

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5875527号
(P5875527)

(45) 発行日 平成28年3月2日 (2016.3.2)

(24) 登録日 平成28年1月29日 (2016.1.29)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K	14/61	(2006.01)	C O 7 K	14/61	Z N A
A 6 1 K	47/48	(2006.01)	A 6 1 K	47/48	
A 6 1 K	38/27	(2006.01)	A 6 1 K	37/36	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

請求項の数 5 (全 169 頁)

(21) 出願番号 特願2012-549377 (P2012-549377)
 (86) (22) 出願日 平成23年1月24日 (2011.1.24)
 (65) 公表番号 特表2013-518038 (P2013-518038A)
 (43) 公表日 平成25年5月20日 (2013.5.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/050923
 (87) 国際公開番号 W02011/089255
 (87) 国際公開日 平成23年7月28日 (2011.7.28)
 審査請求日 平成26年1月20日 (2014.1.20)
 (31) 優先権主張番号 61/297, 305
 (32) 優先日 平成22年1月22日 (2010.1.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 10151405.7
 (32) 優先日 平成22年1月22日 (2010.1.22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者 511031755
 ノヴォ・ノルディスク・ヘルス・ケア・ア
 ーゲー
 スイス・CH-8050・チューリッヒ・
 サーガウアーシュトラッセ・36/38
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦
 (72) 発明者 カルステン・ペーレンス
 デンマーク・DK-2880・ハウスベア
 ・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・
 ノルディスク・アー／エス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *in vivo* における効力が延長された成長ホルモン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I):

A-W-B-GH (I)

(式中、

GHは、対応するhGH(配列番号1)のT3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187CおよびG190Cのいずれか1つから選択される、単一Cys変異を有する成長ホルモン化合物を表し、

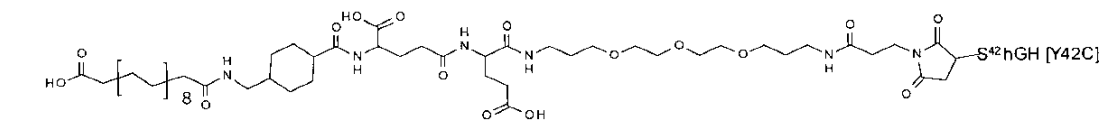
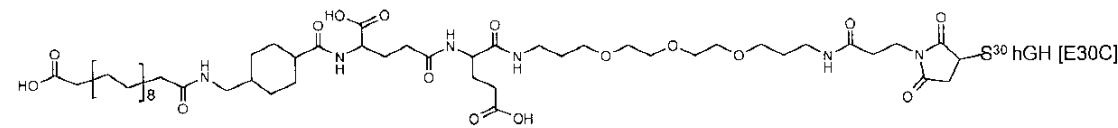
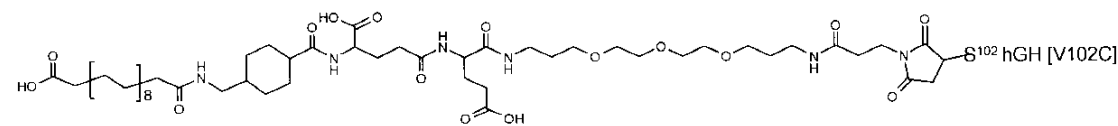
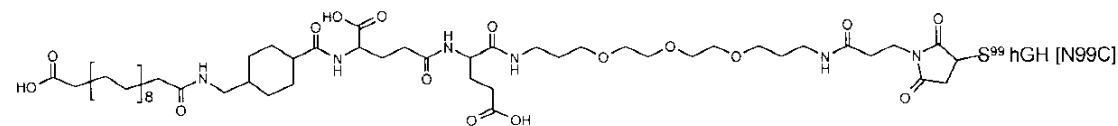
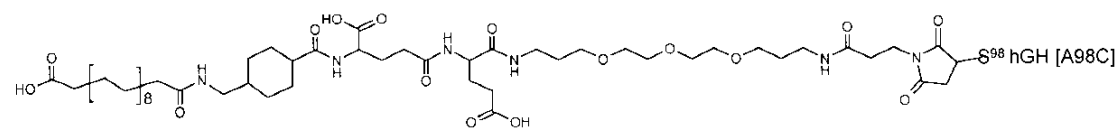
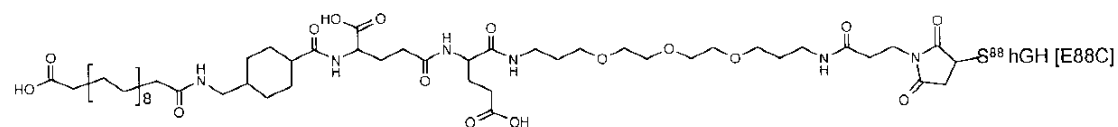
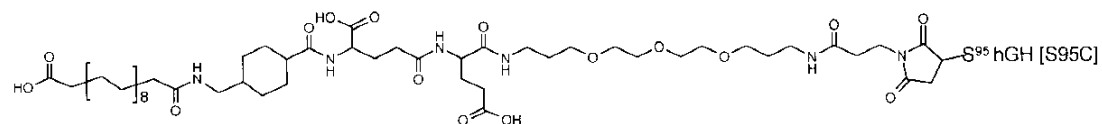
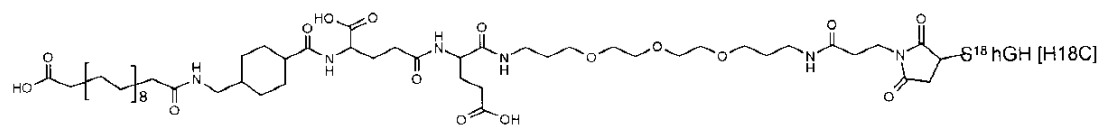
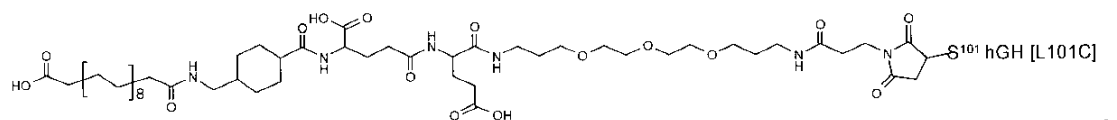
Bは親水性スペーサーを表し、

Wは、AとBを連結する化学基であり、

Aはアルブミン結合残基を表す)

を有し、前記親水性スペーサー(B)を介する前記アルブミン結合残基(A)が、前記単一Cysを介して前記GHに連結している成長ホルモンコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩であって、前記化合物が

【化 1】

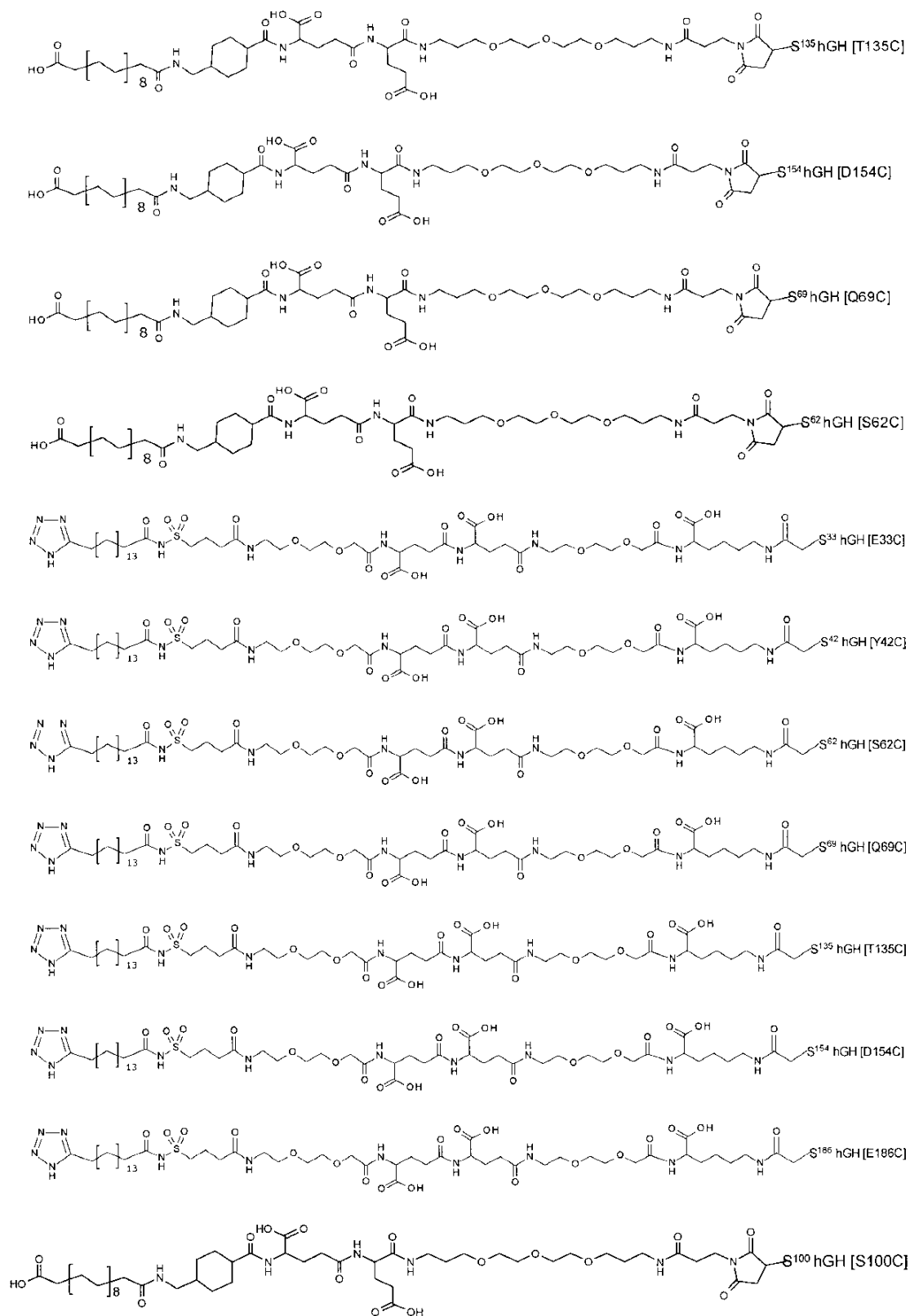


10

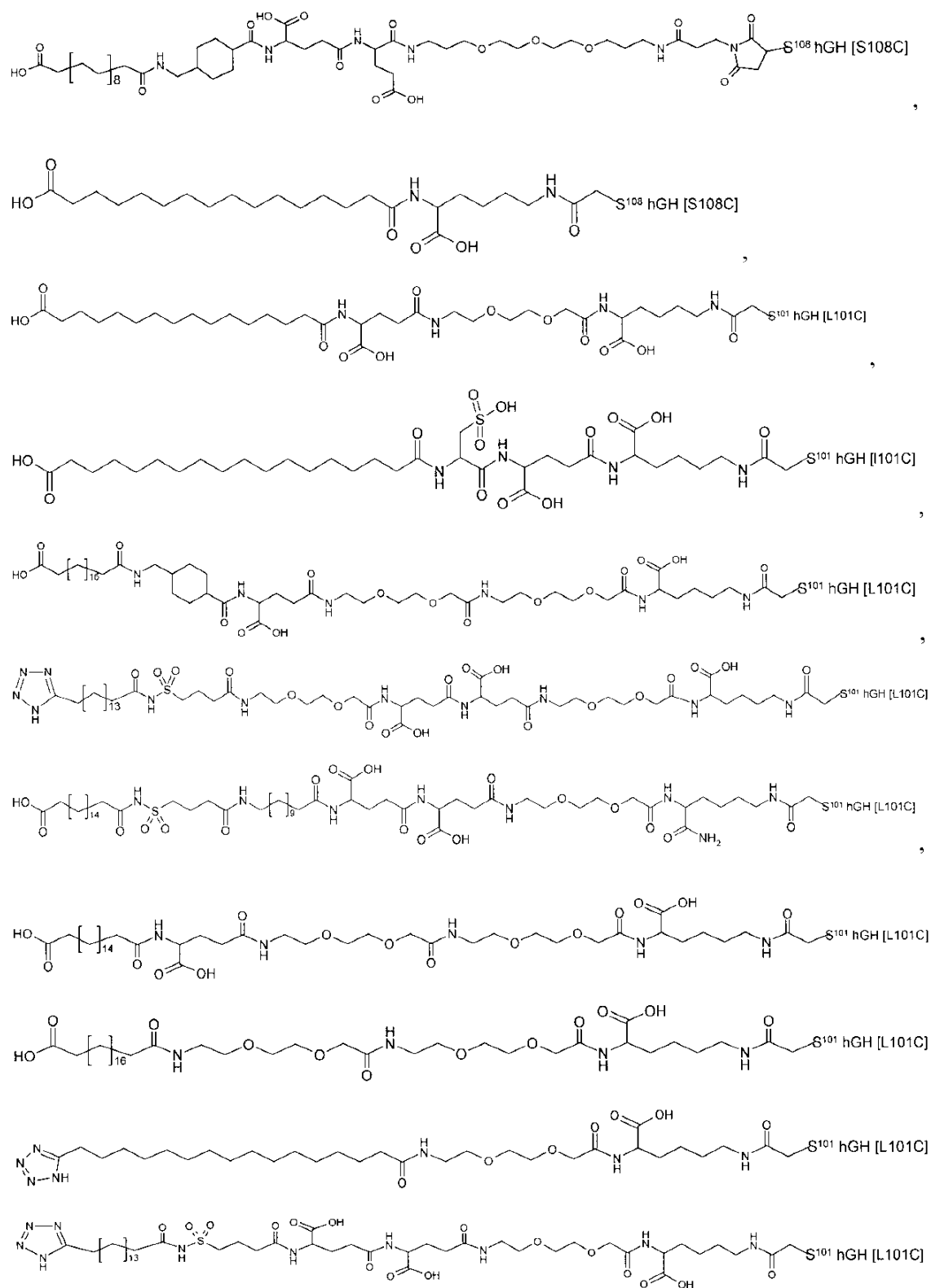
20

30

【化 2】



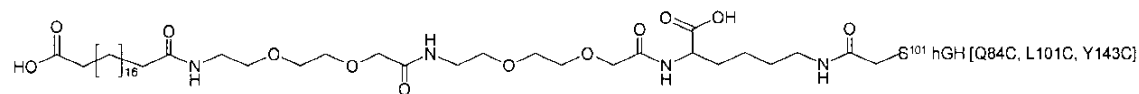
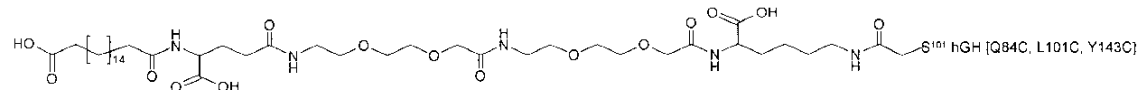
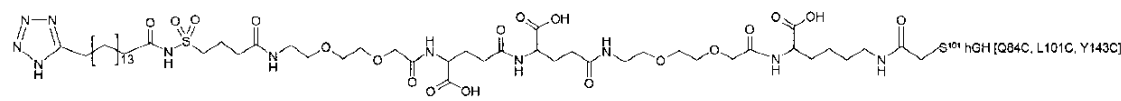
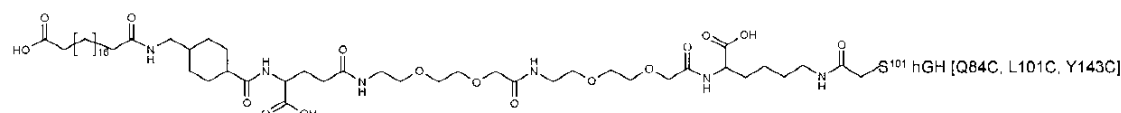
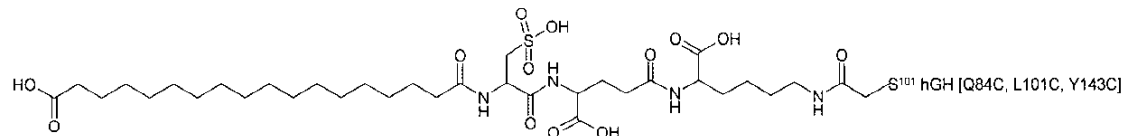
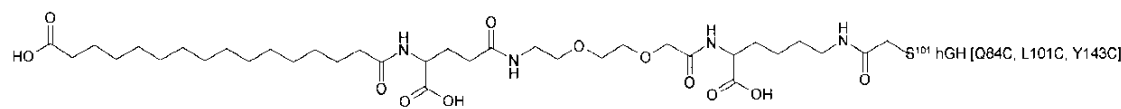
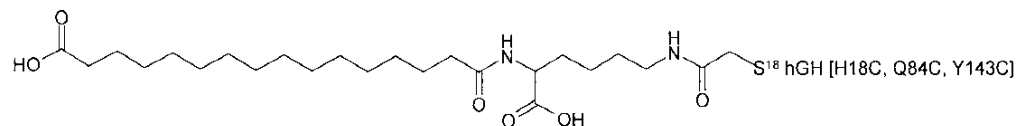
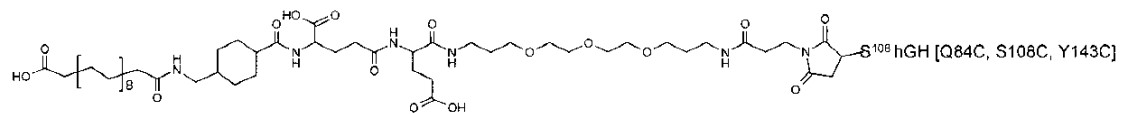
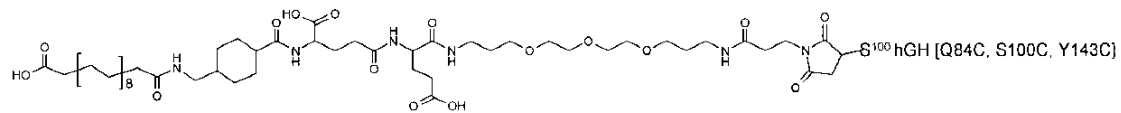
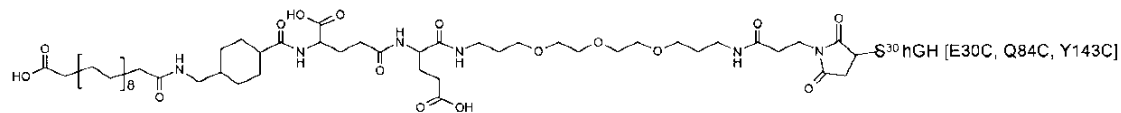
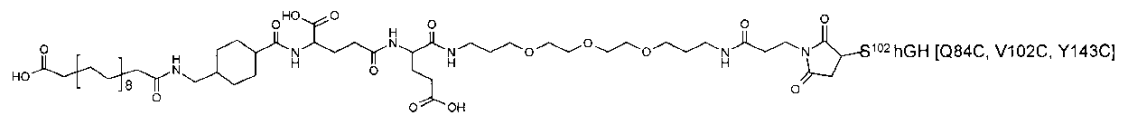
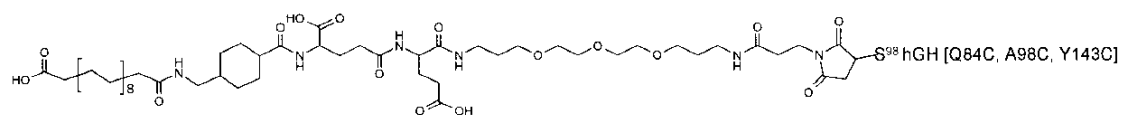
【化 3】



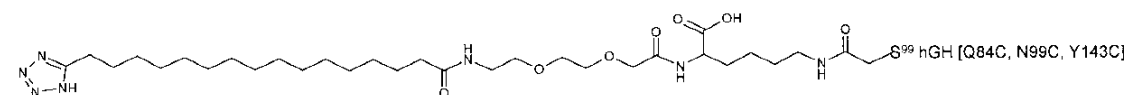
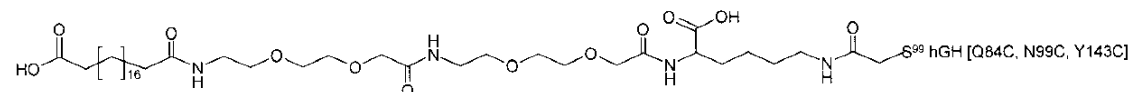
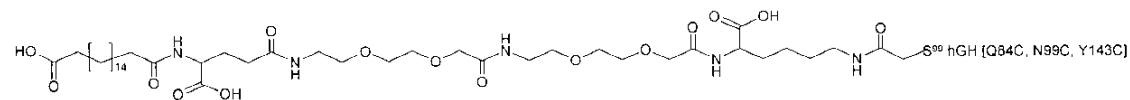
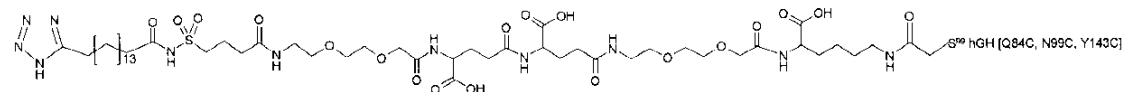
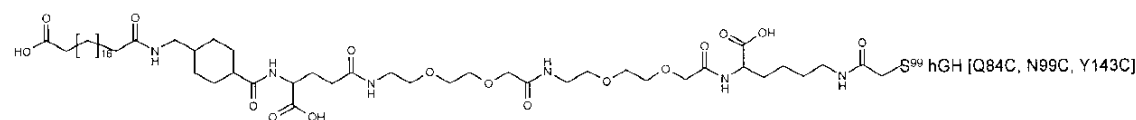
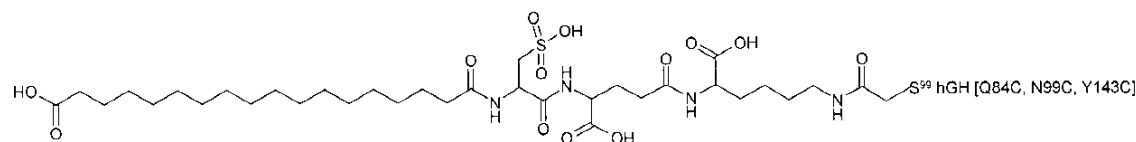
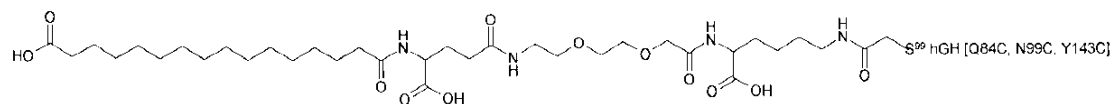
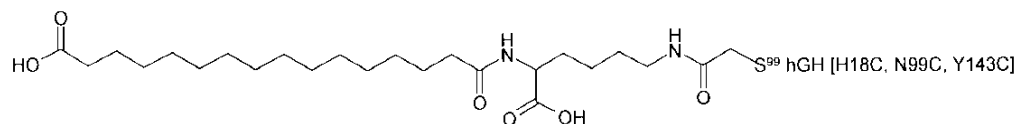
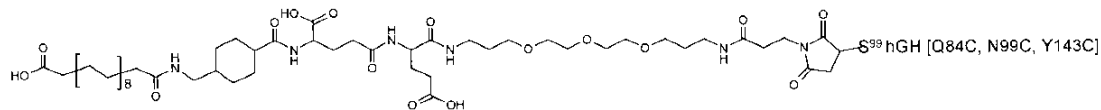
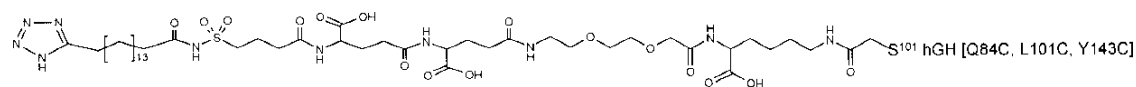
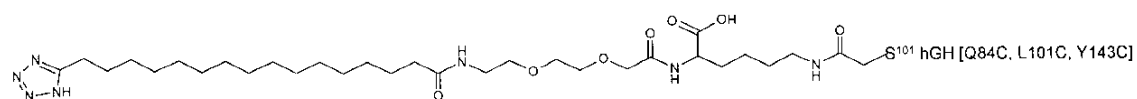
【化 4】



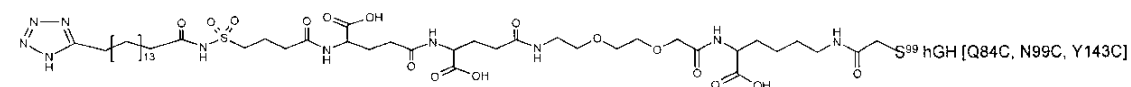
【化 5】



【化6】



及び

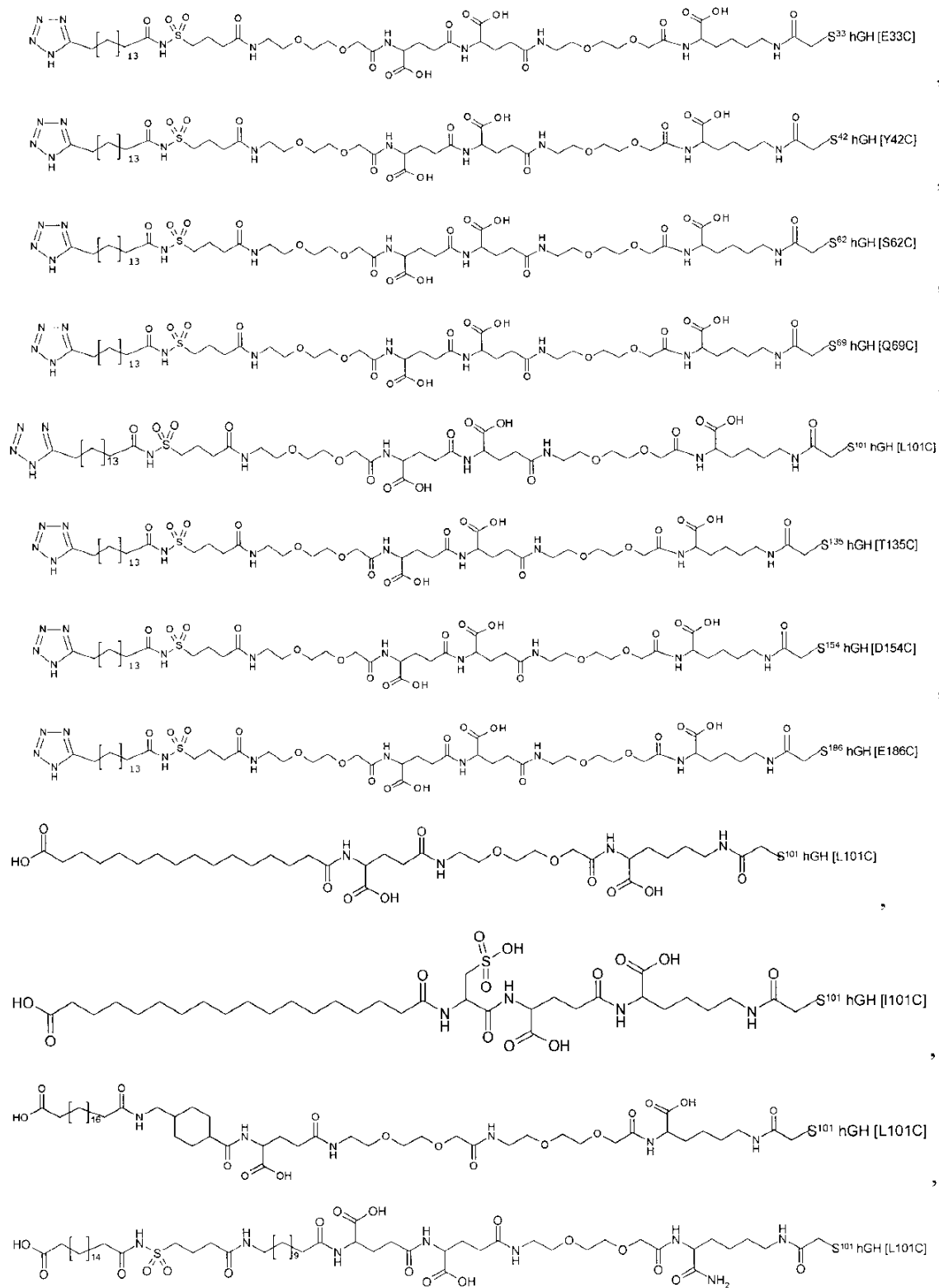


から選択される、成長ホルモンコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩。

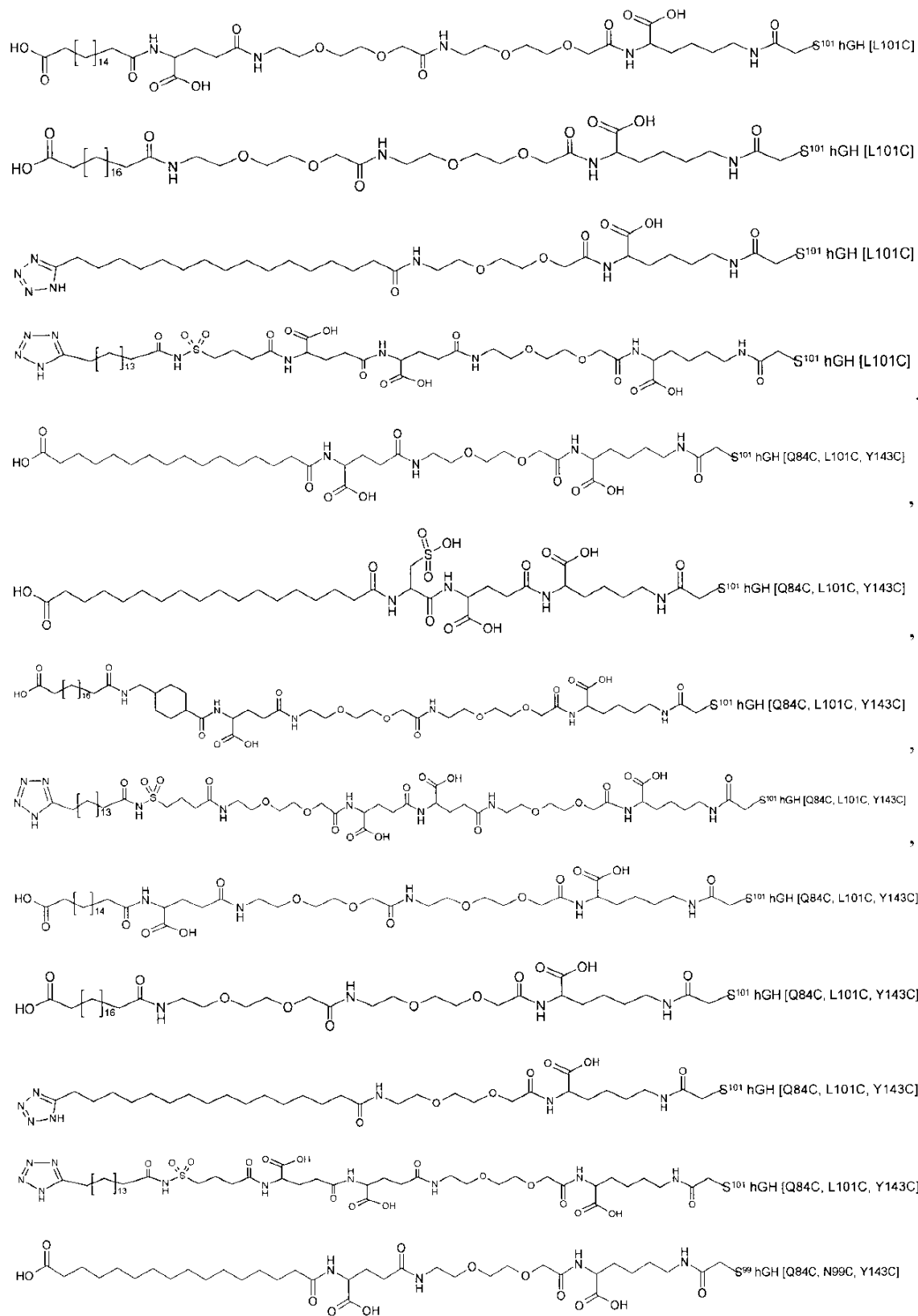
【請求項2】

以下の群：

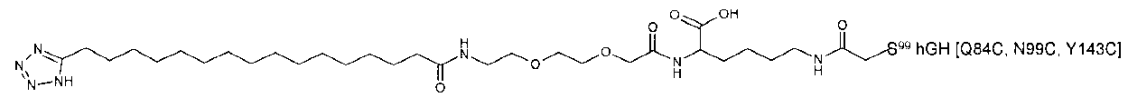
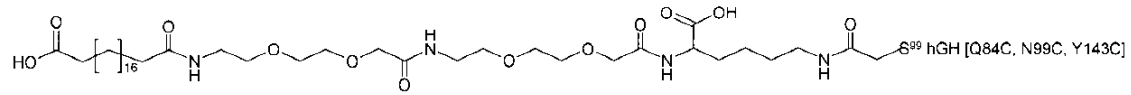
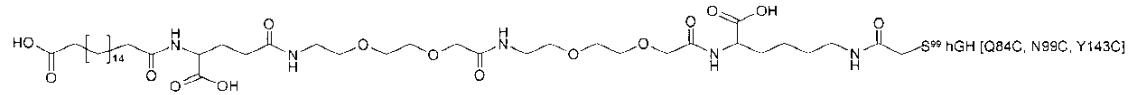
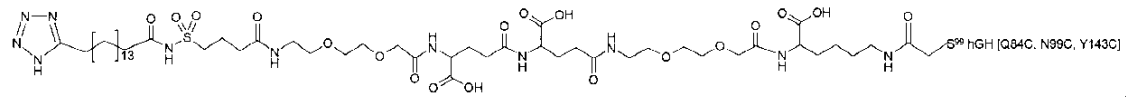
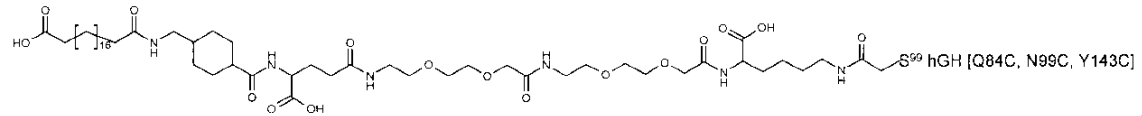
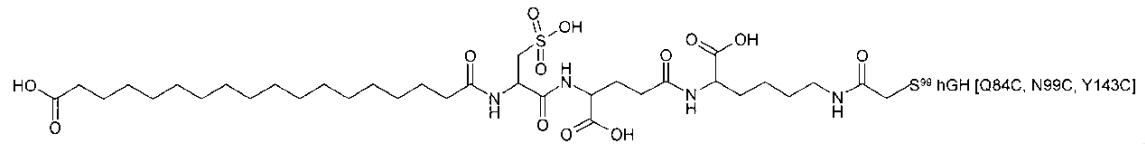
【化 7】



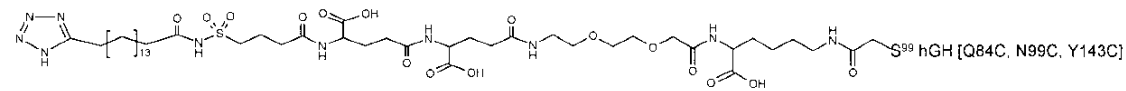
【化 8】



【化 9】



及び



から選択される、成長ホルモンコンジュゲート。

【請求項 3】

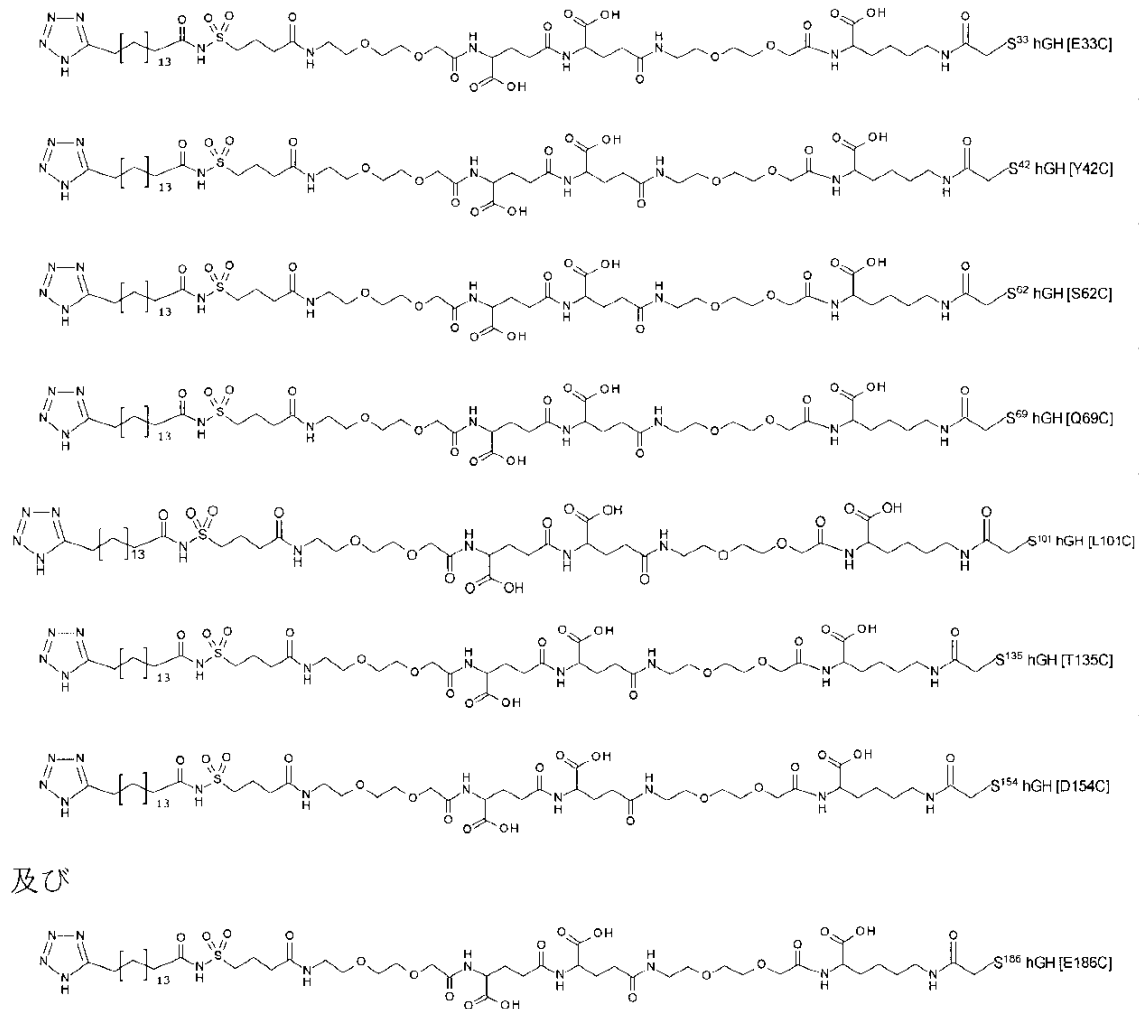
以下の群：

10

20

30

【化 10】



10

20

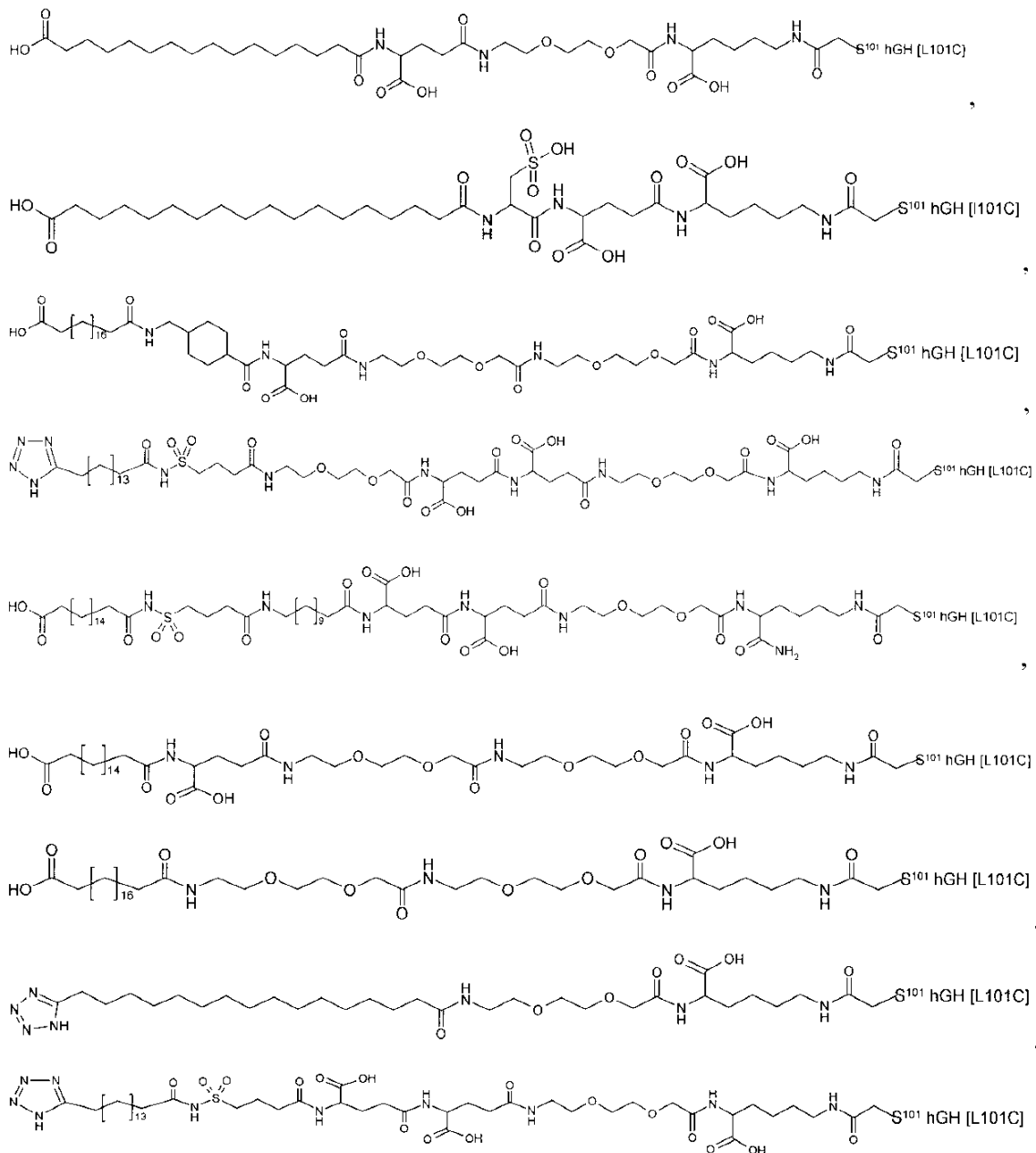
30

から選択される、成長ホルモンコンジュゲート。

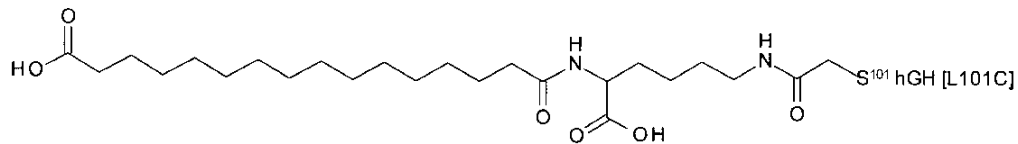
【請求項 4】

以下の群：

【化 1 1】



及び

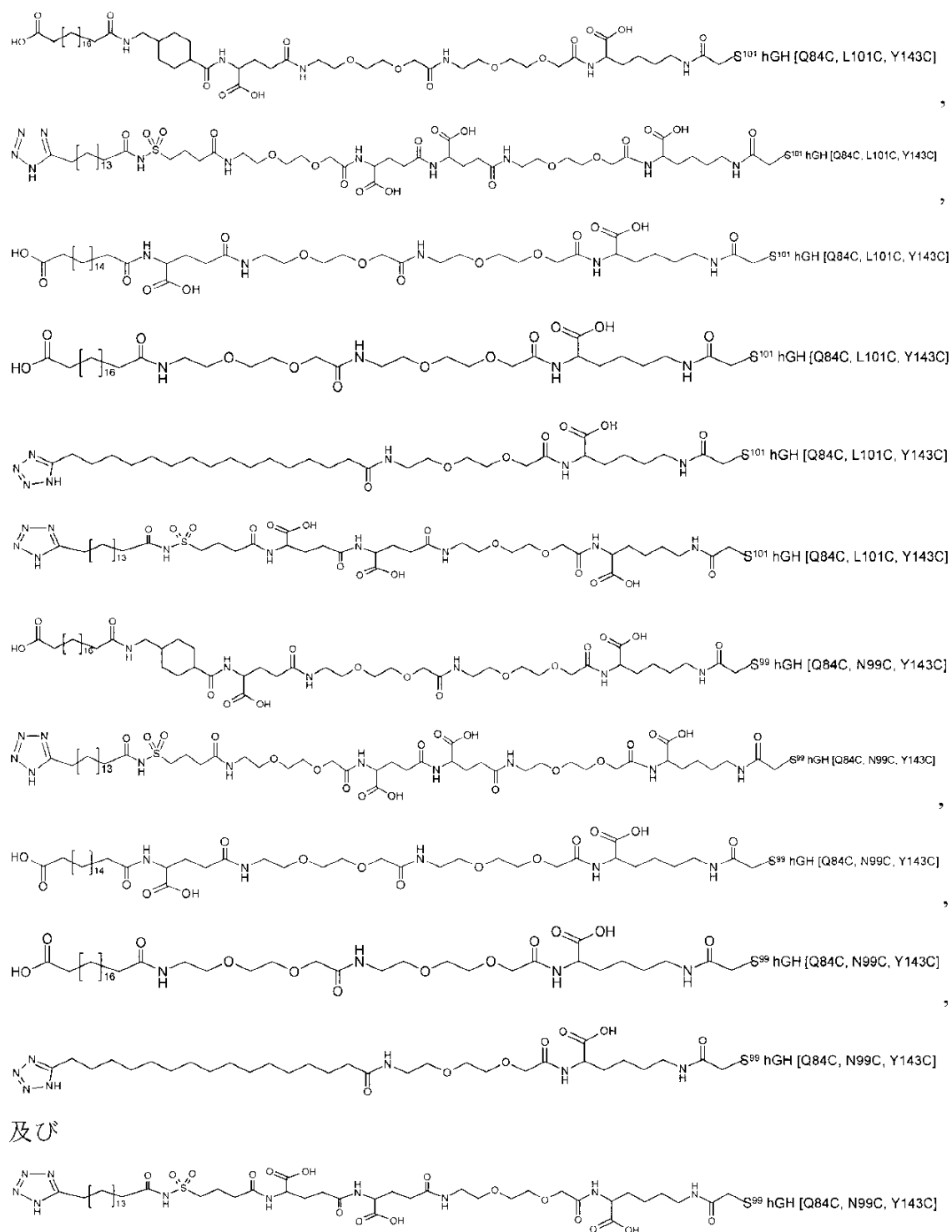


から選択される、成長ホルモンコンジュゲート。

【請求項 5】

以下の群：

【化 1 2】



及び

から選択される、成長ホルモンコンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、親水性スパーサーを介してアルブミン結合残基に連結した成長ホルモン化合物、およびそのような化合物の調製方法および使用方法に関する。これらの成長ホルモンコンジュゲートは、作用のプロファイルが引き延ばされているのと併せて、タンパク質分解に対する耐性が増加しており、また、治療において有用である。

