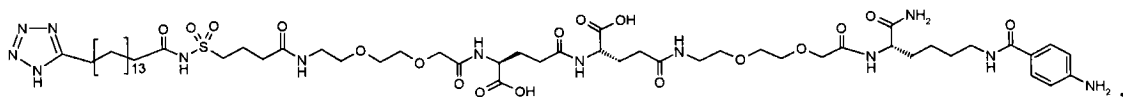


[0588] TOF-MS :质量 851. 10

[0589] 实施例 11

[0590] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0591]

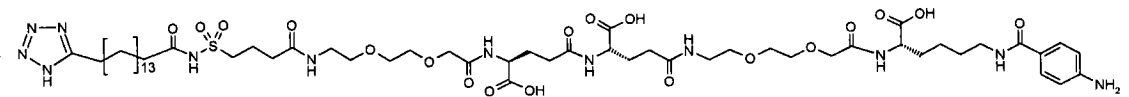


[0592] TOF-MS :质量 1258. 51

[0593] 实施例 12

[0594] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys (Mtt) -OH 和 Wang 树脂制备以下化合物。

[0595]

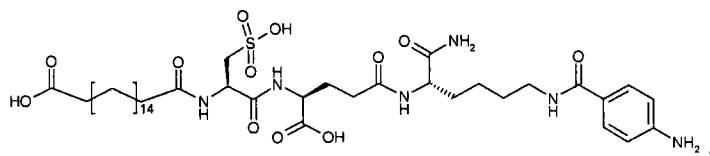


[0596] TOF-MS :质量 1269. 49

[0597] 实施例 13

[0598] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys (Mtt) -OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0599]

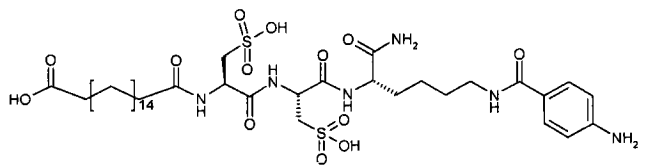


[0600] TOF-MS :质量 841. 04

[0601] 实施例 14

[0602] 可以以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys (Mtt) -OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0603]

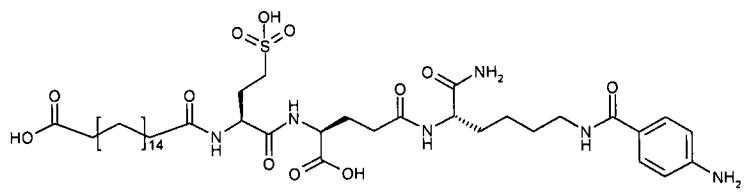


[0604] 计算的质量 863. 07

[0605] 实施例 15

[0606] 可以以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys (Mtt) -OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0607]

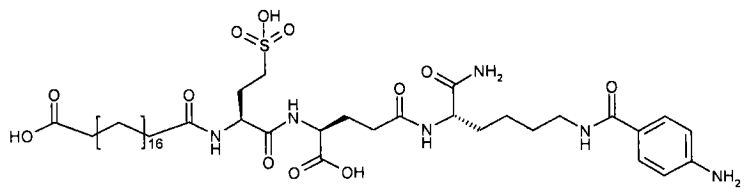


[0608] 计算的质量 855. 07

[0609] 实施例 16

[0610] 可以以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys (Mtt) -OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0611]

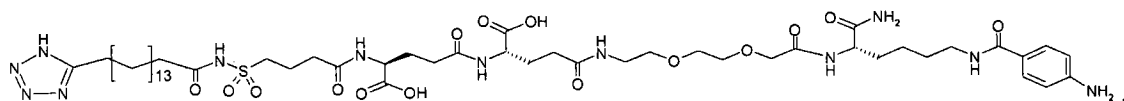


[0612] 计算的质量 883.12

[0613] 实施例 17

[0614] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0615]

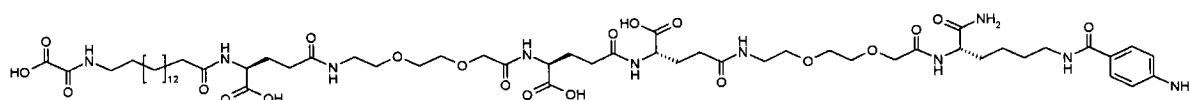


[0616] TOF-MS :质量 1123.35

[0617] 实施例 18

[0618] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0619]

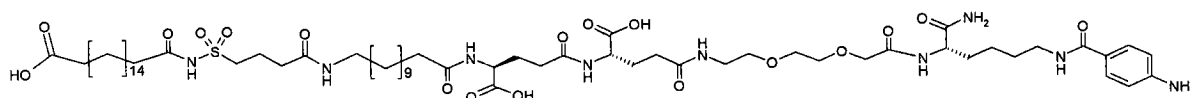


[0620] TOF-MS :Rt = 4,7min,质量 1267.45

[0621] 实施例 19

[0622] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0623]