【背景技術】

【0002】

成長ホルモンは、哺乳動物において下垂体前葉から分泌されるポリペプチドホルモンである。成長ホルモンは、種に応じて、およそ22kDaの分子量に対応する、およそ190アミノ酸残基で構成されるタンパク質である。成長ホルモンは、細胞表面の受容体である成長ホルモン受容体(GHR)に結合し、それを通してシグナルを送る。成長ホルモンは、成長の促進、正常な体組成の維持、同化作用および脂質代謝において重要な役割を果たす。成長ホルモンは、中間代謝、例えば、グルコースの取り込みの減少、脂肪分解の増加、アミノ酸の取り込みの増加およびタンパク質合成などにも直接的な効果を有する。このホルモンは、脂肪組織、肝臓、腸、腎臓、骨格、結合組織および筋肉を含めた他の組織に対しても効果を発揮する。組換えヒト成長ホルモン(hGH)が作出され、例えば、Genotropin(商標)(Pharmacia Upjohn)、Nutropin(商標)およびProtropin(商標)(Genentech)、Humatrope(商標)(Eli Lilly)、Serostim(商標)(Serono)、Norditropin(Novo Nordisk)、Omnitrope(Sandoz)、Nutropin Depot(Genentech and Alkermes)として市販されている。さらに、N末端に追加的なメチオニン残基を有する類似体も、例えば、Somatonorm(商標)(Pharmacia Upjohn/Pfizer)として販売されている。

10

【0003】

成長ホルモンは、タンパク質の成長ホルモンファミリーの他のメンバー、プロラクチン(PRL)および胎盤性ラクトゲン(PL)と一般的なトポロジーを共有する。成長ホルモンは、2つの保存されたジスルフィド結合を有する「上上下下(up-up-down-down)」トポロジーを示す4ヘリックスバンドルタンパク質に分類される(図1)。詳細には、野生型ヒト成長ホルモン(hGH)は、191アミノ酸残基で構成され、53位、165位、182位および189位に、4つのシステイン残基を有し、それらは、それぞれC53とC165、およびC182とC189をつなぐ2つの分子内のジスルフィド結合を形成することによってタンパク質の3次構造を安定化する(図1)。hGHの構造は、遊離形態で(Chantal L.ら Protein and Peptide Letters 3、333~340頁、(1995))およびその結合性タンパク質との複合体で(ヒトGHR(hGHR)の細胞外ドメイン)(Devos, A.M.ら Science 255、306~312頁、(1992))、X線結晶構造解析によって実験的に決定された。これらの構造は、Protein Data Bank(PDB)に寄託されており、公的に入手可能である(それぞれ、PDB受託番号1HGUおよび1HWG)。したがって、公開されたhGHの構造から、hGHがhGHRに結合するために重要な残基を同定することができる。さらに、hGHの動的性質は、核磁気共鳴(NMR)分光法によって試験されている(Kasimova M.R.ら J.Mol.Biol. 318巻、679~695頁、(2002))。X線およびNMRのデータを組み合わせて、よく構造化され、明確に定義されたhGHの領域と、あまり構造化されておらず、動的な領域とを区別することができる。hGHのあまり構造化されておらず、動的な領域は、タンパク質分解性の切断を特に受けやすいことが予測され、そのような領域を適切に安定化することにより、タンパク質分解に対する安定性が改善される。

20

30

【0004】

hGHは、所望の化学的性質または生物学的性質を有するhGH類似体を作成するための試みにおいて、大規模な変異誘発に供されている。特に、いくつかの目的のためのシステイン変異体が記載されている。

40

【0005】

US2003/0162949には、GH遺伝子スーパーファミリーのメンバーのシステインバリエントが開示されている。これらのタンパク質の、部位特異的な、生物学的に活性なコンジュゲートを創出するための一般的な方法が提供されている。この方法は、そのタンパク質の非必須領域にシステイン残基を付加、または部位特異的な変異誘発を用いてタンパク質の非必須アミノ酸をシステイン残基で置換し、次いでシステイン反応性ポリマーまたは他の種類のシステイン反応性部分を、付加されたシステイン残基を介してタンパク質に共有結合的にカップリングすることを伴う。

【0006】

WO02/055532には、共有結合的に付着した少なくとも1つの非ポリペプチド部分を有する

50

遺伝子操作されたhGH変異体、特に、導入されたシステイン残基がペグ化に使用されるhGH変異体が記載されている。

【 0 0 0 7 】

US5,951,972には、タンパク質内の少なくとも1つの天然に存在するシステイン残基または組み込まれたシステイン残基が種々の置換基で誘導体化された、生理活性のある、誘導体化された、天然のおよび組換えの、哺乳動物のおよびヒトのタンパク質およびポリペプチドが記載されている。

【 0 0 0 8 】

hGHのタンパク質分解性の切断は、詳細に研究されている。残基128～154で構成される長いループは、トロンピン、プラスミン、コラゲナーゼ、スブチリシンおよびキモトリプシン様セリンプロテアーゼなどのいくつかのプロテアーゼの推定切断部位を有する。したがって、hGHのこの部分は、タンパク質分解性の切断を特に受けやすいことが示されている(Lewis, U.J. Ann. Rev. Physiol. 46, 33～42頁、(1984))。hGHを分解することが報告されている酵素としては、トロンピン、プラスミン、スブチリシン、キモトリプシン様セリンプロテイナーゼおよびカリクレインが挙げられる。

10

【 0 0 0 9 】

ラット組織におけるhGHの分解が調査されている(Garcia-Barrosら J. Endocrinol. Invest. 23, 748～754頁、(2000))。

【 0 0 1 0 】

かさがあり、親油性であるアミノ酸残基における切断を好むラット甲状腺キモトリプシン様プロテアーゼは、最初にY143とS144の間のペプチド結合を切断して2つの鎖分子を生じさせ、その後Y42とS43の間を切断してN末端ペプチドF1-Y42を遊離させることが見いだされた。2つの鎖分子内の分割ループは、キモトリプシン様プロテアーゼによるF146とD147の間の切断によってさらにプロセシングされ、カルボキシペプチダーゼの作用によってさらにプロセシングされる。

20

【 0 0 1 1 】

タンパク質分解に対して安定化されたhGH類似体を作成するためのいくつかの方法が報告されている。

【 0 0 1 2 】

Alamら、J. Biotech. 65, 183～190頁、(1998)では、特異的な点変異によって、トロンピンおよびプラスミンに対して抵抗性のhGH変異体が設計された。トロンピンは、R134とT135の間をhGH特異的に切断し、R134D、T135P二重変異体により、トロンピンによる切断に対して抵抗性のhGHバリエーションがもたらされ、R134D、T135P、K140A三重変異体により、プラスミンに対する抵抗性がもたらされた。さらに、後者のhGH変異体は、ヒト血漿によるタンパク質分解に対して7日間にわたって抵抗性であった。

30

【 0 0 1 3 】

EP534568には、R134をアラニン、ロイシン、トレオニン、フェニルアラニン、プロリンまたはヒスチジンに変異させることによってタンパク質分解に対して安定化されたhGH変異体が記載されている。

【 0 0 1 4 】

WO2004/022593/Nautilusには、タンパク質分解に対する安定性が増加した、GHバリエーションを含めた修飾されたサイトカインを作成するための一般的なハイスループットな定向進化の方法が記載されている。

40

【 0 0 1 5 】

WO2006/048777/Nautilusには、タンパク質分解に対する安定性が改善された修飾されたhGH類似体が特に記載されている。類似体は、1～55位、57位、58位、60～63位、67～87位、89～91位、93位、95～100位、102～128位、131～132位、135～139位、141位、142位、144位、148～182位、184位、185位および187～191位に1つから5つの変異を含有する。システイン残基を導入することにより、望ましくない、ジスルフィド連結した二量体の形成が導かれる可能性があり得、WO2006/048777では、アミノ酸残基をシステインで置換するこ

50

とは、この範囲から特に排除され;WO2006/048777(65頁)において、「システイン残基によるアミノ酸の置き換えは、この変化が潜在的に分子内ジスルフィド結合の形成をもたらすので、明確に除外される」と明示されている。

【0016】

タンパク質分解に対して抵抗性であるhGH化合物を開発する明白な必要性がある。そのような安定化された化合物は、hGHの所望の生物学的性質を保持しながら、タンパク質分解性の切断に対する安定性の増加を示すべきである。そのようなGH分子は、安定性が増加している、クリアランスが遅い、かつ/またはin vivo半減期が延長している。

【0017】

さらに、ペプチドに、ペプチドの性質を適正に変化させる基をコンジュゲートすることによってペプチドの性質および特性を修飾することが周知である。そのようなコンジュゲーションは、一般に、ペプチド内に、コンジュゲート基内の別の官能基と反応させるためのいくつかの官能基を必要とする。一般には、アミノ基、例えばリジンのN末端アミノ基または -アミノ基などが適切なアシル化試薬と組み合わせて使用されている。あるいは、ポリエチレングリコール(PEG)またはそれらの誘導体を、タンパク質に付着させることができる。概説については、Exp.Opion.Ther.Patent.14、859～894頁、(2004)を参照されたい。PEGを成長ホルモンに付着させることは、成長ホルモンの血漿内半減期に対する正の効果を有し得ることが示されている、WO03/044056。

【0018】

ペプチドのC末端を修飾するためのカルボキシペプチダーゼの使用は、以前に記載されている。WO92/05271には、C末端カルボキシ基をアミド化するためのカルボキシペプチダーゼおよび求核性化合物の使用が開示されており、WO98/38285には、この目的のために特に適したカルボキシペプチダーゼYバリエーションが開示されている。

【0019】

EP243 929には、ポリペプチド、レポーター基または細胞毒性薬をタンパク質またはポリペプチドのC末端に組み込むためのカルボキシペプチダーゼの使用が開示されている。

【0020】

WO2005/035553には、ペプチドのC末端に酵素によって官能基を組み込むことによってペプチドを選択的にコンジュゲートするための方法が開示されている。

【0021】

活性化されたハロゲン誘導体およびマレイミドは、ペプチド内のスルフヒドリル基にコンジュゲートを組み込むために最も一般的に使用される官能基のいくつかを代表する(G.T.Hermanson in Bioconjugate Techniques 第2版、2008年、Elsevier)。

【0022】

これまで、ペプチドの性質を変化させるために、トランスグルタミナーゼが使用されている。食品産業、特に乳業において、例えば、トランスグルタミナーゼを使用してペプチドを架橋結合させるための多くの技法が利用可能である。他の文書には、生理活性ペプチドの性質を変化させるためのトランスグルタミナーゼの使用が開示されている。EP950665、EP785276およびSato、Adv.Drug Delivery Rev.54、487～504頁、(2002)には、少なくとも1つのGlnを含むペプチドとアミン官能性をもたせたPEGまたは同様のリガンドの、トランスグルタミナーゼの存在下での直接的な反応が開示されており、Wada、Biotech.Lett.23、1367～1372頁、(2001)には、ラクトグロブリンと脂肪酸の、トランスグルタミナーゼによる直接的なコンジュゲーションが開示されている。WO2005/070468として公開された国際特許出願には、コンジュゲート基を付着させることができる取っ手を組み込むためのトランスグルタミナーゼの使用が開示されている。

【0023】

成長ホルモンは、体成長の調節だけでなく、タンパク質、炭水化物および脂質の代謝の調節にも関与する重要なホルモンである。成長ホルモンの主要な効果は、成長を促進することである。ヒト成長ホルモンは、以下の配列を有する191アミノ酸残基のタンパク質である:FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLEL

10

20

30

40

50

LRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDA
LLKNYGLLYCFRKMDKVFETFLRIVQCRSVEGSCGF(配列番号1)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0024】

【特許文献1】US2003/0162949

【特許文献2】WO02/055532

【特許文献3】US5,951,972

【特許文献4】EP534568

【特許文献5】WO2004/022593

10

【特許文献6】WO2006/048777

【特許文献7】WO03/044056

【特許文献8】WO92/05271

【特許文献9】WO98/38285

【特許文献10】EP243 929

【特許文献11】WO2005/035553

【特許文献12】EP950665

【特許文献13】EP785276

【特許文献14】WO2005/070468

【特許文献15】US5,156,956

20

【特許文献16】US5,252,469

【特許文献17】JP2003/199569

【特許文献18】US5,731,183

【特許文献19】WO96/06931

【特許文献20】WO96/22366

【特許文献21】EP-0555649

【特許文献22】US5,736,356

【特許文献23】WO2007/020290

【特許文献24】WO2008/020075

【特許文献25】WO2009/024791

30

【特許文献26】WO2007/093594

【非特許文献】

【0025】

【非特許文献1】Chantalet L.ら Protein and Peptide Letters 3巻、333～340頁、(1995年)

【非特許文献2】Devos, A. M.ら Science 255、306～312頁、(1992)

【非特許文献3】Kasimova M.R.ら J. Mol. Biol. 318巻、679～695頁、(2002)

【非特許文献4】Lewis, U.J. Ann. Rev. Physiol. 46、33～42頁、(1984)

【非特許文献5】Garcia-Barrosら J. Endocrinol. Invest. 23、748～754頁、(2000)

【非特許文献6】Alamら、J. Biotech. 65、183～190頁、(1998)

40

【非特許文献7】Exp. Opin. Ther. Patent. 14、859～894頁、(2004)

【非特許文献8】G.T. Hermanson in Bioconjugate Techniques 第2版、2008年、Elsevier

【非特許文献9】Sato、Adv. Drug Delivery Rev. 54、487～504頁、(2002)

【非特許文献10】Wada、Biotech. Lett. 23、1367～1372頁、(2001)

【非特許文献11】J. Biol. Chem. 277(38)、35035～35042頁、(2002)

【非特許文献12】Kaempfer、J. Gen. Microbiol. 137、1831～1892頁、(1991)

【非特許文献13】J. Pharm. Sci. 66、2頁、(1977)

【非特許文献14】M.R. Kasimovaら J. Mol. Biol. 318、679～695頁、(2002)

【非特許文献15】B. LeeおよびF.M. Richards、"The Interpretation of Protein Struc

50

- tures: Estimation of Static Accessibility」J.Mol.Biol.55、379～400頁(1971)
- 【非特許文献16】T.Fujita;J.IwasaおよびC.Hansch、J.Am.Chem.Soc.86、5175～5180頁(1964)「A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients」
- 【非特許文献17】C.A.Lipinskiら、Advanced Drug Delivery Reviews、23、3～25頁、(1997)「Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings」
- 【非特許文献18】I.Moriguchi、S.Hirono、I.Nakagome、H.Hirano、Chem.Pharm.Bull.42、976～978頁、(1994)「Comparison of Reliability of LogP Values for Drugs Calculated by Several Methods」
- 【非特許文献19】Computational Molecular Biology、Lesk、A.M.編、Oxford University Press、New York、1988 10
- 【非特許文献20】Biocomputing: Informatics and Genome Projects、Smith、D.W.編、Academic Press、New York、1993
- 【非特許文献21】Computer Analysis of Sequence Data、Part 1、Griffin、A.M.、およびGriffin、H.G.編、Humana Press、New Jersey、1994
- 【非特許文献22】Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje、G.、Academic Press、1987
- 【非特許文献23】Sequence Analysis Primer、Gribskov、M.およびDevereux、J.編、M. Stockton Press、New York、1991
- 【非特許文献24】Carilloら、SIAM J.Applied Math.、48、1073頁、(1988) 20
- 【非特許文献25】Devereuxら、Nucl.Acids.Res.、12、387、(1984)
- 【非特許文献26】Altschulら、J.Mol.Biol.、215、403～410頁、(1990)
- 【非特許文献27】BLAST Manual、AltschulらNCB/NLM/NIH Bethesda、Md.20894
- 【非特許文献28】Dayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure、5巻、付録3、(1978)
- 【非特許文献29】Henikoffら、Proc.Natl.Acad.Sci USA、89、10915～10919頁、(1992)
- 【非特許文献30】Needlemanら、J.Mol.Biol.、48、443～453頁、(1970)
- 【非特許文献31】J.Biotech.、65、183頁、(1998)
- 【非特許文献32】J.Med.Chem.、43、1986頁、(2000)
- 【非特許文献33】N.Cheneら、Reprod.Nutr.Develop.29、1～25頁(1989) 30
- 【非特許文献34】B.Peschkeら「C-Terminally PEGylated GH derivatives」Bioorg.Med.Chem.15、4382～4395頁、(2007)
- 【非特許文献35】Remington: The ScienceおよびPractice of Pharmacy、第20版、2000年
- 【非特許文献36】WilliamsおよびPolli、J.Parenteral Sci.Technol.、38、48～59頁、(1984)
- 【非特許文献37】Masters(1991)、Spray-Drying Handbook(第5版;Longman Scientific and Technical、Essex、U.K.)、491～676頁
- 【非特許文献38】Broadheadら、Drug Devel.Ind.Pharm.18、1169～1206頁、(1992)
- 【非特許文献39】Mumenthalerら、Pharm.Res.、11、12～20頁、(1994) 40
- 【非特許文献40】CarpenterおよびCrowe、Cryobiology 25、459～470頁、(1988)
- 【非特許文献41】Roser、Biopharm.4、47～53頁、(1991)
- 【非特許文献42】Handbook of Pharmaceutical Controlled Release(Wise、D.L.編Marcel Dekker、New York、2000)
- 【非特許文献43】Drug and the Pharmaceutical Sciences 99巻: Protein Composition and Delivery(MacNally、E.J.編Marcel Dekker、New York、2000)
- 【非特許文献44】Stability of Protein Pharmaceuticals、Ahern.T.J.& Manning M.C.、Plenum Press、New York 1992
- 【非特許文献45】M.M.Kurfurst in Anal.Biochem.200(2)、244～248頁、(1992)
- 【非特許文献46】J.Am.Chem.Soc.、86、5175～5180頁、(1964)「A New Substituent Co 50

stant、 /、 Derived from Partition Coefficients」

【非特許文献 4 7】C.A.Lipinskiら、Advanced Drug Delivery Reviews、23、3～25頁(1997)、「Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings」

【非特許文献 4 8】I.Moriguchi、S.Hirono、I.Nakagome、H.Hirano、Chem. and Pharm.Bull.、42、976～978頁、(1994)「Comparison of Reliability of LogP Values for Drugs Calculated by Several Methods」

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

成長ホルモンの欠乏に関連する種々の疾患を治療するために、ヒト成長ホルモンおよび密接に関連するその変異形を投与することを用いる。ポリペプチドであるので、成長ホルモンは非経口的に、すなわち、針を用いて投与する。成長ホルモンは、さらに、相対的に短い半減期を特徴とし、したがって、高頻度の投与が必要であり、患者には対応する疼痛および不自由が伴う。したがって、例えば、半減期の延長など、薬理的性質が改善された成長ホルモン化合物を提供することが依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0027】

本発明は、薬物動態学的性質および薬理的性質が改善された新規の成長ホルモン化合物コンジュゲート、ならびにそれらを作成するための方法を提供する。

【0028】

皮下投与された医薬化合物の生物学的利用能は、吸収速度に関連し得る。化合物の、皮下の毛細血管のタイトジャンクションを通過する能力は、一部において、それらの物理的性質および化学的性質、ならびに分子サイズまたは化合物の流体力学的体積に関連し得る。タンパク質コンジュゲート、例えば40kDaのPEGを有するペグ化hGH(PEG-hGH)は、150～250kDaの見かけの分子量を有する。アルブミンが共有結合したhGH分子は、87kDaの分子量を有し、一方アルブミンが非共有結合したhGH分子は、時々アルブミンから解離し、したがって、22kDaの分子量を有する。

【0029】

解離した状態で費やされる時間は、少なくともある程度はアルブミン結合部分の親和性に左右されると考えられる。したがって、アルブミンが非共有結合したhGH分子の吸収速度は、PEG-hGHより速い可能性がある。吸収速度の増加は、アルブミンに対する親和性がより低いアルブミン結合部分を使用した場合に得ることができる。

【0030】

さらに、アルブミン結合部分をhGHに付着させるリンカーおよび/またはスペーサーの物理的性質および化学的性質が、化合物の機能性に影響を及ぼす。

【0031】

本出願人らは、驚いたことに、性質が改善された、例えば、in vitroでの効力が高い、または、例えばin vivoでの半減期が増加している、または、例えば、おそらくin vivoにおける作用のプロファイルが引き延ばされているのと併せてタンパク質分解に対する抵抗性が増加しているGHコンジュゲートを得るために、単一cys変異(single Cys mutation)および/または追加的なジスルフィド架橋を有する成長ホルモン化合物(GH)を、GHとアルブミン結合残基を分離する、一般には $m\text{LogP} < 0$ -または $c\text{LogP} < 0.5$ を有する化学的部分を有する親水性スペーサーを介して、アルブミン結合残基に選択的に連結することができることを見いだした。親水性スペーサーを介してアルブミン結合残基を変異させた単一cys(single Cys)に連結することにより、生物活性を保持することができ、かつ上記の改善の1つまたは複数を得ることができる。そのような改善は、アルブミン結合残基を、親水性スペーサーを介して、追加的なジスルフィド架橋を有する成長ホルモンに、例えば、hGHのN末端、40位または141位に連結した場合にも得られる。成長ホルモン化合物は、単一cys変異と追加的なジスルフィド架橋の両方を含んでもよく、その態様では、アルブミン結合残基が

10

20

30

40

50

親水性スパーサーを介して単一cys変異に連結している。

【0032】

広範な態様において、本発明は、

a)単一cys変異、

b)追加的なジスルフィド架橋、または

c)単一cys変異および追加的なジスルフィド架橋

を有する成長ホルモン化合物(GH)を含み、アルブミン結合残基が親水性スパーサーを介して前記GHに連結している成長ホルモンコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩に関する。

【0033】

本発明の一実施形態では、安定なhGH化合物は、追加的なジスルフィド結合を有する。その一方または両方が点変異によって野生型hGH配列に導入されるシステイン対の間にジスルフィド結合が形成される。

【0034】

本発明の別の実施形態では、安定なhGH化合物は、追加的なシステインを有する。システインは、点変異によって野生型hGH配列に導入される。

【0035】

本発明の別の実施形態では、安定なhGH化合物は、追加的なジスルフィド結合および1つまたは複数の追加的なシステインを有する。追加的なシステインと追加的なシステイン対の間に形成される追加的なジスルフィド結合は、点変異によって野生型hGH配列に導入される。

【0036】

さらに、本発明は、親水性スパーサーを介したアルブミン結合残基のヒト成長ホルモン(hGH)への導入を選択的に行うことができ、活性の大部分は保持されるという知見に基づく。アルブミン結合残基を、親水性スパーサーを介して、導入されたシステインに対応する位置および/または配列番号1の配列を有するhGHのグルタミン40位および/またはグルタミン141位および/またはN末端に導入することが好ましい。トランスグルタミナーゼ(TGase)、具体的にはストレプトベルチシリウム・モバラエンス(*Streptovercillium mobarae*)またはストレプトマイセス・リジクス(*Streptomyces lydicus*)由来のTGaseを使用することにより、アルブミン結合残基を、親水性スパーサーを介して40位または141位に選択的に導入し、かつ、グルタミンがトランスグルタミナーゼの基質であるという事実にもかかわらず残りの11グルタミン残基は手をつけずにすることができる。

【0037】

したがって、本発明の一実施形態では、成長ホルモン化合物(GH)は、親水性スパーサーを介して1つのアルブミン結合残基に連結している。一般には、アルブミン結合残基は、親水性スパーサーを介して、hGHのN末端、または18位、30位、40位、42位、62位、69位、88位、95位、98位、99位、100位、101位、102位、108位、135位、141位または154位に付着している。他の実施形態では、単一cys変異および上記の位置のいずれか1つ、例えばhGHのN末端、40位または141位などに、2つのアルブミン結合残基が親水性スパーサーを介して付着している。

【0038】

本発明の成長ホルモン化合物コンジュゲートは、ペグ化されたhGHと比較して皮下吸収が速く、したがって、脂肪萎縮症をほとんど、または全くもたらさない。さらに、アルブミン結合残基および親水性スパーサーは、PEGとは対照的に、生分解性である。

【0039】

本発明のさらに別の目的は、本発明の方法に従って前記タンパク質をコンジュゲートすることによってGHの性質を改善するための方法をもたらすことである。

【0040】

別の態様では、本発明は、単一cys変異、追加的なジスルフィド結合を含む単離された成長ホルモン化合物(GH)または単一cys変異および追加的なジスルフィド結合を含む成長

10

20

30

40

50

ホルモン化合物に関する。本発明の別の目的では、そのような化合物は可溶性である。

【0041】

定義

本明細書において、「成長ホルモン化合物」という用語は、本明細書で使用される場合、哺乳動物起源の成長ホルモン、例えばヒト、ウシ、またはブタの成長ホルモン、ならびに組換え成長ホルモン、例えば組換え型のヒト、ウシ、またはブタの成長ホルモン、ならびにそのような成長ホルモンのバリエーションおよび変異体を意味する。本明細書で使用される場合、「GH」および「成長ホルモン化合物」は、互換的である。GHが哺乳動物起源の成長ホルモンのバリエーション、例えばhGHおよび組換えhGHである場合、前記バリエーションは、成長ホルモン、例えばhGHの1つまたは複数のアミノ酸残基を、別の天然アミノ酸または非天然アミノ酸を有する配列で置換することによって；および/または成長ホルモン、例えばhGHの配列に1つまたは複数の天然アミノ酸または非天然アミノ酸を付加することによって；および/または、成長ホルモン、例えばhGHの配列から1つまたは複数のアミノ酸残基を欠失させることによって得られる化合物であると理解され、これらのステップのいずれも、場合によって、その後さらに1つまたは複数のアミノ酸残基の誘導体化を続けることができる。一般には、GHは、hGHに対して少なくとも80%の同一性を有し、一般には、本明細書におけるアッセイ(1)(実施例46)において決定された通り、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも10%を有する。

【0042】

本明細書において、「アルブミン結合残基」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒト血清アルブミンに非共有結合する残基を意味する。成長ホルモン化合物(GH)に付着したアルブミン結合残基のヒト血清アルブミンに対する結合親和性は、一般には、約10 μMを下回る、または約1 μMまでも下回る。12~40個の炭素原子を含有する直鎖親油性部分および分岐親油性部分、シクロペンタノフェナントレン骨格を持つ化合物、および/または10~45アミノ酸残基を有するペプチドなどの中でさまざまなアルブミン結合残基が公知である。アルブミン結合特性は、J.Biol.Chem.277(38)、35035~35042頁、(2002)に記載の表面プラズモン共鳴によって測定することができる。

【0043】

「親水性スペーサー」という用語は、本明細書で使用される場合、成長ホルモン化合物とアルブミン結合残基を、30~50%がNまたはOのいずれかである少なくとも5個の非水素原子を含む化学的部分で分離するスペーサーを意味する。

【0044】

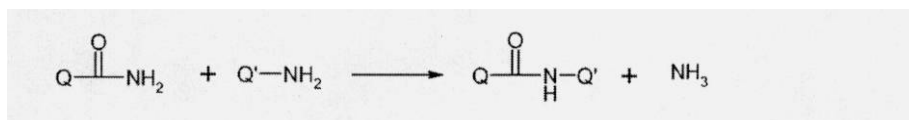
本明細書において、「アミノ基転移」という用語および関連する用語は、グルタミンの側鎖のアミドの窒素が別の化合物由来の窒素、具体的には求核試薬を含有する別の窒素由来の窒素と交換される反応を示すものとする。

【0045】

トランスグルタミナーゼ(E.C.2.3.2.13)は、タンパク質-グルタミン- -グルタミルトランスフェラーゼとしても公知であり、以下の一般的な反応を触媒する。

【0046】

【化1】



【0047】

Q-C(O)-NH₂(アミン受容体)は、グルタミン残基を含有するペプチドまたはタンパク質を示し得、Q'-NH₂(アミン供与体)はアミンを含有する求核試薬を示す。あるいは、Q-C(O)-NH₂およびQ'-NH₂は、それぞれ、アミン受容体およびリジン含有するペプチドまたはタンパク質を示し得る。しかし、本発明では、上に示されている通り、Q-C(O)-NH₂はグルタミン残基を含有する成長ホルモンを示し、Q'-NH₂はアミンを含有する求核試薬を示す。

【0048】

有用なトランスグルタミナーゼの例としては、微生物トランスグルタミナーゼ、例えばストレプトマイセス・モバラエンス(*Streptomyces mobaraense*)、ストレプトマイセス・シナモネウム(*Streptomyces cinnamoneum*)およびストレプトマイセス・グリセオカルネウム(*Streptomyces griseocarneum*)由来のトランスグルタミナーゼ(全て、参照により本明細書に組み込まれるUS5,156,956に開示されている)、およびストレプトマイセス・ラベンデュラエ(*Streptomyces lavendulae*)由来のトランスグルタミナーゼ(参照により本明細書に組み込まれるUS5,252,469に開示されている)およびストレプトマイセス・ラダカヌム(*Streptomyces ladakanum*)由来のトランスグルタミナーゼ(参照により本明細書に組み込まれるJP2003/199569)が挙げられる。以前のストレプトベルチシリウム(*Streptoverticillium*)属のメンバーは、現在はストレプトマイセス(*Streptomyces*)属に含まれることに留意すべきである(Kaempfer, J.Gen.Microbiol.137, 1831~1892頁、(1991))。他の有用な微生物トランスグルタミナーゼが、枯草菌(*Bacillus subtilis*)(参照により本明細書に組み込まれるUS5,731,183に開示されている)および種々の変形菌から単離されている。有用な微生物トランスグルタミナーゼの他の例は、その両方が参照により本明細書に組み込まれるWO96/06931(例えばバチルス・リディクス(*Bacillus lydicus*)由来のトランスグルタミナーゼ)およびWO96/22366に開示されているトランスグルタミナーゼである。有用な非微生物のトランスグルタミナーゼとしては、モルモット肝臓トランスグルタミナーゼ、ならびにカレイ類のマダイ(*Pagrus major*)(参照により本明細書に組み込まれるEP-0555649に開示されている)、および日本カキのマガキ(*Crassostrea gigas*)(参照により本明細書に組み込まれるUS5,736,356に開示されている)のような種々の海洋性の供給源由来のトランスグルタミナーゼが挙げられる。

【0049】

本明細書において、「接近できない」という用語は、それに到達することができないという意味で、何かが存在しない、または事実上存在しないことを示すものとする。コンジュゲートされるタンパク質において官能基が接近できないと明示されている場合、それは、前記官能基がタンパク質に存在しないこと、または、存在したとしても、何らかによって反応に関与することを妨げられていることを示すものとする。例として、前記官能基は、タンパク質の構造に深く埋もれていて、したがって、反応に関与することから遮蔽されている可能性がある。官能基を利用できるかどうかは、反応条件に左右されることが認識されている。例えば、変性剤の存在下で、または温度が上昇すると、タンパク質がほどけて、そうでなければ接近できない官能基が露出することが予測される。「接近できない」とは、「対象とする特定の反応のために選択された反応条件において接近できない」ことを意味することが理解されるべきである。

【0050】

「アルカン」または「アルキル」という用語は、直鎖飽和炭化水素、分岐飽和炭化水素、および/または環式飽和炭化水素を示すものとする。別の炭素原子数が指定されていないければ、この用語は、1個から30個まで(両端値を含む)、例えば、1個から20個まで(両端値を含む)、例えば、1個から10個まで(両端値を含む)、例えば1個から5個まで(両端値を含む)の炭素原子を有する炭化水素を示すものとする。アルキルおよびアルキレンという用語は、それぞれ、対応するラジカルおよびビラジカルを指す。

【0051】

「C₁₋₆アルキル」という用語は、両端値を含めて1個から6個までの炭素原子を有する直鎖飽和炭化水素または分岐飽和炭化水素を指す。そのような基の例としては、これらに限定されないが、メチル、2-プロピル、1-ブチル、2-ブチル、2-メチル-2-プロピル、2-メチル-1-ブチルおよびn-ヘキシルが挙げられる。

【0052】

「C₃₋₁₀シクロアルキル」という用語は、一般には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、およびシクロデカニルを指す。

【 0 0 5 3 】

「アルケン」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む直線炭化水素、分岐炭化水素および/または環式炭化水素を示すものとする。別の炭素原子数が指定されていなければ、この用語は、2個から30個まで(両端値を含む)、例えば2個から20個まで(両端値を含む)、例えば2個から10個まで(両端値を含む)、例えば2個から5個まで(両端値を含む)の炭素原子を有する炭化水素を示すものとする。アルケニルおよびアルケニレンという用語は、それぞれ、対応するラジカルおよびピラジカルを指す。

【 0 0 5 4 】

「アルキン」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む直線炭化水素、分岐炭化水素および/または環式炭化水素を示すものとし、これは、場合によって1つまたは複数の炭素-炭素二重結合を含んでよい。別の炭素原子数が指定されていなければ、この用語は、2個から30個まで(両端値を含む)、例えば2個から20個まで(両端値を含む)、例えば2個から10個まで(両端値を含む)、例えば2個から5個まで(両端値を含む)の炭素原子を有する炭化水素を示すものとする。アルキニルおよびアルキニレンという用語は、それぞれ、対応するラジカルおよびピラジカルを指す。

10

【 0 0 5 5 】

「同素環式芳香族化合物」という用語は、ベンゼンおよびナフタレンなどの芳香族炭化水素を示すものとする。

【 0 0 5 6 】

「複素環化合物」という用語は、5個、6個または7個の環原子を含み、そのうち1個、2個、3個または4個がN、Oおよび/またはSから選択されるヘテロ原子である環式化合物を示すものとする。例としては、チオフエン、フラン、ピラン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、イソチアゾール、イソオキサゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジンなどの複素環式芳香族化合物、ならびにそれらの部分的にまたは完全に水素化された等価物、例えば、ピペリジン、ピラゾリジン、ピロリジン、ピロリン、イミダゾリジン、イミダゾリン、ピペラジンおよびモルホリンが挙げられる。

20

【 0 0 5 7 】

「ヘテロアルカン」、「ヘテロアルケン」および「ヘテロアルキン」という用語は、上で定義されたアルカン、アルケンおよびアルキンの、前記部分の構造に1つまたは複数のヘテロ原子またはヘテロ基が挿入されているアルカン、アルケンおよびアルキンを示すものとする。ヘテロ基およびヘテロ原子の例としては、-O-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-C(O)-、-C(S)-および-N(R*)-が挙げられ、R*は水素またはC₁~C₆-アルキルを表す。ヘテロアルカンの例としては、以下が挙げられる。

30

【 0 0 5 8 】

【表 1】

40

【 0 0 5 9 】

「ラジカル」または「ピラジカル」という用語は、それぞれ、1つまたは2つの水素原子が除去されている化合物を示すものとする。具体的に明示されている場合、ラジカルとは

50

、より大きな原子団、例えばヒドロキシルが化合物から形式的に除去されることによって形成された部分も示し得る。

【0060】

「ハロゲン」という用語は、周期表の第7族メンバー、例えば、F、Cl、BrおよびIを示すものとする。

【0061】

本明細書において、「アリール」という用語は、環の少なくとも1つが芳香族である、炭素環式芳香族環ラジカルまたは融合した芳香族環系ラジカルを示すものとする。典型的なアリール基としては、フェニル、ピフェニルイル、ナフチルなどが挙げられる。

【0062】

「ヘテロアリール」または「ヘタリール」という用語は、本明細書で使用される場合、単独でまたは組み合わせて、例えば5~7員の原子を有する芳香族環ラジカル、または例えば7員から18員までの原子を有する融合した芳香族環系ラジカルを指し、少なくとも1つの環が芳香族であり、窒素ヘテロ原子、酸素ヘテロ原子、または硫黄ヘテロ原子から選択される1つまたは複数のヘテロ原子を環原子として含有し、N-オキシドおよび一酸化硫黄および二酸化硫黄が許容できる複素環式芳香族置換である。例としては、フラニル、チエニル、チオフェニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、イソチアゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピラジニル、ピリミジニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェニル、インドリル、およびインダゾリルなどが挙げられる。

【0063】

名詞としての「コンジュゲート」という用語は、修飾されたタンパク質、すなわち、前記タンパク質の性質を修飾するために、ある部分を結合させたタンパク質を示すものとする。動詞としては、この用語は、前記タンパク質の性質を修飾するために、ある部分をタンパク質に結合させるプロセスを示すものとする。

【0064】

「単-cys」または「遊離のシステイン」という用語は、二重結合に関与しないシステイン残基を指す。したがって、タンパク質は、前記単-cysによって内部のジスルフィド架橋が導かれない限りは、1つまたは複数の追加的なジスルフィド架橋に加えて、1つまたは複数の単-cys残基を含んでよい。

【0065】

本明細書で使用される場合、「プロドラッグ」という用語は、生物加水分解可能な(bio hydrolyzable)アミドおよび生物加水分解可能なエステルを示し、a)そのようなプロドラッグの生物加水分解可能な官能性が本発明による化合物に包含される化合物、およびb)所与の官能基において生物学的に酸化または還元して本発明による原薬をもたらすことができる化合物も包含する。これらの官能基の例としては、1,4-ジヒドロピリジン、N-アルキルカルボニル-1,4-ジヒドロピリジン、1,4-シクロヘキサジエン、tert-ブチルなどが挙げられる。

【0066】

本明細書で使用される場合、「生物加水分解可能なエステル」という用語は、a)親物質の生物活性に干渉しないが、その物質に例えば、作用の持続時間、作用の開始などのin vivoにおいて有利な性質を付与する、またはb)生物学的に不活性であるがin vivoで対象によって生物学的有効成分に容易に変換される、原薬(この場合は本発明による化合物)のエステルである。利点は、例えば、溶解性が増加すること、または、生物加水分解可能なエステルが経口摂取で腸から吸収され、血漿中で本発明による化合物に転換されることである。そのような多数の例が当技術分野で公知であり、その例としては、低級アルキルエステル(例えば、C₁~C₄)、低級アシルオキシアルキルエステル、低級アルコキシアシルオキシアルキルエステル、アルコキシアシルオキシエステル、アルキルアシルアミノアルキルエステル、およびコリンエステルが挙げられる。

【0067】

本明細書で使用される場合、「生物加水分解可能なアミド」という用語は、a)親物質の生物活性に干渉しないが、その物質に例えば、作用の持続時間、作用の開始などのin vivoにおいて有利な性質を付与する、またはb)生物学的に不活性であるがin vivoで対象によって生物学的有効成分に容易に変換される、原薬(この場合は本発明による化合物)のアミドである。利点は、例えば、溶解性が増加すること、または、生物加水分解可能なアミドが経口摂取で腸から吸収され、血漿中で本発明による化合物に転換されることである。そのような多数の例が当技術分野で公知であり、その例としては、低級アルキルアミド、アミノ酸アミド、アルコキシアルキルアミド、およびアルキルアミノアルキルカルボニルアミドが挙げられる。

10

【0068】

本明細書において、「薬学的に許容される塩」という用語は、患者にとって有害でない塩を示すものとする。そのような塩としては、薬学的に許容される酸付加塩、薬学的に許容される金属塩、アンモニウムおよびアルキル化されたアンモニウム塩が挙げられる。酸付加塩としては、無機酸ならびに有機酸の塩が挙げられる。適切な無機酸の代表的な例としては、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リン酸、硫酸、硝酸などが挙げられる。適切な有機酸の代表的な例としては、ギ酸、酢酸、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、安息香酸、桂皮酸、クエン酸、フマル酸、グリコール酸、乳酸、マレイン酸、リンゴ酸、マロン酸、マンデル酸、シュウ酸、ピクリン酸、ピルビン酸、サリチル酸、コハク酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、酒石酸、アスコルビン酸、パモン酸、ビスメチレンサリチル酸、エタンジスルホン酸、グルコン酸、シトラコン酸、アスパラギン酸、ステアリン酸、パルミチン酸、EDTA、グリコール酸、p-アミノ安息香酸、グルタミン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などが挙げられる。薬学的に許容される無機酸付加塩または有機酸付加塩のさらなる例としては、参照により本明細書に組み込まれるJ.Pharm.Sci.66、2頁、(1977)において列挙されている薬学的に許容される塩が挙げられる。金属塩の例としては、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩などが挙げられる。アンモニウム塩およびアルキル化されたアンモニウム塩の例としては、アンモニウム塩、メチルアンモニウム塩、ジメチルアンモニウム塩、トリメチルアンモニウム塩、エチルアンモニウム塩、ヒドロキシエチルアンモニウム塩、ジエチルアンモニウム塩、ブチルアンモニウム塩、テトラメチルアンモニウム塩などが挙げられる。

20

30

【0069】

化合物の「治療有効量」は、本明細書で使用される場合、所与の疾患およびその合併症の臨床的な症状発現を治癒、緩和または部分的に静止するために十分な量を意味する。これを実現するために適した量が、「治療有効量」と定義される。それぞれの目的のための有効量は、疾患または傷害の重症度ならびに対象の体重および全身状態に左右される。適切な投与量の決定は、常套的な実験を用いて、値のマトリックスを構築し、そのマトリックスの種々のポイントを試験することによって実現することができ、それは全て訓練された医師または獣医師の通常の技術の範囲内であることが理解されよう。

【0070】

「治療」および「治療すること」という用語は、本明細書で使用される場合、疾患または障害などの状態と闘うために患者を管理および介護することを意味する。この用語は、患者が罹患している所与の状態に対する治療の完全なスペクトル、例えば、症状または合併症を緩和するために活性化合物を投与すること、疾患、障害または状態の進行を遅らせること、症状および合併症を緩和または軽減すること、および/または疾患、障害または状態を治癒または排除することなど、ならびに状態を予防することを含むものとし、予防は、疾患、状態または障害と闘うために患者を管理および介護することであり、症状または合併症の発症を妨げるために活性化合物を投与することを含むと理解されるべきである。治療される患者は、哺乳動物;特にヒトであることが好ましいが、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジおよびブタなどの動物を含んでもよい。

40

【発明を実施するための形態】

50

【0071】

広範な態様において、本発明は、

a) 単一cys変異、

b) 追加的なジスルフィド架橋、または

c) 単一cys変異および追加的なジスルフィド架橋、

を有する成長ホルモン化合物(GH)を含み、アルブミン結合残基が親水性スペーサーを介して前記GHに連結している安定な成長ホルモンコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩に関する。

【0072】

単一cys変異が存在する場合、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介してCysの硫黄残基に連結している。追加的なジスルフィド架橋が存在する(しかし、単一cys変異は存在しない)場合は、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して成長ホルモン化合物内の位置、例えば、本明細書に記載のように、hGHの40位、141位またはN末端に連結している。2つ以上のアルブミン結合残基が、親水性スペーサーを介して成長ホルモン化合物に連結している場合は、そのようなアルブミン結合残基は、単一cys変異が存在する場合、それに連結する、または追加的なジスルフィド架橋のみが存在する場合は、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して本明細書に記載のように、成長ホルモン化合物内の位置に連結している。

10

【0073】

一実施形態では、成長ホルモン化合物は、単一cys変異を1つ有する。

20

【0074】

別の実施形態では、成長ホルモン化合物は、単一cys変異を2つ有する。

【0075】

別の実施形態では、成長ホルモン化合物は、追加的なジスルフィド架橋を有する。

【0076】

別の実施形態では、成長ホルモン化合物は、単一cys変異を1つと、追加的なジスルフィド架橋を1つ有する。

【0077】

別の実施形態では、GHは、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す。別の実施形態では、GHは、hGHに対して少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも95%の同一性、例えば、配列番号1に対して少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%または例えば少なくとも99%の同一性を有する。別の実施形態では、hGHに対する前記同一性は、本明細書のアッセイIにおいて決定された、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも10%、例えば少なくとも20%、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも60%、例えば少なくとも80%と結びついている。配列同一性についての実施形態のいずれか1つは、活性についての実施形態のいずれか1つと組み合わせることができる。例えば、hGHに対して少なくとも80%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも60%と結びついているGH; hGHに対して少なくとも90%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも40%と結びついているGH; hGHに対して少なくとも95%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも80%と結びついているGHなど。本明細書に記載のように、HGは、配列が追加的なN末端メチオニンを含むことを示すMetHGとして表すことができる。

30

40

【0078】

ある実施形態では、GHは、単一cys変異が導入された成長ホルモンバリエーションである。

別の実施形態では、GHは、単一cys変異に加えて1~5の変異を含有する成長ホルモン化合物を示す。

【0079】

別の実施形態では、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して単一cys変異に連結している。ある実施形態では、単一cys変異は、GHのN末端、H1、H2、L2またはH3に位置する。別の実施形態では、単一cys変異はN末端に位置し、その変異は、例えばT3C、P5C

50

、S7Cのいずれか1つである、または、単一cys変異はH1(アミノ酸9~35に対応する)内に位置し、その変異は、例えば、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35Cのいずれか1つである、または単一cys変異はL1(アミノ酸36~71に対応する)内に位置し、その変異は、例えば、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、S57C、P59C、S62C、E65C、Q69Cのいずれか1つである、もしくはY42C、S55C、S57C、S62C、Q69Cのいずれか1つであることが好ましい、または、単一cys変異はH2、L2もしくはH3(アミノ酸72~98、アミノ酸99~106およびアミノ酸107~127に対応する)内に位置し、その変異は、例えば、hGH(配列番号1)のE88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cのいずれか1つである、または、単一cys変異はL3もしくはH4(アミノ酸128~154およびアミノ酸155~184に対応する)内に位置する。L3およびH4(128~154およびアミノ酸155~184)において、変異は、例えばE129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180Cのいずれか1つである、または、単一cys変異はC末端に位置し、その変異は、例えば、E186C G187C G190Cのいずれか1つである。

10

【0080】

hGHバリエーションに単一cys変異が存在する場合、その変異は、対応するアミノ酸残基に位置する。

【0081】

特定の実施形態では、GHの単一cys変異は、hGH(配列番号1)のT3、P5、S7、D11、H18、Q29、E30、E33、A34、Y35、K38、E39、Y42、S43、D47、P48、S55、S57、P59、S62、E65、Q69、E88、Q91、S95、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、D107、S108、D112、Q122、G126、E129、D130、G131、P133、T135、G136、T142、D147、N149、D154、A155、L156、R178、E186、G187およびG190からなる群、例えば、T3、P5、S7、D11、H18、Q29、E30、E33、A34、Y35、E88、Q91、S95、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、D107、S108、D112、Q122およびG126からなる群から選択される位置に相当する親GHに相当する位置に導入され、GHコンジュゲートは、前記単一システイン残基の側鎖にアルブミン結合部分をさらに含む。

20

【0082】

別の実施形態では、単一cys変異は、hGHのアミノ酸93~106またはhGHバリエーションの対応する残基の範囲内に位置する。別の特定の実施形態では、単一cys変異は、L2の範囲内、例えばアミノ酸99~106またはアミノ酸99~103または対応する残基の範囲内に位置する。

30

【0083】

本発明の成長ホルモン化合物コンジュゲートに単一cys変異が存在する場合、典型的な単一cys変異はE30Cである。別の典型的な単一cys変異はY42Cである。別の典型的な単一cys変異はS55Cである。別の典型的な単一cys変異はS57Cである。別の典型的な単一cys変異はS62Cである。別の典型的な単一cys変異はQ69Cである。別の典型的な単一cys変異はS95Cである。別の典型的な単一cys変異はA98Cである。別の典型的な単一cys変異はN99Cである。別の典型的な単一cys変異はS100Cである。別の典型的な単一cys変異はL101Cである。別の典型的な単一cys変異はV102Cである。別の典型的な単一cys変異はS108Cである。

【0084】

rhGH/受容体複合体(PDB:3HHR)の結晶構造に応じて、束は、4つの主要なヘリックス:残基9から34までの第1のヘリックス(A)、残基72から92まで、および残基94から100までの第2のヘリックス(b)、残基106から128までの第3のヘリックス(C)、ならびに残基155から184までの第4のヘリックス(D)からなる(M.R.KasimovaらJ.Mol.Biol.318、679~695頁、(2002))。4つの主要なヘリックスは、タンパク質のコアと称される。ヘリックス領域の一部にならない残基は、ループ残基と定義され、可動領域、ループ、ターン、ヘアピンおよびコイルの一部になり得る。hGHがその結合性タンパク質(PDB:1HWG)と複合している場合、ヘリックスのわずかに異なる局在性が得られ、それが上で言及したヘリックスの定義である。

40

【0085】

さらに、本発明は、少なくとも1つの導入されたシステイン残基を含み、その残基が、h

50

GHのヘリックス領域またはループ領域内の位置に相当する位置に導入されている、GHコンジュゲートに関する。具体的には、アミノ酸残基は、例えば、hGH単独のモデル構造において、またはその2つの受容体分子と複合したhGHのモデル構造において、その側鎖の25%超が表面に露出している、好ましくはその側鎖の50%超が表面に露出しているヘリックス領域またはループ領域の表面に露出した位置に導入することができる。好ましい実施形態では、ヘリックスまたはループ内の位置は、hGHの受容体結合部位の外側の位置に相当する。表面に露出した残基は、コンピュータによる化学アルゴリズムを使用して同定することができる。例えば、相対的な表面への接近可能性は、Accelrys IncによるコンピュータプログラムQuanta 2005を用いて、公的に入手可能な構造(PDB受託番号1HGUおよび1HWGの構造)由来の原子座標および初期状態のパラメータ設定を使用して算出することができる。アルゴリズムの背後の根本原理についての記載は、B.LeeおよびF.M.Richards、「The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility」J.Mol.Biol. 55、379～400頁(1971)を参照されたい。

10

【0086】

別の実施形態では、アルブミン結合残基は、親水性スパーサーを介して追加的なジスルフィド架橋を有するGHに連結している。一般には、アルブミン結合残基は、親水性スパーサーを介してhGHのN末端、40位または141位に連結している。

【0087】

別の実施形態では、GHは、ループセグメントとヘリックスセグメントとの間またはループセグメントの内部またはループセグメント間またはヘリックスセグメント間に追加的なジスルフィド結合を含む。

20

【0088】

別の実施形態では、GHは、システインの少なくとも1つがアミノ酸残基128～154(L3)などのループセグメントに存在する追加的なジスルフィド結合を含む。

【0089】

別の実施形態では、GHは、ループセグメントとヘリックスセグメントをつなぐ追加的なジスルフィド結合を含む。

【0090】

別の実施形態では、GHは、ループセグメントとヘリックスBまたはヘリックス2(アミノ酸72～98に対応する)をつなぐ追加的なジスルフィド結合を含む。

30

【0091】

別の実施形態では、GHは、ヘリックス2(アミノ酸72～98に対応する)とループ3(アミノ酸128～154に対応する)を連結する追加的なジスルフィド結合を含む。

【0092】

別の実施形態では、GHは、配列番号1のR16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148Cおよび/またはV185C/S188Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間に追加的なジスルフィド結合を含む。

40

【0093】

別の実施形態では、GHの追加的なジスルフィド架橋は、hGH(配列番号1)のR16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148Cおよび/またはV185C/S188Cに対応する位置にあるアミノ酸対の少なくとも1つの間にある。

50

【 0 0 9 4 】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド結合は、配列番号1のA17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148Cおよび/またはR94C/D107Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間にある。

【 0 0 9 5 】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド結合は、配列番号1のD26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148Cおよび/またはR94C/D107Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間にある。

10

【 0 0 9 6 】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド結合は、配列番号1のH21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143Cおよび/またはS85C/S144Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間にある。

【 0 0 9 7 】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド結合は、配列番号1のS57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143Cおよび/またはS85C/S144Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間にある。一般には、追加的なジスルフィド架橋はQ84C/Y143Cである。

20

【 0 0 9 8 】

別の実施形態では、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して単一cys変異および追加的なジスルフィド架橋を有するGHに連結している。一般には、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して単一cys変異に連結している。特定の実施形態では、GHは、アルブミン結合残基が親水性スペーサーを介して連結する追加的なジスルフィド架橋Q84C/Y143Cおよび単一cys変異L101Cを有する。

【 0 0 9 9 】

別の実施形態では、GHは、追加的なジスルフィド結合と、T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187CおよびG190Cのいずれか1つ、例えばhGH(配列番号1)のT3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cのいずれか1つまたはhGH変異体の対応する残基から選択される単一cys変異とを有する。

30

【 0 1 0 0 】

特定の実施形態では、GHは、追加的なジスルフィド結合および単一cys変異を有し、前記単一cys変異は、T3、P5、S7、D11、H18、Q29、E30、E33、A34、Y35、K38、E39、Y42、S43、D47、P48、S55、S57、P59、S62、E65、Q69、E88、Q91、S95、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、D107、S108、D112、Q122、G126、E129、D130、G131、P133、T135、G136、T142、D147、N149、D154、A155、L156、R178、E186、G187およびG190からなる群、好ましくは、T3、P5、S7、D11、H18、Q29、E30、E33、A34、Y35、E88、Q91、S95、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、D107、S108、D112、Q122およびG126の群から選択されるhGH(配列番号1)の位置に相当する親GHに相当する位置に導入されている。GHコンジュゲートは、前記単一システイン残基の側鎖にアルブミン結合部分をさらに含む。

40

【 0 1 0 1 】

別の実施形態では、GHは、単一cys変異、およびループセグメントとヘリックスセグメントとの間またはループセグメントの内部またはループセグメント間またはヘリックスセグメント間の追加的なジスルフィド結合を含む。

50

【 0 1 0 2 】

別の実施形態では、GHは、単一cys変異、およびシステインの少なくとも1つがアミノ酸残基128～154(L3)などのループセグメントに存在する追加的なジスルフィド結合を含む。

【 0 1 0 3 】

別の実施形態では、GHは、単一cys変異と、アミノ酸残基128～154などのループセグメントと、ヘリックスBまたはヘリックス2(アミノ酸72～98に対応する)などのヘリックスセグメントをつなぐ追加的なジスルフィド結合とを含む。

【 0 1 0 4 】

別の実施形態では、GHは、単一cys変異と、ヘリックス2(アミノ酸72～98に対応する)とループ3(アミノ酸128～154に対応する)を連結する追加的なジスルフィド結合とを含む。

10

【 0 1 0 5 】

別の実施形態では、GHは、単一cys変異と、配列番号1のR16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148Cおよび/またはV185C/S188Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間の追加的なジスルフィド結合とを含む。

【 0 1 0 6 】

20

別の実施形態では、GHは、単一cys変異と、hGH(配列番号1)のR16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148Cおよび/またはV185C/S188Cに対応する位置にあるアミノ酸対の少なくとも1つの間の追加的なジスルフィド架橋とを含む。

【 0 1 0 7 】

別の実施形態では、GHは、単一cys変異と、配列番号1のA17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148Cおよび/またはR94C/D107Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間の追加的なジスルフィド結合とを含む。

30

【 0 1 0 8 】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド結合は、配列番号1のD26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148Cおよび/またはR94C/D107Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間にある。

【 0 1 0 9 】

別の実施形態では、GHは、単一cys変異と、配列番号1のH21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143Cおよび/またはS85C/S144Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間の追加的なジスルフィド結合とを含む。

40

【 0 1 1 0 】

別の実施形態では、GHは、単一cys変異と、配列番号1のS57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143Cおよび/またはS85C/S144Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間の追加的なジスルフィド結合とを含む。

【 0 1 1 1 】

親水性スパーサー(B)の溶解性は、そのLogP値によって説明することができる。分配係

50

数としても公知のLogPは、平衡にある2種の不混和性溶媒の混合物の2つの相中の化合物の濃度比の対数である。一般には、溶媒の一方は水であり、一方第2の溶媒は、オクタン-1-オール、クロロホルム、シクロヘキサンおよびプロピレングリコールジペラルゴナート(PGDP)から選択される。これらの異なる溶媒において測定されたLogP値は、主に水素結合の影響で、差がある。オクタノールは、水素結合を供与し、受容することができるが、シクロヘキサンは不活性である。クロロホルムは水素結合を供与することができるが、PGDPは、水素結合を受容することのみできる。LogP値は、当技術分野で公知の標準の方法によって測定することができる。

【0112】

本発明の一実施形態では、親水性スペーサーは、オクタン-1-オール、クロロホルム、シクロヘキサンおよびプロピレングリコールジペラルゴナート(PGDP)のいずれにおいても、0を下回るLogP、例えば、0.5を下回るLogPを有する。

10

【0113】

別の実施形態では、親水性スペーサーは、オクタン-1-オール、クロロホルム、シクロヘキサンおよびプロピレングリコールジペラルゴナート(PGDP)のいずれにおいても-1を下回るLogPを有する。

【0114】

あるいは、LogP値は、公開されているアルゴリズムを使用して、アルブミン結合剤部分または親水性スペーサー部分についてのmLogPおよび/またはcLogPとして算出することができる(T.Fujita; J. IwasaおよびC.Hansch、J. Am. Chem. Soc. 86、5175～5180頁(1964)「A New Substituent Constant, P_i , Derived from Partition Coefficients」、C.A.LipinskiらAdvanced Drug Delivery Reviews、23、3～25頁、(1997)「Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings」およびI.Moriguchi、S.Hirono、I.Nakagome、H.Hirano、Chem. Pharm. Bull. 42、976～978頁、(1994)「Comparison of Reliability of LogP Values for Drugs Calculated by Several Methods」)。

20

【0115】

本発明の一実施形態では、親水性スペーサー(B)は、mLogP<0を有する。

【0116】

別の実施形態では、成長ホルモン化合物(GH)は、親水性スペーサー(B)を介して1つのアルブミン結合残基に連結している。

30

【0117】

別の実施形態では、成長ホルモン化合物(GH)は、成長ホルモン化合物(GH)の遊離のシステムとカップリングしている親水性スペーサー(B)を介してアルブミン結合残基に連結している。

【0118】

別の実施形態では、成長ホルモン化合物(GH)は、1つまたは2つの親水性スペーサーを介して2つのアルブミン結合残基に連結している。したがって、一実施例では、一方のアルブミン結合残基が1つの親水性スペーサー(B)を介して単一cys変異に連結し、他方のアルブミン結合残基が1つの親水性スペーサー(B')を介して40位または141位のグルタミンに連結している;あるいは、2つのアルブミン結合残基が1つの親水性スペーサー(B)を介して単一cys変異または40位、141位またはN末端のグルタミンに連結している。さらに別の実施形態では、成長ホルモン化合物(GH)は、1つまたは複数の親水性スペーサーを介して3つのアルブミン結合残基に連結している。

40

【0119】

ある実施形態では、親水性スペーサーは、少なくとも1つのOEGモチーフ、ラジカル8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸、すなわち-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-を含む。別の特定の実施形態では、親水性スペーサーは、少なくとも2つのOEGモチーフを含む。そのようなOEGモチーフの配向は、一実施形態では、-C(O)-が成長ホルモン化合物に最も近いが、成長ホルモン化合物およびアルブミン結合リンカーにつながっておらず、また、-NH-が

50

アルブミン結合残基に最も近くなる配向である。2つのOEGモチーフを含むさらなる実施形態では、2つのモチーフは、同一の配向または異なる配向を有する。ある実施形態では、2つのそのようなOEGモチーフは、互いに隣接して位置するが、代替の実施形態では、そのようなOEGモチーフは、1つまたは複数の共有結合的に連結した原子によって分離されている。

【0120】

ある実施形態では、親水性スペーサーは、少なくとも1つのグルタミン酸残基を含む。アミノ酸であるグルタミン酸は、2つのカルボン酸基を含む。そのガンマカルボキシ基は、リジンのイプシロンアミノ基と、または、もし存在すれば、OEG分子のアミノ基と、または、もし存在すれば、別のGlu残基のアミノ基とアミド結合を形成するために用いることができる。代わりに、アルファカルボキシ基を、リジンのイプシロンアミノ基と、または、もし存在すれば、OEG分子のアミノ基と、または、もし存在すれば、別のGlu残基のアミノ基と同様のアミド結合を形成するために用いることができる。Gluのアミノ基は、今度は、アルブミン結合残基のカルボキシ基と、または、もし存在すれば、OEGモチーフのカルボキシ基と、または、もし存在すれば、別のGluのガンマカルボキシ基またはアルファカルボキシ基とアミド結合を形成することができる。1つのGluのアミノ基の、第2のGluのガンマカルボキシ基への連結は、「ガンマGlu」モチーフと称することができる。

【0121】

ある実施形態では、親水性スペーサーは、少なくとも1つの混合OEG-Gluモチーフ(-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)NH-CH(C(O)OH)-(CH₂)₂-C(O)-)または少なくとも1つの混合Glu-OEGモチーフ(-NH-CH(C(O)OH)-(CH₂)₂-C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-)またはそれらの組み合わせを含み、そのようなGlu-OEGモチーフおよびOEG-Gluモチーフは、1つまたは複数の共有結合的に連結した原子によって分離されていてよい、または、ガンマGluを形成しているGluのアミド結合によって互いに直接結合していてよい。

【0122】

別の態様では、本発明は、式(I):

A-W-B-GH(I)

(式中、

GHは単一cys変異を有する成長ホルモン化合物を表し、

BはCysへの変異の硫黄残基に連結した親水性スペーサーを表し、

Wは、AとBを連結する化学基であり、

Aはアルブミン結合残基を表す)

を有する成長ホルモンコンジュゲート、およびその薬学的に許容される塩に関する。

【0123】

別の実施形態では、GHは、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す。別の実施形態では、GHは、hGH(配列番号1)に対して少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%または例えば少なくとも99%の同一性を有する。別の実施形態では、hGHに対する前記同一性は、本明細書のアッセイIにおいて決定された、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも10%、例えば少なくとも20%、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも60%、例えば少なくとも80%と結びついている。配列同一性についての実施形態のいずれか1つは、活性についての実施形態のいずれか1つと組み合わせることができる。例えば、hGHに対して少なくとも80%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも60%と結びついているGH;hGHに対して少なくとも90%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも40%と結びついているGH;hGHに対して少なくとも95%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも80%と結びついているGHなど。

【0124】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、GHのN末端、H1領域、H2領域、L2領域またはH3領域における単一cys変異のいずれか1つから選択される単一cys変異を有する。別の

そのような実施形態では、単一cys変異は、N末端内に位置し、その変異は、例えばT3C、P5C、S7Cのいずれか1つである、または、単一cys変異はH1(アミノ酸9～35に対応する)内に位置し、その変異は、例えば、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35Cのいずれか1つである、または、単一cys変異は、L1(アミノ酸36～71に対応する)内に位置し、その変異は、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、S57C、P59C、S62C、E65C、Q69Cのいずれか1つ、もしくは、好ましくはY42C、S55C、S57C、S62C、Q69Cのいずれか1つである、または単一cys変異は、H2、L2またはH3(アミノ酸72～98に対応する、アミノ酸99～106およびアミノ酸107～127)にあり、その変異は、hGH(配列番号1)のE88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cのいずれか1つである、または、単一cys変異は、L3もしくはH4(アミノ酸128～154およびアミノ酸155～184に対応する)にある。L3およびH4(128～154およびアミノ酸155～184)では、変異は、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180Cのいずれか1つである、またはC末端では、変異はE186C G187C G190のいずれか1つである。

10

【0125】

hGHバリエーションに単一cys変異が存在する場合、変異は、対応するアミノ酸残基に位置する。

【0126】

別の実施形態は、GHにおける単一cys変異が、hGH(配列番号1)のT3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187CおよびG190Cのいずれか1つ、例えば、T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cなどのいずれか1つから選択されるGHコンジュゲートを包含する。

20

【0127】

さらに別の実施形態では、単一Cys変異は、hGHのアミノ酸93～106またはhGHバリエーションの対応する残基の範囲内に位置する。別の特定の実施形態では、単一Cys変異は、L2の範囲内、例えば、アミノ酸99～106またはアミノ酸99～103の範囲内、または対応する残基の範囲内に位置する。

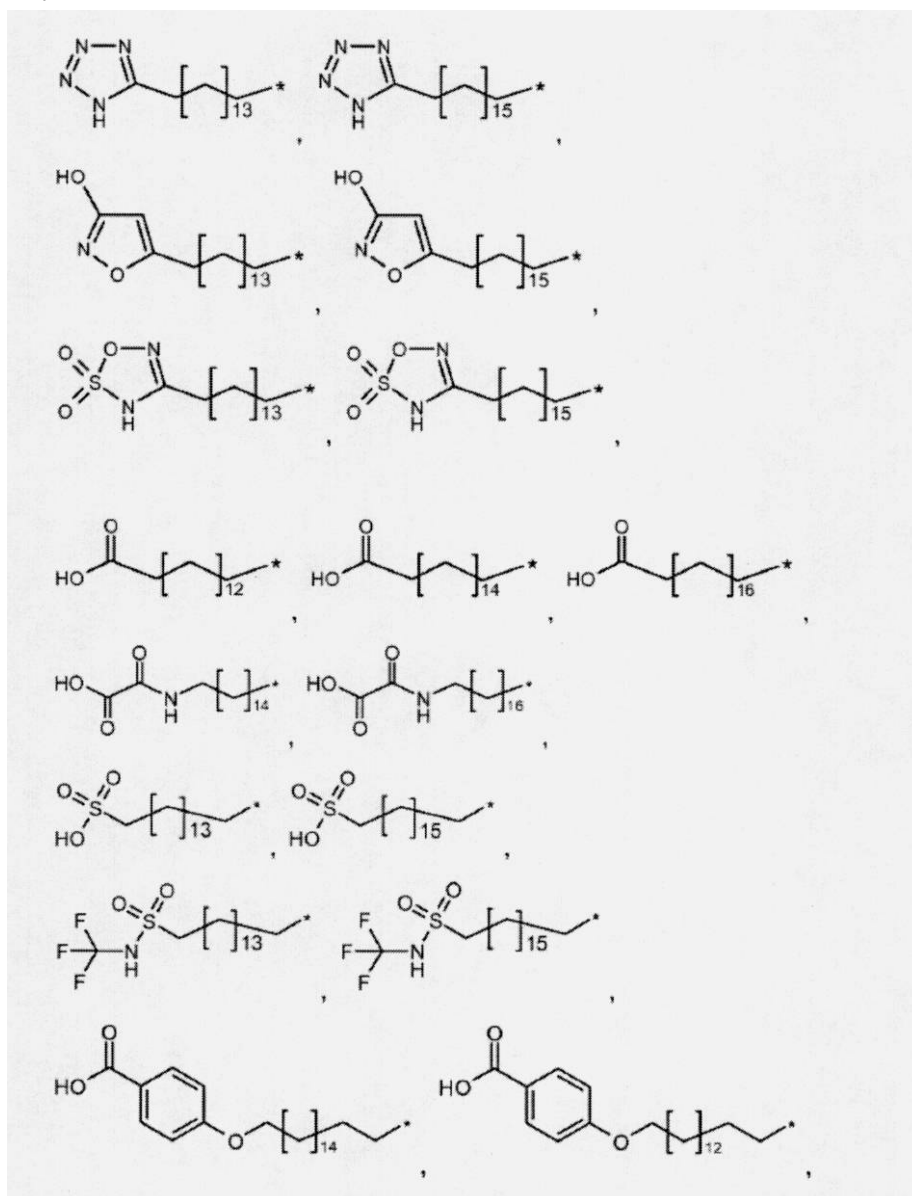
30

【0128】

別の実施形態では、Aは、

【0129】

【化2】



10

20

30

【0130】

(式中、*は、Wを通じたBへの付着を示す)
から選択される。

【0131】

別の実施形態では、Wは、式

-W₇-Y-

(式中、

Yは(CH₂)₁₇-C₃~₁₀-シクロアルキル-W₈-または原子価結合であり、
17は0~6であり、

40

W₇は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、
-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-
、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s3は0または1であり、
W₈は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、
-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-
、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s4は0または1である)
を有する。

【0132】

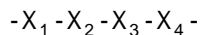
別の実施形態では、Bは、上記の1つまたは複数のOEGモチーフ、および/またはガンマGI

50

uモチーフを含む、または、それからなる。

【 0 1 3 3 】

別の実施形態では、Bは、式



(式中、

X_1 は $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ であり、

X_2 は $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ であり、

X_3 は $-[(CHR^5)_{l5}-W_6]_{m7}-$ であり、

X_4 は $F-D1-(CH_2)_{l6}-D2-$ であり、

$l1$ 、 $l2$ 、 $l3$ 、 $l4$ 、 $l5$ および $l6$ は、独立に、0～16から選択され、

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ は、独立に、0～10から選択され、

$m2$ および $m5$ は、独立に、0～25から選択され、

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ は、独立に、0～16から選択され、

Fはアリール、ヘタリール、ピロリジン-2,5-ジオンまたは原子価結合であり、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁₋₆-アルキルで置換されており、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 は、独立に、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆-アルキル、アリールまたはヘタリールから選択され；アルキル基、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CNまたは-OHで置換されており、

D1、D2、E1およびE2は、独立に、-O-、-N(R⁶)-、-N(C(O)R⁷)-または原子価結合から選択され；R⁶およびR⁷は、独立に、水素またはC₁₋₆-アルキルを示し、

$W_1 \sim W_5$ は、独立に、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され；s2は0または1であり、

W_6 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s1}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆-アルキル、-C(O)NHC₁₋₆-アルキルまたは原子価結合から選択され；s1は0または1であり、C₁₋₆-アルキル基は、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,5-ジオン、-NHC(O)CH*CH₂COOHまたは-NHC(O)CH₂CH*COOHで置換されており；(*)はCHの炭素原子からX₄への付着点を示す)

を有する。

【 0 1 3 4 】

別の実施形態では、 $l1$ 、 $l2$ 、 $l3$ 、 $l4$ 、 $l5$ および $l6$ は、独立に、0～6である。

【 0 1 3 5 】

別の実施形態では、 $m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ は、独立に、0～6である。

【 0 1 3 6 】

別の実施形態では、 $m2$ および $m5$ は、独立に、0～10である。

【 0 1 3 7 】

別の実施形態では、 $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ は、独立に、0～10である。

【 0 1 3 8 】

別の実施形態では、D1およびD2は、独立に、-O-または-N(R⁶)-または原子価結合から選択される。

【 0 1 3 9 】

別の実施形態では、E1およびE2は、独立に、-O-または-N(R⁶)-または原子価結合から選択される。

【 0 1 4 0 】

別の実施形態では、 W_1 から W_8 までが、独立に、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆-アルキル、-C(O)NHC₁₋₆-アルキルまたは原

10

20

30

40

50

子価結合からなる群から選択され;アルキル基が、場合によって、オキソ、ピロリジン-2, 5-ジオン、-NHC(O)CH*CH₂COOHまたは-NHC(O)CH₂CH*COOHで置換されており;(*)がCHの炭素原子からX₄への付着点を示す。

【 0 1 4 1 】

別の実施形態では、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 が、独立に、水素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ または $C_1 \sim 6$ -アルキルから選択され; $C_1 \sim 6$ -アルキル基が、場合によって、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ または $-S(O)_2OH$ で置換されている。

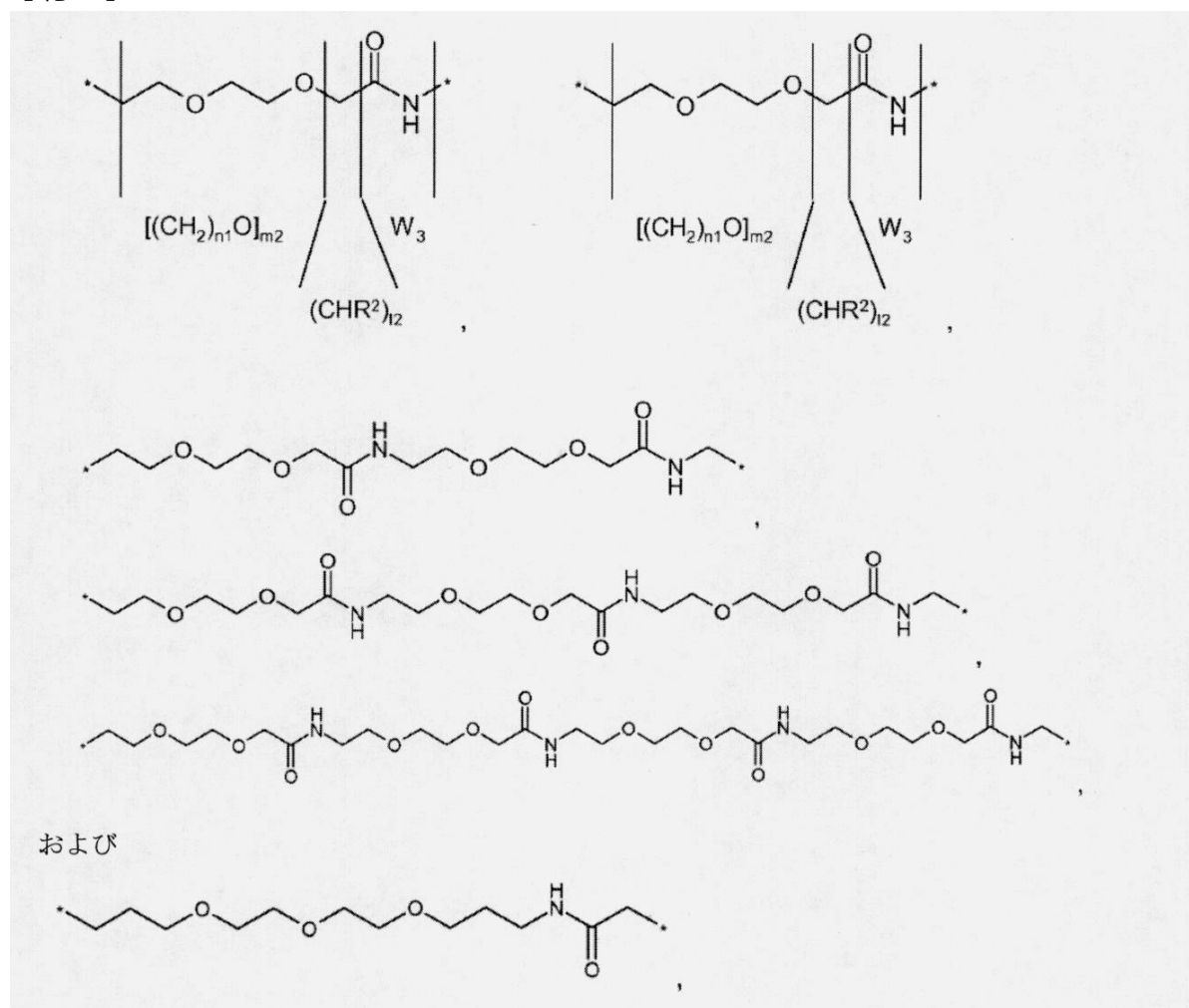
【 0 1 4 2 】

別の実施形態では、 $-\{[(\text{CH}_2)_{n1}\text{E1}]_{m2}-[(\text{CHR}^2)_{l2}-\text{W}_3]_{m3}\}_{n2}$ -および $-\{[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E2}]_{m5}-[(\text{CHR}^4)_{l4}-\text{W}_5]_{m6}\}_{n4}$ -(式中、E1およびE2は-O-である)は、

10

【 0 1 4 3 】

【化 3】



20

30

【 0 1 4 4 】

(式中、*は、付着点、すなわち開結合(open bond)を示す) から選択される。

40

【 0 1 4 5 】

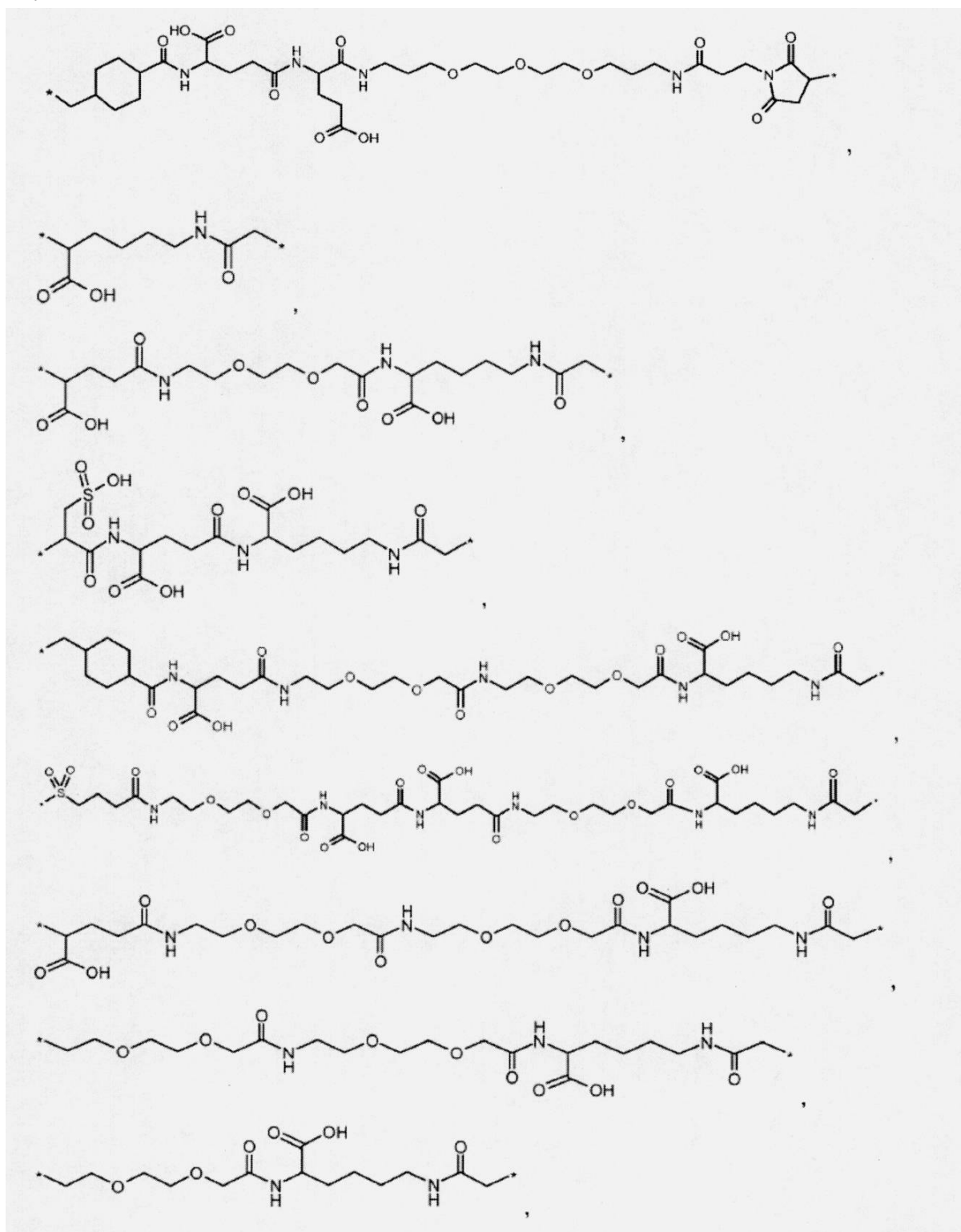
別の実施形態では、 X_4 が、原子価結合であり、 W_6 がピロリジン-2,5-ジオン、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ または $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ のいずれかから選択され、(*)が、CHの炭素原子からGHへの付着点を示す。

【 0 1 4 6 】

別の実施形態では、Bが

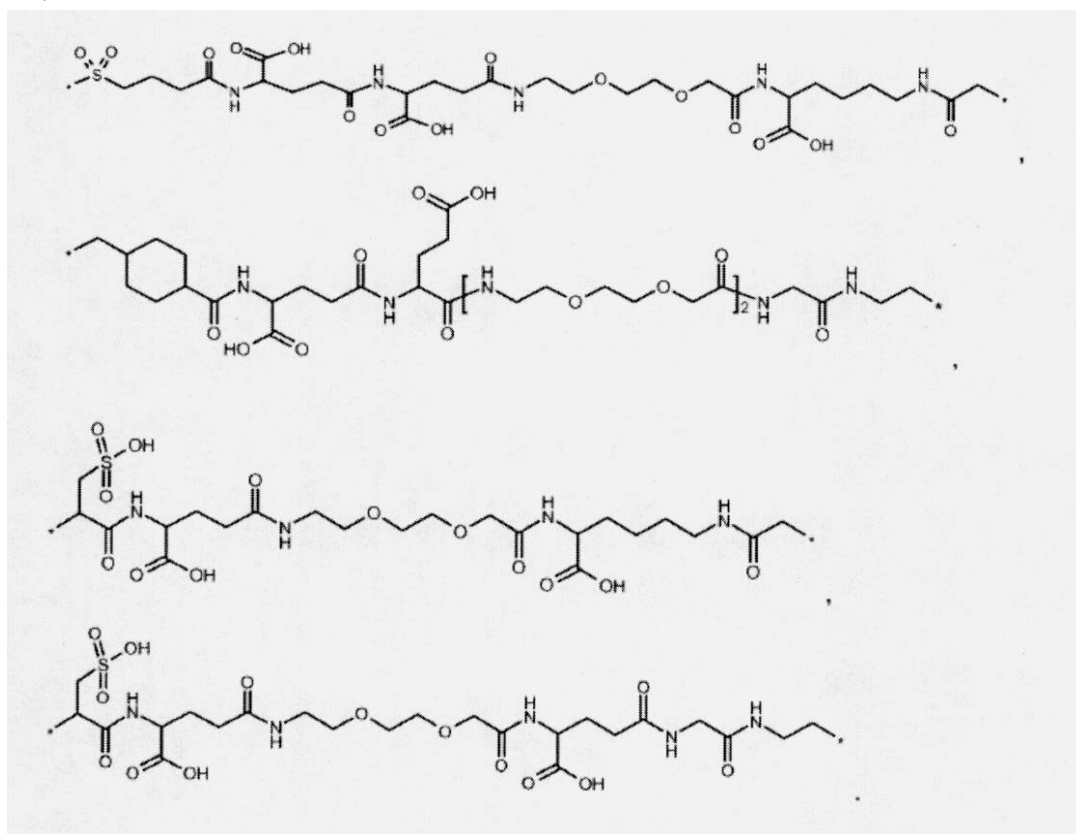
【 0 1 4 7 】

【化 4】



【 0 1 4 8 】

【化 5】



10

20

【 0 1 4 9 】

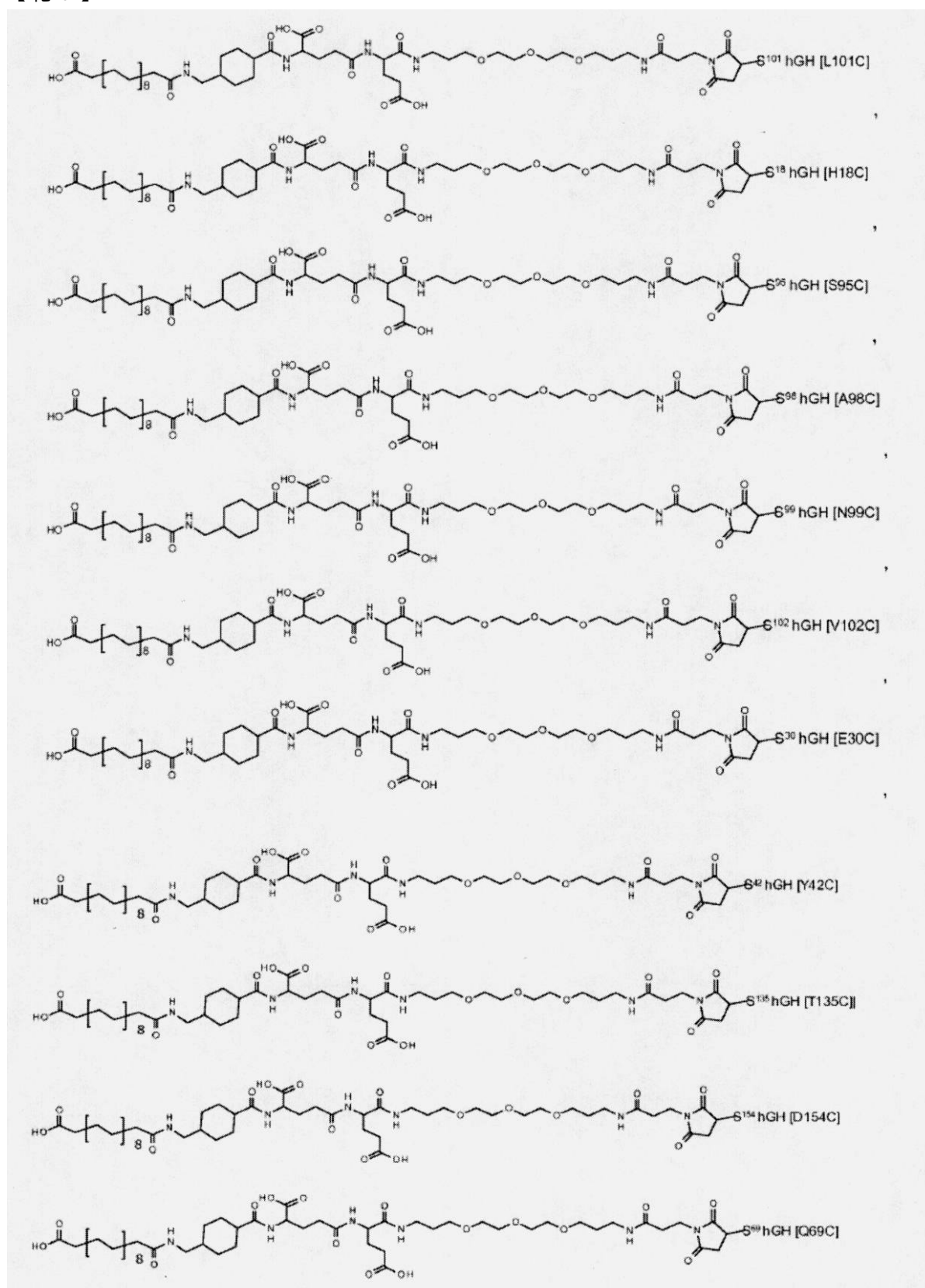
から選択される。

【 0 1 5 0 】

別の実施形態では、GHコンジュゲートは

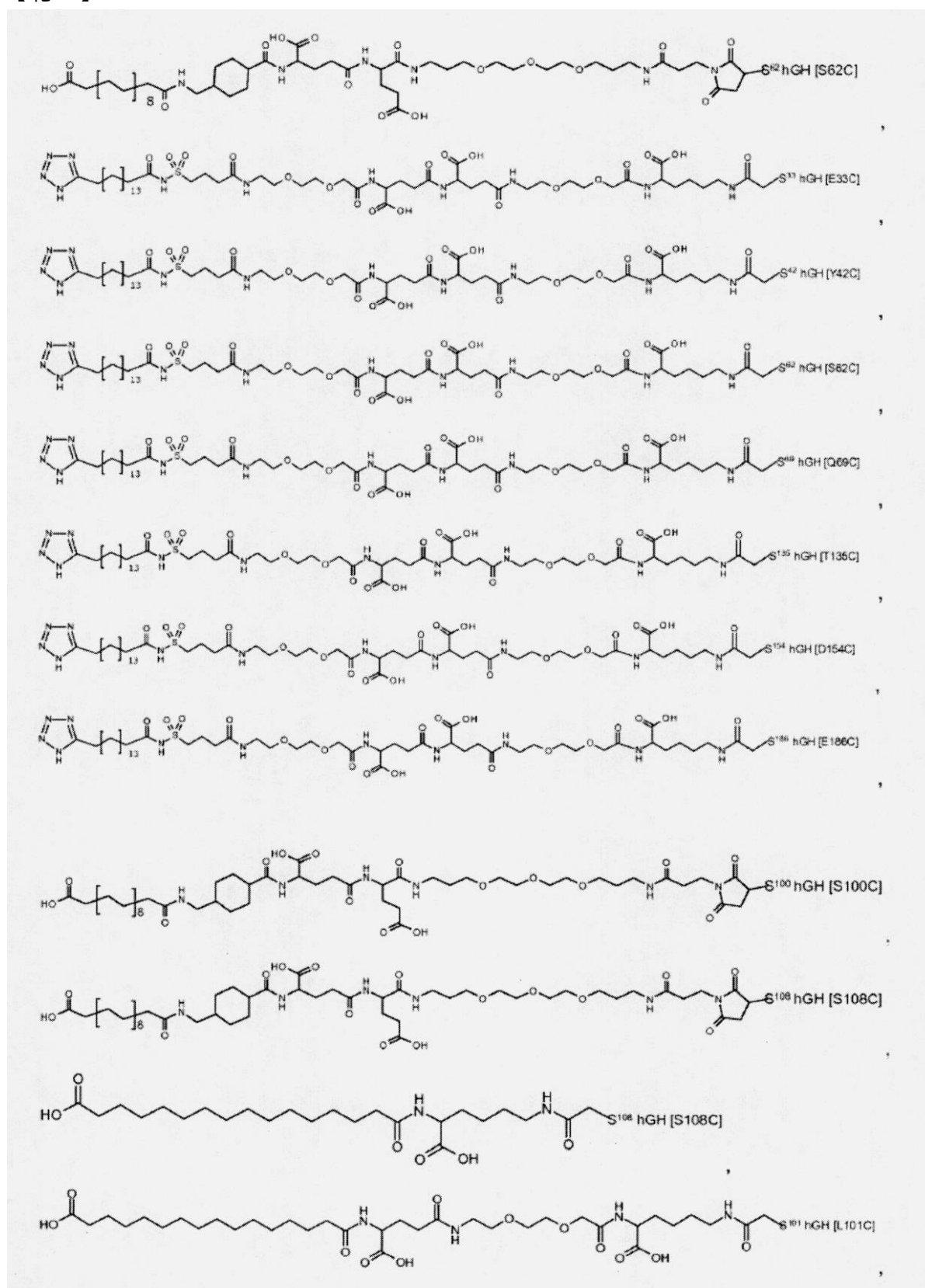
【 0 1 5 1 】

【化 6】



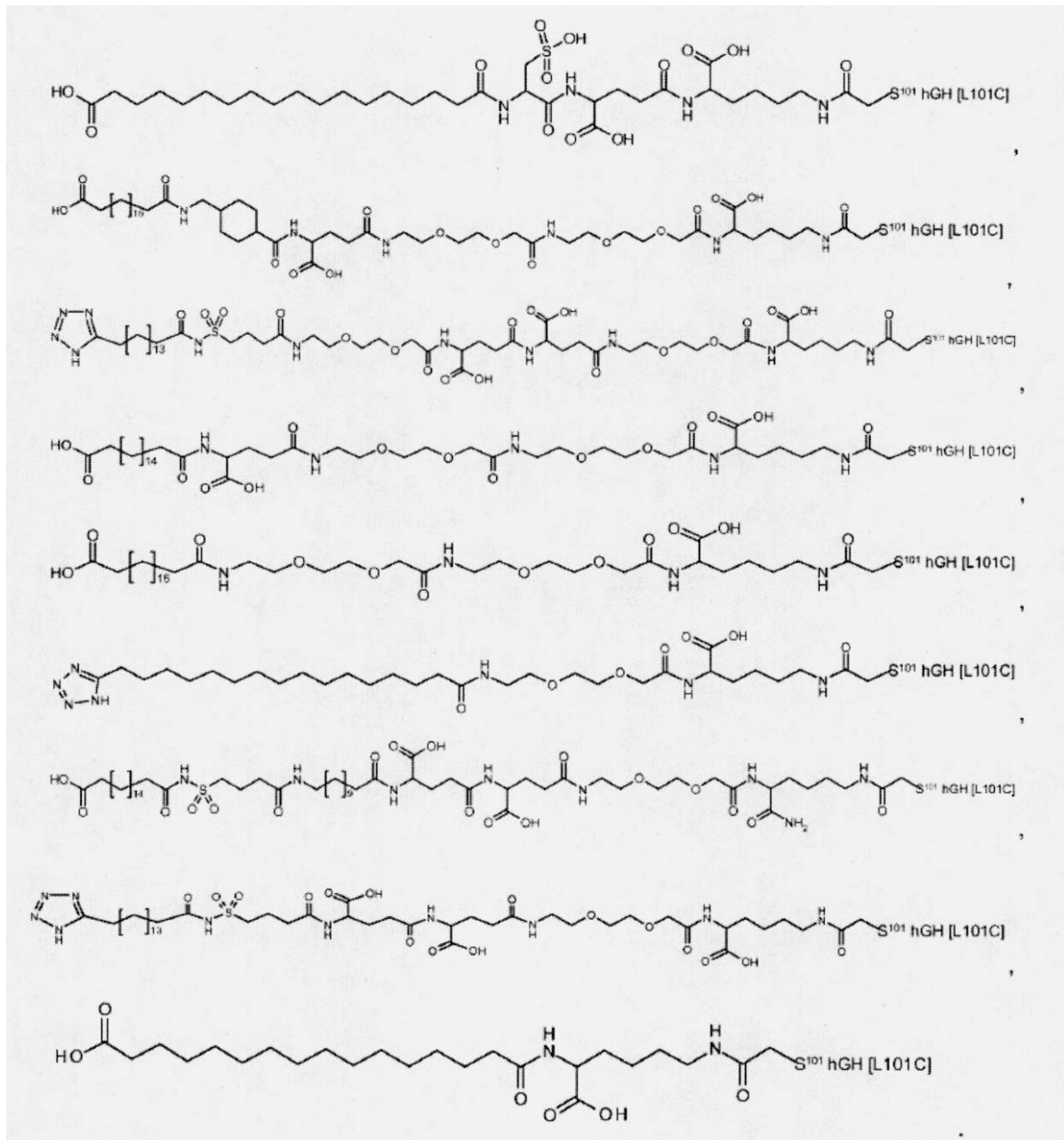
【 0 1 5 2 】

【化 7】



【 0 1 5 3 】

【化 8】



【 0 1 5 4 】

から選択される。

【 0 1 5 5 】

別の態様では、本発明は、式(1)：

A-W-B-GH (1)