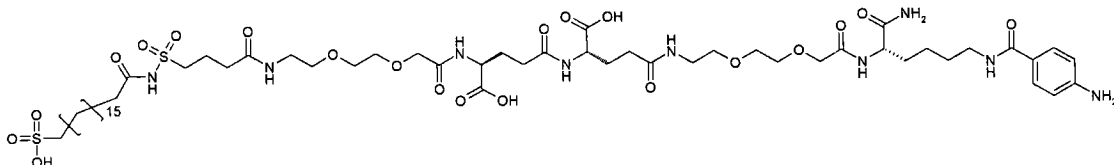


[0624] TOF-MS :质量 1310.67

[0625] 实施例 20

[0626] 可以以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0627]

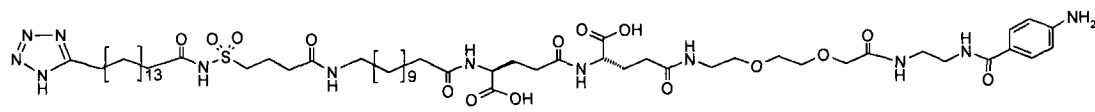


[0628] 计算的质量 1308.58

[0629] 实施例 21

[0630] 可以以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Glu(ODmab)-OH 和 2-氯三苯甲基氯树脂制备以下化合物。

[0631]

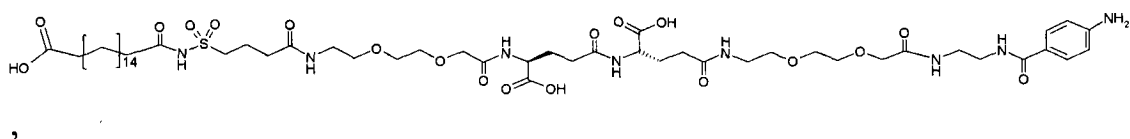


[0632] 计算的质量 1235.56

[0633] 实施例 22

[0634] 可以以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Glu(ODmab)-OH 和 2-氯三苯甲基氯树脂制备以下化合物。

[0635]

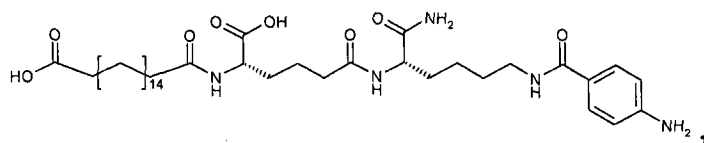


[0636] 计算的质量 1173.40

[0637] 实施例 23

[0638] 以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0639]

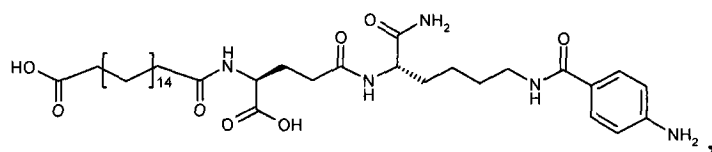


[0640] TOF-MS :质量 703.93

[0641] 实施例 24

[0642] 可以以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink 酰胺树脂制备以下化合物。

[0643]

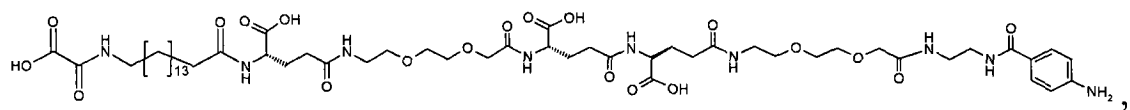


[0644] 计算的质量 689.90

[0645] 实施例 25

[0646] 可以以与以上实施例 1 所述相似方式,用 Fmoc-Glu(ODmab)-OH 和 2-氯三苯甲基氯树脂制备以下化合物。

[0647]



[0648] 计算的质量 1182.34

[0649] GH 白蛋白结合剂化合物的制备

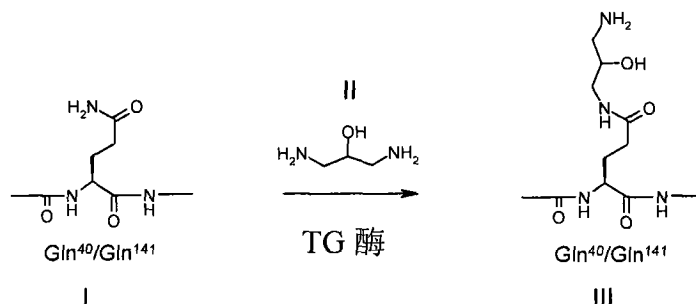
[0650] 实施例 26

[0651] 1. 通式 A-W-B1-NH<sub>2</sub> 的白蛋白结合剂与经转氨基和氧化的 GH 化合物 (I) 的偶联

[0652] 先前业已在 W02005/070468 中阐述了将转谷氨酰胺酶用于将醛柄在谷氨酰胺残基上连接至 GH。按照本发明可将该方法用于连接式 A-W-B1-NH<sub>2</sub> 的基于白蛋白结合剂的接头。所用 TG 酶为来自 US5156956 的茂原链轮丝菌的微生物转谷氨酰胺酶。

[0653] 反应可如下进行:最初如 W02005/070468 所述用 1,3-二氨基-2-丙醇 (II) 对 GH(I) 进行转氨基作用:

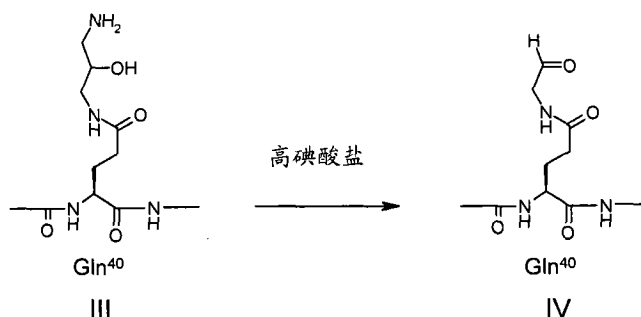
[0654]



[0655] 在下一步中,将高碘酸盐加到经转氨基的 GH(III) 中。通常在低温例如 4-10°C 任选在黑暗中经 30min 进行氧化。高碘酸盐可将 GH 中的甲硫氨酸残基氧化为其相应的甲硫氨酸亚砷残基。为了使该氧化风险最小化,可在高碘酸盐氧化期间加入小分子有机硫醚。合适的有机硫醚为 3-甲硫基丙-1-醇,但技术人员应能够提出其它硫醚。

[0656] 经转氨基的 GH 化合物 (III) 的氧化:

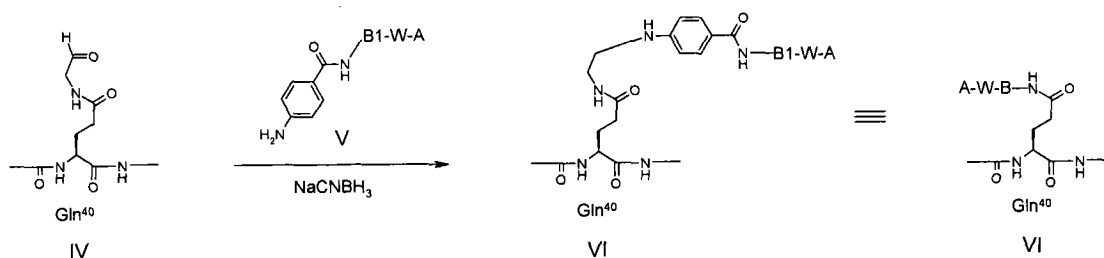
[0657]



[0658] 为了获得有效的氰基硼氢化钠还原所需的酸性溶液,可进行缓冲液更换。通常使用过量的 A-W-B1-NH<sub>2</sub> 胺,可随时间以较小部分加入氰基硼氢化钠。

[0659] 用白蛋白结合剂接头 (V) 使 (IV) 还原氨基化:

[0660]



[0661] 随后的反应可如下进行:

[0662] 向氧化的经转氨基的 GH(IV) 溶液中加入 pH 6.00 在 AcOH(1.5mL) 和 50mM

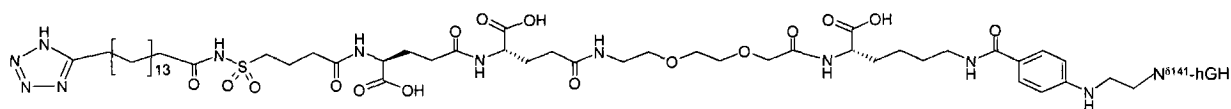
MES(0.5mL)的混合物中的白蛋白结合剂接头(V)溶液。在RT温和振荡得到的反应混合物30min,此时加入NaCNBH<sub>3</sub>溶液(15μL,(溶解在500μL Milli-Q水+AcOH(15μL)中的22mg NaCNBH<sub>3</sub>))。用锡箔盖住样品,并在RT搅拌过夜。

[0663] 可通过阴离子交换色谱如下分离缀合物:通过用Amicon Ultra15设备(Ultracel 10K管)以4000rpm/min离心3x8min让缓冲液与纯水更换(3X)来去掉乙酸。然后用Amicon Filter设备将混合物缓冲液更换为20mM TEA,pH:8.50,用20mM TEA稀释到50mL终体积,然后上样到HiLoad Q Sepharose,26/10柱。将柱开始用20mM TEA,pH 8.50(缓冲液A)洗涤,然后用20mM TEA、500mM NaCl,pH 8.50(缓冲液B)用经20CV的0-100%(B)梯度以2ml/min流速洗脱。用AmiconUltra15设备(Ultracel 10K管)通过以4000rpm/min离心3x8min将合并的流分缓冲液更换5次至含10mM碳酸氢铵缓冲液的纯水中。

[0664] 实施例 27

[0665] 可以以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 2 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0666]



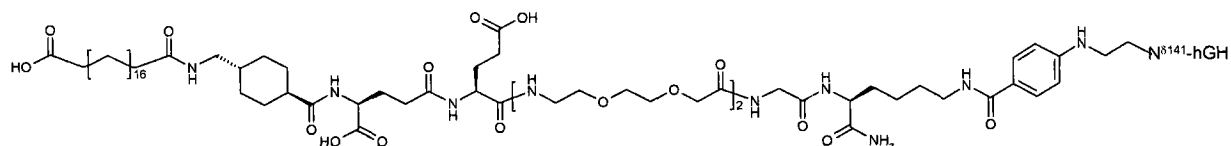
,

[0667] 计算的质量 23.473,81

[0668] 实施例 28

[0669] 以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 4 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0670]