(式中、

GHは、追加的なジスルフィド架橋を有する成長ホルモン化合物を表し、

Bは、親水性スペーサーを表し、

Wは、AとBを連結する化学基であり、

Aはアルブミン結合残基を示す)

を有する成長ホルモンコンジュゲート、およびその薬学的に許容される塩に関する。

【 0 1 5 6 】

別の実施形態では、GHは、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す。別の実施形態では、GHは、hGH(配列番号1)に対して少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例え

10

20

30

40

50

ば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%または例えば少なくとも99%の同一性を有する。別の実施形態では、hGHに対する前記同一性は、本明細書のアッセイIにおいて決定された、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも10%、例えば少なくとも20%、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも60%、例えば少なくとも80%と結びついている。配列同一性についての実施形態のいずれか1つは、活性についての実施形態のいずれか1つと組み合わせることができる。例えば、hGHに対して少なくとも80%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも60%と結びついているGH;hGHに対して少なくとも90%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも40%と結びついているGH;hGHに対して少なくとも95%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも80%と結びついているGHなど。

10

【 0 1 5 7 】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、ループセグメントとヘリックスセグメントとの間またはループセグメントの内部またはループセグメント間またはヘリックスセグメント間に追加的なジスルフィド結合を含む。

【 0 1 5 8 】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、システインの少なくとも1つがアミノ酸残基128~154などのループセグメントに存在する追加的なジスルフィド結合を含む。

【 0 1 5 9 】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、アミノ酸残基128~154などのループセグメント(H3)と、ヘリックスBまたはヘリックス2(アミノ酸72~98に対応する)などのヘリックスセグメントをつなぐ追加的なジスルフィド結合を含む。

20

【 0 1 6 0 】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、ヘリックス2(アミノ酸72~98に対応する)とループ3(アミノ酸128~154に対応する)を連結する追加的なジスルフィド結合を含む。

【 0 1 6 1 】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、配列番号1のR16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148Cおよび/またはV185C/S188Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間に追加的なジスルフィド結合を含む。

30

【 0 1 6 2 】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド架橋は、hGH(配列番号1)のR16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148Cおよび/またはV185C/S188Cに対応する位置にあるアミノ酸対の少なくとも1つの間にある。

40

【 0 1 6 3 】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、配列番号1のA17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148Cおよび/またはR94C/D107Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間に追加的なジスルフィド結合を含む。

【 0 1 6 4 】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド結合は、配列番号1のD26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/

50

S144C、F92C/T148Cおよび/またはR94C/D107Cに対応する位置にあるアミノ酸対の少なくとも1つの間にある。

【0165】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、配列番号1のH21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143Cおよび/またはS85C/S144Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間に追加的なジスルフィド結合を含む。

【0166】

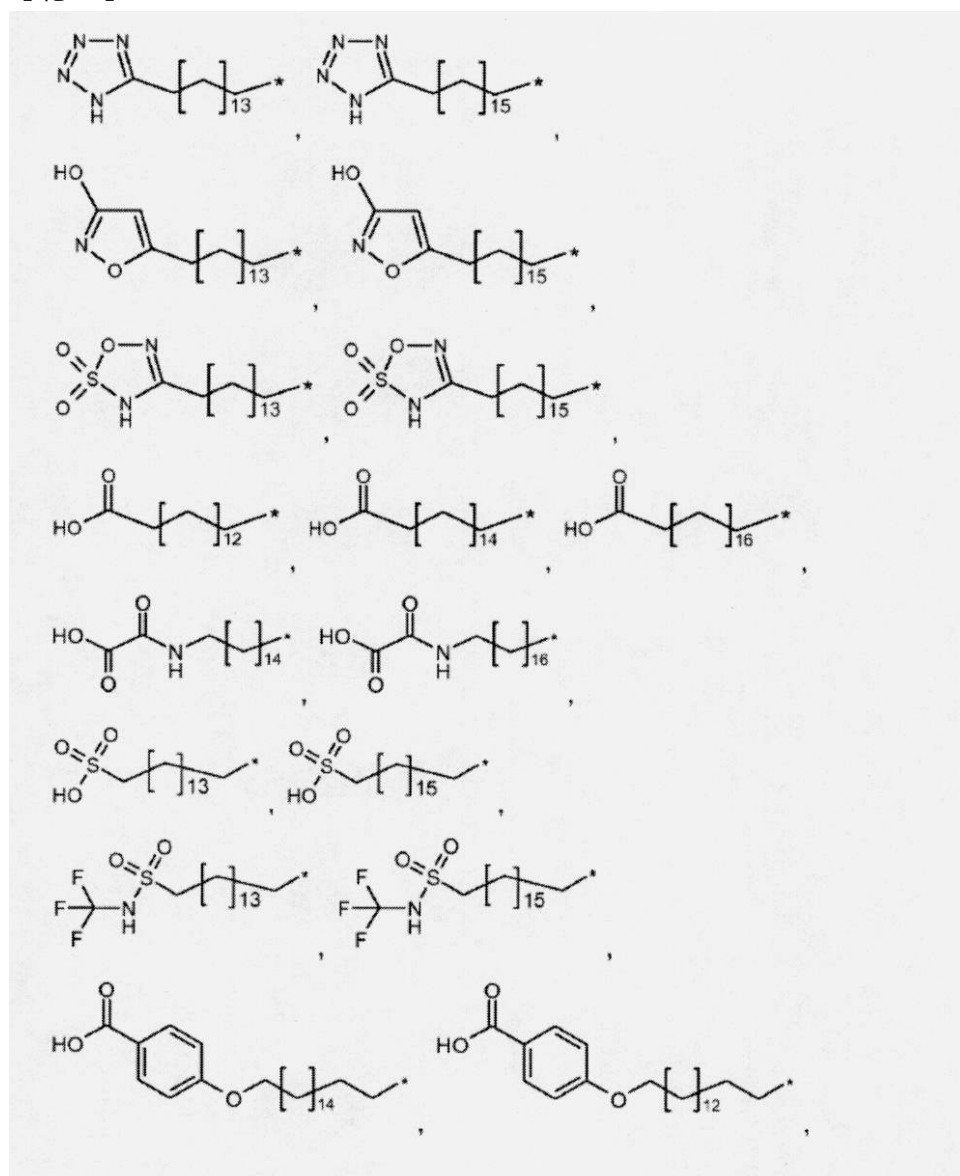
別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、配列番号1のS57C/Y143C、Q84/Y143C、S85C/Y143Cおよび/またはS85C/S144Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間に追加的なジスルフィド結合を含む。

【0167】

別の実施形態では、Aは、

【0168】

【化9】



【0169】

(式中、*は、Wを通じたBへの付着を示す)
から選択される。

【 0 1 7 0 】

別の実施形態では、Wは、式

-W₇-Y-

(式中、

Yは(CH₂)₁₇-C₃~₁₀-シクロアルキル-W₈-または原子価結合であり、

17は0~6であり、

W₇は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s3は0または1であり、

W₈は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s4は0または1である)

を有する。

【 0 1 7 1 】

別の実施形態では、Bは、上記の1つまたは複数のOEGモチーフ、および/またはガンマGl uモチーフを含む、または、それからなる。

【 0 1 7 2 】

別の実施形態では、Bは、式

-X₁-X₂-X₃-X₄-

(式中、

X₁は-W₁-[(CHR¹)₁₁-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)₁₂-W₃]_{m3}]_{n2}-であり、

X₂は-[(CHR³)₁₃-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)₁₄-W₅]_{m6}]_{n4}-であり、

X₃は-[(CHR⁵)₁₅-W₆]_{m7}-であり、

X₄はF-D1-(CH₂)₁₆-D2-であり、

11、12、13、14、15および16は、独立に、0~16から選択され、

m1、m3、m4、m6およびm7は、独立に、0~10から選択され、

m2およびm5は、独立に、0~25から選択され、

n1、n2、n3およびn4は、独立に、0~16から選択され、

Fはアリール、ヘタリール、ピロリジン-2,5-ジオンまたは原子価結合であり、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂O HまたはC₁~₆-アルキルで置換されており、

R¹、R²、R³、R⁴およびR⁵は、独立に、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-N H-C(=NH)-NH₂、C₁~₆-アルキル、アリールまたはヘタリールから選択され;アルキル基、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CNまたは-OHで置換されており、

D1、D2、E1およびE2は、独立に、-O-、-N(R⁶)-、-N(C(O)R⁷)-または原子価結合から選択され;R⁶およびR⁷は、独立に、水素またはC₁~₆-アルキルを示し、

W₁~W₅は、独立に、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s2は0または1であり、

W₆は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s1}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O)C₁~₆-アルキル、-C(O)NHC₁~₆-アルキルまたは原子価結合から選択され;s1は0または1であり、C₁~₆-アルキル基は、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,5-ジオン、-NHC(O)CH*CH₂COOHまたは-NHC(O)CH₂CH*COOHで置換されており;(*)はCHの炭素原子からX₄への付着点を示す)

を有する。

【 0 1 7 3 】

別の実施形態では、11、12、13、14、15および16は、独立に、0~6である。

【 0 1 7 4 】

別の実施形態では、 m_1 、 m_3 、 m_4 、 m_6 および m_7 は、独立に、0～6である。

【 0 1 7 5 】

別の実施形態では、 m_2 および m_5 は、独立に、0～10である。

【 0 1 7 6 】

別の実施形態では、 n_1 、 n_2 、 n_3 および n_4 は、独立に、0～10である。

【 0 1 7 7 】

別の実施形態では、 D_1 および D_2 は、独立に、-O-または-N(R^6)-または原子価結合から選択される。

【 0 1 7 8 】

別の実施形態では、 E_1 および E_2 は、独立に、-O-または-N(R^6)-または原子価結合から選択される。

10

【 0 1 7 9 】

別の実施形態では、 W_1 から W_8 までが、独立に、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆-アルキル、-C(O)NHC₁₋₆-アルキルまたは原子価結合からなる群から選択され；アルキル基が、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,5-ジオン、-NHC(O)CH*CH₂COOHまたは-NHC(O)CH₂CH*COOHで置換されており；(*)がCHの炭素原子から X_4 への付着点を示す。

【 0 1 8 0 】

別の実施形態では、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 が、独立に、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁₋₆-アルキルから選択され；C₁₋₆-アルキル基が、場合によって、-C(O)OH、-C(O)NH₂または-S(O)₂OHで置換されている。

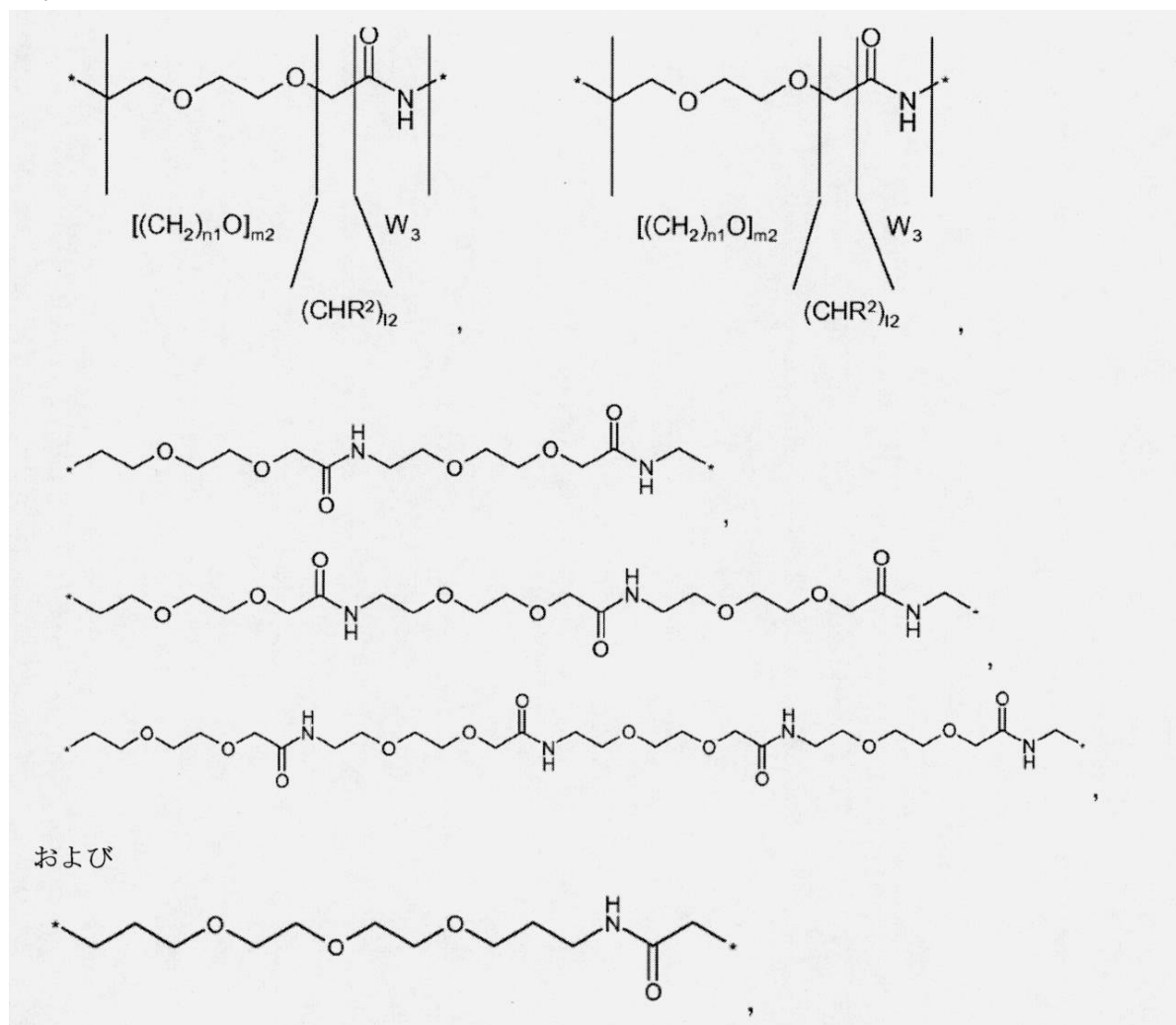
20

【 0 1 8 1 】

別の実施形態では、-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{l2}-W₃]_{m3}}_{n2}-および-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)_{l4}-W₅]_{m6}}_{n4}-(式中、 E_1 および E_2 は-O-である)は、

【 0 1 8 2 】

【化 1 0】



【 0 1 8 3 】

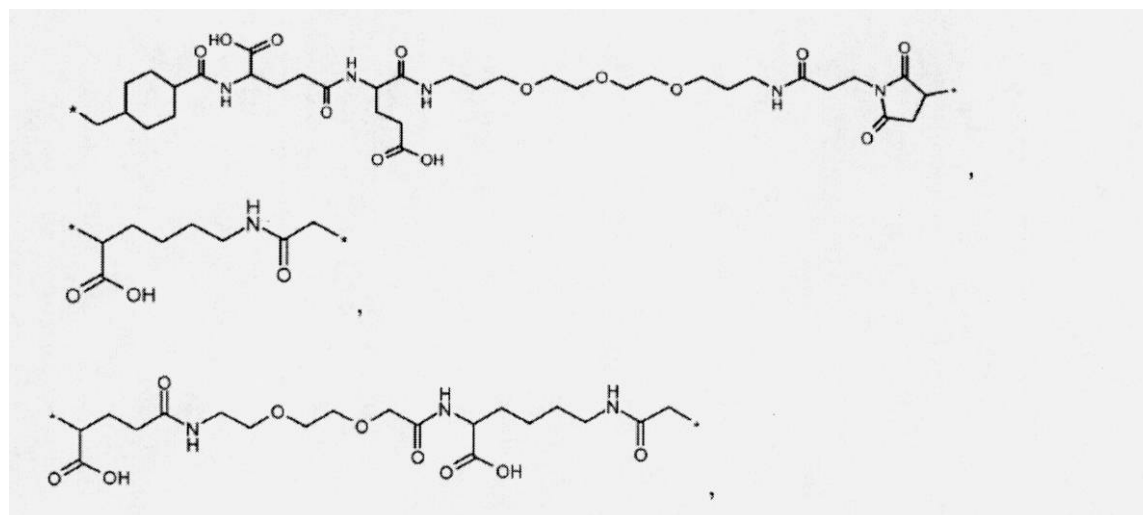
(式中、*は、付着点、すなわち開結合を示す)
から選択される。

【 0 1 8 4 】

別の実施形態では、Bは

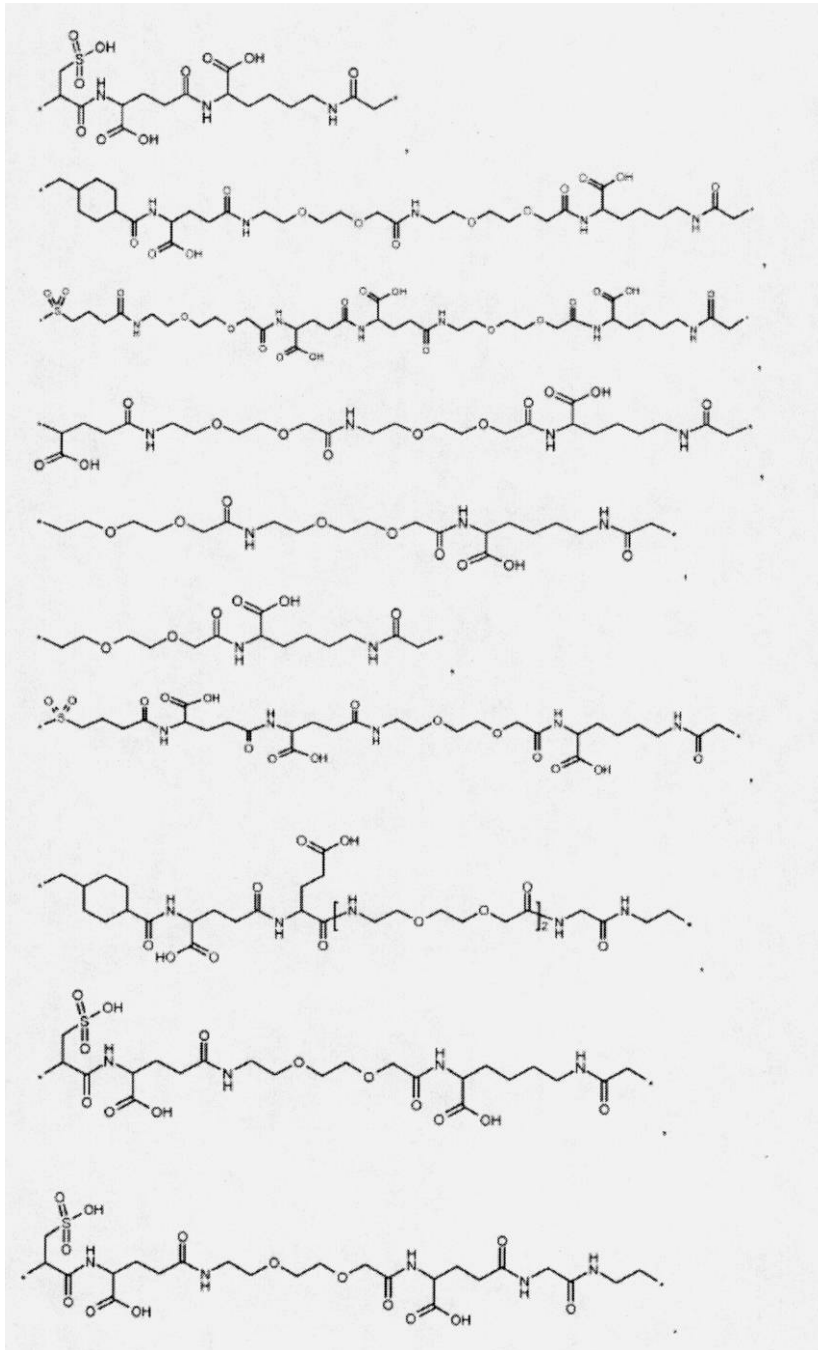
【 0 1 8 5 】

【化 1 1】



【 0 1 8 6 】

【化 1 2】



10

20

30

【 0 1 8 7 】

から選択される。

【 0 1 8 8 】

別の実施形態では、Aは、Bを介して、配列番号1の40位、141位、または成長ホルモン化合物のN末端残基に対応する位置でグルタミン残基に付着している。

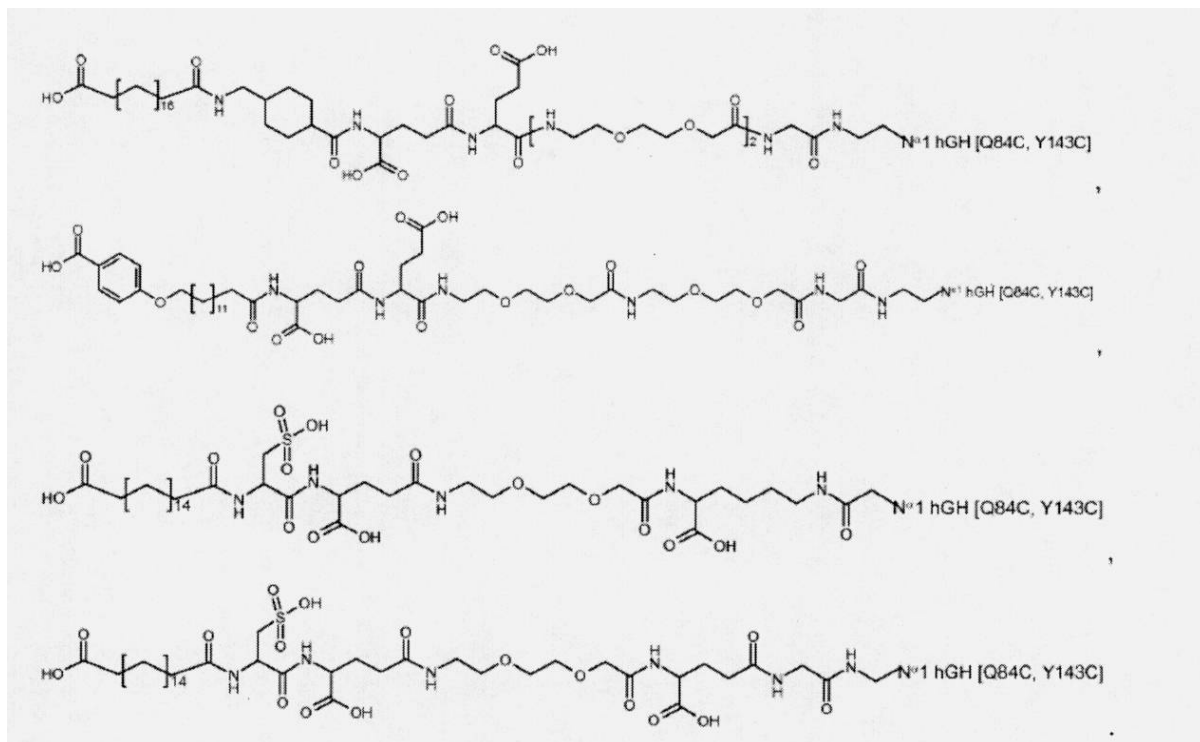
40

【 0 1 8 9 】

別の実施形態では、GHコンジュゲートは

【 0 1 9 0 】

【化 13】



【0191】

から選択される。

【0192】

別の態様では、本発明は、式(1)：

A-W-B-GH (1)

(式中、

GHは単一Cys変異および追加的なジスルフィド架橋を有する成長ホルモン化合物を表し、

BはCysへの変異の硫黄残基に連結した親水性スパーサーを表し、

Wは、AとBを連結する化学基であり、

Aはアルブミン結合残基を示す)

を有する成長ホルモンコンジュゲート、およびその薬学的に許容される塩に関する。

【0193】

別の実施形態では、GHは、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す。別の実施形態では、GHは、hGH(配列番号1)に対して少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%または例えば少なくとも99%の同一性を有する。別の実施形態では、hGHに対する前記同一性は、本明細書のアッセイIにおいて決定された、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも10%、例えば少なくとも20%、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも60%、例えば少なくとも80%と結びついている。配列同一性についての実施形態のいずれか1つは、活性についての実施形態のいずれか1つと組み合わせることができる。例えば、hGHに対して少なくとも80%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも60%と結びついているGH;hGHに対して少なくとも90%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも40%と結びついているGH;hGHに対して少なくとも95%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも80%と結びついているGHなど。

【0194】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、追加的なジスルフィド結合、およびGHのN末端、H1領域、H2領域、L2領域またはH3領域における単一cys変異のいずれか1つから選択される単一cys変異を有する。別のそのような実施形態では、単一Cys変異は、N末端内に

位置し、その変異は、例えばT3C、P5C、S7Cのいずれか1つである、または、単一Cys変異はH1(アミノ酸9～35に対応する)内に位置し、その変異は、例えば、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35Cのいずれか1つである、または、単一Cys変異は、L1(アミノ酸36～71に対応する)内に位置し、その変異は、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、S57C、P59C、S62C、E65C、Q69Cのいずれか1つ、もしくは、好ましくはY42C、S55C、S57C、S62C、Q69Cのいずれか1つである、または単一Cys変異は、H2、L2またはH3(アミノ酸72～98に対応する、アミノ酸99～106およびアミノ酸107～127)にあり、その変異は、hGH(配列番号1)のE88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cのいずれか1つである、または、単一Cys変異は、L3もしくはH4(アミノ酸128～154およびアミノ酸155～184に対応する)にある。L3およびH4(128～154およびアミノ酸155～184)では、変異は、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180Cのいずれか1つである、またはC末端では、変異はE186C G187C G190Cのいずれか1つである。

10

【0195】

hGHバリエーションに単一Cys変異が存在する場合、変異は、対応するアミノ酸残基に位置する。

【0196】

別の実施形態は、追加的なジスルフィド結合を有するGHコンジュゲートと、hGH(配列番号1)のT3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187CおよびG190Cのいずれか1つ、例えば、T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cなどのいずれか1つから選択されるGHにおける単一cys変異とを含む。

20

【0197】

さらに別の実施形態では、単一cys変異は、hGHのアミノ酸93～106またはhGH変異体の対応する残基の範囲内に位置する。別の特定の実施形態では、単一cys変異は、L2の範囲内、例えば、アミノ酸99～106またはアミノ酸99～103の範囲内、または対応する残基の範囲内に位置する。

30

【0198】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド結合は、ループセグメントとヘリックスセグメントとの間またはループセグメントの内部またはループセグメント間またはヘリックスセグメント間の追加的なジスルフィド結合であり得る。

【0199】

別の実施形態では、GHは、単一cys変異体と、システインの少なくとも1つがアミノ酸残基128～154(L3)などのループセグメントに存在する追加的なジスルフィド結合とを含む。

【0200】

別の実施形態では、GHは、単一cys変異体と、アミノ酸残基128～154などのループセグメントと、ヘリックスBまたはヘリックス2(アミノ酸72～98に対応する)などのヘリックスセグメントをつなぐ追加的なジスルフィド結合とを含む。

40

【0201】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、単一cys変異体と、ヘリックス2(アミノ酸72～98に対応する)とループ3(アミノ酸128～154に対応する)を連結する追加的なジスルフィド結合とを含む。

【0202】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、単一cys変異体と、配列番号1のR16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58

50

C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148Cおよび/またはV185C/S188Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間の追加的なジスルフィド結合とを含む。

【 0 2 0 3 】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド架橋は、hGH(配列番号1)のR16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148Cおよび/またはV185C/S188Cに対応する位置にあるアミノ酸対の少なくとも1つの間にある。

10

【 0 2 0 4 】

別の実施形態では、コンジュゲートのGHは、単一cys変異体と、配列番号1のA17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148Cおよび/またはR94C/D107Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間の追加的なジスルフィド結合とを含む。

20

【 0 2 0 5 】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド結合は、配列番号1のD26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148Cおよび/またはR94C/D107Cに対応する位置にあるアミノ酸対の少なくとも1つの間にある。

【 0 2 0 6 】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド結合は、配列番号1のH21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143Cおよび/またはS85C/S144Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間にある。

30

【 0 2 0 7 】

別の実施形態では、追加的なジスルフィド結合は、配列番号1のS57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143Cおよび/またはS85C/S144Cに対応する位置にあるアミノ酸対のうちの1つの間にある。

【 0 2 0 8 】

別の実施形態では、GHは、L2における単一システインの変異と、アミノ酸残基128～154(H3)などのループセグメントと、ヘリックスBまたはヘリックス2(アミノ酸72～98に対応する)などのヘリックスセグメントをつなぐ追加的なジスルフィド結合とを含む。

【 0 2 0 9 】

ある実施形態では、GHは、以下の群から選択される変異の組み合わせを含む:A98C/Q84C/Y143C、A98C/S85C/Y143C、A98C/S85C/S144C、N99C/Q84C/Y143C、N99C/S85C/Y143C、N99C/S85C/S144C、S101C/Q84C/Y143C、S101C/S85C/Y143C、S101C/S85C/S144C、L101C/Q84C/Y143C、L101C/S85C/Y143C、L101C/S85C/S144C、C102C/Q84C/Y143C、C102C/S85C/Y143CおよびC102C/S85C/S144C。

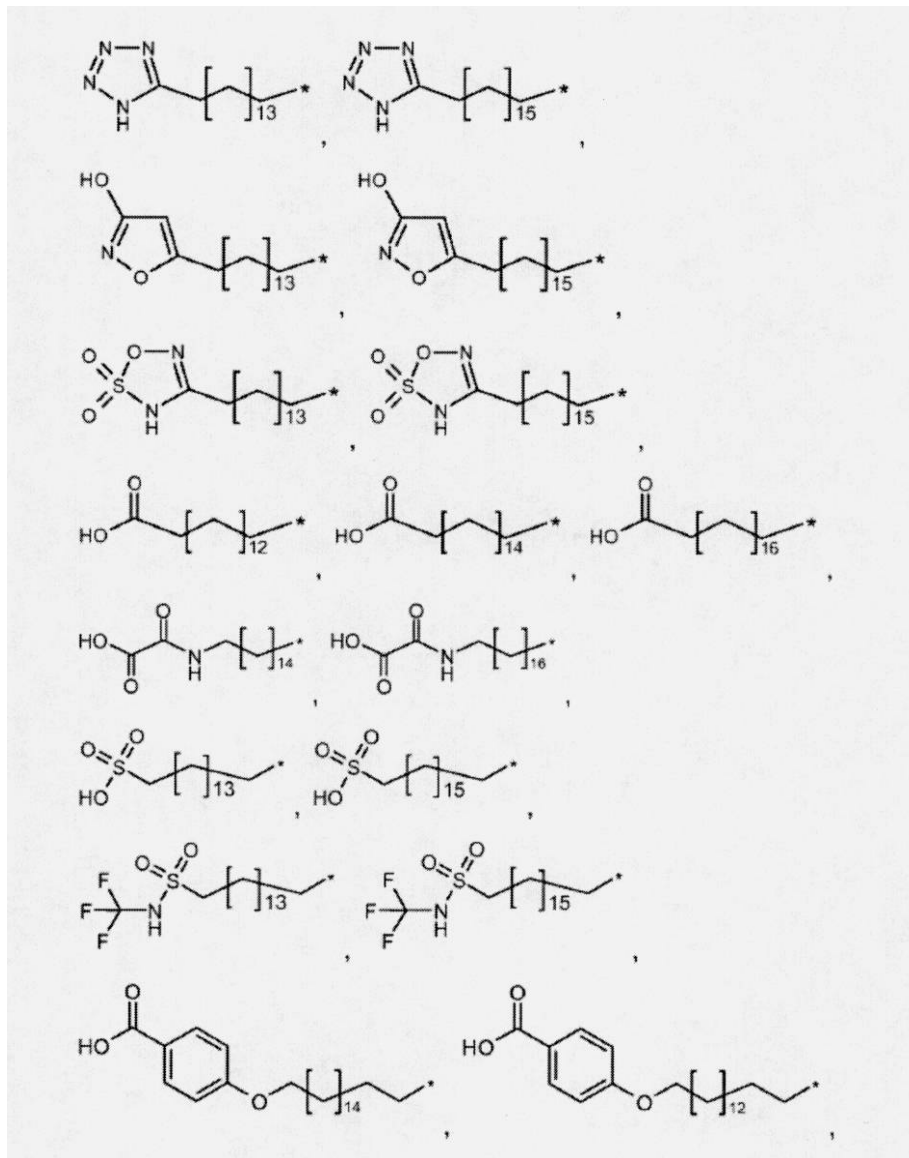
40

【 0 2 1 0 】

別の実施形態では、Aは、

【 0 2 1 1 】

【化 1 4】



10

20

30

【 0 2 1 2 】

(式中、*は、Wを通じたBへの付着を示す)
から選択される。

【 0 2 1 3 】

別の実施形態では、Wは、式

-W₇-Y-

(式中、

Yは(CH₂)₁₇-C₃-₁₀-シクロアルキル-W₈-または原子価結合であり、

17は0~6であり、

W₇は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s3は0または1であり、

W₈は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s4は0または1である)

を有する。

【 0 2 1 4 】

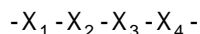
別の実施形態では、Bは、上記の1つまたは複数のOEGモチーフ、および/またはガンマGl uモチーフを含む、または、それからなる。

40

50

【 0 2 1 5 】

別の実施形態では、Bは、式



(式中、

X_1 は $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ であり、

X_2 は $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ であり、

X_3 は $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ であり、

X_4 は $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ であり、

11、12、13、14、15および16は、独立に、0～16から選択され、

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ は、独立に、0～10から選択され、

$m2$ および $m5$ は、独立に、0～25から選択され、

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ は、独立に、0～16から選択され、

Fはアリール、ヘタリール、ピロリジン-2,5-ジオンまたは原子価結合であり、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたは $C_1 \sim 6$ -アルキルで置換されており、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 は、独立に、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、 $C_1 \sim 6$ -アルキル、アリールまたはヘタリールから選択され；アルキル基、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CNまたは-OHで置換されており、

D1、D2、E1およびE2は、独立に、-O-、-N(R^6)-、-N(C(O) R^7)-または原子価結合から選択され； R^6 および R^7 は、独立に、水素または $C_1 \sim 6$ -アルキルを示し、

$W_1 \sim W_5$ は、独立に、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され；s2は0または1であり、

W_6 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s1}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O) $C_1 \sim 6$ -アルキル、-C(O)NHC_{1 \sim 6}-アルキルまたは原子価結合から選択され；s1は0または1であり、 $C_1 \sim 6$ -アルキル基は、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,5-ジオン、-NHC(O)CH*CH₂COOHまたは-NHC(O)CH₂CH*COOHで置換されており；(*)はCHの炭素原子から X_4 への付着点を示す)

を有する。

【 0 2 1 6 】

別の実施形態では、11、12、13、14、15および16は、独立に、0～6である。

【 0 2 1 7 】

別の実施形態では、 $m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ は、独立に、0～6である。

【 0 2 1 8 】

別の実施形態では、 $m2$ および $m5$ は、独立に、0～10である。

【 0 2 1 9 】

別の実施形態では、 $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ は、独立に、0～10である。

【 0 2 2 0 】

別の実施形態では、D1およびD2は、独立に、-O-または-N(R^6)-または原子価結合から選択される。

【 0 2 2 1 】

別の実施形態では、E1およびE2は、独立に、-O-または-N(R^6)-または原子価結合から選択される。

【 0 2 2 2 】

別の実施形態では、 W_1 から W_8 までが、独立に、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-NHC(O) $C_1 \sim 6$ -アルキル、-C(O)NHC_{1 \sim 6}-アルキルまたは原子価結合からなる群から選択され；アルキル基が、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,

10

20

30

40

50

5-ジオン、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}^*\text{CH}_2\text{COOH}$ または $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}^*\text{COOH}$ で置換されており；(*)がCHの炭素原子から X_4 への付着点を示す。

【0223】

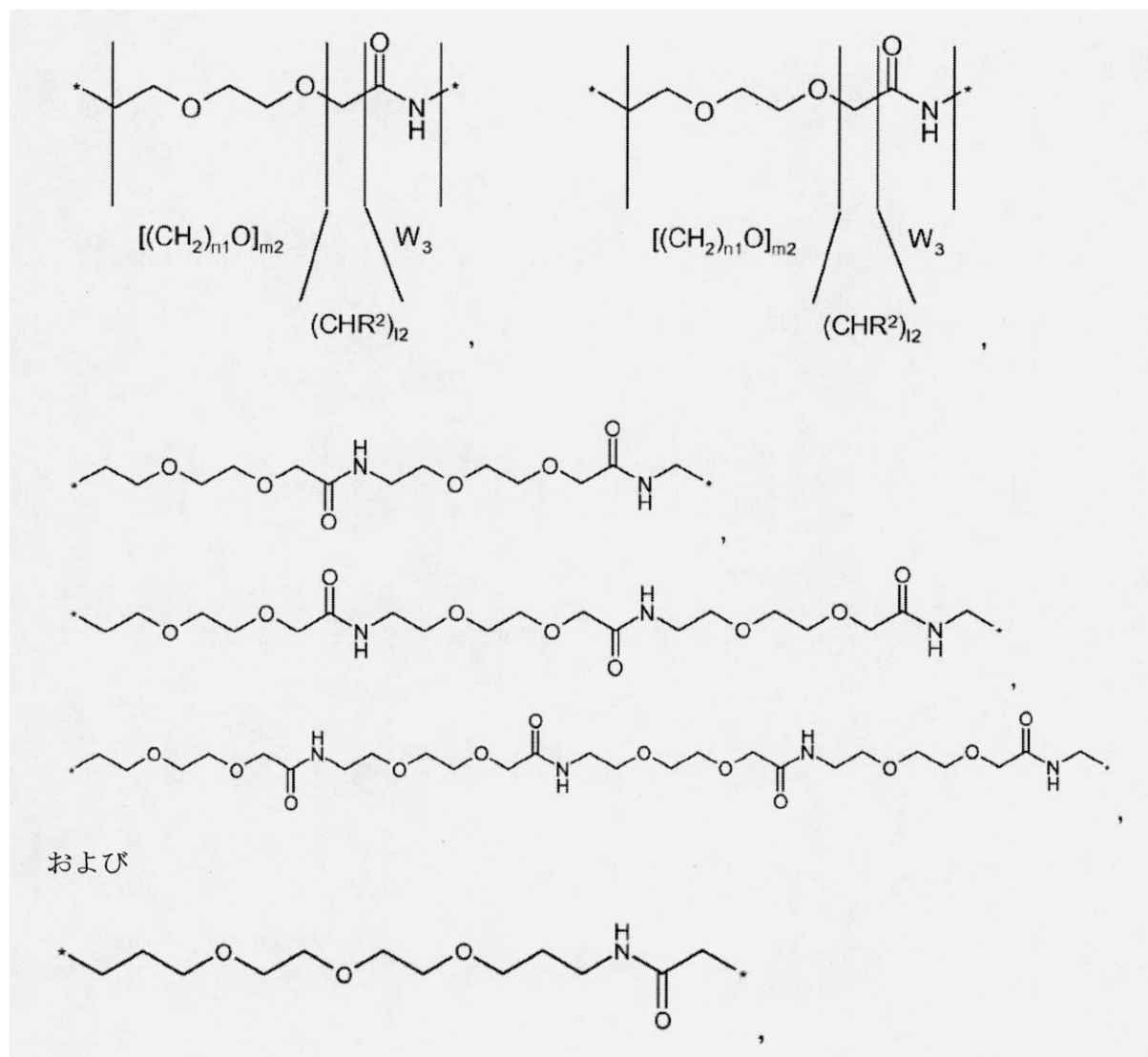
別の実施形態では、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 が、独立に、水素、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ または C_{1-6} -アルキルから選択され； C_{1-6} -アルキル基が、場合によって、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ または $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ で置換されている。

【0224】

別の実施形態では、 $-\{[(\text{CH}_2)_{n1}\text{E1}]_{m2}-[(\text{CHR}^2)_{l2}-\text{W}_3]_{m3}\}_{n2}$ -および $-\{[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E2}]_{m5}-[(\text{CHR}^4)_{l4}-\text{W}_5]_{m6}\}_{n4}$ -(式中、E1およびE2は-O-である)は、

【0225】

【化15】



【0226】

(式中、*は、付着点、すなわち開結合を示す)から選択される。

【0227】

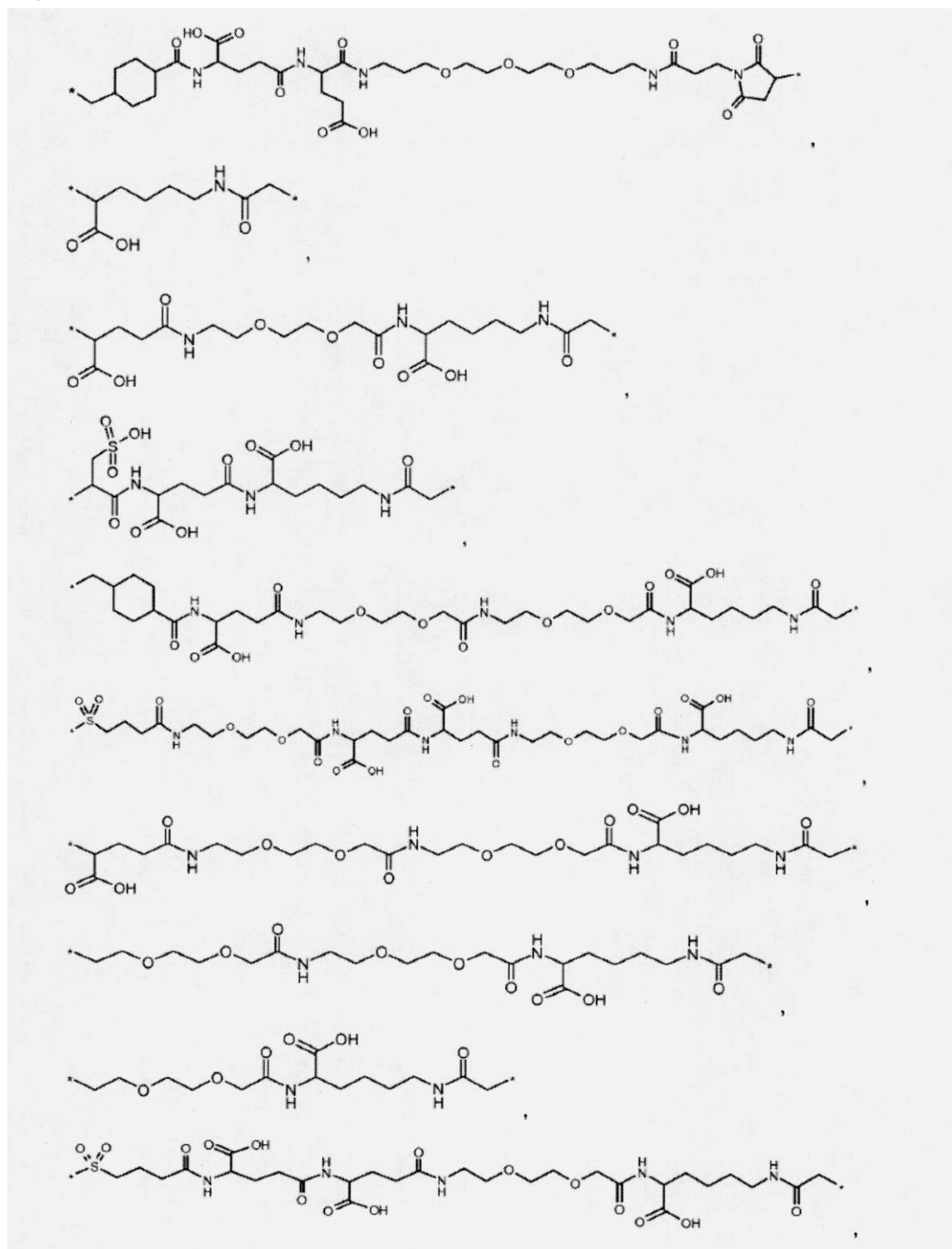
別の実施形態では、 X_4 が、原子価結合であり、 W_6 がピロリジン-2,5-ジオン、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}^*\text{CH}_2\text{COOH}$ または $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}^*\text{COOH}$ のいずれかから選択され、(*)が、CHの炭素原子からGHへの付着点を示す。