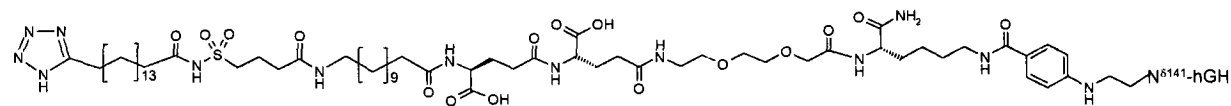
,

[0671] TOF-MS:质量 23.428

[0672] 实施例 29

[0673] 以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 5 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0674]



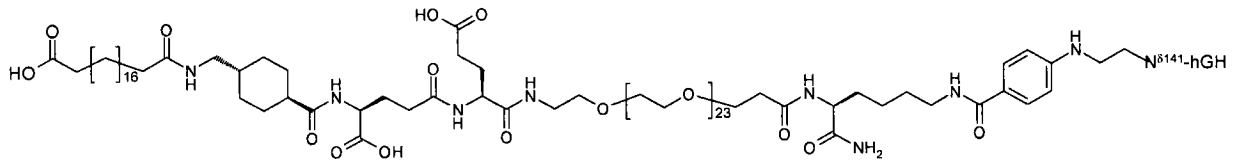
,

[0675] TOF-MS:质量 23.472,40

[0676] 实施例 30

[0677] 以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 6 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0678]



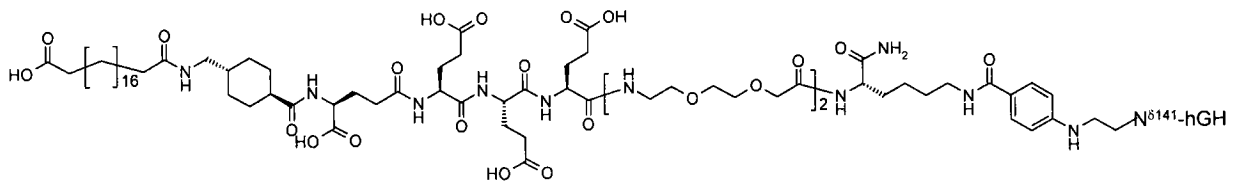
,

[0679] TOF-MS :质量 24. 265, 71

[0680] 实施例 31

[0681] 以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 7 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0682]



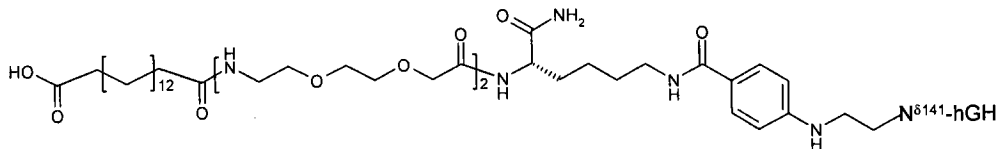
,

[0683] TOF-MS :质量 23. 686, 83

[0684] 实施例 32

[0685] 以与以上实施例 26 所述相似的方式用来自实施例 8 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0686]



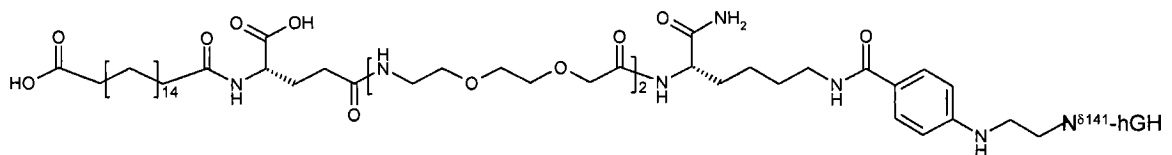
,

[0687] TOF-MS :质量 22. 974, 75

[0688] 实施例 33

[0689] 以与以上实施例 26 所述相似的方式用来自实施例 9 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0690]



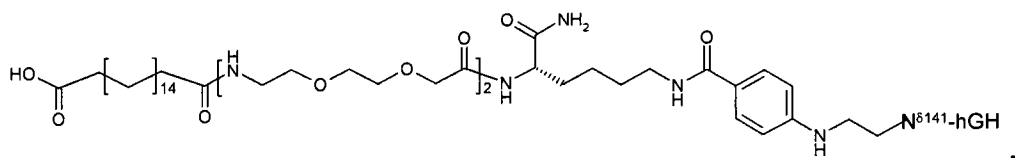
,

[0691] TOF-MS :质量 23. 131, 31

[0692] 实施例 34

[0693] 以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 10 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0694]

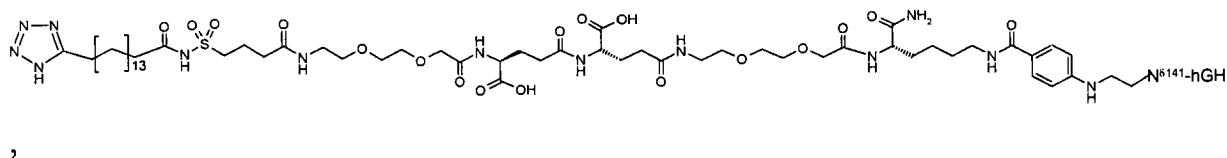


[0695] TOF-MS :质量 23. 002

[0696] 实施例 35

[0697] 以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 11 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0698]