【0228】

別の実施形態では、Bは

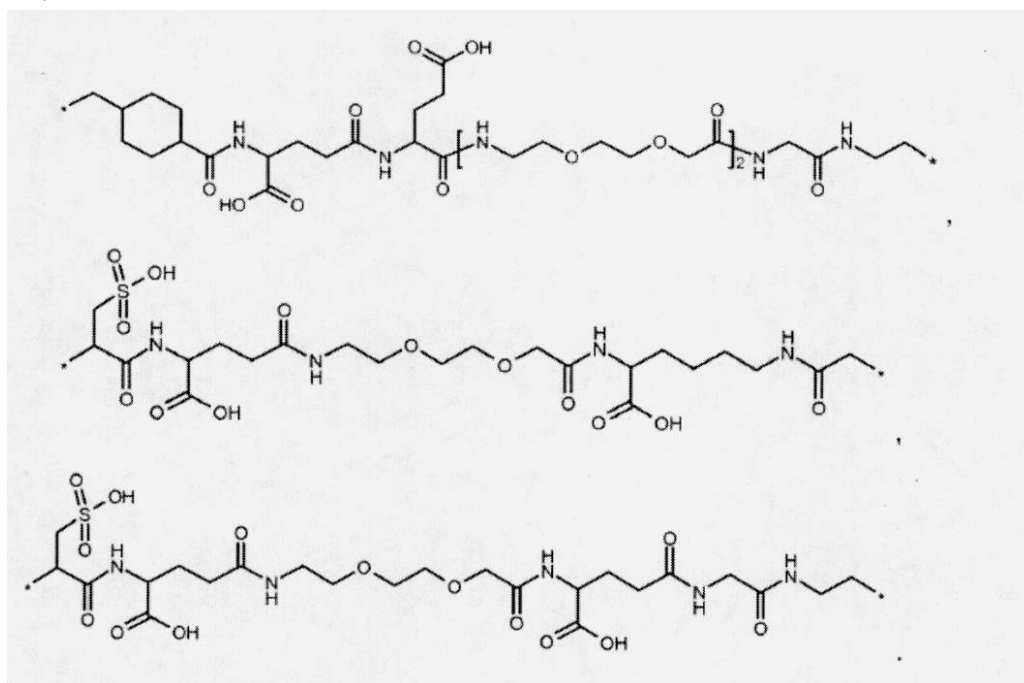
【0229】

【化 1 6】



【 0 2 3 0 】

【化 17】



10

【 0 2 3 1 】

20

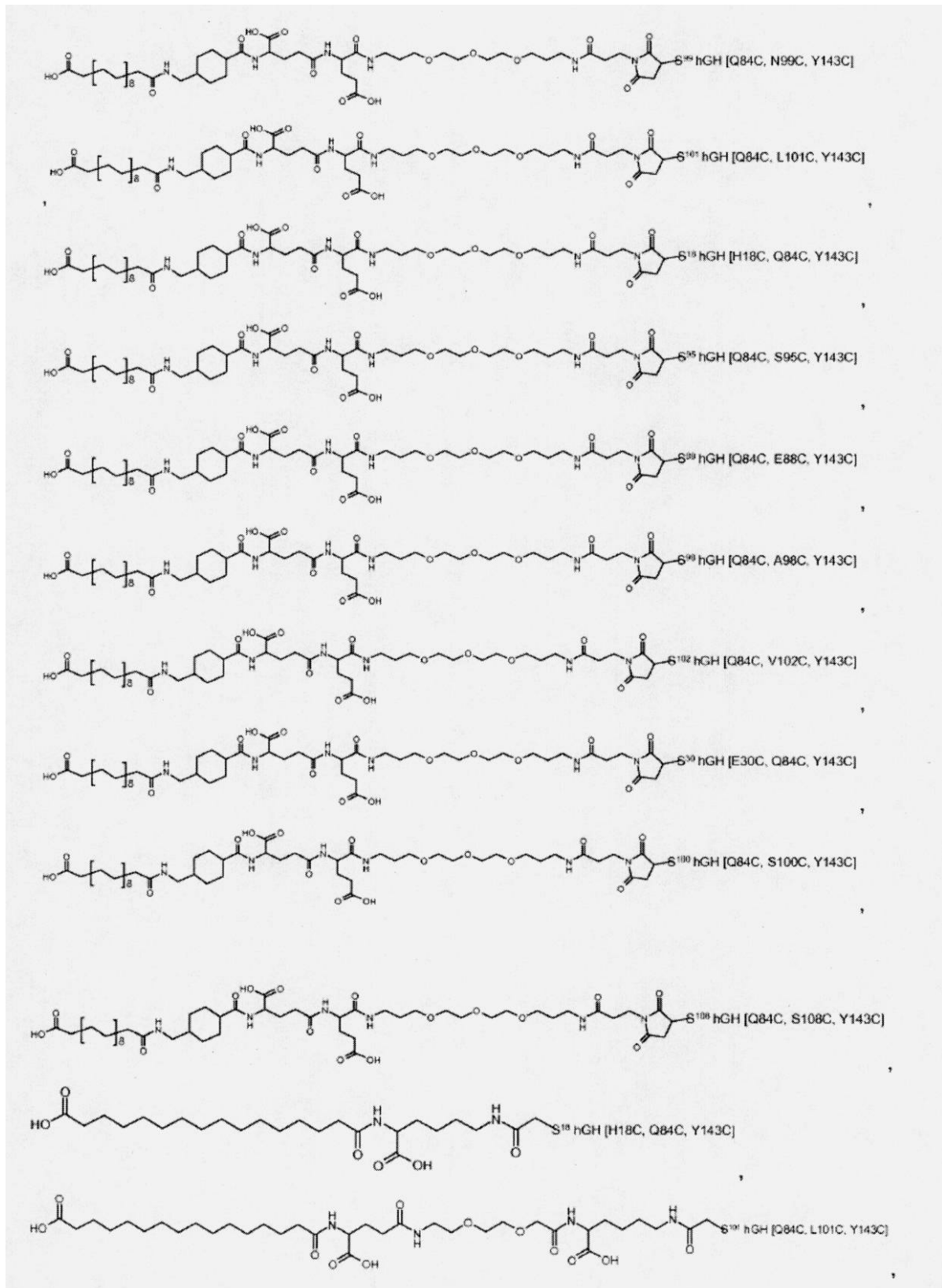
から選択される。

【 0 2 3 2 】

別の実施形態では、GHコンジュゲートは式

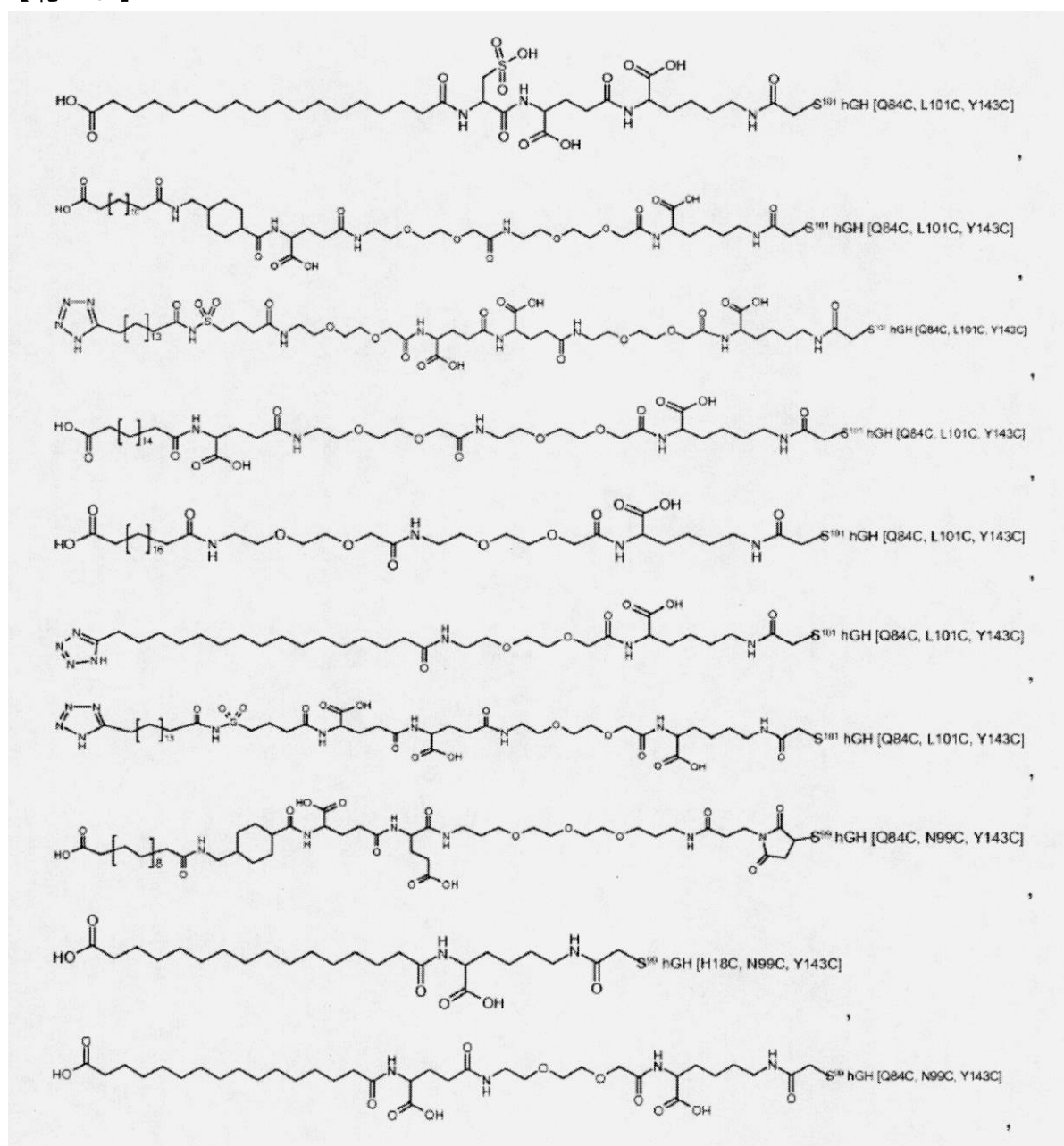
【 0 2 3 3 】

【化 1 8】



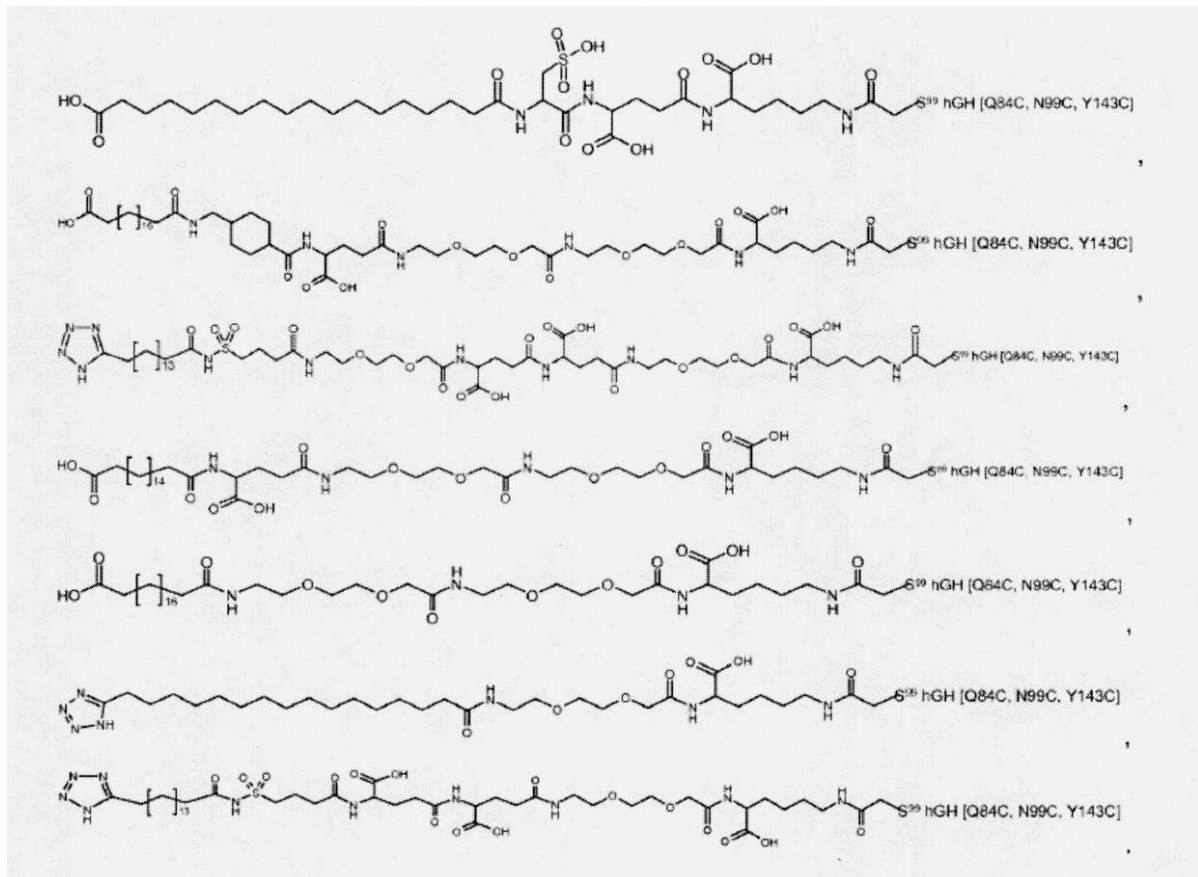
【 0 2 3 4 】

【化 19】



【 0 2 3 5 】

【化 20】



【 0 2 3 6 】

から選択される。

【 0 2 3 7 】

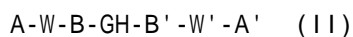
一般には、本発明のコンジュゲートは、親水性スパーサー(B)、例えば1つの親水性スパーサー(B)を介して成長ホルモン化合物(GH)に連結した1つのアルブミン結合残基(A)を有する。

【 0 2 3 8 】

しかし、成長ホルモン化合物(GH)は、親水性スパーサーを介して2つのアルブミン結合残基に連結されていてよい。

【 0 2 3 9 】

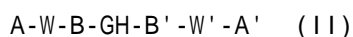
したがって、さらに別の態様では、本発明は、式(II)：



(式中、GHは単一cys変異を有する成長ホルモン化合物を表し、
BおよびB'は、独立に、Cysへの変異の硫黄残基に連結した親水性スパーサーであり、
Wは、AとBを連結する化学基であり、
W'は、A'とB'を連結する化学基であり、
AおよびA'は、独立に、アルブミン結合残基を表す)
の成長ホルモンコンジュゲート、およびその薬学的に許容される塩に関する。

【 0 2 4 0 】

さらに、他の態様では、本発明は、式(II)：



(式中、GHは追加的なジスルフィド架橋を有する成長ホルモン化合物を表し、
BおよびB'は、独立に、親水性スパーサーであり、
Wは、AとBを連結する化学基であり、
W'は、A'とB'を連結する化学基であり、
AおよびA'は、独立に、アルブミン結合残基を表す)

の成長ホルモンコンジュゲート、およびその薬学的に許容される塩に関する。

【0241】

さらに別の態様では、本発明は、式(II)：

A-W-B-GH-B'-W'-A' (II)

(式中、

GHは単一Cys変異および追加的なジスルフィド架橋を有する成長ホルモン化合物を表し、

BおよびB'は、独立に、Cysへの変異の硫黄残基に連結した親水性スペーサーであり、

Wは、AとBを連結する化学基であり、

W'は、A'とB'を連結する化学基であり、

AおよびA'は、独立に、アルブミン結合残基を表す)

の成長ホルモンコンジュゲート、およびその薬学的に許容される塩に関する。

【0242】

上記の式(II)のコンジュゲートにおいて、W'は、Wと同じ群から選択され、A'は、Aと同じ群から選択され、B'は、Bと同じ群から選択され、WおよびW'、AおよびA'、ならびにBおよびB'は、独立に、本明細書で定義されているそれぞれの群の任意の1つから選択されることが理解されるべきである。したがって、本明細書におけるW、A、およびBの任意の実施形態は、W'、A'、およびB'の実施形態でもある。さらに、本明細書に記載の実施形態のいずれか1つは、独立に、式(I)および(II)のコンジュゲートの両方、ならびに、適切な場合はその広範な態様および実施形態を指す。

【0243】

上記の実施形態ならびにこの下に記載される実施形態は、実施形態がある特定の態様または本発明の態様に関することが指定されていなければ、本明細書に記載の態様のいずれか1つならびに本明細書に記載の実施形態のいずれか1つを指すと見られるべきである。

【0244】

一実施形態では、GHは、hGHのバリエーションであり、バリエーションは、hGH配列の1つまたは複数のアミノ酸残基を別の天然アミノ酸または非天然アミノ酸で置換することによって；および/またはhGH配列に1つまたは複数の天然アミノ酸または非天然アミノ酸を付加することによって；および/またはhGH配列から1つまたは複数のアミノ酸残基を欠失させることによって得られる化合物であると理解され、これらのステップのいずれも、場合によって、その後さらに1つまたは複数のアミノ酸残基の誘導体化を続けることができる。

【0245】

別の実施形態では、GHは、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す。別の実施形態では、GHは、hGH(配列番号1)に対して少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%または例えば少なくとも99%の同一性を有する。別の実施形態では、hGHに対する前記同一性は、本明細書のアッセイIにおいて決定された、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも10%、例えば少なくとも20%、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも60%、例えば少なくとも80%と結びついている。配列同一性についての実施形態のいずれか1つは、活性についての実施形態のいずれか1つと組み合わせることができる。例えば、hGHに対して少なくとも80%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも60%と結びついているGH；hGHに対して少なくとも90%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも40%と結びついているGH；hGHに対して少なくとも95%の同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも80%と結びついているGHなど。

【0246】

さらに別の実施形態では、GHはhGH(配列番号1)である。

【0247】

別の実施形態では、Bは、上記の1つまたは複数のOEGモチーフおよび/またはガンマGluモチーフを含むまたはそれからなる。

【0248】

10

20

30

40

50

式(I)または(II)のコンジュゲートの別の実施形態では、親水性スパーサーBは、式
 $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

(式中、

X_1 は $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ であり

X_2 は $-[(CHR^3)_{l3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ であり、

X_3 は $-[(CHR^5)_{l5}-W_6]_{m7}-$ であり、

X_4 は $F-D1-(CH_2)_{l6}-D2-$ であり、

$l1$ 、 $l2$ 、 $l3$ 、 $l4$ 、 $l5$ および $l6$ は、独立に、0~16から選択され、

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ は、独立に、0~10から選択され、

$m2$ および $m5$ は、独立に、0~25から選択され、

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ は、独立に、0~16から選択され、

Fはアリール、ヘタリール、ピロリジン-2,5-ジオンまたは原子価結合であり、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたは $C_1 \sim 6$ -アルキルで置換されており、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 は、独立に、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、 $C_1 \sim 6$ -アルキル、アリールまたはヘタリールから選択され；アルキル基、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CNまたは-OHで置換されており、

D1、D2、E1およびE2は、独立に、-O-、-N(R⁶)-、-N(C(O)R⁷)-または原子価結合から選択され；R⁶およびR⁷は、独立に、水素または $C_1 \sim 6$ -アルキルを示し、

$W_1 \sim W_5$ は、独立に、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され；s2は0または1であり、

W_6 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s1}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O) $C_1 \sim 6$ -アルキル、-C(O)NHC_{1 \sim 6}-アルキルまたは原子価結合から選択され；s1は0または1であり、アルキル基は、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,5-ジオン、-NHC(O)CH*CH₂COOHまたは-NHC(O)CH₂CH*COOHで置換されており；(*)はCHの炭素原子から X_4 への付着点を示す)

を有する。

【0249】

別の実施形態では、 W_1 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合から選択される。一般には、 W_1 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-または-C(O)NHS(O)₂-から選択される。

【0250】

別の実施形態では、 W_2 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合から選択される。一般には、 W_2 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-または-C(O)NHS(O)₂-から選択される。

【0251】

別の実施形態では、 W_3 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合から選択される。一般には、 W_3 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-または-C(O)NHS(O)₂-から選択される。

【0252】

別の実施形態では、 W_4 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合から選択される。一般には、 W_4 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-または-C(O)NHS(O)₂-から選択される。

【0253】

別の実施形態では、 W_5 は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合から選択される。一般には、 W_5 は、-C(O)NH-、-N

10

20

30

40

50

HC(O)-または-C(O)NHS(O)₂-から選択される。

【0254】

別の実施形態では、W₆は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH₂NHC(O)-、C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆-アルキル、-C(O)NHC₁₋₆-アルキルまたは原子価結合から選択され；アルキル基は、場合によってピロリジン-2,5-ジオン、-NHC(O)CH*CH₂COOHまたは-NHC(O)CH₂CH*COOHで置換され；(*)は、CHの炭素原子からX₄への付着点を示す。一般には、W₆は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、C(O)NHS(O)₂-または-NHC(O)C₁₋₆-アルキルから選択される。

【0255】

別の実施形態では、D1、D2、Fは全て原子価結合であり、I6は0であり、W6は、ピロリジン-2,5-ジオン、-NHC(O)CH*CH₂COOHまたは-NHC(O)CH₂CH*COOHのいずれかから選択され、(*)は、CHの炭素原子からGHへの付着点を示す。

10

【0256】

別の実施形態では、R¹は、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁₋₆-アルキルから選択され；アルキル基は、場合によって-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHで置換されている。一般には、R¹は、-C(O)OH、-C(O)NH₂、またはC₁₋₆-アルキルから選択され；アルキル基は、場合によって、-C(O)OH、-C(O)NH₂、または-S(O)₂OHで置換されている。

【0257】

別の実施形態では、R²は、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁₋₆-アルキルから選択され；アルキル基は、場合によって-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHで置換されている。一般には、R²は、-C(O)OH、-C(O)NH₂、またはC₁₋₆-アルキルから選択され；アルキル基は、場合によって、-C(O)OH、-C(O)NH₂、または-S(O)₂OHで置換されている。

20

【0258】

別の実施形態では、R³は、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁₋₆-アルキルから選択され；アルキル基は、場合によって-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHで置換されている。一般には、R³は、-C(O)OH、-C(O)NH₂、またはC₁₋₆-アルキルから選択され；アルキル基は、場合によって、-C(O)OH、-C(O)NH₂、または-S(O)₂OHで置換されている。

【0259】

別の実施形態では、R⁴は、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁₋₆-アルキルから選択され；アルキル基は、場合によって-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHで置換されている。一般には、R⁴は、-C(O)OH、-C(O)NH₂、またはC₁₋₆-アルキルから選択され；アルキル基は、場合によって、-C(O)OH、-C(O)NH₂、または-S(O)₂OHで置換されている。

30

【0260】

別の実施形態では、R⁵は、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁₋₆-アルキルから選択され；アルキル基は、場合によって-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHで置換されている。一般には、R⁵は、-C(O)OH、-C(O)NH₂、またはC₁₋₆-アルキルから選択され；アルキル基は、場合によって、-C(O)OH、-C(O)NH₂、または-S(O)₂OHで置換されている。

【0261】

別の実施形態では、E1は、-O-または-N(R⁶)-、または原子価結合から選択される。一般には、E1は、-O-から選択される。

【0262】

別の実施形態では、E2は、-O-または-N(R⁶)-、または原子価結合から選択される。一般には、E2は、-O-から選択される。

40

【0263】

別の実施形態では、E1およびE2は、どちらも-O-である。

【0264】

別の実施形態では、E1およびE2は、どちらも-N(R⁶)-である。

【0265】

別の実施形態では、Fは、フェニル、ピロリジン-2,5-ジオンまたは原子価結合である。

【0266】

別の実施形態では、D1は、-O-または-N(R⁶)-、または原子価結合から選択される。一般

50

には、D1は、 $-N(R^6)-$ から選択される。

【0267】

別の実施形態では、D2は、 $-O-$ または $-N(R^6)-$ 、または原子価結合から選択される。一般には、D1は、 $-N(R^6)-$ から選択される。

【0268】

別の実施形態では、I1は、0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

【0269】

別の実施形態では、I2は、0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

【0270】

別の実施形態では、I3は、0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

10

【0271】

別の実施形態では、I4は、0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。別の実施形態では、I5は、0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

【0272】

別の実施形態では、I6は、0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

【0273】

別の実施形態では、m1は、0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

【0274】

別の実施形態では、m2は、0~10、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10などである。

20

【0275】

別の実施形態では、m3は、0~5、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

【0276】

別の実施形態では、m4は、0~5、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

【0277】

別の実施形態では、m5は、0~10、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10などである。

【0278】

別の実施形態では、m6は、0~5、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

【0279】

別の実施形態では、m7は、0~5、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

30

【0280】

別の実施形態では、n1は、0~10、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

【0281】

別の実施形態では、n2は、0~10、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

【0282】

別の実施形態では、n3は、0~10、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

【0283】

別の実施形態では、n4は、0~10、例えば、0、1、2、3、4、5または6などである。

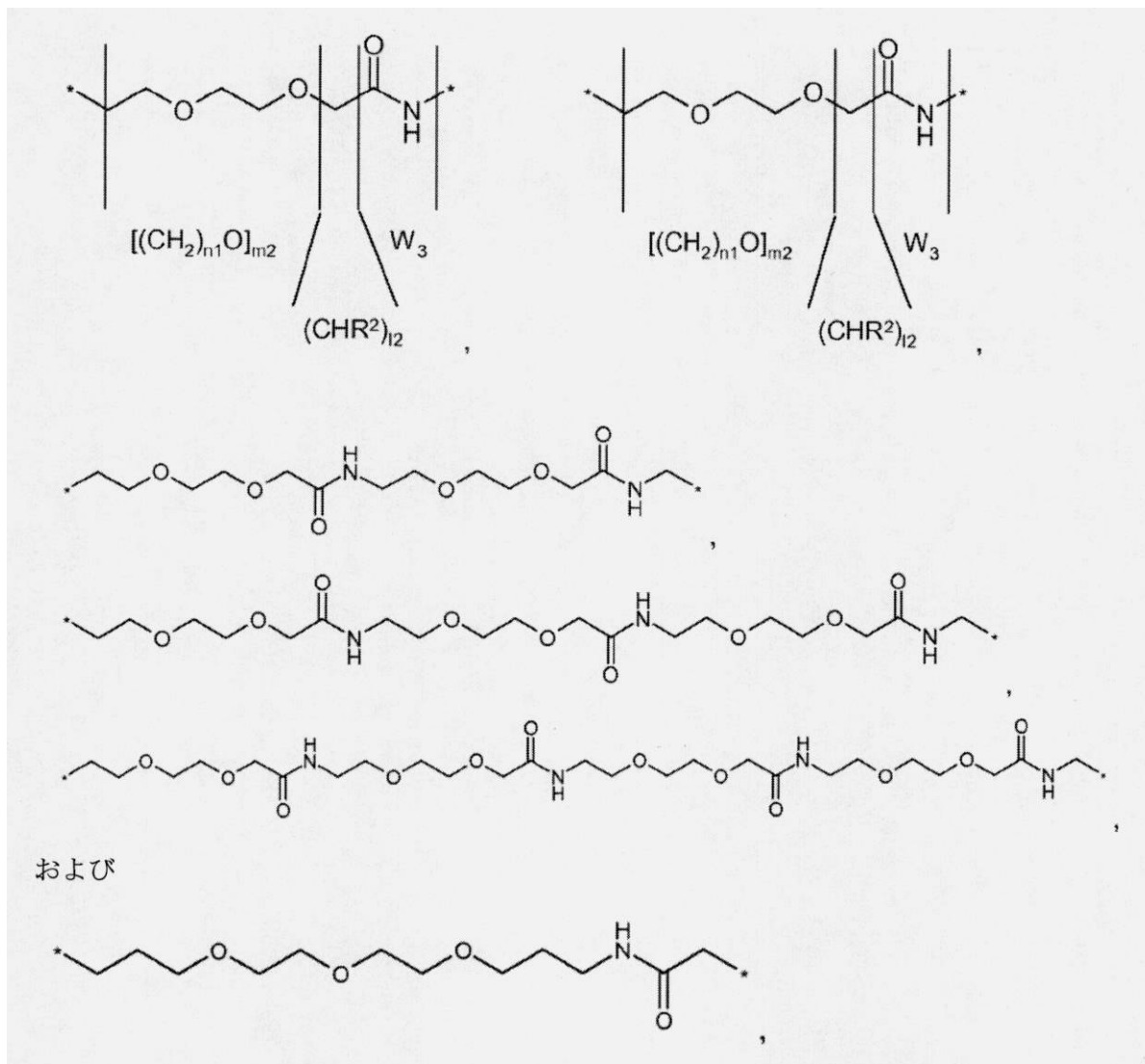
【0284】

別の実施形態では、 X_1 は、 $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ であり、 X_2 は、 $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ であり、 $-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ および $-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ は、

40

【0285】

【化 2 1】



【 0 2 8 6 】

(式中、*は、付着点、すなわち開結合(open bond)を示す)から選択される。

【 0 2 8 7 】

別の実施形態では、前記親水性スパーサーのモル重量は、80ダルトン(D)から1500Dまでにわたる、または300Dから1100Dまでにわたる。

【 0 2 8 8 】

さらに別の実施形態では、Wが、
-W₇-Y-

(式中、

Yは(CH₂)₁₇-C₃₋₁₀-シクロアルキル-W₈-または原子価結合であり、
17は0~6であり、

W₇は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、
-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-
、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s3は0または1であり、

W₈は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、
-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-
、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s4は0または1である)

式を有する。

【 0 2 8 9 】

10

20

30

40

50

あるWの実施形態では、Yは $(\text{CH}_2)_{17}$ -シクロヘキシル- W_8 -である。

【0290】

別の実施形態では、Yは、原子価結合である。

【0291】

ある実施形態では、 W_7 は、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ または原子価結合から選択される。一般には、 W_7 は、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、または $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2$ から選択される。

【0292】

別の実施形態では、 W_8 は、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ または原子価結合から選択される。一般には、 W_8 は、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、または $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2$ から選択される。 10

【0293】

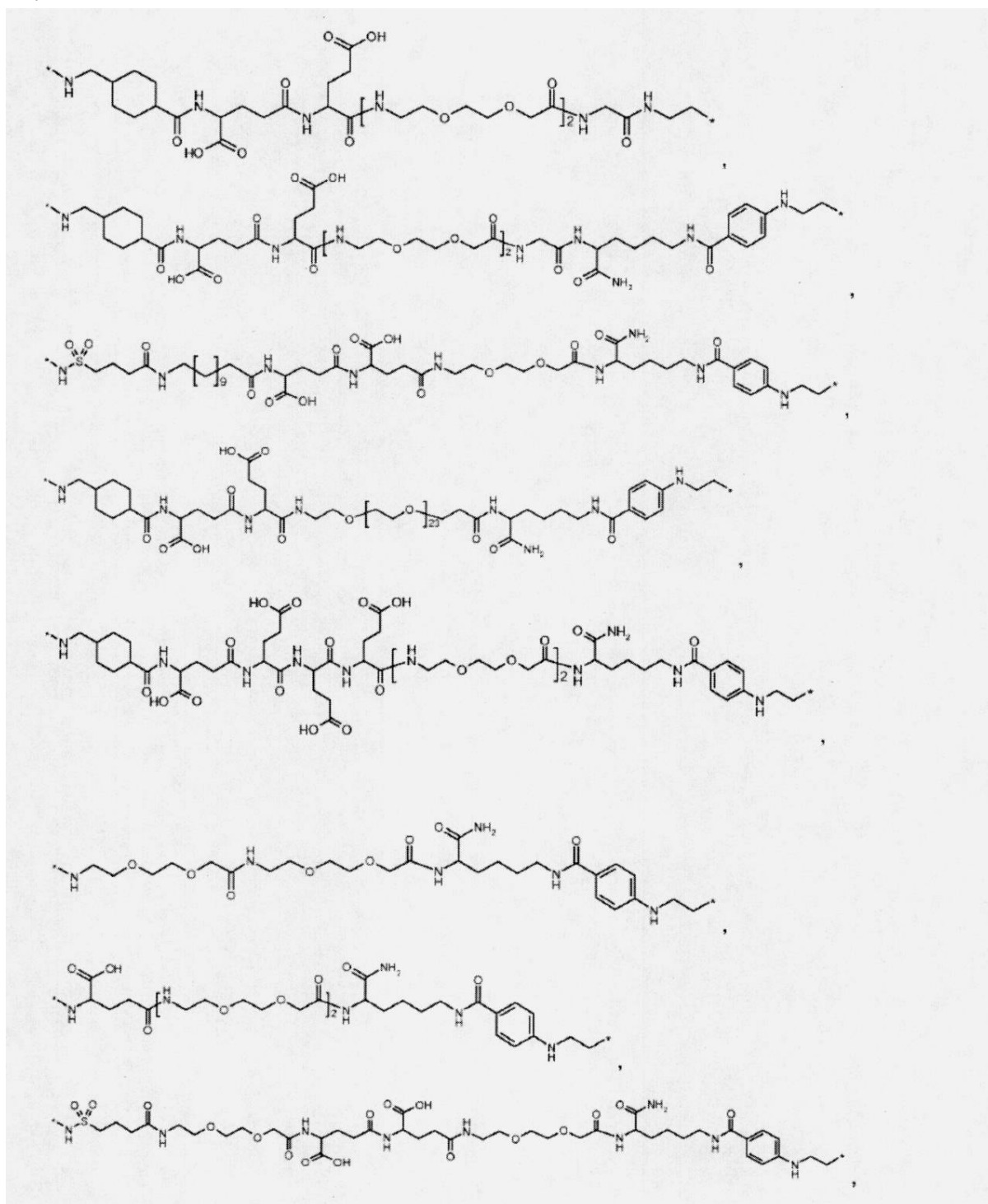
別の実施形態では、17は0または1である。

【0294】

別の実施形態では、本発明の親水性スペーサーBは、

【0295】

10



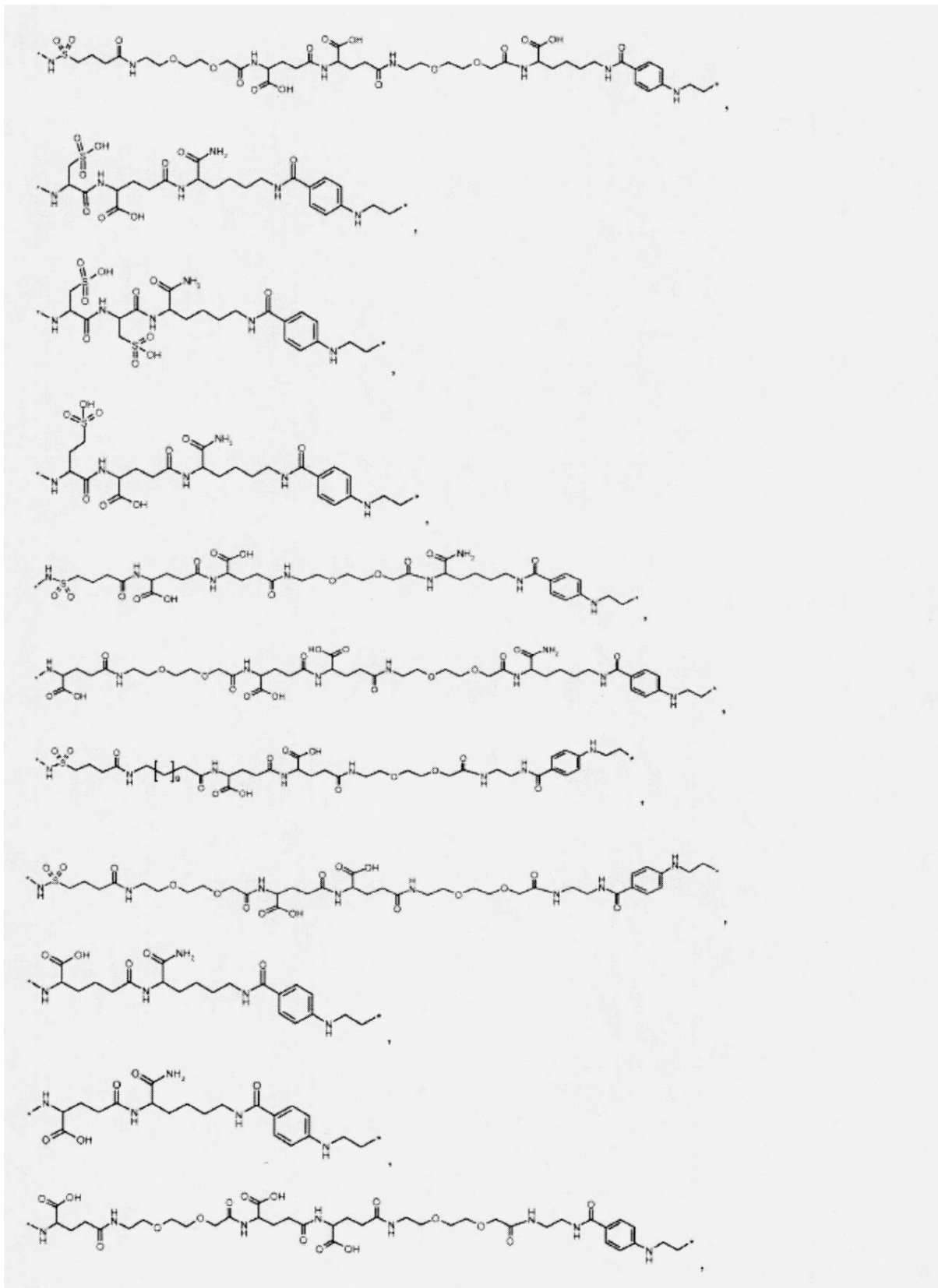
20

30

【 0 2 9 6 】

40

【化 2 3】



10

20

30

40

【 0 2 9 7 】

(式中、*は、付着点、すなわち開結合(open bond)を示す)
から選択される。

【 0 2 9 8 】

本発明の成長ホルモン化合物に付着したアルブミン結合残基(上記の式(I)または(II)中の置換基A)は、アルブミンに非共有結合する親油性の残基である。一般には、アルブミン

50

結合残基は、生理的なpHにおいて負に荷電しており、ヒト血清アルブミンに対する結合親和性は約10 μ Mを下回る、または約1 μ Mまでも下回る。

【0299】

本発明の成長ホルモン化合物の別の実施形態では、アルブミン結合残基は、直鎖アルキル基、分岐アルキル基、 α -カルボン酸基または α -カルボン酸アイソスターを有する基から選択される。一般には、アルブミン結合残基は、6個から40個までの炭素原子を有する。別の実施形態では、アルブミン結合残基は、8個から26個までの炭素原子を有する。別の実施形態では、アルブミン結合残基は、8個から20個までの炭素原子を有する。

【0300】

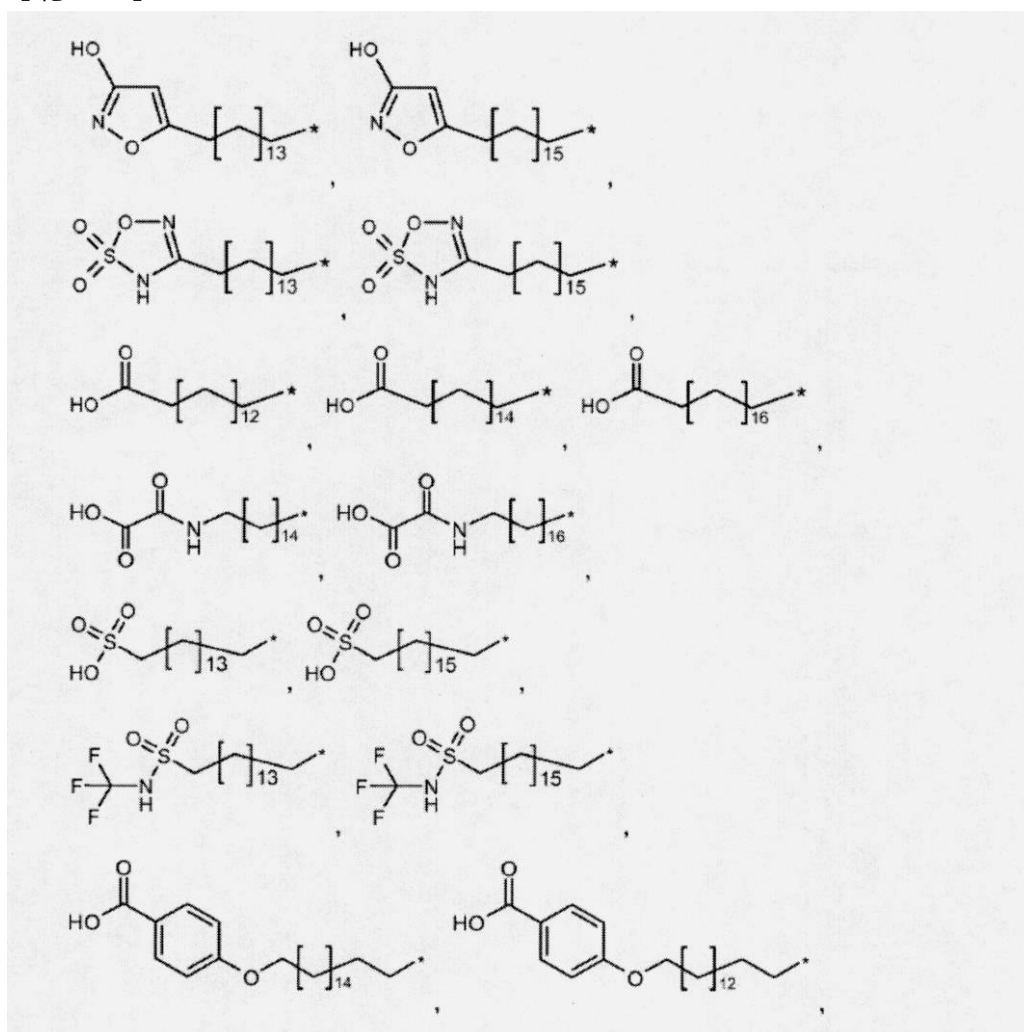
別の実施形態では、Aは、14~26個の炭素原子を有し、 α -カルボン酸基を含む。別の実施形態では、Aは、14~26個の炭素原子を有し、 α -カルボン酸アイソスター、例えばテトラゾールを含む。

【0301】

別の実施形態では、Aは、

【0302】

【化24】



【0303】

(式中、*は、Wを通じたBへの付着を示す)

から選択される。

【0304】

親水性スパーサー(B)は、成長ホルモン化合物(GH)に1つのアルブミン結合残基(A)を組み込むべきかまたは2つのアルブミン結合残基(A)を組み込むべきかを制御することができ、成長ホルモン化合物内のある位置に選択的に導入されることが好ましい。親水

性スペーサー(B)を、GH化合物のアミノ酸側鎖に付着させることができる。そのようなアミノ酸側鎖は、化学修飾されたGH化合物のアミノ酸側鎖であってよい。別の、そのようなアミノ酸側鎖は、酵素によって修飾されたGH化合物のアミノ酸側鎖であってよい。親水性スペーサーを、配列番号1の40位または141位に対応する位置のグルタミン残基に導入するために、トランスグルタミナーゼを使用することが好ましい。親水性スペーサーを選択的に導入する別のやり方は、成長ホルモン化合物、例えばhGH(配列番号1)のN末端残基に導入することである。

【0305】

式(1)の成長ホルモンコンジュゲートにおいて、断片A-W-Bは、直鎖状または分岐状であってよい。一実施形態では、A-W-Bは、直鎖ペプチドではない。

10

【0306】

別の実施形態では、アルブミン結合残基は親水性スペーサーを介して配列番号1の40位に対応する位置のグルタミン残基に付着している。

【0307】

別の実施形態では、アルブミン結合残基は親水性スペーサーを介して配列番号1の141位に対応する位置のグルタミン残基に付着している。

【0308】

別の実施形態では、アルブミン結合残基は親水性スペーサーを介して成長ホルモン化合物、例えばhGH(配列番号1)のN末端残基に付着している。

【0309】

20

別の実施形態では、アルブミン結合残基は親水性スペーサーを介して成長ホルモン化合物、例えばhGH(配列番号1)の40位、141位に対応する位置のグルタミン残基およびN末端残基に付着している。

【0310】

本発明の成長ホルモンコンジュゲートは、以下の式から選択される

【0311】

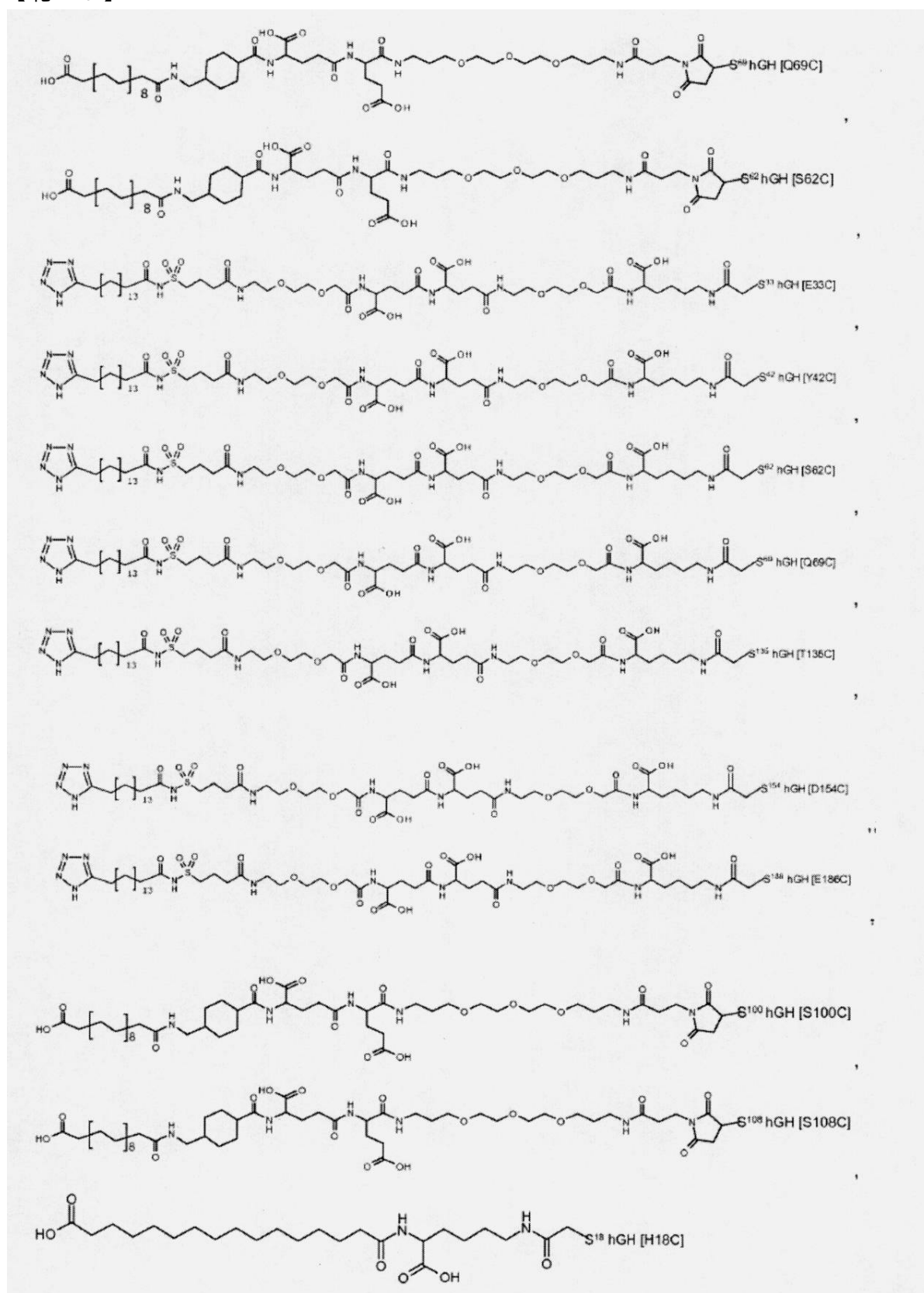
The figure displays the chemical structures of 11 hGH variants, each consisting of a hGH backbone with a common C-terminal linker. The linker is a poly(ethylene glycol) (PEG) chain of 12 units, terminated by a succinyl-L-proline moiety. The variants are labeled as follows:

- S¹⁰¹ hGH [L101C]
- S¹⁸ hGH [H18C]
- S⁹⁵ hGH [S95C]
- S⁸⁸ hGH [E88C]
- S⁹⁸ hGH [A98C]
- S⁹⁹ hGH [N99C]
- S¹⁰² hGH [V102C]
- S³⁶ hGH [E30C]
- S⁴² hGH [Y42C]
- S¹³⁵ hGH [T135C]
- S¹⁵⁴ hGH [D154C]

The hGH backbone is shown in a simplified representation, with the N-terminus as a carboxylic acid and the C-terminus as a carboxylic acid. The linker is attached to the C-terminus via a succinyl-L-proline moiety.

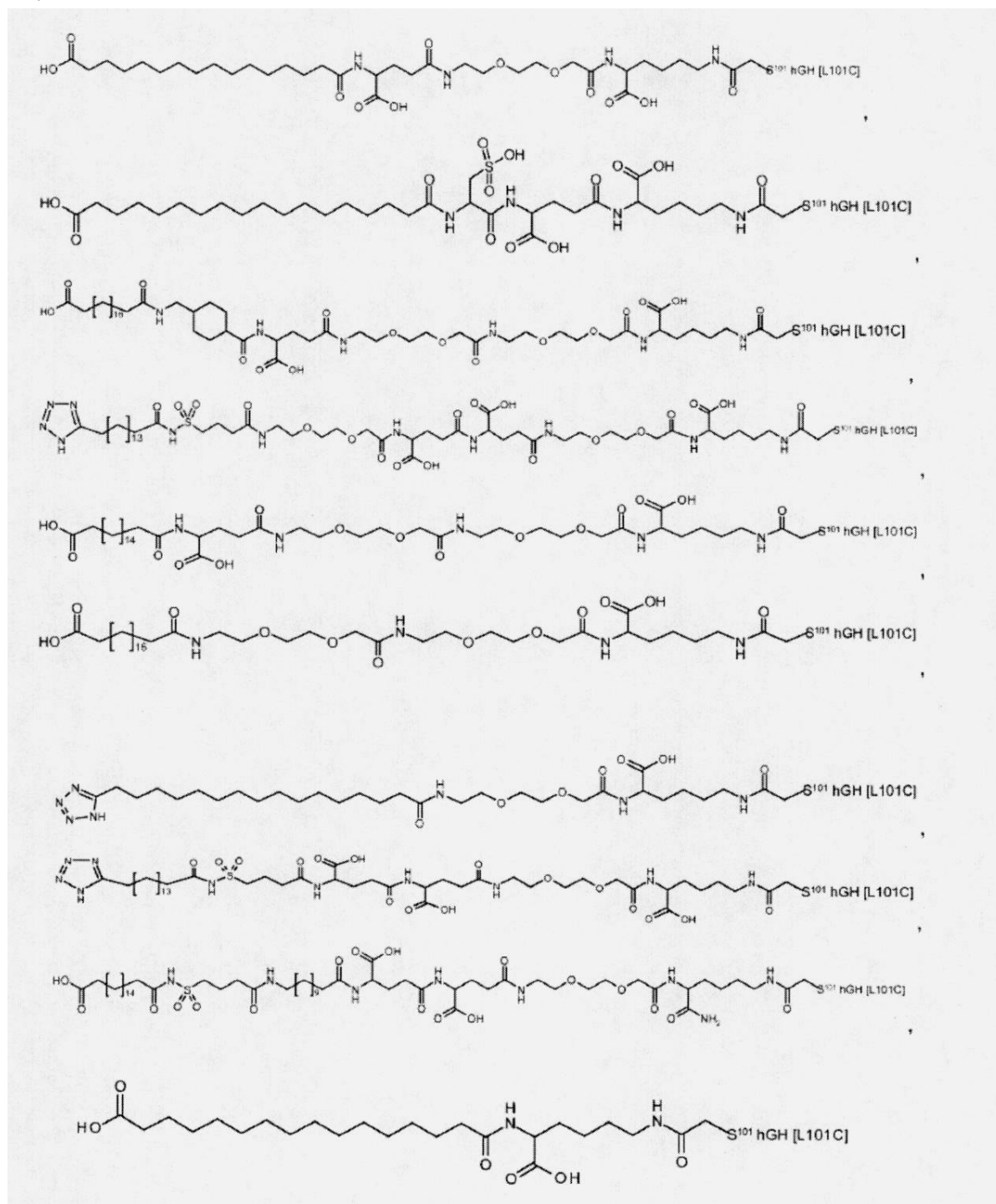
【 0 3 1 2 】

【化 2 6】



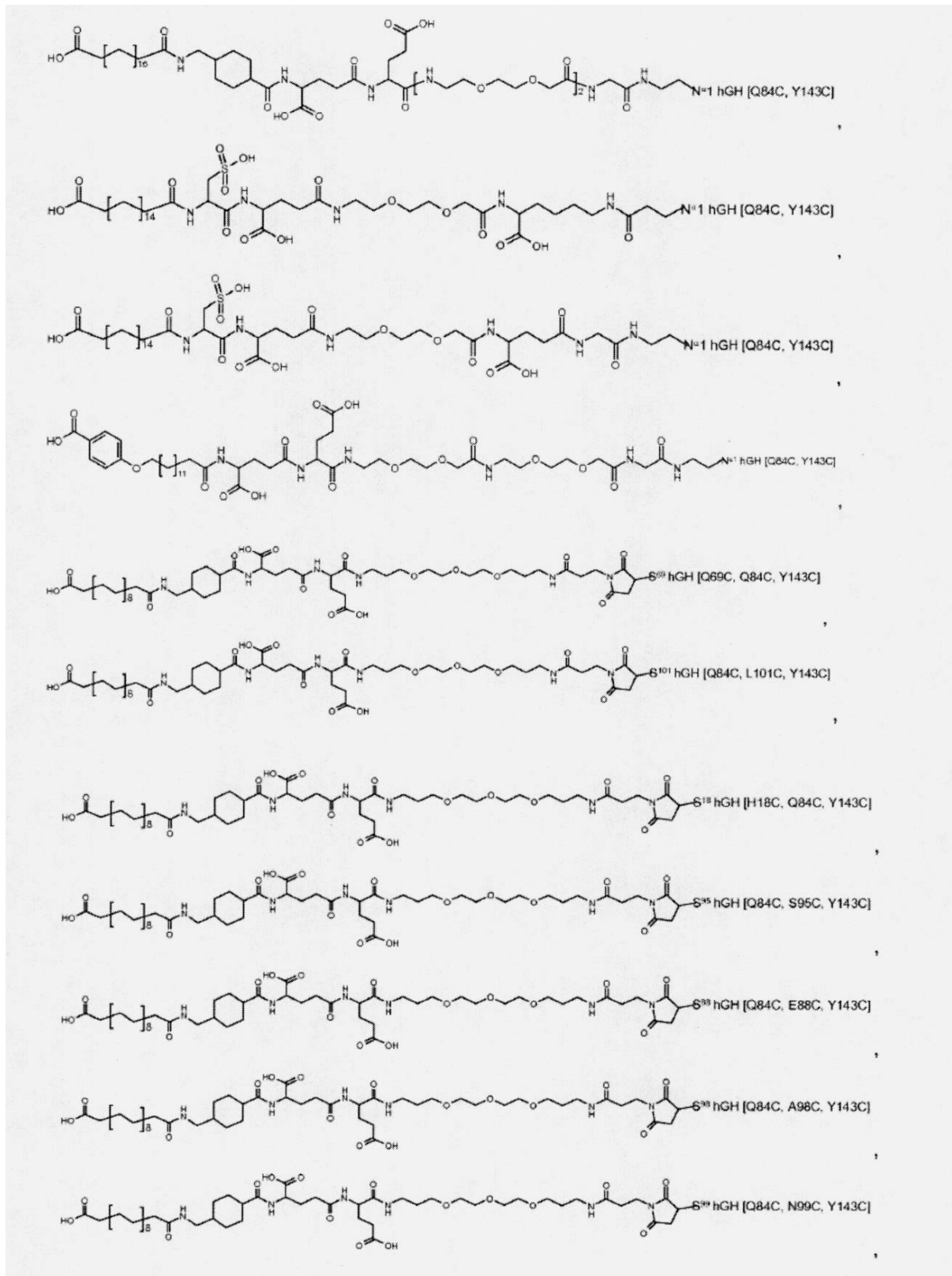
【 0 3 1 3 】

【化 27】



【 0 3 1 4 】

【化 28】

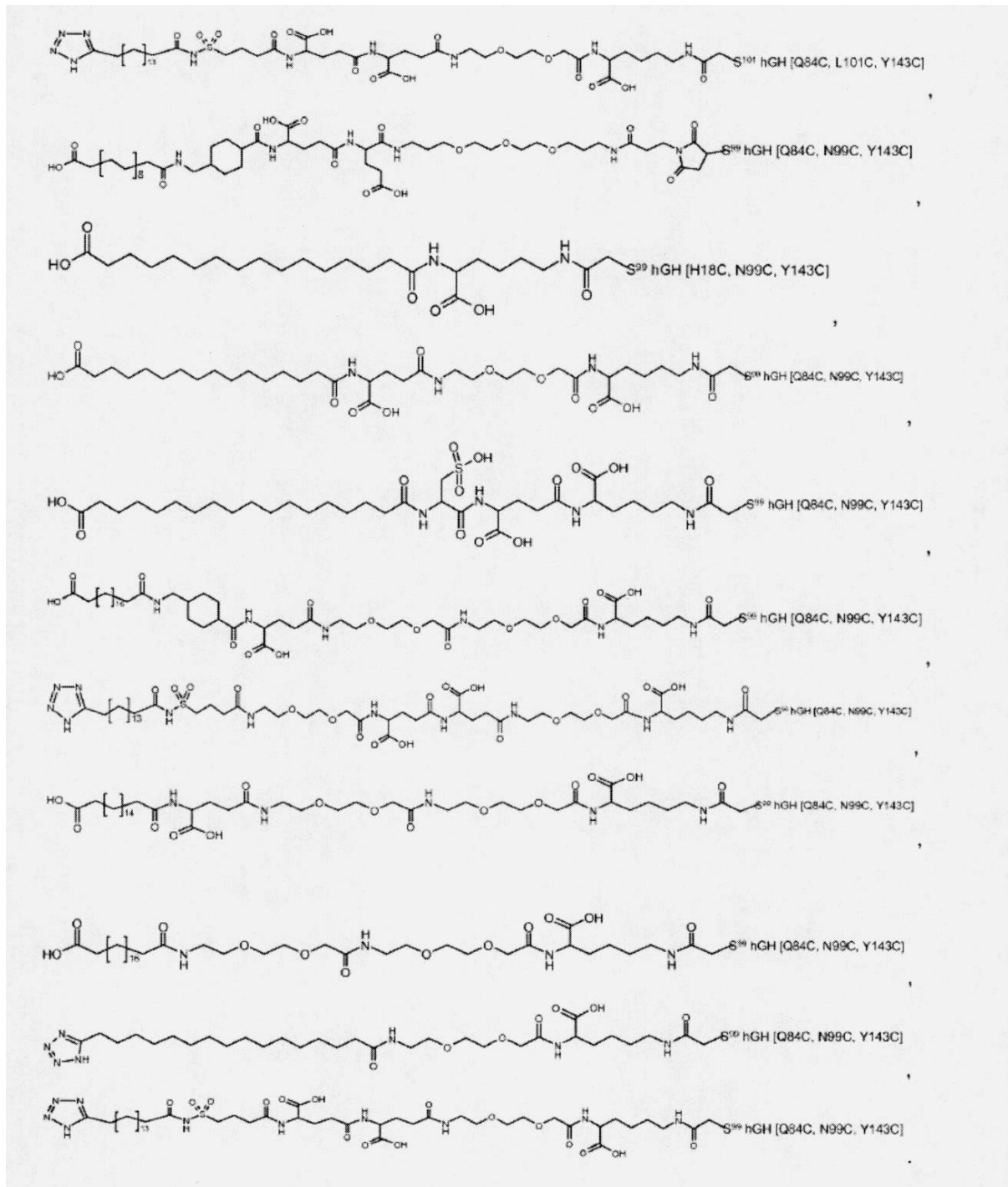


【 0 3 1 5 】

Chemical structures of various hGH derivatives are shown, including S¹⁰² hGH [Q84C, V102C, Y143C], S¹⁰³ hGH [E30C, Q84C, Y143C], S¹⁰⁰ hGH [Q84C, S100C, Y143C], S¹⁰⁸ hGH [Q84C, S108C, Y143C], S¹⁸ hGH [H18C, Q84C, Y143C], S¹⁰⁹ hGH [Q84C, L101C, Y143C], S¹⁰¹ hGH [Q84C, L101C, Y143C], S¹⁶¹ hGH [Q84C, L101C, Y143C], S¹⁷¹ hGH [Q84C, L101C, Y143C], S¹⁰¹ hGH [Q84C, L101C, Y143C], and S¹⁰¹ hGH [Q84C, L101C, Y143C].

【 0 3 1 6 】

【化 3 0】



10

20

30

【 0 3 1 7 】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の成長ホルモン化合物(GH)などの成長ホルモンバリエーションに関する。成長ホルモンバリエーションは、治療剤として、または成長ホルモンコンジュゲートの調製における中間体として有用であり得る。成長ホルモン化合物は、当技術分野で公知の、または本明細書に記載の組換え方法によって作出することができる。ある実施形態では、成長ホルモン変異体は可溶性である。

40

【 0 3 1 8 】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の成長ホルモンバリエーションを含む組成物に関する。

【 0 3 1 9 】

ある実施形態では、組成物は、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C

50

、Q122CおよびG126Cの群から選択される単一cys変異を含む成長ホルモンバリエーションを含む。

【0320】

本発明のある実施形態では、組成物の成長ホルモンバリエーションは、成長ホルモン化合物のN末端(アミノ酸1~8)、ヘリックス1、ループ1、ヘリックス2、ループ2、またはヘリックス3に、単一cys変異を有する。

【0321】

ある実施形態では、単一cys変異は、N末端内に位置し、その変異は、例えばP5C、S7Cの任意の1つである。ある実施形態では、単一cys変異は、H1(アミノ酸9~35に対応する)内に位置し、例えば、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35Cの任意の1つである。ある実施形態では、単一cys変異は、L1(アミノ酸36~71に対応する)内に位置し、その変異は、例えば、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、S57C、P59C、S62C、E65C、Q69Cの任意の1つであり、またはY42C、S55C、S57C、S62C、Q69Cの任意の1つであることが好ましい。ある実施形態では、単一cys変異は、H2(アミノ酸72~98)内に位置し、例えば、E88C、Q91C、S95CおよびA98Cのいずれか1つである。ある実施形態では、単一cys変異は、アミノ酸99~127の範囲内に位置する。ある実施形態では、単一cys変異は、L2(アミノ酸99~106)内に位置し、例えば、N99C、S100C、L101C、V102CおよびY103Cのいずれか1つである。ある実施形態では、単一cys変異は、H3(アミノ酸107~127)内に位置し、その変異は、例えば、hGH(配列番号1)のD107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cのいずれか1つである、またはL3もしくはH4(アミノ酸128~154およびアミノ酸155~184に対応する)内に位置し、その変異は、例えば、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180Cのいずれか1つである、またはC末端内に位置し、その変異は、例えば、E186C、G187CおよびG190Cのいずれか1つである。hGHバリエーションに単一cys変異が存在する場合、変異は、対応するアミノ酸残基に位置する。さらに別の実施形態では、単一cys変異は、hGHのアミノ酸93~106またはhGHバリエーションの対応する残基の範囲内に位置する。別の特定の実施形態では、単一cys変異は、L2の範囲内、例えば、アミノ酸99~106またはアミノ酸99~104または対応する残基の範囲内に位置する。

【0322】

ある実施形態では、本発明による組成物は、単一cys変異および追加的なジスルフィド結合を含む成長ホルモンバリエーションを含む。ある実施形態では、単一cys変異は、上記の単一cys変異のいずれか1つである。ある実施形態では、GHにおける単一cys変異は、hGH(配列番号1)のT3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187CおよびG190Cのいずれか1つ、例えば、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cのいずれか1つまたは対応する残基から選択される。ある実施形態では、追加的なジスルフィド結合は、システイン変異の対の以下の群から選択される：R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/

T148Cおよび/またはV185C/S188C。ある実施形態では、成長ホルモンバリエーションは、単一システインと、以下のシステイン変異の対から選択される追加的なジスルフィド結合を含む：S57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143Cおよび/またはS85C/S144C。

【0323】

ある実施形態では、成長ホルモンバリエーションは、L2における単一システインの変異と、

アミノ酸残基128～154(H3)などのループセグメントと、ヘリックスBまたはヘリックス2(アミノ酸72～98に対応する)などのヘリックスセグメントをつなぐ追加的なジスルフィド結合とを含む。ある実施形態では、成長ホルモンバリエーションは、以下の群から選択される変異の組み合わせを含む:A98C/Q84C/Y143C、A98C/S85C/Y143C、A98C/S85C/S144C、N99C/Q84C/Y143C、N99C/S85C/Y143C、N99C/S85C/S144C、S101C/Q84C/Y143C、S101C/S85C/Y143C、S101C/S85C/S144C、L101C/Q84C/Y143C、L101C/S85C/Y143C、L101C/S85C/S144C、C102C/Q84C/Y143C、C102C/S85C/Y143CおよびC102C/S85C/S144C。ある実施形態では、成長ホルモンバリエーションは、以下の群から選択される変異の組み合わせを含む:A98C/Q84C/Y143C、N99C/Q84C/Y143C、S101C/Q84C/Y143C、L101C/Q84C/Y143CおよびC102C/Q84C/Y143C。ある実施形態では、成長ホルモンバリエーションは、変異L101C、Q84CおよびY143Cを含む。

10

【0324】

別の態様では、本発明は、治療において使用するための、親水性スパーサーを介してアルブミン結合残基と連結した成長ホルモン化合物(GH)を含む成長ホルモンコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩に関する。さらに、本発明の成長ホルモンコンジュゲートにおいて、GH、アルブミン結合残基、および親水性スパーサーは、上記の実施形態のいずれか1つから選択され、具体的には、成長ホルモンコンジュゲートは、式(I)または(I')を有する。

【0325】

別の態様では、本発明は、親水性スパーサーを介してアルブミン結合残基と連結した成長ホルモン化合物(GH)を含む成長ホルモンコンジュゲート、または薬学的に許容される塩を、場合によって、薬学的に許容される賦形剤と併せて含む医薬組成物に関する。

20

【0326】

当技術分野で公知の「同一性」という用語は、配列を比較することによって決定される、2つ以上のタンパク質の配列間の関係を指す。当技術分野では、「同一性」は、2つ以上のアミノ酸残基の一続き間の一致の数によって決定されるタンパク質間の配列の関連性の程度も意味する。「同一性」は、特定の数学的モデルまたはコンピュータプログラム(すなわち、「アルゴリズム」)によって取り込まれる、ギャップアラインメント(もしあれば)を伴うより小さい2つ以上の配列間の完全な一致のパーセントを測定する。関連するタンパク質の同一性は、公知の方法によって容易に算出することができる。そのような方法としては、これらに限定されないが、Computational Molecular Biology、Lesk、A.M.編、Oxford University Press、New York、1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects、Smith、D.W.編、Academic Press、New York、1993;Computer Analysis of Sequence Data、Part 1、Griffin、A.M.、およびGriffin、H.G.編、Humana Press、New Jersey、1994;Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje、G.、Academic Press、1987;Sequence Analysis Primer、Gribskov、M.およびDevereux、J.編、M.Stockton Press、New York、1991;およびCarilloら、SIAM J.Applied Math.、48、1073頁、(1988)に記載の方法が挙げられる。

30

【0327】

同一性を決定するための好ましい方法を設計して、試験する配列間の最も大きな一致をもたらす。同一性を決定するための方法は、公的に入手可能なコンピュータプログラムに記載されている。2つの配列間の同一性を決定するための、好ましいコンピュータプログラムによる方法としては、GAP(Devereuxら、Nucl.Acids Res.、12、387、(1984));Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison、Wis.)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Altschulら、J.Mol.Biol.、215、403～410頁、(1990))を含めたGCGプログラムパッケージが含まれる。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information(NCBI)および他の供給源(BLAST Manual、AltschulらNCB/NLM/NIH Bethesda、Md.20894;Altschulら、上記)から公的に入手可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムも、同一性を決定するために使用することができる。

40

【0328】

例えば、コンピュータアルゴリズムであるGAP(Genetics Computer Group、University

50

of Wisconsin, Madison, Wis.)を使用して、パーセント配列同一性を決定しようとしている2つのタンパク質を、それらのそれぞれのアミノ酸(アルゴリズムによって決定される「一致スパン(matched span)」)が最適に一致するようにアラインメントする。ギャップ開始ペナルティ(gap opening penalty)(平均対角項(average diagonal)の3倍として算出し;「平均対角項(average diagonal)」は、使用される比較行列の対角項の平均であり;「対角項」は、特定の比較行列によって完全なアミノ酸の一致のそれぞれに割り当てられたスコアまたは数)、ギャップ伸長ペナルティ(通常ギャップ開始ペナルティの{分率(1/10)}倍)、ならびにPAM250またはBLOSUM62などの比較行列を、アルゴリズムと併せて使用する。標準の比較行列(PAM250比較行列についてはDayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure、5巻、付録3、(1978)を参照されたい;BLOSUM62比較行列についてはHenikoffら、Proc.Natl.Acad.Sci USA、89、10915~10919頁、(1992)を参照されたい)もアルゴリズムで使用される。

10

【0329】

タンパク質配列を比較するための好ましいパラメータとしては、以下が挙げられる:

アルゴリズム:Needlemanら、J.Mol.Biol、48、443~453頁、(1970);比較行列:BLOSUM62、Henikoffら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、89、10915~10919頁、(1992);ギャップペナルティ:12、ギャップ長ペナルティ:4、類似性の閾値:0。

【0330】

GAPプログラムは上記のパラメータを用いて有用である。上述のパラメータは、GAPアルゴリズムを用いてタンパク質を比較するための初期状態のパラメータである(末端ギャップに対してペナルティなしと一緒に)。

20

【0331】

本発明の化合物は、親化合物とも称される、対応するコンジュゲートしていない成長ホルモンと比較して、薬理的性質が改善されている。そのような薬理的性質の例としては、機能性in vivo半減期、免疫原性、腎臓濾過、プロテアーゼからの保護およびアルブミン結合性が挙げられる。

【0332】

「機能性in vivo半減期」という用語は、その通常の意味、すなわち、GHまたはGHコンジュゲートの生物活性の50%が依然として体器官/標的器官内に存在する時間、またはGHまたはGHコンジュゲートの活性がその最初の値の50%である時間という意味で使用される。機能性in vivo半減期を決定する代わりに、「in vivo血漿内半減期」すなわち、GHまたはGHコンジュゲートの50%が取り除かれる前に血漿中または血流中を循環する時間を決定することができる。血漿内半減期を決定することは、多くの場合、機能性半減期を決定することよりも単純であり、血漿内半減期の程度は、通常、機能性in vivo半減期の程度のよい指標である。血漿内半減期に対する代替の用語としては、血清半減期、循環半減期(circulating half-life)、循環半減期(circulatory half-life)、血清クリアランス、血漿クリアランス、およびクリアランス半減期が挙げられる。

30

【0333】

「増加した」という用語は、機能性in vivo半減期または血漿内半減期とともに使用される場合、比較に適した条件下で決定したところ、親GHの半減期と比較してGHコンジュゲートの関連性のある半減期が統計的に有意に増加したことを示すために使用される。例えば、関連性のある半減期は、少なくとも約25%、例えば、少なくとも約50%、例えば、少なくとも約100%、150%、200%、250%、または500%増加し得る。一実施形態では、本発明の化合物の半減期は、親GHの半減期と比較して、少なくとも約5h、好ましくは少なくとも約24h、好ましくは少なくとも約72h、および最も好ましくは少なくとも約7日間増加する。

40

【0334】

in vivo血漿内半減期の測定は、文献に記載のいくつかのやり方で行うことができる。in vivo血漿内半減期の増加は、クリアランス(CL)の減少として、または平均滞留時間(MRT)の増加として数量化することができる。適切なアッセイにおいて決定したところ、CLが親GHのCLの70%未満、例えば50%未満、例えば20%未満、例えば10%未満に減少した本発明の

50

コンジュゲートしたGHは、in vivo血漿内半減期が増加したといえる。適切なアッセイにおいて、MRTが、親GHのMRTの130%超、例えば150%超、例えば200%超、例えば500%超に増加した本発明のコンジュゲートしたGHは、in vivo血漿内半減期が増加したといえる。クリアランスおよび平均滞留時間は、標準の薬物動態試験において、適切な試験動物を使用して評価することができる。所与のタンパク質に対して適切な試験動物を選択することは当業者の能力の範囲内である。ヒトにおける試験は、当然、最終試験を示す。適切な試験動物としては、正常な、雄のスプライングドーリー (Sprague-Dawley) ラット、マウスおよびカニクイザルが挙げられる。一般には、マウスおよびラットには、単回の皮下ボーラス投与で注射するが、サルには、単回の皮下ボーラス投与で、または単回のiv投与で注射することができる。注射量は、試験動物に左右される。その後、CLおよびMRTを評価するために、必要に応じて、血液試料を1~5日にわたって取得する。血液試料は、ELISA技法によって分析することが都合よい。

10

【0335】

化合物の「免疫原性」という用語は、ヒトに投与されると、体液性、細胞性、またはその両方のいずれであろうと、有害な免疫応答を引き出す化合物の能力を指す。任意のヒトの亜集団内には、特定の投与されたタンパク質に対する感受性を示す個体がいる可能性がある。免疫原性は、感受性が高い個体における、成長ホルモンに対する抗体および/または成長ホルモンに反応するT細胞の存在を、当技術分野で公知の従来の方法を使用して数値化することによって測定することができる。一実施形態では、本発明のコンジュゲートしたGHは、感受性が高い個体において、その個体に対する親GHの免疫原性と比較して、少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約25%、より好ましくは少なくとも約40%、および最も好ましくは少なくとも約50%減少した免疫原性を示す。「プロテアーゼからの保護」または「プロテアーゼから保護された」という用語は、本明細書で使用される場合、本発明のコンジュゲートしたGHが、血漿中のペプチダーゼまたはプロテアーゼに対して、親GHよりも抵抗性であることを示すものとする。血漿中に存在するプロテアーゼ酵素およびペプチダーゼ酵素は、循環しているタンパク質、例えば、成長ホルモンなどの循環しているペプチドホルモンなどの分解に関与することが公知である。そのようなプロテアーゼからの保護は、本明細書に記載の実施例Aの方法によって測定することができる。

20

【0336】

成長ホルモンは、例えば、トロンピン、プラスミン、スプチリシン、およびキモトリプシン様セリンプロテイナーゼによる分解を受けやすい可能性がある。これらのプロテアーゼの分解を決定するためのアッセイは、J.Biotech.、65、183頁、(1998)に記載されている。一実施形態では、GHコンジュゲートの加水分解の速度は、親GHの加水分解の速度の70%未満、例えば40%未満、例えば10%未満である。

30

【0337】

哺乳動物種の循環血液中の最も豊富なタンパク質成分は血清アルブミンであり、これは通常、全血100ミリリットル当たりおよそ3~4.5グラムの濃度で存在する。血清アルブミンは、循環系においていくつかの重要な機能を有する、およそ65,000ダルトンの血液タンパク質である。血清アルブミンは、血液に見いだされる種々の有機分子のトランスポーターとして、脂肪酸およびビリルビンなどの種々の代謝産物の血液を通じた主要なトランスポーターとして、また、その豊富さに起因して、循環血液の浸透圧調節因子として機能する。血清アルブミンは、1週間を超える半減期を有し、血清アルブミンに結合するタンパク質群にコンジュゲートすることが、タンパク質の血漿内半減期を増加させるための1つの手法になっている。アルブミン結合性は、参照により本明細書に組み込まれるJ.Med.Chem.、43、1986頁、(2000)に記載の通り決定することができる。

40

【0338】

式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートは、成長ホルモン活性を発揮し、循環している成長ホルモンの量を増加させることが有効である疾患または状況の治療において、そのようなものとして使用することができる。具体的には、本発明は、成長ホルモン欠乏症(GHD);ターナー症候群;ブラダー・ウィリー症候群(PWS);ヌーナン症候群;ダウン症候

50

群;慢性腎疾患、若年性関節リウマチ;嚢胞性線維症、HAART治療を受けている小児のHIV感染(HIV/HALS小児);妊娠期間に比して背が低く生まれた背の低い小児(short children born short for gestational age)(SGA);出生時超低体重(VLBW)だがSGAで生まれた小児の低身長;骨格形成異常;低軟骨形成症;軟骨無形成症;特発性低身長(ISS);成人GHD;長骨、例えば、脛骨、腓骨、大腿骨、上腕骨、橈骨、尺骨、鎖骨、中手骨、中足骨および指などにおける骨折もしくはその骨折;頭蓋骨、手根部、および足根部などの海綿様骨における骨折もしくはその骨折;例えば手、膝、または肩の腱または靱帯の外科手術を受けた後の患者;仮骨延長を有する、もしくは仮骨延長を経験している患者;例えば膝、股関節、肩、肘、手首または顎などにおいて、股関節もしくは円板の交換、半月板修復術、脊髄癒合または人工器官の固定を受けた後の患者;爪、ねじおよび板などの骨接合材料が固定されている患者;骨折が偽関節または変形治癒になっている患者;例えば、脛骨または母趾からの骨切り術を受けた後の患者;グラフトの移植を受けた後の患者;外傷または関節炎によって引き起こされる膝の関節軟骨変性;ターナー症候群の患者における骨粗鬆症;男性の骨粗鬆症;慢性的に透析を受けている成人患者(APCD);APCDにおける栄養不良に関連する心臓血管疾患;APCDにおける悪液質の反転;APCDにおける癌;APCDにおける慢性閉塞性肺疾患;APCDにおけるHIV;APCDである高齢者;APCDにおける慢性肝疾患、APCDにおける疲労症候群;クローン病;肝機能障害;HIV感染している男性;短腸症候群;中心性肥満;HIV関連リポジストロフィー症候群(HALS);男性不妊症;主要な待機的手術、アルコール/薬物の解毒または神経外傷を受けた後の患者;加齢;虚弱高齢者;変形性関節症;外傷性の損傷を受けた軟骨;勃起不全;線維筋痛症;記憶障害;うつ病;外傷性脳損傷;くも膜下出血;出生時超低体重;メタボリックシンドローム;グルココルチコイドミオパチー;または小児におけるグルココルチコイド治療が原因の低身長を治療するための方法であって、治療有効量の式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを、それを必要とする患者に投与することを含む方法を提供する。

10

20

【0339】

別の態様では、本発明は、筋肉組織、神経組織または創傷の治癒を加速する;損傷を受けた組織への血流を加速または改善する;または損傷を受けた組織における感染率を減少させるための方法であって、治療有効量の式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを、それを必要とする患者に投与することを含む方法を提供する。

【0340】

別の実施形態では、本発明は、上記の疾患などの、成長ホルモンの血漿レベルを増加させることが有効である疾患の製造における式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートの使用に関する。

30

【0341】

典型的な非経口用量は、投与当たり体重1kg当たり 10^{-9} mgから約100mgの範囲である。典型的な投与用量は、投与当たり体重1kg当たり約0.0000001から約10mgまでである。正確な用量は、例えば、適応症、医薬品、頻度および投与形式、治療される対象の性別、年齢および全身状態、治療される疾患または状態の性質および重症度、所望の治療効果および当業者に明らかである他の因子に左右される。

【0342】

典型的な投薬頻度は、1日2回、1日1回、2日に1回、週2回、週1回である、またはさらに長い投薬間隔を伴う。本発明の融合タンパク質の半減期は延長されているので、投薬間隔が長い投薬レジメン、例えば、週2回、週1回またはさらに長い投薬間隔を伴う投薬レジメンは、本発明の特定の実施形態である。

40

【0343】

多くの疾患は、治療において、2種以上の医薬品を同時投与、または逐次的な投与のいずれかで使用して治療する。したがって、上記の疾患の1つを治療するための治療方法において、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを、前記疾患の治療において通常使用される1種または複数種の他の治療的に活性のある化合物と組み合わせて使用することは本発明の範囲内である。類似性により、上記の疾患のための医薬品の製造において

50

、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを、前記疾患の1つの治療において通常使用される他の治療的に活性のある化合物と組み合わせて使用することも本発明の範囲内である。

【0344】

一般的な方法

酵素によるコンジュゲーション：

本発明の成長ホルモンコンジュゲートの調製では、一般には、式(I)のA-W-B-GHコンジュゲートの調製において確立される共有結合の少なくとも1つを、下記の実施例において例示されているように、酵素を使用することによって調製する。そのような酵素は、例えば、トランスグルタミナーゼ、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼからなる群から選択することができる。一般には、前記酵素は、トランスグルタミナーゼである。そのようなトランスグルタミナーゼは、例えば、微生物トランスグルタミナーゼ、組織トランスグルタミナーゼおよび第XIII因子およびそのバリエーションからなる群から選択することができる。別の実施形態では、前記酵素は、システインプロテアーゼである。本発明の成長ホルモンコンジュゲートは、多くの異なる方法によって調製することができ、その非限定的な例が以下に示されている。

10

【0345】

本発明は、式(I)のA-W-B-GHコンジュゲートを調製するための方法も提供する。

【0346】

トランスグルタミナーゼ

20

上記の通り、本発明のA-W-B-GHコンジュゲートの調製において確立される共有結合の少なくとも1つは、トランスグルタミナーゼを使用することによって調製することができる。トランスグルタミナーゼとしては、微生物トランスグルタミナーゼ、例えば、ストレプトマイセス種；S.モバラエンス、S.シナモネウム、S.グリセオカルネウム(参照により本明細書に組み込まれるUS5156956)、S.ラベンデュラエ(参照により本明細書に組み込まれるUS5252469)およびS.ラダカヌム(参照により本明細書に組み込まれるJP2003/199569)から単離した微生物トランスグルタミナーゼなどを挙げるることができる。他の有用な微生物トランスグルタミナーゼは、枯草菌(参照により本明細書に組み込まれるUS5731183に開示されている)および種々の変形菌から単離されている。有用な微生物トランスグルタミナーゼの他の例は、その両方が参照により本明細書に組み込まれるWO1996/06931(例えば、パチルス・リディクス由来のトランスグルタミナーゼ)およびWO1996/22366に開示されているものである。有用な非微生物のトランスグルタミナーゼとしては、モルモット肝臓トランスグルタミナーゼ、ならびにカレイ類のマダイ(参照により本明細書に組み込まれるEP0555649に開示されている)、および日本カキのマガキ(参照により本明細書に組み込まれるUS5736356に開示されている)のような種々の海洋性の供給源由来のトランスグルタミナーゼが挙げられる。それらの機能的な類似体および誘導体も有用であり得る。

30

【0347】

一般には、本発明の方法において使用されるTGaseは、微生物トランスグルタミナーゼである。一実施形態では、TGaseは、例えば、WO2007/020290およびWO2008/020075に記載のS.モバラエンス由来のもの、またはそのバリエーションである。別の実施形態では、TGaseは、例えば、WO2008/020075に記載のS.ラダカヌム由来のもの、またはその変異体である。

40

【0348】

本発明によるGHのA-W-Bへのコンジュゲーションは、使用する基質に応じて、GH化合物の配列内の特定のリジン(Lys)位またはグルタミン(Gln)位における選択的な変更が生じる、TGaseに媒介される修飾によって実現することができる。基質としてアミンを使用することにより、グルタミンが修飾され、一方、第一級アミドを使用することにより、リジンが修飾される。hGH(配列番号1)は、38位、41位、70位、115位、140位、145位、158位、168位および172位の9個のリジン残基を有し、22位、29位、40位、46位、49位、68位、69位、84位、91位、122位、137位、141位および181位の13個のグルタミン残基を有するが、修

50

飾することにより、成長ホルモン結合性タンパク質に対する結合効力が減少し、したがって生物活性が低下するので、これらの全てが修飾に容易に利用可能なわけでも、修飾に適しているわけでもない。hGHとその結合性タンパク質との間のX線によるタンパク質結晶構造(PDB:3HHR)により、結合性タンパク質への結合には少なくとも4個のリジン(38、41、168および172)が関与しており、グルタミン(Gln 46)は1つのみが関与している可能性があることが示されている。これにより、アルブミン結合リンカーを選択的に導入するための標的としてグルタミンがより魅力的になる。これらの構造的な考察は、リジンに影響を及ぼす化学的な修飾はin vivo生物活性およびGHの肝臓の受容体に対する結合能に対する負の影響を有することが見いだされたと結論付けられているN.Cheneら、Reprod.Nutr.Develop.29、1~25頁(1989)によって要約された所見により、さらに裏付けられる。

10

【0349】

化学反応I

ある態様では、本発明は、GH化合物を、TGaseに触媒される化学反応を用いて性質修飾基(property-modifying group)で処理する、式(I)の成長ホルモンコンジュゲートの調製に関する。最初に、アミノアルコールを用いた二段階の反応によってアルデヒド官能性またはケトン官能性を組み入れ、その後、過ヨウ素酸で処理して、酸化的切断によってアルデヒド官能性またはケトン官能性を生じさせる。単に例示するための非限定的なアミノアルコールの例としては、1,3-ジアミノ-2-プロパノールおよび1-アミノ-2,3-ジヒドロキシプロパンが挙げられる。

【0350】

20

別の態様では、本発明は、式(I)の成長ホルモンコンジュゲートの調製であって、GH化合物に由来するアルデヒドまたはケトンを性質修飾基由来のアニリンまたはヘテロアリアルアミンで処理してアミンをもたらすこと(III-IV)を含む調製に関する。

【0351】

ある実施形態では、GH化合物に由来するアルデヒドを、性質修飾基由来のアニリンまたはヘテロアリアルアミンで処理する。

【0352】

「GH化合物由来のアルデヒド(もしくはケトン)」または「GH化合物に由来するアルデヒドもしくはケトン」という用語は、アルデヒド官能基またはケトン官能基が共有結合的に付着したGH化合物、またはアルデヒド官能基またはケトン官能基が生じたGH化合物を示すものとする。以下に例示されている化合物(III)などのGH化合物由来のアルデヒドの調製は、当業者に周知であり、任意のこれらの公知の手順を使用して、本明細書に開示されている発明を実現するために必要なGH化合物由来のアルデヒド(III)を調製することができる。

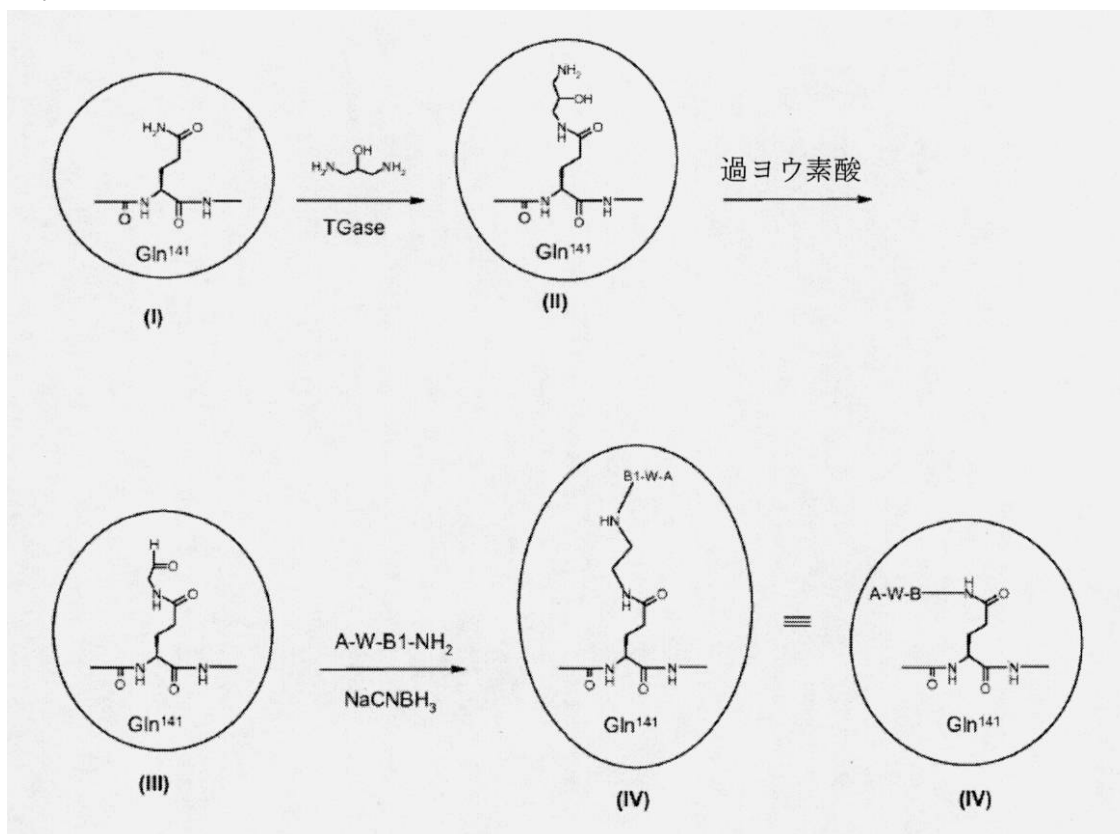
30

【0353】

一実施形態では、以下に例示されている通りコンジュゲートA-W-B-GH(IV)を調製する：

【0354】

【化 3 1】



10

20

【 0 3 5 5 】

GH(I)を用いたTaseに媒介される酵素反応により、141位および/または40位のGlnが修飾され、(II)がもたらされる。修飾されたGH(II)を過ヨウ素酸で処理してアミノアルコールを切断してGH由来のアルデヒド(III)をもたらす。GHアルデヒド(III)とA-W-B1-NH₂のコンジュゲーションは、還元的アルキル化によって起こる(III → IV)。本明細書において例示されている還元的アルキル化は、当技術分野においてよく認識されており、それにより、Gln(141)位および/または40位において修飾されたGH化合物(IV)がもたらされる。

30

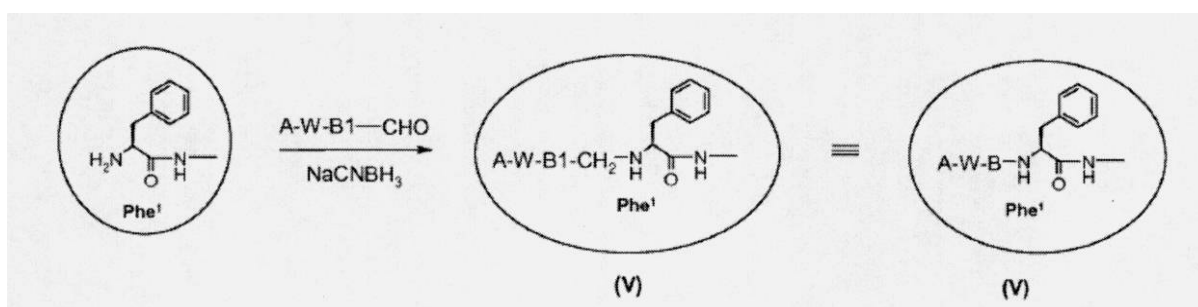
【 0 3 5 6 】

化学反応II

一実施形態では、コンジュゲートA-W-B-GHを、以下に例示されている通り、GHのN末端の還元的アミノ化を用いて調製する：

【 0 3 5 7 】

【化 3 2】



40

【 0 3 5 8 】

GHのA-W-B1-CHOへのコンジュゲーションは、還元的アルキル化によって起こる(GH → V)。上に例示されている還元的アルキル化は、GHのN末端を修飾することに関して、当技術分野においてよく認識されている。

【 0 3 5 9 】

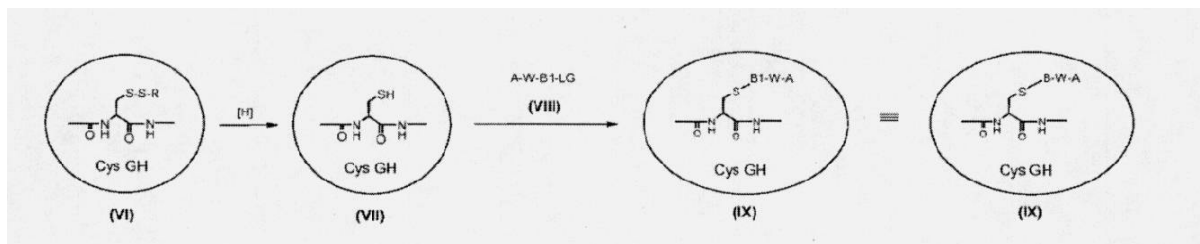
化学反応III

50

一実施形態では、コンジュゲートA-W-B-GHを以下に例示されている通り調製する：

【0360】

【化33】



10

【0361】

ここで、システイン残基は、場合によって、混合ジスルフィド(VI)(GH-S-S-R)として、小さな有機部分であるRで保護されている。混合ジスルフィドの非限定的な例としては、シスタミン(R=-CH₂CH₂NH₂)；システイン(R=-CH₂CH(C(O)OH)NH₂)；ホモシステイン(R=-CH₂CH₂CH(C(O)OH)NH₂)；およびグルタチオン(R=-CH₂CH(C(O)NH-CH₂C(O)OH)NH-C(O)CH₂CH₂CH(C(O)OH)NH₂)の間のジスルフィドを挙げることができる。

【0362】

誘導体化プロセスでは、アルブミン結合性リンカーA-W-B1-LGを利用し、LGは無機脱離基、例えば-Cl、-Br、-Iなど、または有機脱離基、例えばメシル酸またはトシラートなどを示す。GHとA-W-B1-LGのコンジュゲーションは、求核置換によって起こる(VII IX)。

20

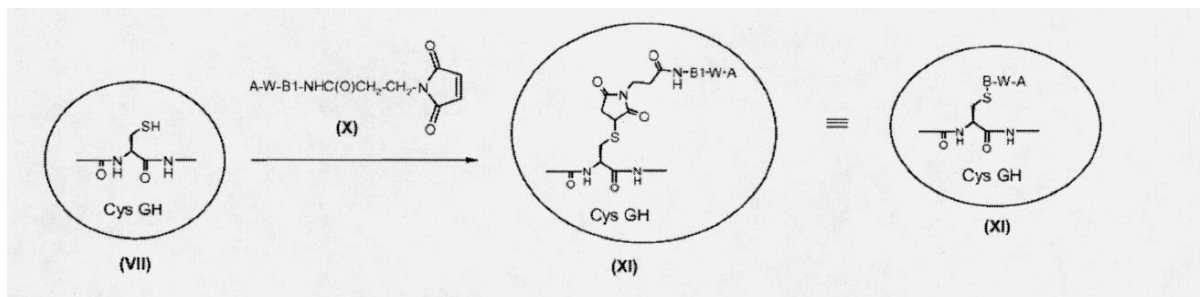
【0363】

化学反応IV

一実施形態では、コンジュゲートA-W-B-GHを以下に例示されている通り調製する：

【0364】

【化34】



30

【0365】

上記の(VI)から得られた脱保護されたCys GH化合物(VII)をマレイミド置換されたアルブミン結合リンカー(X)と反応させて、GHコンジュゲートA-W-B1-NHC(O)CH₂CH₂-ピロリジン-2,5-ジオン-3-GH(XI)をもたらすことができ、ここで、親水性スパーサーB1は、以下の式を有する。

-X₁-X₂-X₃-X₄-

(式中、

X₁は-W₁-[(CHR¹)₁₁-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)₁₂-W₃]_{m3}]_{n2}-であり、

X₂は-[(CHR³)₁₃-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)₁₄-W₅]_{m6}]_{n4}-であり、