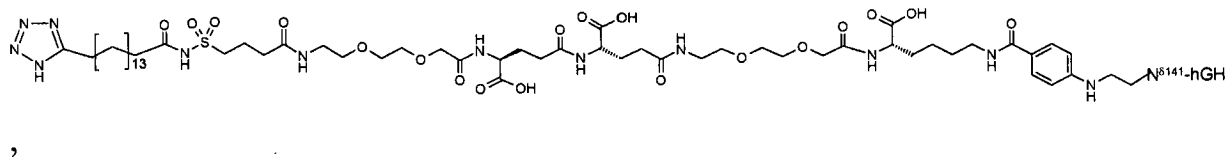


[0699] TOF-MS :质量 23. 419, 59

[0700] 实施例 36

[0701] 以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 12 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0702]

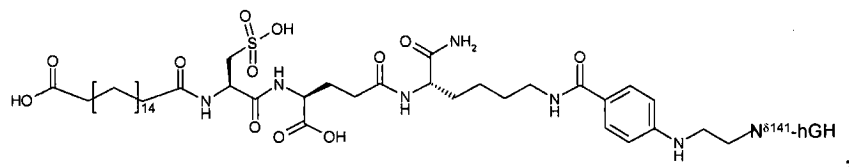


[0703] TOF-MS :质量 23. 420, 58

[0704] 实施例 37

[0705] 以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 13 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0706]

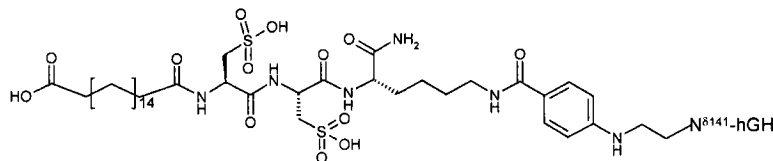


[0707] TOF-MS :质量 22. 992, 13

[0708] 实施例 38

[0709] 可以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 14 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

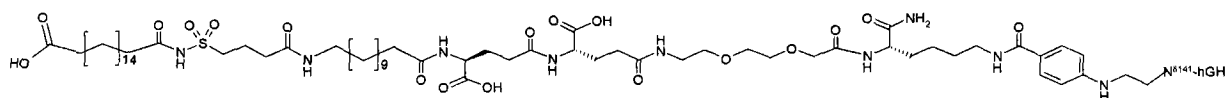
[0710]



[0711] 计算的质量 23. 015, 15

[0712] 实施例 39





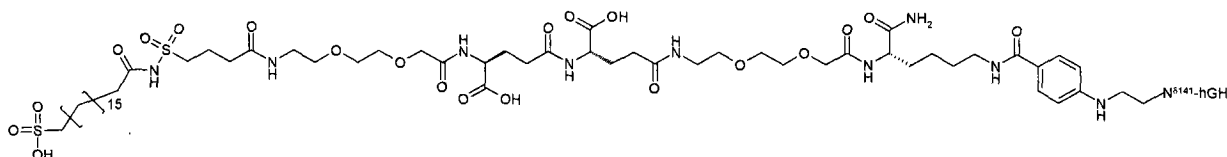
,

[0731] 计算的质量 23. 461, 75

[0732] 实施例 44

[0733] 可以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 20 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0734]



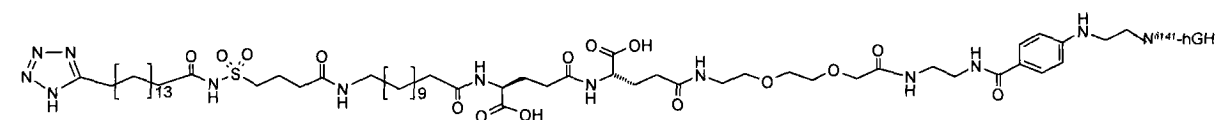
,

[0735] 计算的质量 23. 459, 67

[0736] 实施例 45

[0737] 可以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 21 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0738]



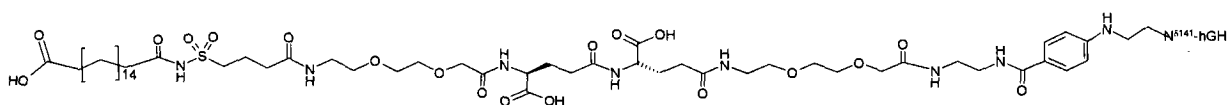
,

[0739] 计算的质量 23. 386, 65

[0740] 实施例 46

[0741] 可以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 22 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0742]



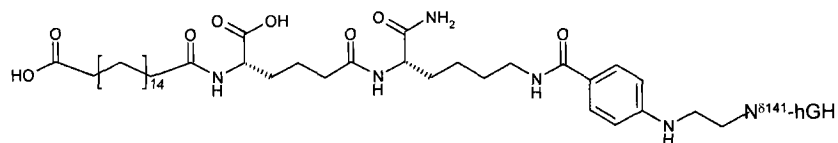
,

[0743] 计算的质量 23. 324, 48

[0744] 实施例 47

[0745] 以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 23 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0746]

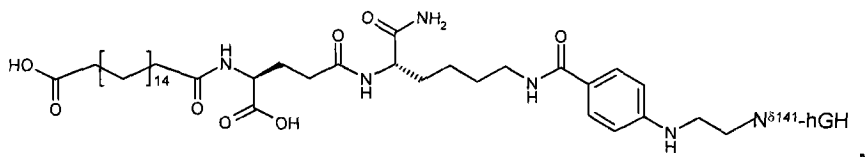


[0747] TOF-MS :质量 22. 841

[0748] 实施例 48

[0749] 可以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 24 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0750]

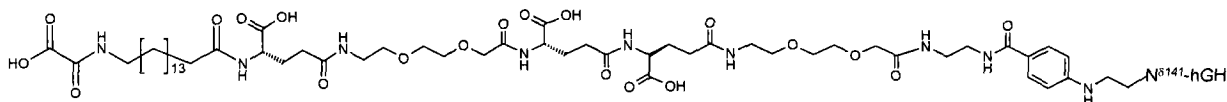


[0751] 计算的质量 22.826,97

[0752] 实施例 49

[0753] 可以与以上实施例 26 所述相似的方式,用来自实施例 25 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0754]



[0755] 实施例 50

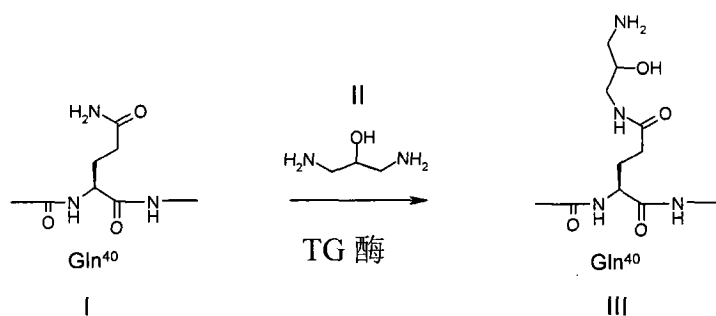
[0756] 通式 A-W-B1-NH<sub>2</sub> 的白蛋白结合剂与经转氨基和氧化的 GH 化合物 (I) 的偶联

[0757] 先前业已在 W02005/070468 中阐述了将转谷氨酰胺酶用于将醛把手柄在谷氨酰胺残基上连接至 GH。按照本发明可将该方法用于连接式 A-W-B1-NH<sub>2</sub> 的基于白蛋白结合剂的接头。所用 TG 酶为来自 US5156956 的茂原链轮丝菌的微生物转谷氨酰胺酶。

[0758] 反应可如下进行:最初如 W02005/070468 所述用 1,3-二氨基-2-丙醇 (II) 对 GH(I) 进行转氨基作用:

[0759] 从实施例 26 作为来自 CIE 色谱纯化的二元产物 (biprodukt) 获得经转氨基的 hGH Gln<sup>40</sup> (III)。

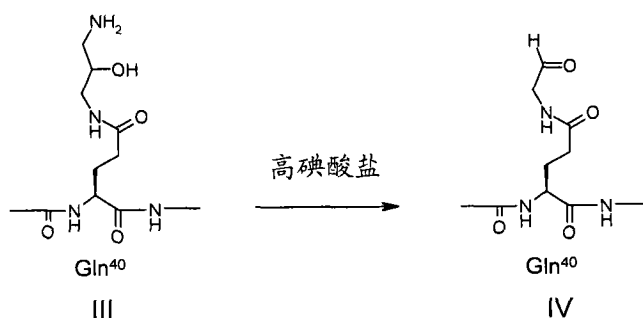
[0760]



[0761] 在下一步中,将高碘酸盐加到经转氨基的 GH(III) 中。通常在低温例如 4-10°C 任选在黑暗中经 30min 进行氧化。高碘酸盐可将 GH 中的甲硫氨酸残基氧化为其相应的甲硫氨酸亚砷残基。为了使该氧化风险最小化,可在高碘酸盐氧化期间加入小分子有机硫醚。合适的有机硫醚为 3-甲硫基丙-1-醇,但技术人员应能够提出其它硫醚。

[0762] 经转氨基的 GH 化合物 (III) 的氧化:

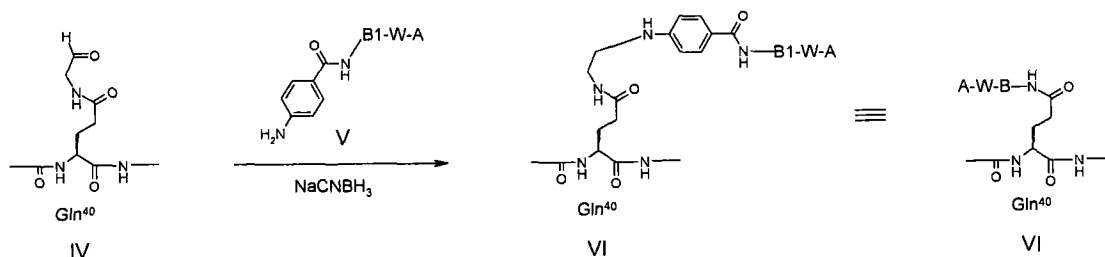
[0763]