X₃は-[(CHR⁵)₁₅]_{m7}-であり、

X₄は原子価結合であり、

11、12、13、14および15は、独立に、0～16から選択され、

m1、m3、m4、m6およびm7は、独立に、0～10から選択され、

m2およびm5は、独立に、0～25から選択され、

n1、n2、n3およびn4は、独立に、0～16から選択され、

R¹、R²、R³、R⁴およびR⁵は、独立に、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆-アルキル、アリールまたはヘタリールから選択され；アルキル基、

50

アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ または $-\text{OH}$ で置換されており、

E1およびE2は、独立に、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^6-$ 、 $-\text{N}(\text{COR}^7)-$ または原子価結合から選択され; R^6 および R^7 は、独立に、水素または $\text{C}_1 \sim 6$ -アルキルを示し、

$\text{W}_1 \sim \text{W}_5$ は、独立に、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{s2}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、または原子価結合から選択され; $s2$ は0または1である)。

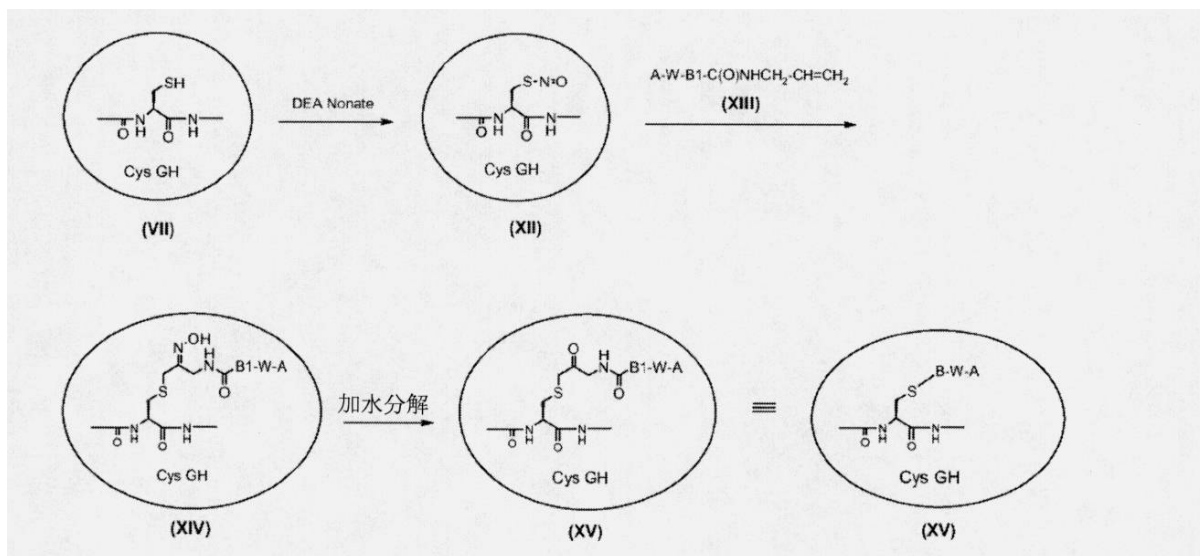
【0366】

化学反応V

一実施形態では、コンジュゲートA-W-B-GHを以下に例示されている通り調製する:

【0367】

【化35】



【0368】

WO2009/024791に記載のS-ニトロシル化学反応を用いて、アルブミン結合剤を単一cys GH誘導体に付着させることができる。

【0369】

脱保護されたCys GH化合物(VII)を、DEA Nonate(Sigma Aldrich)などのNO供与体を加えることによってS-ニトロシル化に供する。次いで、ニトロシル化された単一cys GH(XII)をアリルアミン置換されたアルブミン結合剤(XIII)と反応させて、オキシム(XIV)をもたらし、その後それを加水分解してGHコンジュゲートA-W-B1-C(O)NHCH₂C(O)CH₂-Cys GH(XV)をもたらす。ここで、親水性スパーサーB1は、以下の式を有する

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

(式中、

X_1 は $-\text{W}_1-[(\text{CHR}^1)_{11}-\text{W}_2]_{m1}-\{[(\text{CH}_2)_{n1}\text{E1}]_{m2}-[(\text{CHR}^2)_{12}-\text{W}_3]_{m3}\}_{n2}-$ であり

X_2 は $-(\text{CHR}^3)_{13}-\text{W}_4]_{m4}-\{[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E2}]_{m5}-[(\text{CHR}^4)_{14}-\text{W}_5]_{m6}\}_{n4}-$ であり、

X_3 は $-(\text{CHR}^5)_{15}]_{m7}-$ であり、

X_4 は原子価結合であり、

11、12、13、14および15は、独立に、0~16から選択され、

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ は、独立に、0~10から選択され、

$m2$ および $m5$ は、独立に、0~25から選択され、

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ は、独立に、0~16から選択され、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 は、独立に、水素、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$ 、 $\text{C}_1 \sim 6$ -アルキル、アリールまたはヘタリールから選択され;アルキル基、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$

、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ または $-OH$ で置換されており、
 E1およびE2は、独立に、 $-O-$ 、 $-N(R^6)-$ 、 $-N(C(O)R^7)-$ または原子価結合から選択され; R^6 および R^7 は、独立に、水素または $C_1 \sim 6$ -アルキルを示し、
 $W_1 \sim W_5$ は、独立に、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、または原子価結合から選択され; $s2$ は0または1である)。

【0370】

天然のペプチドとの密接な関連性は、それにより、例えば任意の望ましくない抗体生成が起こる危険性が最小限になるので、一般に、この天然のペプチドのバリエーションまたは類似体を投与することを含む治療介入に関しては利点とみなされる。

10

【0371】

GHは、カルボキシペプチダーゼY(EC.3.4.16.5)、およびWO2007/093594に記載の適切な修飾された基質を使用することによって、それらのC末端において修飾することができる。B. Peschkeら「C-Terminally PEGylated GH derivatives」Bioorg. Med. Chem. 15、4382～4395頁、(2007)に記載されている二段階の手順では、C末端のアラニンを酵素によってN-(4-アセチルベンゾイル)リジンと交換し、その後、本発明によるアルブミン結合剤誘導体と反応させる。

【0372】

上記から明らかであるように、本発明は、さらに、コンジュゲートA-W-B-GHの調製において適用される介在リンカーに関する。前記リンカー化合物は、式(III)により説明することができる。

20

A-W-B1-U (III)

(式中、Aはアルブミン結合残基を表し、

B1は、親水性スペーサーを表し、

Wは、AとB1を連結する化学基であり、Uは、コンジュゲート部分を示す)

【0373】

上記に基づいて、コンジュゲート部分は、適用されるコンジュゲーションの方法に応じて変動し、最後には、最終的なhGH化合物(A-W-B-GH)において同様に目に見えるようにすることができる。

30

【0374】

化合物、A-W-B1-Uの別の実施形態では、AおよびWは、上記の実施形態のいずれかにおいて定義されている通りである。

【0375】

本明細書において化学反応IVとして上記されている方法を化合物A-W-B1-Uに適用する場合、さらに、Uが、アリール、ヘテロアリール、置換されたマレイミドまたは $-NHC(O)CH_2CH_2$ -ピロリジン-2,5-ジオンなどのピロリジン-2,5-ジオンを含む、またはそれからなる実施形態として定義することができる。

【0376】

化合物A-W-B1-Uの代替の実施形態では、Uは、 $D1-(CH_2)_{16}-D2$ を含み、D1およびD2は、独立に $-O-$ 、 $-N(R^6)-$ 、 $-NC(O)R^7$ -または原子価結合から選択され; R^6 および R^7 は、独立に、水素または $C_1 \sim 6$ -アルキルを示す。

40

【0377】

同様に、本明細書において上記されている化学反応IIIの適用では、Uが、例えばCl、Br、I、 $-OH$ 、 $-OS(O)_2Me$ 、 $-OS(O)_2CF_3$ または $-OTs$ などの脱離基を含む、またはそれからなるリンカー化合物を適用する、または、脱離基がCl、BrおよびI、好ましくはBrから選択されるハロゲン化合物である式(III)の化合物を適用することが好ましい。

【0378】

リンカー化合物(化学反応Vにおいて適用される)の別の実施形態は、Uが、アリルアミン($H_2C=CH-CH_2-NH_2$)、例えば $-C(O)NHCH_2-CH=CH_2$ などを含む、またはそれからなる式(III)に

50

よって定義される本発明に従う。

【0379】

本明細書において化学反応Iとして上記されている方法に化合物A-W-B1-Uを適用する場合、さらに、Uが、アミン(-NH₂)を含む、またはそれからなる実施形態として定義することができる。

【0380】

代替の実施形態では、Uは、-CHOなどのアルデヒドを含んでよい、またはそれからなつてよい。

【0381】

化合物は、その後、「U」をコンジュゲートすることができる受容体基を含む任意の種類の治療用化合物とコンジュゲートすることができる。好ましい実施形態では、治療用化合物は、ポリペプチドである。ペプチドは、受容体基として機能し得るアミノ酸残基、例えばGln残基、Phe残基およびCys残基などを天然に含んでよい。あるいは、そのようなアミノ酸残基をポリペプチドの適切な位置に導入することができる。

【0382】

医薬組成物

別の目的は、本発明の成長ホルモンコンジュゲート、例えば式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートなどを10⁻¹⁵mg/mLから200mg/mLまで、例えば、10⁻¹⁰mg/mLから5mg/mLの濃度で含み、2.0から10.0までのpHを有する医薬組成物もたらすことである。組成物は、緩衝系、保存料、等張化剤(tonicity agent)、キレート化剤、安定剤および界面活性物質などの医薬の賦形剤をさらに含んでよい。本発明の一実施形態では、医薬組成物は、水性組成物、すなわち、水を含む組成物である。そのような組成物は、一般には、溶液または懸濁液である。本発明の別の実施形態では、医薬組成物は、水溶液である。「水性組成物」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む組成物と定義される。同様に、「水溶液」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む溶液と定義され、「水性懸濁液」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む懸濁液と定義される。

【0383】

別の実施形態では、医薬組成物は、医師または患者が使用する前に溶媒および/または希釈剤に加える、フリーズドライした組成物である。

【0384】

別の実施形態では、医薬組成物は、いかなる事前の溶解も伴わず使える状態である乾燥した組成物(例えば、フリーズドライまたは噴霧乾燥した)である。

【0385】

別の態様では、本発明は、0.1~100mg/mLまたはそれを上回る濃度の成長ホルモンコンジュゲート、例えば、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートなどの水溶液および緩衝液を含み、約2.0から約10.0までのpHを有する医薬組成物に関する。

【0386】

本発明の別の実施形態では、組成物のpHは、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、および10.0からなる一覧から選択される。

【0387】

本発明の別の実施形態では、緩衝液は、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸塩、グリシルグリシン、ヒスチジン、グリシン、リジン、アルギニン、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸ナトリウム、およびトリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン、ピシン、トリシン、リンゴ酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、アスパラギン酸、またはそれらの混合物からなる群から選択される。これらの特定の緩衝液のひとつひとつが本発明の代替的な実施形態を構成する。

【0388】

本発明の別の実施形態では、組成物は、薬学的に許容される保存料をさらに含む。本発明の別の実施形態では、保存料は、フェノール、o-クレゾール、m-クレゾール、p-クレゾール、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピル、2-フェノキシエタノール、p-ヒドロキシ安息香酸ブチル、2-フェニルエタノール、ベンジルアルコール、クロロブタノール、およびチメロサール、プロノポール、安息香酸、イミド尿素、クロロヘキシジン、デヒドロ酢酸ナトリウム、クロロクレゾール、p-ヒドロキシ安息香酸エチル、塩化ベンゼトニウム、クロルフェネシン(3-(p-クロロフェノキシ)プロパン-1,2-ジオール)、またはそれらの混合物からなる群から選択される。本発明の別の実施形態では、保存料は、0.1mg/mLから20mg/mLまでの濃度で存在する。本発明の別の実施形態では、保存料は、0.1mg/mLから5mg/mLまでの濃度で存在する。本発明の別の実施形態では、保存料は、5mg/mLから10mg/mLまでの濃度で存在する。本発明の別の実施形態では、保存料は、10mg/mLから20mg/mLまでの濃度で存在する。これらの特定の保存料のひとつひとつが本発明の代替的な実施形態を構成する。医薬組成物における保存料の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington:The ScienceおよびPractice of Pharmacy、第20版、2000年を参照する。

10

【0389】

本発明の別の実施形態では、組成物は、等張化剤(isotonic agent)をさらに含む。本発明の別の実施形態では、等張化剤(isotonic agent)は、塩(例えば、塩化ナトリウム)、糖または糖アルコール、アミノ酸(例えば、L-グリシン、L-ヒスチジン、アルギニン、リジン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、トレオニン)、アルジトール(例えば、グリセロール(グリセリン)、1,2-プロパンジオール(プロピレングリコール)、1,3-プロパンジオール、1,3-ブタンジオール)ポリエチレングリコール(例えば、PEG400)、またはそれらの混合物からなる群から選択される。任意の糖、例えば、フルクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプンおよびカルボキシメチルセルロースNaを含めた単糖、二糖または多糖、または水溶性グルカンなどを使用することができる。一実施形態では、糖添加物はスクロースである。糖アルコールは、少なくとも1つの-OH基を有するC4~C8の炭化水素と定義され、それらとしては、例えば、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、ガラクトール、ズルシトール、キシリトール、およびアラビトールが挙げられる。一実施形態では、糖アルコール添加物はマンニトールである。上記の糖または糖アルコールは、個々に、または組み合わせて使用することができる。糖または糖アルコールが液体の調製物に可溶性であり、かつ本発明の方法を使用して得られる安定化効果に悪影響を及ぼさない限りは、その使用量に対する固定された制限はない。一実施形態では、糖または糖アルコールの濃度は約1mg/mLから約150mg/mLの間である。本発明の別の実施形態では、等張化剤(isotonic agent)は、1mg/mLから50mg/mLまでの濃度で存在する。本発明の別の実施形態では、等張化剤(isotonic agent)は、1mg/mLから7mg/mLまでの濃度で存在する。本発明の別の実施形態では、等張化剤(isotonic agent)は、8mg/mLから24mg/mLまでの濃度で存在する。本発明の別の実施形態では、等張化剤(isotonic agent)は、25mg/mLから50mg/mLまでの濃度で存在する。これらの特定の等張化剤のひとつひとつが本発明の代替的な実施形態を構成する。医薬組成物における等張化剤(isotonic agent)の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington:The ScienceおよびPractice of Pharmacy、第20版、2000年を参照する。

20

30

40

【0390】

本発明の別の実施形態では、組成物は、キレート化剤をさらに含む。本発明の別の実施形態では、キレート化剤は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、クエン酸、およびアスパラギン酸の塩、ならびにそれらの混合物から選択される。本発明の別の実施形態では、キレート化剤は、0.1mg/mLから5mg/mLまでの濃度で存在する。本発明の別の実施形態では、キレート化剤は、0.1mg/mLから2mg/mLまでの濃度で存在する。本発明の別の実施形態では、

50

キレート化剤は、2mg/mLから5mg/mLまでの濃度で存在する。これらの特定のキレート化剤のひとつひとつが本発明の代替的な実施形態を構成する。医薬組成物におけるキレート化剤の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington:The ScienceおよびPractice of Pharmacy、第20版、2000年を参照する。

【0391】

本発明の別の実施形態では、組成物は、安定剤をさらに含む。医薬組成物における安定剤の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington:The ScienceおよびPractice of Pharmacy、第20版、2000年を参照する。

【0392】

より詳細には、本発明の組成物は、治療的に活性な構成成分が、液体の医薬組成物の状態で貯蔵している間に凝集体の形成を示す可能性があるタンパク質を含む、安定化された液体の医薬組成物である。「凝集体の形成」とは、可溶性のままであるオリゴマー、または溶液から沈澱する大きな目に見える凝集体の形成をもたらすタンパク質分子間の物理的な相互作用を意味する。「貯蔵している間」は、液体の医薬組成物または組成物を、調製した後すぐには対象に投与しないことを意味する。それどころか、調製した後、後で対象に投与するために適した液体の形態または他の形態に再構成するために、貯蔵用に液体の形態、凍結した状態、または乾燥した形態のいずれかで包装する。「乾燥した形態」は、液体の医薬組成物または組成物を、フリーズドライ(すなわち、凍結乾燥;例えば、WilliamsおよびPolli、J.Parenteral Sci.Technol.、38、48~59頁、(1984)を参照されたい)、噴霧乾燥(Masters(1991)in Spray-Drying Handbook(第5版;Longman Scientific and Technical、Essez、U.K.)、491~676頁;BroadheadらDrug Devel.Ind.Pharm.18、1169~1206頁、(1992);およびMumenthalerら、Pharm.Res.、11、12~20頁、(1994)を参照されたい)、または空気乾燥(CarpenterおよびCrowe、Cryobiology 25、459~470頁、(1988);およびRoser、Biopharm.4、47~53頁、(1991))のいずれかで乾燥することを意味する。液体の医薬組成物を貯蔵している間にタンパク質により凝集体が形成されることは、そのタンパク質の生物活性に悪影響を及ぼし、それにより医薬組成物の治療効果が減少する可能性がある。さらに、凝集体の形成により、注入系を用いてタンパク質を含有する医薬組成物を投与する場合に管材料、膜、またはポンプが遮断されることなどの他の問題が引き起こされる可能性がある。

【0393】

本発明の医薬組成物は、組成物を貯蔵している間のタンパク質による凝集体の形成を減少させるために十分な量のアミノ酸塩基をさらに含んでよい。「アミノ酸塩基」は、任意の所与のアミノ酸がその遊離塩基の形態で、またはその塩の形態で存在する1つのアミノ酸、または複数のアミノ酸の組み合わせを意味する。複数のアミノ酸の組み合わせを使用する場合、アミノ酸の全てがそれらの遊離塩基の形態で存在してよい、または、アミノ酸の全てがそれらの塩の形態で存在してよい、またはアミノ酸の一部がそれらの遊離塩基の形態で存在し、その他がそれらの塩の形態で存在してよい。一実施形態では、本発明の組成物の調製において使用するためのアミノ酸は、荷電した側鎖、例えば、アルギニン、リジン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸などを保有するアミノ酸である。特定のアミノ酸(メチオニン、ヒスチジン、アルギニン、リジン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、トレオニンならびにそれらの混合物)の任意の立体異性体(すなわち、L異性体またはD異性体、またはそれらの混合物)、またはこれらの立体異性体の組み合わせまたはグリシン、または、例えば、これに限定されないがイミダゾールなどの有機塩基は、その特定のアミノ酸または有機塩基がその遊離塩基の形態またはその塩の形態のいずれかで存在する限りは、本発明の医薬組成物中に存在してよい。一実施形態では、アミノ酸のL-立体異性体を使用する。一実施形態では、L-立体異性体を使用する。本発明の組成物は、これらのアミノ酸の類似体を用いて製剤化することもできる。「アミノ酸類似体」は、本発明の液体の医薬組成物を貯蔵している間のタンパク質による凝集体の形成を減少させるという所望の効果をもたらす天然に存在するアミノ酸の誘導体を意味する。適切なアルギニン類似体としては、例えば、アミノグアニジン、オルニチンおよびN-モノエチルL-

10

20

30

40

50

アルギニンが挙げられ、適切なメチオニン類似体としては、エチオニンおよびブチオニンが挙げられ、適切なシステイン類似体としては、S-メチル-Lシステインが挙げられる。他のアミノ酸と同様に、アミノ酸類似体は、それらの遊離塩基の形態またはそれらの塩の形態のいずれかで組成物に組み込まれる。本発明の別の実施形態では、アミノ酸またはアミノ酸類似体は、タンパク質の凝集を妨げるまたは遅らせるために十分な濃度で使用される。

【0394】

本発明の別の実施形態では、治療剤として作用するタンパク質が、メチオニン残基からメチオニンスルホキシドへの酸化を受けやすい少なくとも1つのメチオニン残基を含むタンパク質である場合、そのような酸化を阻害するためにメチオニン(または他の硫黄を含むアミノ酸またはアミノ酸類似体)を加えることができる。「阻害する」は、ある期間にわたるメチオニンの酸化種の蓄積が最小になることを意味する。メチオニンの酸化を阻害することにより、タンパク質がその適切な分子形態に高度に保持される。メチオニンの任意の立体異性体(L異性体またはD異性体)またはそれらの任意の組み合わせを使用することができる。加える量は、メチオニン残基の酸化を阻害するために十分な量、したがってメチオニンスルホキシドの量が調節媒体にとって許容できる量であるべきである。一般には、これは、組成物が、約10%~約30%を超えないメチオニンスルホキシドを含有することを意味する。一般に、これは、加えたメチオニンのメチオニン残基に対する比率が、約1:1から約1000:1まで、例えば10:1から約100:1などの範囲になるようにメチオニンを加えることによって得ることができる。

【0395】

本発明の別の実施形態では、組成物は、高分子量のポリマーまたは低分子化合物の群から選択される安定剤をさらに含む。本発明の別の実施形態では、安定剤は、ポリエチレングリコール(例えば、PEG3350)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルピロリドン、カルボキシセルロース/ヒドロキシセルロース、またはその誘導体(例えば、HPC、HPC-SL、HPC-LおよびHPMC)、シクロデキストリン、モノチオグリセロール、チオグリコール酸および2-メチルチオエタノールのような硫黄を含有する物質、ならびに種々の塩(例えば、塩化ナトリウム)から選択される。これらの特定の安定剤のひとつひとつが本発明の代替的な実施形態を構成する。

【0396】

医薬組成物は、その中に含まれる治療的に活性なタンパク質の安定性をさらに増強する追加的な安定化剤も含んでよい。本発明にとって特に興味深い安定化剤としては、これらに限定されないが、タンパク質を、メチオニンの酸化から保護するメチオニンおよびEDTA、ならびにタンパク質を、凍結融解または機械的せん断に伴う凝集から保護する非イオン性界面活性物質が挙げられる。

【0397】

本発明の別の実施形態では、組成物は、界面活性物質をさらに含む。本発明の別の実施形態では、界面活性物質は、界面活性剤、エトキシ化ヒマシ油、ポリグリコール化(polyglycolized)グリセリド、アセチル化モノグリセリド、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロックポリマー(例えば、Pluronic(登録商標)F68、ポロキサマー188および407、Triton X-100などのポロキサマー)、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン誘導体およびポリエチレン誘導体、例えばアルキル化誘導体またはアルコキシル化誘導体(ツイーン、例えば、Tween-20、Tween-40、Tween-80およびBrij-35)など、モノグリセリドまたはそのエトキシ化誘導体、ジグリセリドまたはそのポリオキシエチレン誘導体、アルコール、グリセロール、レクチンおよびリン脂質(例えば、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジイルノシトール、ジホスファチジルグリセロールおよびスフィンゴミエリン)、リン脂質の誘導体(例えば、ジパルミトイルホスファチジン酸)およびリゾリン脂質(例えば、パルミトイルリゾホスファチジル-L-セリンおよびエタノールアミン、コリン、セリンまたはトレオニンの1-アシル-sn-グリセロ-3-リン酸エステル)およ

び、リゾホスファチジルおよびホスファチジルコリンのアルキル誘導体、アルコキシル(アルキルエステル)誘導体、アルコキシ(アルキルエーテル)誘導体、例えば、リゾホスファチジルコリンのラウロイル誘導体およびミリストイル誘導体、ジパルミトイルホスファチジルコリン、および、コリン、エタノールアミン、ホスファチジン酸、セリン、トレオニン、グリセロール、イノシトール、および正に荷電したDODAC、DOTMA、DCP、BISHOP、リゾホスファチジルセリンおよびリゾホスファチジルトレオニンである極性頭部基の修飾、およびグリセロリン脂質(例えば、セファリン)、グリセロ糖脂質(例えば、ガラクトピラノシド)、スフィンゴ糖脂質(例えば、セラミド、ガングリオシド)、ドデシルホスホコリン、ニワトリ卵白リゾレシチン、フシジン酸誘導体-(例えば、ナトリウムタウロ-ジヒドロフシデートなど)、長鎖脂肪酸およびその塩 $C_6 \sim C_{12}$ (例えば、オレイン酸およびカプリル酸)、アシルカルニチンおよび誘導体、リジン、アルギニンまたはヒスチジンのN -アシル化された誘導体、またはリジンまたはアルギニンの側鎖がアシル化された誘導体、リジン、アルギニンまたはヒスチジンおよび中性アミノ酸または酸性アミノ酸の任意の組み合わせを含むジペプチドのN -アシル化された誘導体、中性アミノ酸および2つの荷電アミノ酸の任意の組み合わせを含むトリペプチドのN -アシル化された誘導体、DSS(ドクサートナトリウム、CAS登録番号[577-11-7])、ドクサートカルシウム、CAS登録番号[128-49-4])、ドクサートカリウム、CAS登録番号[7491-09-0])、SDS(ドデシル硫酸ナトリウムまたはラウリル硫酸ナトリウム)、カプリル酸ナトリウム、コール酸、またはその誘導体、胆汁酸およびその塩およびグリシンコンジュゲートまたはタウリンコンジュゲート、ウルソデオキシコール酸、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、N-ヘキサデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホン酸、アニオン性の(アルキルアリールスルホン酸)一価の界面活性物質、両性イオン性界面活性物質(例えば、N-アルキル-N,N-ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホン酸、3-コラミド-1-プロピルジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホン酸、カチオン性界面活性物質(第四級アンモニウム塩基)(例えば、セチル-トリメチルアンモニウムブロミド、塩化セチルピリジニウム)、非イオン性界面活性物質(例えば、ドデシル -D-グルコピラノシド)、プロピレンオキシドおよびエチレンオキシドをエチレンジアミンに逐次的に付加することによって得られる四官能性のブロック共重合であるポロキサミン(例えば、Tetronicの)から選択される、または界面活性物質は、イミダゾリン誘導体、またはそれらの混合物の群から選択することができる。これらの特定の界面活性物質のひとつひとつが本発明の代替的な実施形態を構成する。

【0398】

医薬組成物における界面活性物質の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington: The ScienceおよびPractice of Pharmacy、第20版、2000年を参照する。

【0399】

他の成分が本発明の医薬組成物に存在してよい。そのような追加的な成分としては、湿潤剤、乳化剤、抗酸化剤、充填剤、張度調節剤(tonicity modifier)、キレート化剤、金属イオン、油性ビヒクル、タンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチンまたはタンパク質)および両性イオン(例えば、ベタイン、タウリン、アルギニン、グリシン、リジンおよびヒスチジンなどのアミノ酸)を挙げることができる。そのような追加的な成分は、当然、本発明の医薬組成物の全体的な安定性に悪影響を及ぼさないべきである。

【0400】

本発明による成長ホルモンコンジュゲートを含有する医薬組成物は、そのような治療を必要とする患者に、いくつかの部位に、例えば、局所部位、例えば、皮膚部位および粘膜部位に、吸収をバイパスする部位に、例えば、動脈内投与、静脈内投与、心臓内投与で、および吸収に関与する部位に、例えば、皮膚内投与、皮下投与、筋肉内投与または腹部内投与で投与することができる。

【0401】

医薬本発明による組成物の投与は、いくつかの投与経路、例えば、そのような治療を必要とする患者への、舌への投与経路、舌下投与経路、頬側投与経路、口腔内投与経路、経

10

20

30

40

50

口的投与経路、胃腸内投与経路、鼻への投与経路、肺、例えば、細気管支および肺胞への投与経路、またはそれらの組み合わせ、上皮への投与経路、皮膚への投与経路、経皮的投与経路、腔内投与経路、直腸内投与経路、眼、例えば、結膜への投与経路、尿管への投与経路、および非経口的な投与経路を通じてよい。

【0402】

本発明の組成物は、いくつかの剤形、例えば、液剤、懸濁剤、乳剤、マイクロエマルジョン、多層乳剤、泡状剤、膏薬、ペースト剤、貼付剤、軟膏剤、錠剤、コーティング錠剤、リンス剤、カプセル剤、例えば、硬ゼラチンカプセル剤および軟ゼラチンカプセル剤、坐剤、直腸用カプセル剤、滴剤、ゲル剤、噴霧剤、散剤、エアロゾル剤、吸入剤、点眼剤、眼軟膏剤、眼リンス剤、腔坐薬、腔リング、腔軟膏剤、注射液、in situ形質転換溶液、例えば、in situゲル化溶液、in situ硬化溶液、in situ沈殿溶液、in situ結晶化溶液、輸液、および移植片として投与することができる。

10

【0403】

本発明の組成物は、成長ホルモンコンジュゲートの安定性をさらに増強するため、生物学的利用能を増加させるため、溶解性を増加させるため、有害作用を減少させるため、当業者に周知の時間治療を実現するため、および患者のコンプライアンスを増加させるため、またはそれらの任意の組み合わせのために、例えば、共有結合性相互作用、疎水性相互作用および静電的な相互作用によって、薬物担体、薬物送達システムおよび先進薬物送達システムにさらに配合する、または付着させることができる。担体、薬物送達システムおよび先進薬物送達システムの例としては、これらに限定されないが、ポリマー、例えば、セルロースおよび誘導体、多糖、例えば、デキストランおよび誘導体、デンプンおよび誘導体、ポリ(ビニルアルコール)、アクリル酸ポリマーおよびメタクリル酸ポリマー、ポリ乳酸およびポリグリコール酸およびそれらのブロック共重合体、ポリエチレングリコール、担体タンパク質、例えば、アルブミン、ゲル、例えば、熱ゲル化(thermogelling)系、例えば、当業者に周知のブロック共重合体系、ミセル、リポソーム、ミクロスフェア、ナノ粒子、液晶およびその分散液、L2相およびその分散液、相挙動が当業者に周知の脂質-水系、ポリマーミセル、多層乳剤、自己乳化型、自己マイクロエマルション化型(self-microemulsifying)、シクロデキストリンおよびそれらの誘導体、およびデンドリマーが挙げられる。

20

【0404】

本発明の組成物は、成長ホルモンコンジュゲートを、例えば、全て当業者に周知のデバイスである定量噴霧式吸入器、乾燥粉末吸入器およびネブライザーを使用して肺内投与するための固体、半固体、粉末および溶液の組成物において有用である。

30

【0405】

本発明の組成物は、特に、制御放出、持続的放出、長期放出、遅延型放出および緩慢な放出の薬物送達システムの組成物において有用である。より詳細には、これに限定されないが、組成物は、当業者に周知の非経口的な制御放出系および持続的放出系(どちらの系によっても、投与数が何分の1にも低減される)の組成物において有用である。皮下投与される制御放出系および持続的放出系がさらに好ましい。本発明の範囲を限定することなく、有用な制御放出系および組成物の例は、ヒドロゲル、油性ゲル、液晶、ポリマーミセル、ミクロスフェア、ナノ粒子である。

40

【0406】

本発明の組成物に有用な制御放出系を作出するための方法としては、これらに限定されないが、結晶化、縮合、共結晶化、沈殿、共沈殿、乳化、分散、高压均質化、封入、噴霧乾燥、マイクロカプセル化、コアセルベーション、相分離、ミクロスフェアを作出するための溶媒の蒸発、押出しおよび超臨界流体プロセスが挙げられる。Handbook of Pharmaceutical Controlled Release(Wise、D.L.編Marcel Dekker、New York、2000)およびDrug and the Pharmaceutical Sciences 99巻:Protein Composition and Delivery(MacNally、E.J.編Marcel Dekker、New York、2000)を一般的に参照する。

【0407】

50

非経口投与は、シリンジ、場合によって、ペン様のシリンジによる皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射または静脈内注射によって実施することができる。あるいは、非経口投与は、注入ポンプによって実施することができる。別の選択肢は、成長ホルモンコンジュゲートを鼻噴霧剤または肺噴霧剤の形態で投与するための、溶液または懸濁液であってよい組成物である。さらに別の選択肢として、本発明の成長ホルモンコンジュゲートを含有する医薬組成物は、経皮投与、例えば、無針注射による経皮投与、またはパッチ剤、場合によってイオン導入のパッチ剤からの経皮投与、または経粘膜的な経皮投与、例えば、頬側投与にも適合させることができる。

【0408】

「安定化された組成物」という用語は、物理的安定性が増加した組成物、化学的安定性が増加した組成物または物理的安定性および化学的安定性が増加した組成物を指す。

10

【0409】

タンパク質組成物の「物理的安定性」という用語は、本明細書で使用される場合、熱機械ストレスに曝露された結果として、および/または疎水性の表面および界面などの不安定化している界面および表面との相互作用の結果として、タンパク質が生物学的に不活性かつ/または不溶性のタンパク質の凝集体を形成する傾向を指す。水性タンパク質組成物の物理的安定性は、適切な容器(例えば、カートリッジまたはバイアル)に満たした組成物を、種々の温度で種々の期間にわたって機械的/物理的ストレス(例えば、攪拌)に曝露させた後に目視検査および/または濁度測定によって評価する。組成物の目視検査は、暗い背景で鋭く焦点を合わせた光の中で実施する。組成物の濁度は、濁度の程度を、視覚的なスコアを、例えば0から3までの尺度で順位づけることによって特徴づける(濁度を示さない組成物は視覚的なスコア0に対応し、昼光において視覚的な濁度を示す組成物は視覚的なスコア3に対応する)。組成物が昼光において視覚的な濁度を示す場合、それはタンパク質の凝集について物理的に不安定であると分類される。あるいは、組成物の濁度は、当業者に周知の単純な濁度測定によって評価することができる。水性タンパク質組成物の物理的安定性は、分光学的な作用剤(spectroscopic agent)またはタンパク質のコンフォメーションの状態のプロープを使用することによっても評価することができる。プロープは、タンパク質の非ネイティブな配座異性体に優先的に結合する小分子であることが好ましい。タンパク質の構造の小分子分光プロープの1つの例は、チオフラビンTである。チオフラビンTは、アミロイド線維を検出するために広範に使用されている蛍光色素である。原線維、およびおそらくさらに他のタンパク質の立体配置の存在下で、チオフラビンTは、線維タンパク質形態に結合すると、約450nmで最大の新しい励起を生じ、約482nmにおける放出が増強される。結合していないチオフラビンTは、本質的にその波長では非蛍光である。

20

30

【0410】

タンパク質の構造の、ネイティブな状態から非ネイティブな状態への変化のプロープとして他の小分子を使用することができる。例えば、タンパク質の露出した疎水性パッチに優先的に結合する「疎水性パッチ」プロープ。疎水性パッチは、一般に、そのネイティブな状態ではタンパク質の三次構造の内部に埋もれているが、タンパク質がほどけ始める、または変性し始めるにつれて露出する。これらの小分子の例である分光プロープは、例えば、アントラセン、アクリジン、フェナントロリンなどの芳香族の疎水性色素である。他の分光プロープは、金属-アミノ酸複合体、例えば、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、およびバリンなどの疎水性アミノ酸のコバルト金属複合体などである。

40

【0411】

タンパク質組成物の「化学的安定性」という用語は、本明細書で使用される場合、ネイティブなタンパク質構造と比較して生物学的効力が潜在的に低下している、かつ/または免疫原性が潜在的に増加している化学的分解産物の形成を導く、タンパク質の構造の化学的な共有結合性の変化を指す。ネイティブなタンパク質の種類および本質およびタンパク質が曝露されている環境に応じて、種々の化学的分解産物が形成され得る。化学的分解を

50

排除することは、ほぼ確実に、完全に回避することができず、化学的分解産物の増加量は、当業者に周知の通り、多くの場合、タンパク質組成物を貯蔵している間および使用している間に見られる。大部分のタンパク質は、グルタミニル残基またはアスパラギニル残基の側鎖のアミド基が加水分解されて遊離のカルボン酸が形成されるプロセスである脱アミドを起こしやすい。他の分解経路は、2つ以上のタンパク質分子がアミド基転移および/またはジスルフィド相互作用によって互いに共有結合した高分子量の形質転換生成物の形成を伴い、これが共有結合した二量体、オリゴマーおよびポリマーの分解生成物の形成につながる(Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern.T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992)。酸化(例えば、メチオニン残基の)は、化学的分解の別のバリエーションとして言及することができる。タンパク質組成物の化学的安定性は、種々の環境条件に曝露させた後に(分解産物の形成は、多くの場合、例えば、温度の上昇によって加速され得る)、化学的分解産物の量を種々の時間ポイントで測定することによって評価することができる。個々の分解生成物の量は、多くの場合、種々のクロマトグラフィー技法(例えば、SEC-HPLCおよび/またはRP-HPLC)を用いて分解産物を分子サイズおよび/または電荷に応じて分離することによって決定される。

10

【0412】

したがって、上に概説されている通り、「安定化された組成物」は、物理的安定性が増加した組成物、化学的安定性が増加した組成物または物理的安定性および化学的安定性が増加した組成物を指す。一般に、組成物は、有効期限に達するまで、使用する間および貯蔵の間(推奨される使用条件および貯蔵条件に従って)、安定でなければならない。

20

【0413】

本発明の一実施形態では、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを含む医薬組成物は、6週間を超える使用の間および3年を超える貯蔵の間、安定である。

【0414】

本発明の別の実施形態では、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを含む医薬組成物は、4週間を超える使用の間および3年を超える貯蔵の間、安定である。

【0415】

本発明の別の実施形態では、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを含む医薬組成物は、4週間を超える使用の間および2年を超える貯蔵の間安定である。

【0416】

さらに別の実施形態では、本発明の式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを含む医薬組成物は、2週間を超える使用の間および2年を超える貯蔵の間安定である。

30

【0417】

本明細書において引用されている、刊行物、特許出願および特許を含めた全ての参考文献は、これにより、参照のそれぞれが、個々にかつ具体的に参照により組み込まれることが示され、本明細書においてその全体が記載されたのと同じ程度に参照により組み込まれる。

【0418】

全ての見出しおよび小見出しは、本明細書では単に便宜上使用されており、どのような形でも本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

40

【0419】

本明細書において特に指定がある場合、または文脈から明らかに矛盾する場合を除き、可能性のあるその変形の全てにおける上記の要素の任意の組み合わせが本発明に包含される。

【0420】

「a(1つの)」および「an(1つの)」および「the(その)」という用語および同様の指示対象は、本発明の記載において使用される場合、本明細書において特に指定がある場合、または文脈から明らかに矛盾する場合を除き、単数と複数の両方を包含する(すなわち、1つまたは複数)と解釈されるべきである。

【0421】

50

本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書において別段の指定のない限り、ただ単にその範囲内に入る別々の値のそれぞれについて個々に参照する簡潔な方法としての機能を果たすものとし、別々の値のそれぞれが、それが本明細書において個々に列挙されたかのように本明細書に組み込まれる。別段の指定のない限り、本明細書において提供される全ての正確な値は、対応するおおよその値を表す(例えば、特定の因子または測定値に関して提供される正確な例示的な値は全て、対応するおおよその測定値も提供すると考えることができ、適切な場合には「約」によって修飾される)。

【0422】

本明細書において特に指定のある場合、または文脈から明らかに矛盾する場合を除き、本明細書に記載の方法は全て、任意の適切な順番で実施することができる。

10

【0423】

任意のかつ全ての実施例の使用、または本明細書において提供される例示的な言葉(例えば、「例えばなど」)は、別段の指定のない限り、ただ単に本発明をより明らかにするもので、本発明の範囲に対する限定を提起するものではない。本明細書のどの言葉も、そう明記されていない限り、いかなる要素も本発明を実施するために必須であることを示すと解釈されるべきではない。

【0424】

本明細書への特許文書の引用および取り込みは、単に便宜上行われ、そのような特許文書の有効性、特許性および/または強制力のいずれの観点も反映しない。

【0425】

20

本発明を説明している非網羅的な実施形態の一覧が以下に提供される。

【0426】

実施形態の一覧

【0427】

実施形態1:

a) 単一Cys変異、

b) 追加的なジスルフィド架橋、または

c) 単一Cys変異および追加的なジスルフィド架橋、

を有する成長ホルモン化合物(GH)を含み、

アルブミン結合残基が親水性スペーサーを介して前記GHに連結している成長ホルモンコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩。

30

【0428】

2. GHが、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する、例えば、hGHに対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す、またはGHがhGH(配列番号1)である、実施形態1に記載のコンジュゲート。

【0429】

3. GHまたはGHコンジュゲートが、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも80%を有する、実施形態1に記載のコンジュゲート。

【0430】

40

4. アルブミン結合残基が、親水性スペーサーを介して単一cys変異を有するGHに連結している、実施形態1から3のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0431】

5. 単一cys変異が、GHのN末端、H1、H2、L2またはH3から選択される領域のいずれか1つの位置にある、実施形態4に記載のコンジュゲート。

【0432】

6. GHが、T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cのいずれか1つから選択される単一cys変異を有する、実施形態5に記載のコンジュゲート。

50

【 0 4 3 3 】

7. アルブミン結合残基が、親水性スパーサーを介して追加的なジスルフィド架橋を有するGHに連結している、実施形態1から3のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 3 4 】

8. 追加的なジスルフィド結合が、ループセグメントとヘリックスセグメントとの間またはループセグメントの内部またはループセグメント間またはヘリックスセグメント間にある、実施形態7のコンジュゲート。

【 0 4 3 5 】

9. GHが、システインの少なくとも1つがアミノ酸残基128～154(L3)などのループセグメントに存在する追加的なジスルフィド結合を含む、実施形態7から8のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

10

【 0 4 3 6 】

10. GHが、ループセグメントと、ヘリックスBまたはH2などのヘリックスセグメントをつなぐ追加的なジスルフィド結合を含む、実施形態7から9のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 3 7 】

11. 追加的なジスルフィド結合がL3とH2をつなぐ、実施形態7から10のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 3 8 】

12. 追加的なジスルフィド架橋が、hGH(配列番号1)のR16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148Cおよび/またはV185C/S188Cに対応する位置、例えば、Q84C/Y143Cなどにあるアミノ酸対の少なくとも1つの間にある、実施形態7から11のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

20

【 0 4 3 9 】

13. アルブミン結合残基が、親水性スパーサーを介して単一cys変異および追加的なジスルフィド架橋を有するGHに連結している、実施形態1から3のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

30

【 0 4 4 0 】

14. GHが、T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cのいずれか1つから選択される単一cys変異を有する、実施形態13に記載のコンジュゲート。

【 0 4 4 1 】

15. 追加的なジスルフィド結合が、ループセグメントとヘリックスセグメントとの間またはループセグメントの内部またはループセグメント間またはヘリックスセグメント間にある、実施形態13から14のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

40

【 0 4 4 2 】

16. GHが、システインの少なくとも1つがアミノ酸残基128～154(L3)などのループセグメントに存在する追加的なジスルフィド結合を含む、実施形態13から15のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 4 3 】

17. GHが、ループセグメントと、ヘリックスBまたはH2などのヘリックスセグメントをつなぐ追加的なジスルフィド結合を含む、実施形態13から16のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 4 4 】

18. 追加的なジスルフィド結合が、アミノ酸残基128～154(L3)などのループセグメント

50

と、ヘリックスBまたはH2をつなぐ、実施形態13から17のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 4 5 】

19. 追加的なジスルフィド架橋が、hGH(配列番号1)のR16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C および/またはV185C/S188Cに対応する位置、例えばQ84C/Y143Cなどにあるアミノ酸対の少なくとも1つの間にある、実施形態13から18のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

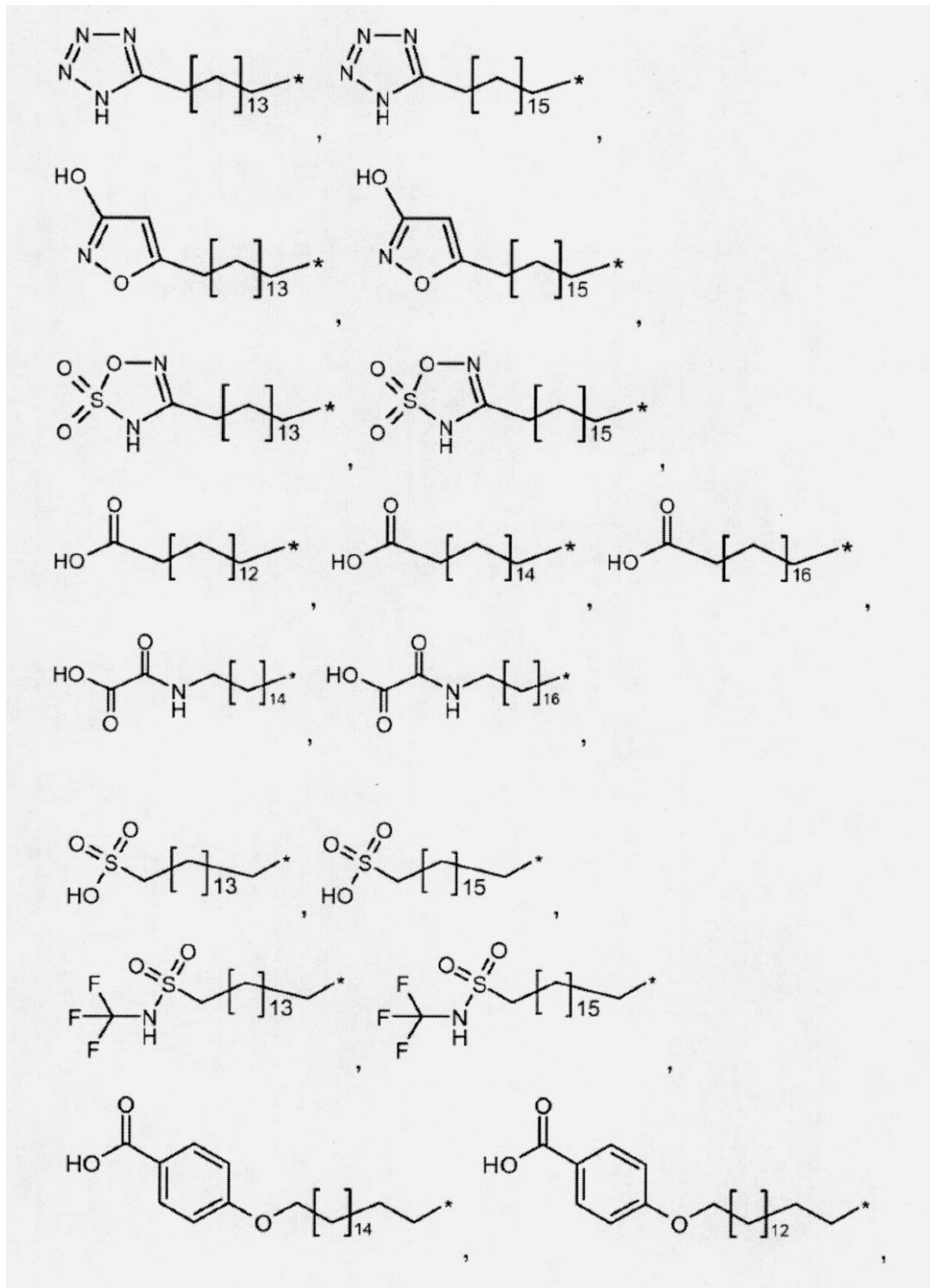
10

【 0 4 4 6 】

20. アルブミン結合残基が

【 0 4 4 7 】

【化 3 6】



10

20

30

40

【0 4 4 8】

(式中、*は、アルブミン結合残基と親水性スパーサーを連結する化学基を通じた親水性スパーサーへの付着を示す)