[0764] 为了获得有效的氰基硼氢化钠还原所需的酸性溶液,可进行缓冲液更换。通常使用过量的 A-W-B1-NH<sub>2</sub> 胺,可随时间以较小部分加入氰基硼氢化钠。

[0765] 用白蛋白结合剂接头 (V) 使 (IV) 还原氨基化:

[0766]



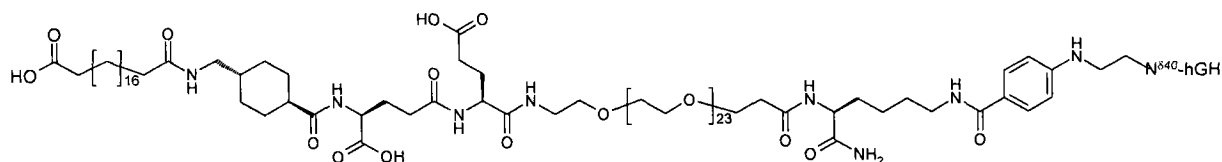
[0767] 随后的反应可如下进行:

[0768] 向氧化的经转氨基 GH(IV) 溶液中加入 pH 6.00 在 AcOH(1.5mL) 和 50mM MES(0.5mL) 的混合物中的胆汁酸接头 (V) 溶液。在 RT 温和振荡得到的反应混合物 30min, 此时加入 NaCNBH<sub>3</sub> 溶液 (15 μL, (溶解在 500 μL Milli-Q 水 +AcOH(15 μL) 中的 22mg NaCNBH<sub>3</sub>))。用锡箔盖住样品,并在 RT 搅拌过夜。

[0769] 可通过阴离子交换色谱如下分离缀合物:通过用 Amicon Ultra15 设备 (Ultracel 10K 管) 以 4000rpm/min 离心 3x8min 让缓冲液与纯水更换 (3X) 来去掉乙酸。然后用 Amicon Filter 设备将混合物缓冲液更换为 20mM TEA, pH:8.50, 用 20mM TEA 稀释到 50mL 终体积, 然后上样到 HiLoad Q Sepharose, 26/10 柱。将柱开始用 20mM TEA, pH 8.50 (缓冲液 A) 洗涤, 然后用 20mM TEA, 500mM NaCl, pH 8.50 (缓冲液 B) 用经 20CV 的 0-100% (B) 梯度以 2ml/min 流速洗脱。用 Amicon Ultra15 设备 (Ultracel 10K 管) 通过以 4000rpm/min 离心 3x8min 将合并的流分缓冲液更换 5 次至含 10mM 碳酸氢铵缓冲液的纯水。

[0770] 以与以上实施例 50 所述相似的方式,用来自实施例 6 的白蛋白结合剂制备以下化合物。

[0771]



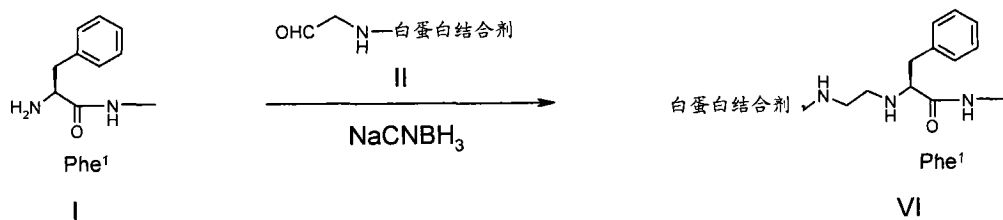
[0772] TOF-MS :Rt = 4,7min, 质量 23.473,81

[0773] 实施例 51

[0774] 1. GH 化合物 (I) 在 N- 末端与白蛋白结合剂 (II) 的偶联

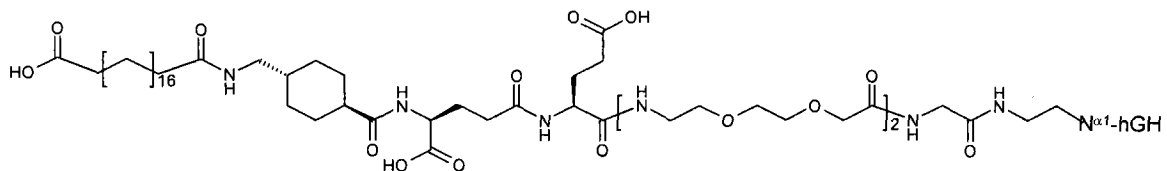
[0775] (A) 用白蛋白结合剂醛 (II) 使 (I) 还原烷基化

[0776]



[0777] 如实施例 3 中所述获得白蛋白结合剂 (II)。

[0778]



[0779] 2-(C<sub>20</sub> 二酸 -Trx-γ Glu-Glu-OEG-OEG-Gly- 甘氨酸酰胺 (Glycin amid))- 乙基 -N<sup>α1</sup>-hGH

[0780] 将 hGH(23mg) 溶解在 HEPES 缓冲液 (2, 3mL 0, 25mM pH 7, 0) 中。

[0781] 用 TFA(50 μL) 将 C20 二酸 -Trx-γ Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly- 二甲基乙缩醛 (2mg, 参见以上实施例 3) 处理 6min., 在真空中蒸发到干燥。用 EtOH(200 μL) 反萃取残留物, 在真空中蒸发到干燥。让残留物溶解在 DMF(100 μL) 中, 加入到 hGH 溶液中。形成沉淀, 并通过加入 DMF(1mL) 重新溶解。1 小时后分部 (portionwise) 加入 NaCNBH<sub>3</sub>(20mg, 在 0, 5mL MeCN(230 μL) 中) 溶液并静置 20 小时。通过加入 AcOH(2mL) 淬灭反应, 用水稀释到总体积 20ml, 在制备型 HPLC 的 C18 柱上用 MeCN/0, 1% TFA 从 40-80% (相对于 0, 1% TFA/水) 的梯度纯化。收集最后的洗脱峰, 用水将 70% MeCN 稀释到 10%, 冻干得到 4, 51mg 的化合物。

[0782] TOF-MS : 质量 23. 237, 6

[0783] 实施例 52

[0784] 在一种或多种上文所述测定中检测本文所述 GH 化合物。

[0785] 测定了基于 BAF 测定的 EC<sub>50</sub> 值以及半衰期 (T<sub>1/2</sub>) 和平均停留时间 (MRT), 并包括在下表 2 中。

[0786] 如上所述在 5 头杂种 LYD 母猪中测量所选择的化合物的清除速率。结果作为 AUC(0-45 小时) 呈提在表 2 中。

[0787] 表示为通过以上所述方法测定的间隔基 (B) 的 cLogP 的溶解性增强特性亦包括在表 2 中。

[0788] 通过 Biacor 和或 HPLC 测定的白蛋白结合亲和力亦包括在表中。

[0789] 也包括与聚乙二醇化 hGH 化合物相关的数据。PEG-hGH 与揭示于 WO2006024953A2 的实施例 1 中的化合物相同。

[0790] 表 2

[0791]

化合物	白蛋白结合剂和连接	间隔基(B) <sup>1</sup> 的溶解性 cLogP	EC50/效力 (BAF)	T <sub>1/2</sub> (i.v. 大鼠) (小时)	平均停留时间 (MRT)	清除 AUC (0-45 小时)	白蛋白结合剂亲和力 (Biacor)	白蛋白结合 (HPLC) (Rt, min)
hGH	-	-	1	0.15	-	519	-	0.36
hGH-PEG	-	-	26	5.8	-	2426	-	-
实施例 28	Gln141 实施例 4	-5.32	1.4	1.6	8.3	ND	0.58	7.16
实施例 29	Gln141 实施例 5	0.25	1.3	1.5	12.3	1659	0.50	6.76
实施例 30	Gln141 实施例 6	-6.79	1.5	2	3.6	2283	0.76	7.00
实施例 31	Gln141 实施例 7	-7.05	1.7	ND	ND	1977	0.65	7.46
实施例 32	Gln141 实施例 8	-0.44	0.3	ND	ND	1500	ND	4.25
实施例 33	Gln141 实施例 9	-2.17	0.63	ND	ND	1789	0.02	6.57
实施例 34	Gln141 实施例 10	-0.44	0.62	0.84	ND	903	ND	6.01
实施例 35	Gln141 实施例 11	-3.43	0.78	1.6	7.0	ND	0.23	6.75
实施例 36	Gln141 实施例 12	-2.43	0.84	1.8	7.4	1606	0.41	6.88
实施例 37	Gln141 实施例 13	-5.07	0.64	0.86	1.5	1260	ND	6.45
实施例 41	Gln141 实施例 17	-2.74	2.52	2.3	6.2	1570	0.29	7.06
实施例 42	Gln141 实施例 18	-4.76	2.10	ND	ND	ND	ND	5.69
实施例 47	Gln141 实施例 23	-0.67	ND	ND	ND	ND	ND	7.00

[0792]

实施例 50	Gln40 实施例 6	-6.79	1.60	2.8	4.3	ND	0.55	ND
实施例 51	N-末 端 实施例 3	-5.87	2.80	2.5	11.6	1935	0.74	7.07

[0793] <sup>1)</sup> 出于计算目的,\* 已在单独的 B- 间隔基成分中设成碳

[0001]

CPCH1260017P

## 序 列 表

&lt;110&gt; 诺沃—诺迪斯克保健股份有限公司

C. 贝伦斯

J. 布夏特

L. 诺斯科夫-劳里特森

J. 苏

H. S. 安德森

N. L. 约翰森

&lt;120&gt; 具有延长的体内功效的生长激素

&lt;130&gt; 7928.204-W0

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 191

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人类(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 1

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg

1

5

10

15

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu

20

25

30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro

35

40

45

[0002]

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

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

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

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

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

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

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr  
 145 150 155 160

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

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