から選択される、実施形態1から19のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0 4 4 9】

21. アルブミン結合残基と親水性スパーサーを連結する化学基が、式

-W₇-Y-

(式中、

Yは(CH₂)₁₇-C₃~₁₀-シクロアルキル-W₈-または原子価結合であり、

17は0~6であり、

50

W₇は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s3は0または1であり、
W₈は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s4は0または1である)
を有する、実施形態1から20のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 5 0 】

22. 親水性スパーサーが式

-X₁-X₂-X₃-X₄-

10

(式中、

X₁は-W₁-[(CHR¹)₁₁-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)₁₂-W₃]_{m3}]_{n2}-であり、

X₂は-[(CHR³)₁₃-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)₁₄-W₅]_{m6}]_{n4}-であり、

X₃は-[(CHR⁵)₁₅-W₆]_{m7}-であり、

X₄はF-D1-(CH₂)₁₆-D2-であり、

11、12、13、14、15および16は、独立に、0~16から選択され、

m1、m3、m4、m6およびm7は、独立に、0~10から選択され、

m2およびm5は、独立に、0~25から選択され、

n1、n2、n3およびn4は、独立に、0~16から選択され、

Fはアリール、ヘタリール、ピロリジン-2,5-ジオンまたは原子価結合であり、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁~6-アルキルで置換されており、

20

R¹、R²、R³、R⁴およびR⁵は、独立に、水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁~6-アルキル、アリールまたはヘタリールから選択され;アルキル基、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CNまたは-OHで置換されており、

D1、D2、E1およびE2は、独立に、-O-、-N(R⁶)-、-N(C(O)R⁷)-または原子価結合から選択され;R⁶およびR⁷は、独立に、水素またはC₁~6-アルキルを示し、

W₁~W₅は、独立に、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s2は0または1であり、

30

W₆は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s1}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O)C₁~6-アルキル、-C(O)NHC₁~6-アルキルまたは原子価結合から選択され;s1は0または1であり、C₁~6-アルキル基は、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,5-ジオン、-NHC(O)CH*CH₂COOHまたは-NHC(O)CH₂CH*COOHで置換されており;(*)はCHの炭素原子からX₄への付着点を示す)

を有する、実施形態1から21のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 5 1 】

40

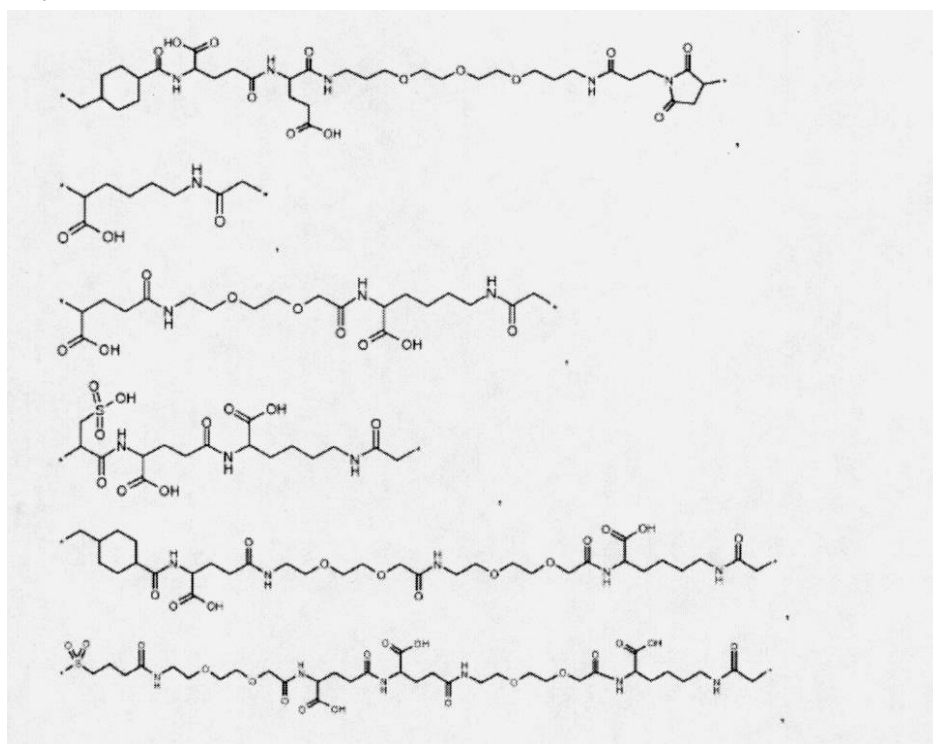
23. X₄が、原子価結合であり、W₆がピロリジン-2,5-ジオン、-NHC(O)CH*CH₂COOHまたは-NHC(O)CH₂CH*COOHのいずれかから選択され、(*)が、CHの炭素原子からGHへの付着点を示す、実施形態1から22のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 5 2 】

24. 親水性スパーサーが

【 0 4 5 3 】

【化 3 7】

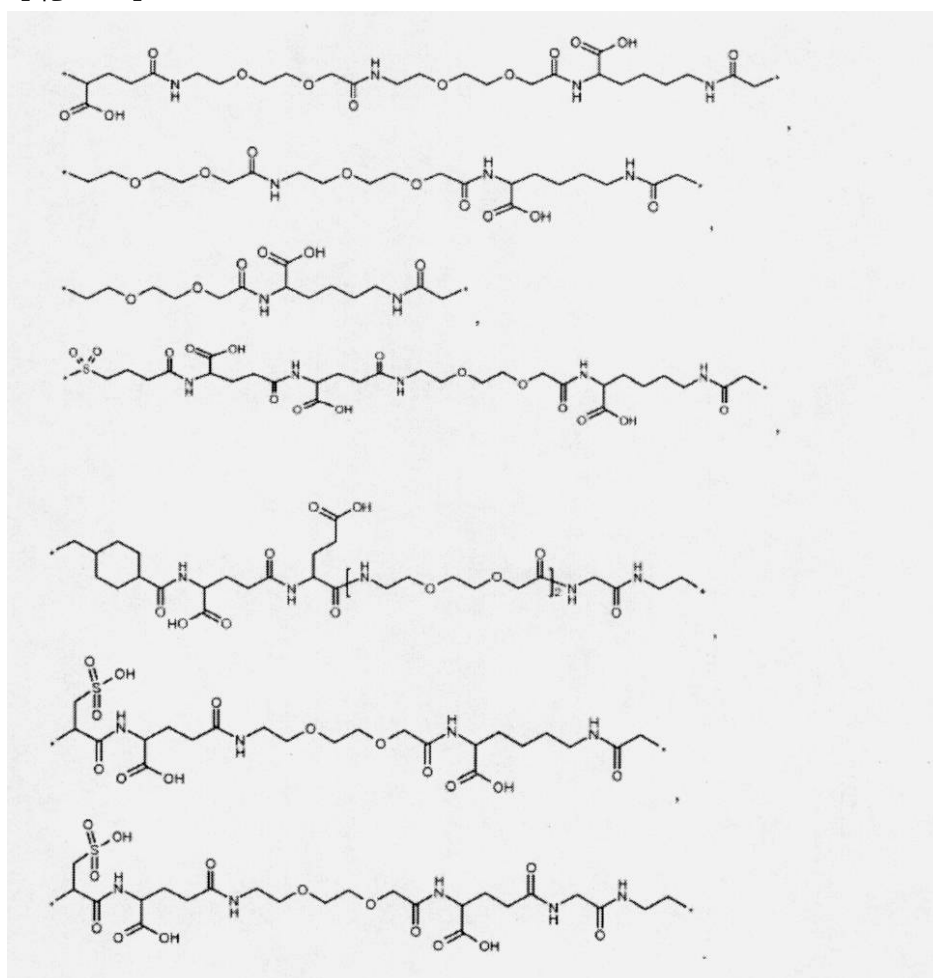


10

20

【 0 4 5 4】

【化 3 8】



30

40

【 0 4 5 5】

50

から選択される、実施形態22に記載のコンジュゲート。

【0456】

25. 式(1):

A-W-B-GH (1)

(式中、

GHは単一Cys変異を有する成長ホルモン化合物を表し、

BはCysへの変異の硫黄残基に連結した親水性スペーサーを表し、

Wは、AとBを連結する化学基であり、

Aはアルブミン結合残基を表す)

を有する成長ホルモンコンジュゲート、およびその薬学的に許容される塩。

10

【0457】

26. GHが、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する、例えば、hGHに対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す、またはGHがhGH(配列番号1)である、実施形態25に記載のコンジュゲート。

【0458】

27. GHまたはGHコンジュゲートが、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも80%を有する、実施形態25に記載のコンジュゲート。

【0459】

28. 単一Cys変異が、GHのN末端、H1、H2、L2またはH3から選択される領域のいずれか1つの位置にある、実施形態25から27のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

20

【0460】

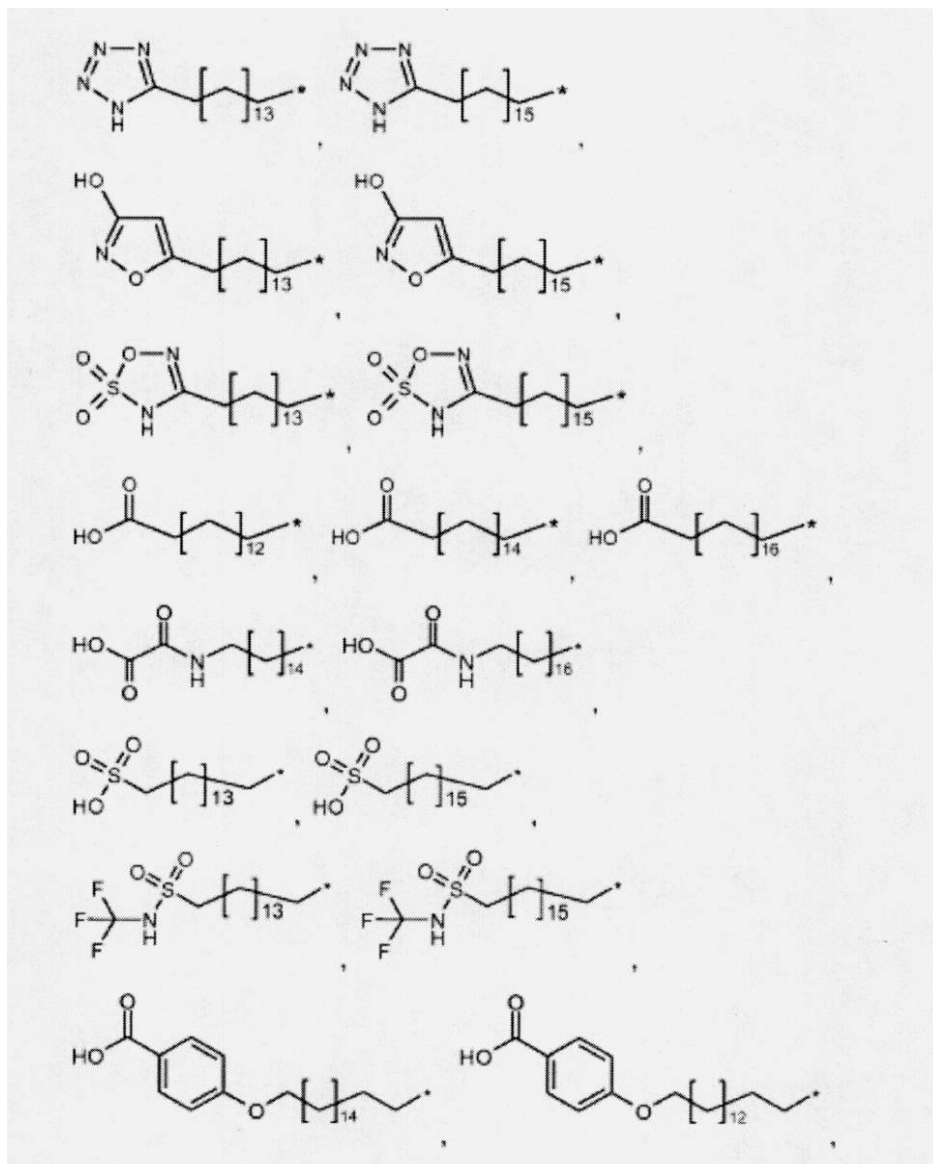
29. GHが、T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cのいずれか1つから選択される単一Cys変異を有する、実施形態25から28のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0461】

30. Aが、

【0462】

【化 3 9】



【 0 4 6 3 】

(式中、*は、Wを通じたBへの付着を示す)

から選択される、実施形態25から29のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 6 4 】

31.Wが、式

-W₇-Y-

(式中、

Yは(CH₂)₁₇-C₃~₁₀-シクロアルキル-W₈-または原子価結合であり、

17は0~6であり、

W₇は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s3は0または1であり、

W₈は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s4は0または1である)

を有する、実施形態25から30のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 6 5 】

32.Bが式

-X₁-X₂-X₃-X₄-

10

20

30

40

50

(式中、

X_1 は $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}$ - であり、

X_2 は $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}$ - であり、

X_3 は $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}$ - であり、

X_4 は $F-D1-(CH_2)_{16}-D2$ - であり、

11 、 12 、 13 、 14 、 15 および 16 は、独立に、 $0 \sim 16$ から選択され、

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ は、独立に、 $0 \sim 10$ から選択され、

$m2$ および $m5$ は、独立に、 $0 \sim 25$ から選択され、

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ は、独立に、 $0 \sim 16$ から選択され、

F はアリール、ヘタリール、ピロリジン-2,5-ジオンまたは原子価結合であり、アリール基
およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2O$
 H または $C_{1 \sim 6}$ -アルキルで置換されており、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 は、独立に、水素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH$
 $-C(=NH)-NH_2$ 、 $C_{1 \sim 6}$ -アルキル、アリールまたはヘタリールから選択され；アルキル基、ア
リール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、
 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ または $-OH$ で置換されており、

$D1$ 、 $D2$ 、 $E1$ および $E2$ は、独立に、 $-O-$ 、 $-N(R^6)-$ 、 $-N(C(O)R^7)-$ または原子価結合から選択
され； R^6 および R^7 は、独立に、水素または $C_{1 \sim 6}$ -アルキルを示し、

$W_1 \sim W_5$ は、独立に、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-$
 $S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)$
 $-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、または原子価結合から選択され； $s2$ は 0 また
は 1 であり、

W_6 は、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$
、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s1}$
、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-NHC(O)C_{1 \sim 6}$ -アルキル、 $-C(O)NHC_{1 \sim 6}$ -アルキルまたは
原子価結合から選択され； $s1$ は 0 または 1 であり、 $C_{1 \sim 6}$ -アルキル基は、場合によって、オ
キソ、ピロリジン-2,5-ジオン、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ または $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ で置換され
ており；(*) は CH の炭素原子から X_4 への付着点を示す)

を有する、実施形態25から31のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0466】

33. 11 、 12 、 13 、 14 、 15 および 16 が、独立に、 $0 \sim 6$ であり、

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ が、独立に、 $0 \sim 6$ であり、

$m2$ および $m5$ が、独立に、 $0 \sim 10$ であり、

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ が、独立に、 $0 \sim 10$ である、実施形態25から32のいずれか1つに記載の
コンジュゲート。

【0467】

34. $D1$ および $D2$ が、独立に、 $-O-$ または $-N(R^6)-$ または原子価結合から選択される、実施
形態25から33のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0468】

35. $E1$ および $E2$ が、独立に、 $-O-$ または $-N(R^6)-$ または原子価結合から選択される、実施
形態25から34のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0469】

36. W_1 から W_8 までが、独立に、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $S(O)$
 $_2NHC(O)-$ 、 $-NHC(O)C_{1 \sim 6}$ -アルキル、 $-C(O)NHC_{1 \sim 6}$ -アルキルまたは原子価結合からなる
群から選択され；アルキル基が、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,5-ジオン、 $-NHC(O)$
 CH^*CH_2COOH または $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ で置換されており；(*) は、 CH の炭素原子から X_4 への
付着点を示す、実施形態25から35のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0470】

37. R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 が、独立に、水素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ または $C_{1 \sim 6}$ -
アルキルから選択され；アルキル基が、場合によって、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ または $-S(O)$

10

20

30

40

50

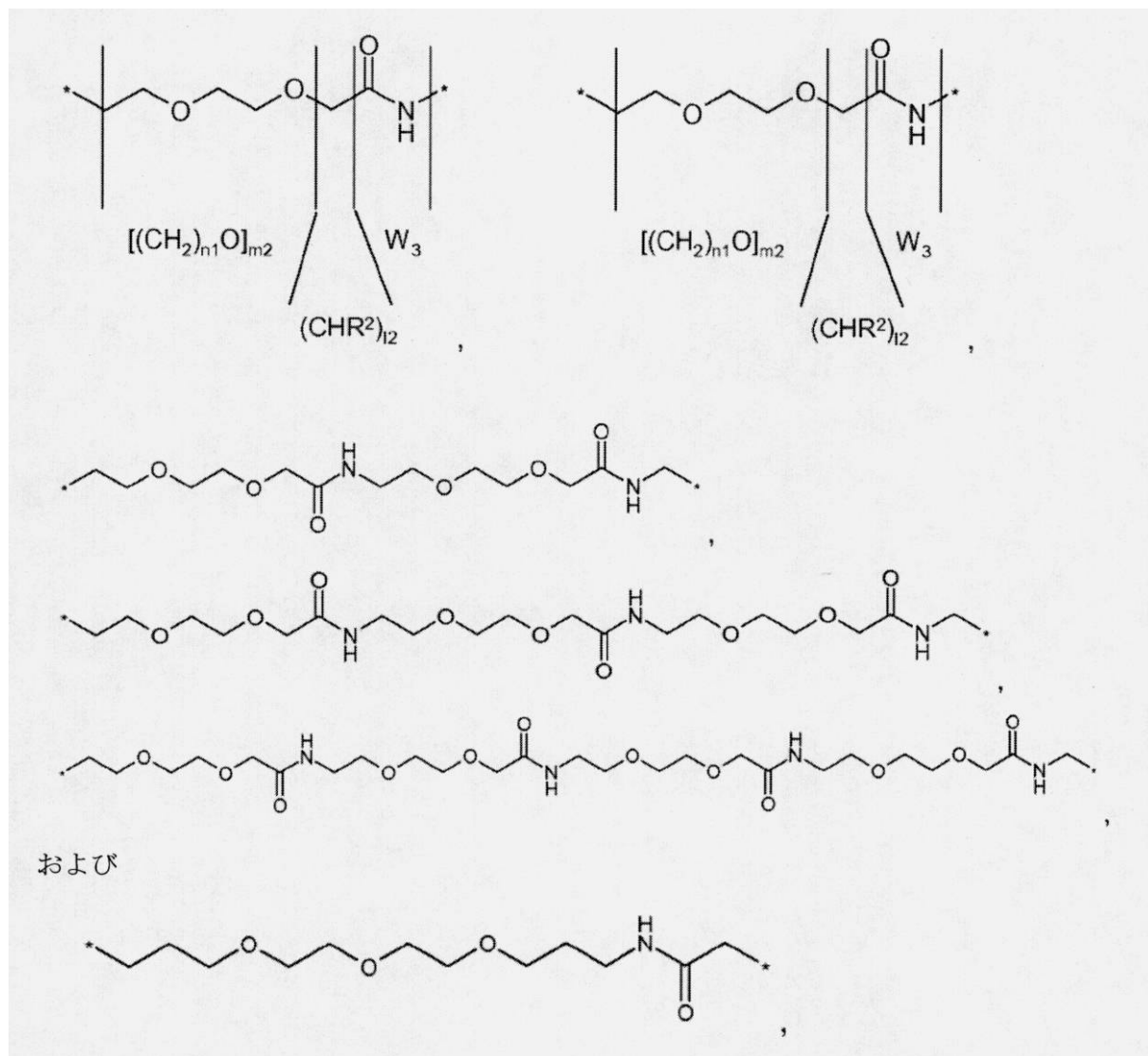
)₂OHで置換されている、実施形態25から36のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0471】

38.E1およびE2が-O-である- $\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_2-W_3]_{m3}\}_{n2}$ -および- $\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}$ -が、

【0472】

【化40】



【0473】

(式中、*は、付着点、すなわち開結合を示す)

から選択される、実施形態25から37のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0474】

39. X_4 が、原子価結合であり、 W_6 がピロリジン-2,5-ジオン、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ または $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ のいずれかから選択され、(*)が、CHの炭素原子からGHへの付着点を示す、実施形態25から38のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0475】

40.Bが

【0476】

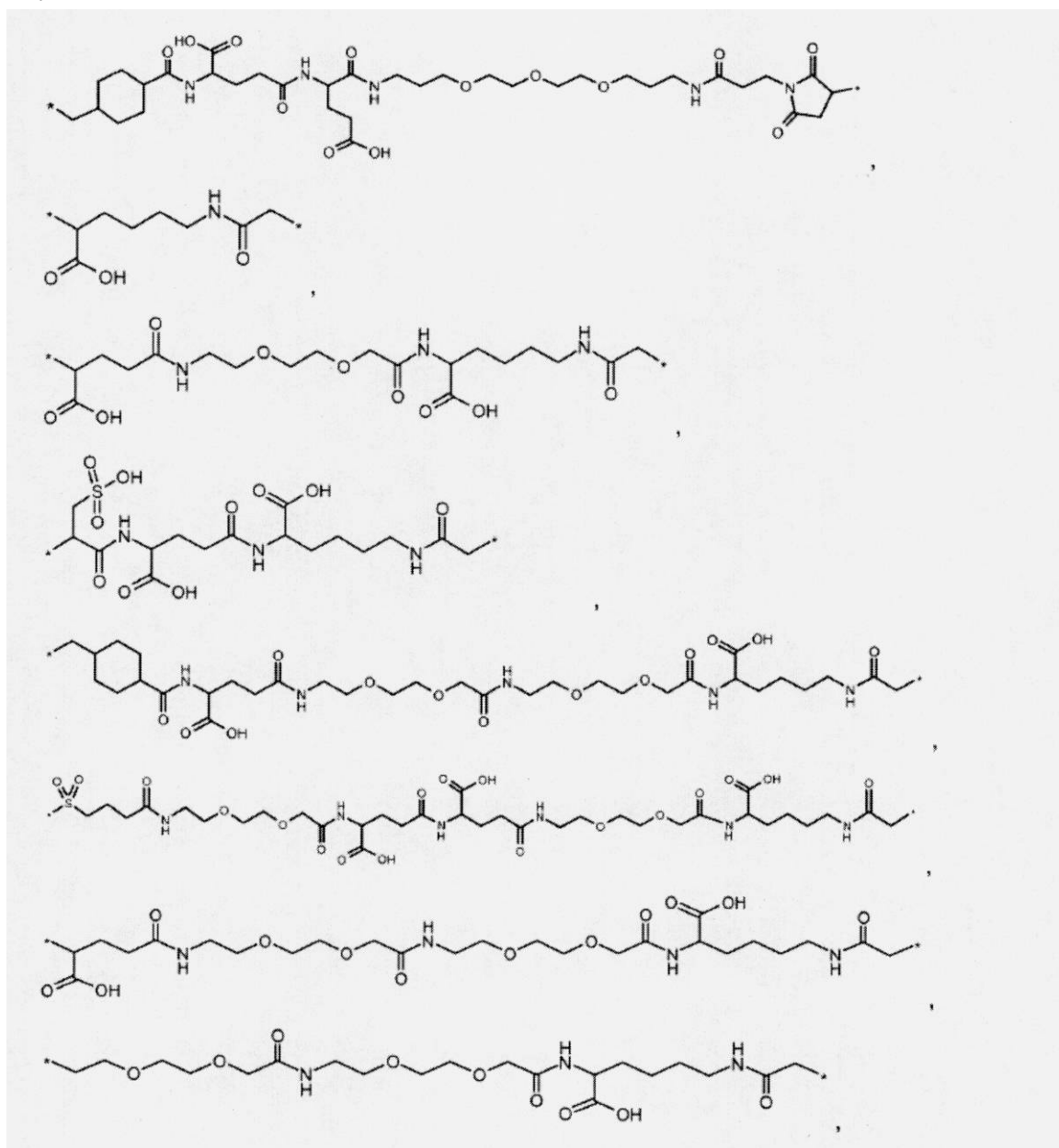
10

20

30

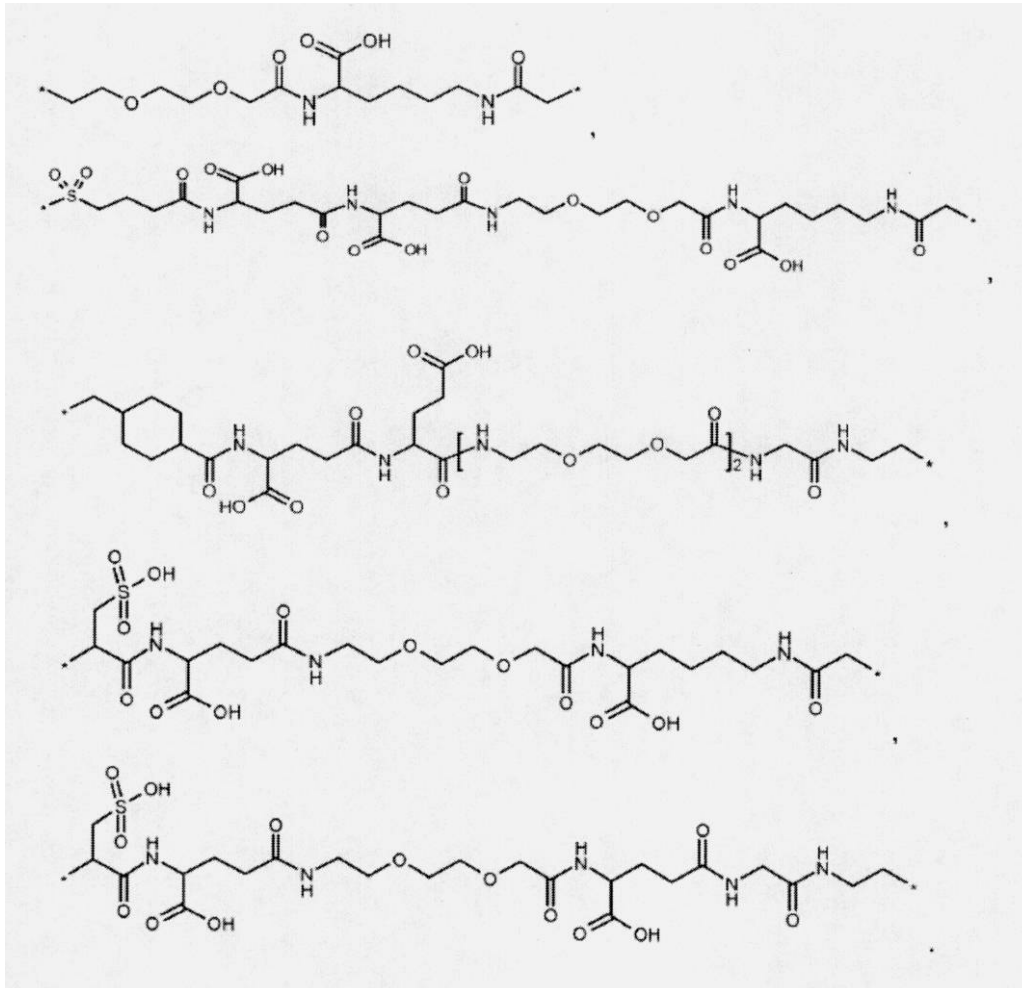
40

【化 4 1】



【 0 4 7 7 】

【化 4 2】



10

20

【 0 4 7 8 】

から選択される、実施形態25から39のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

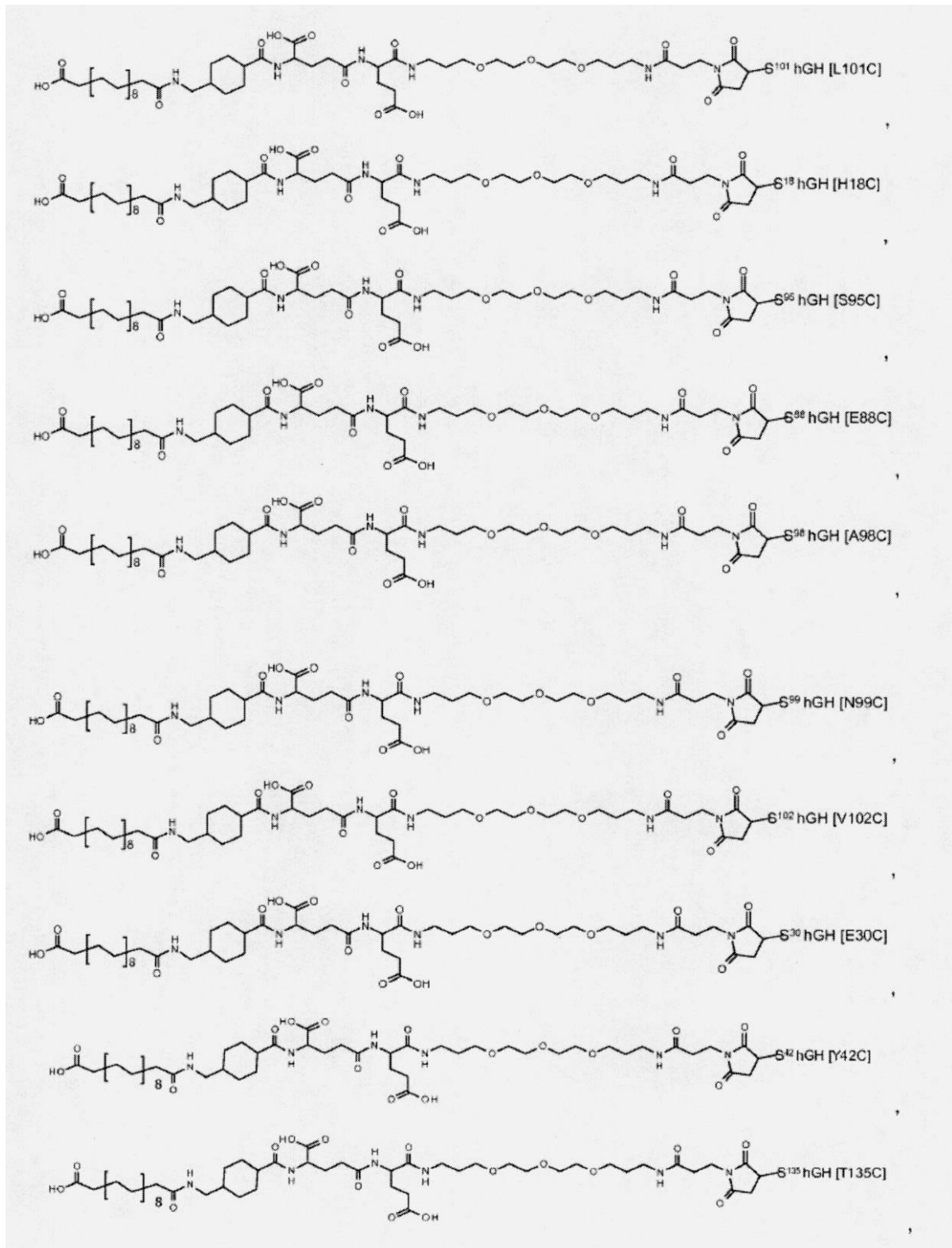
【 0 4 7 9 】

41. 前記化合物が

【 0 4 8 0 】

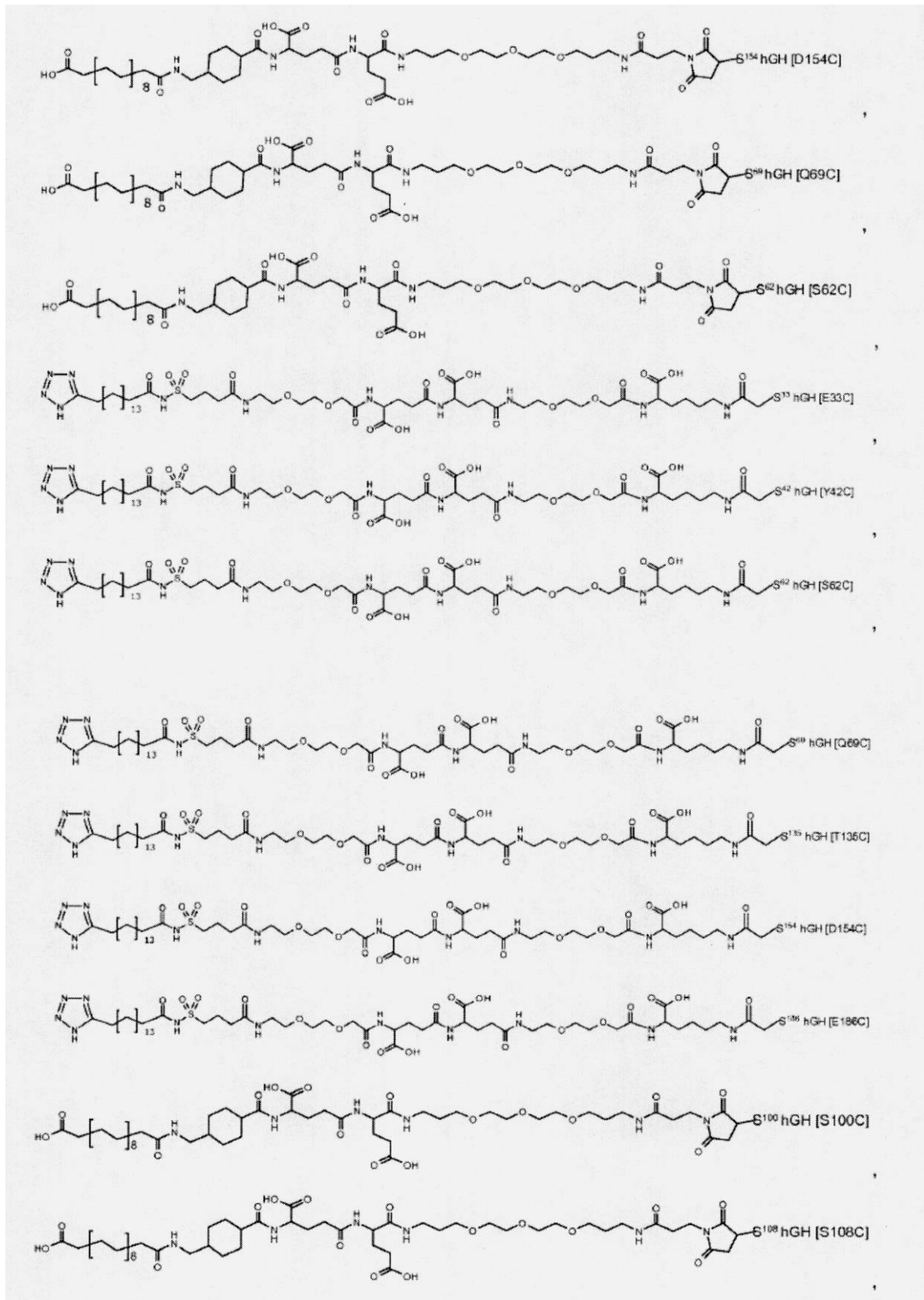
30

【化 4 3】



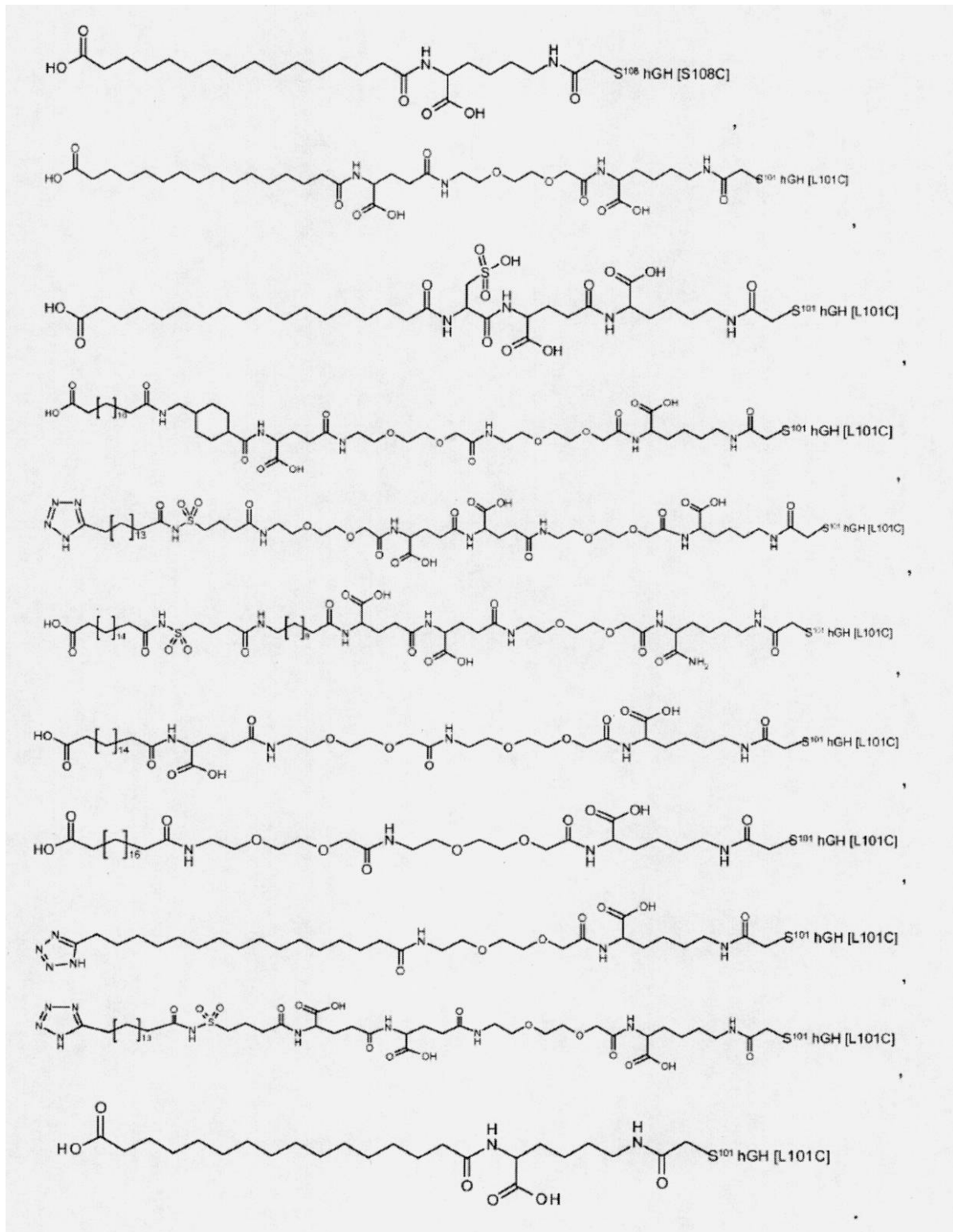
【 0 4 8 1 】

【化 4 4】



【 0 4 8 2 】

【化45】



【0483】

から選択される、実施形態25から40のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0484】

42. 以下の式(I):

A-W-B-GH (I)

(式中、

GHは追加的なジスルフィド架橋を有する成長ホルモン化合物を表し、

Bは親水性スペーサーを表し、

Wは、AとBを連結する化学基であり、

10

20

30

40

50

Aはアルブミン結合残基を表す)

を有する成長ホルモンコンジュゲート、およびその薬学的に許容される塩。

【0485】

43. GHが、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する、例えば、hGHに対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す、またはGHがhGH(配列番号1)である、実施形態42に記載のコンジュゲート。

【0486】

44. GHまたはGHコンジュゲートが、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも80%を有する、実施形態42に記載のコンジュゲート。

10

【0487】

45. 活性をin vitro BAFアッセイ(アッセイI)において測定する、実施形態44に記載のコンジュゲート。

【0488】

46. GHが、ループセグメントとヘリックスセグメントとの間またはループセグメントの内部またはループセグメント間またはヘリックスセグメント間に追加的なジスルフィド結合を含む、実施形態42から45のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0489】

47. GHが、システインの少なくとも1つがアミノ酸残基128~154(L3)などのループセグメントに存在する追加的なジスルフィド結合を含む、実施形態42から46のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

20

【0490】

48. GHが、ループセグメントと、ヘリックスBまたはヘリックス2などのヘリックスセグメントをつなぐ追加的なジスルフィド結合を含む、実施形態42から47のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0491】

49. GHが、L3(128~154)と、ヘリックスBまたはヘリックス2をつなぐ追加的なジスルフィド結合を含む、実施形態42から48のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0492】

50. 追加的なジスルフィド架橋が、hGH(配列番号1)のR16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C および/またはV185C/S188Cに対応する位置、例えば、Q84C/Y143Cなどにあるアミノ酸の対の少なくとも1つの間にある、実施形態42から49のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

30

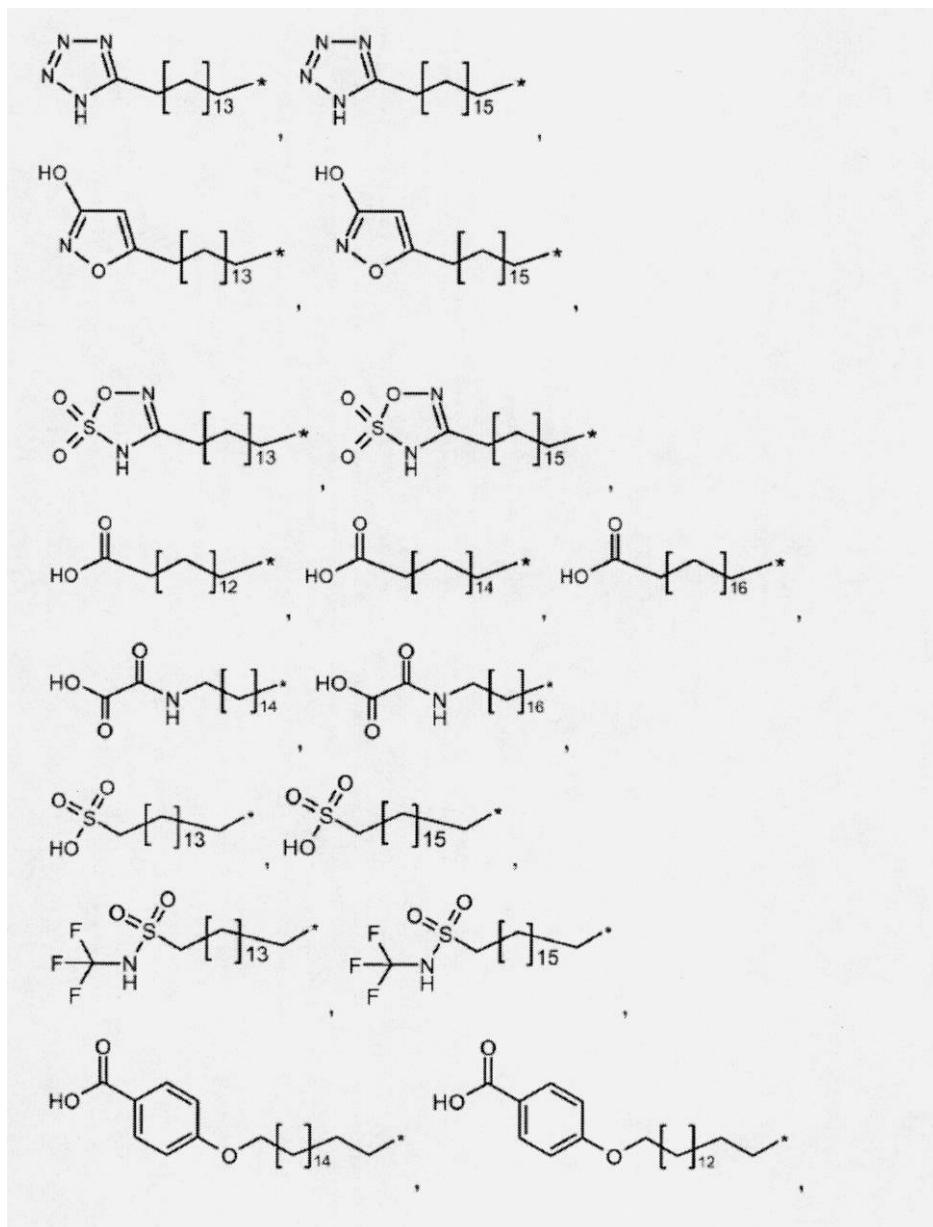
【0493】

51. Aが、

【0494】

40

【化 4 6】



10

20

30

【 0 4 9 5】

(式中、*は、Wを通じたBへの付着を示す)

から選択される、実施形態42から50のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 9 6】

52.Wが、式

-W₇-Y-

(式中、

Yは(CH₂)₁₇-C₃₋₁₀-シクロアルキル-W₈-または原子価結合であり、

17は0~6であり、

W₇は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s3は0または1であり、

W₈は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s4は0または1である)

を有する、実施形態42から51のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 4 9 7】

40

50

53.Bが式

$-X_1-X_2-X_3-X_4-$

(式中、

X_1 は $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ であり、

X_2 は $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ であり、

X_3 は $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ であり、

X_4 は $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ であり、

11 、 12 、 13 、 14 、 15 および 16 は、独立に、 $0 \sim 16$ から選択され、

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ は、独立に、 $0 \sim 10$ から選択され、

$m2$ および $m5$ は、独立に、 $0 \sim 25$ から選択され、

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ は、独立に、 $0 \sim 16$ から選択され、

F はアリール、ヘタリール、ピロリジン-2,5-ジオンまたは原子価結合であり、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ または $C_1 \sim 6$ -アルキルで置換されており、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 は、独立に、水素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 $C_1 \sim 6$ -アルキル、アリールまたはヘタリールから選択され；アルキル基、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ または $-OH$ で置換されており、

$D1$ 、 $D2$ 、 $E1$ および $E2$ は、独立に、 $-O-$ 、 $-N(R^6)-$ 、 $-N(C(O)R^7)-$ または原子価結合から選択され； R^6 および R^7 は、独立に、水素または $C_1 \sim 6$ -アルキルを示し、

$W_1 \sim W_5$ は、独立に、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、または原子価結合から選択され； $s2$ は0または1であり、

W_6 は、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s1}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-NHC(O)C_1 \sim 6$ -アルキル、 $-C(O)NHC_1 \sim 6$ -アルキルまたは原子価結合から選択され； $s1$ は0または1であり、 $C_1 \sim 6$ -アルキル基は、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,5-ジオン、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ または $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ で置換されており；(*)はCHの炭素原子から X_4 への付着点を示す)

を有する、実施形態42から52のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0498】

54. 11 、 12 、 13 、 14 、 15 および 16 が、独立に、 $0 \sim 6$ であり、

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ が、独立に、 $0 \sim 6$ であり、

$m2$ および $m5$ が、独立に、 $0 \sim 10$ であり、

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ が、独立に、 $0 \sim 10$ である、実施形態42から53のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0499】

55. $D1$ および $D2$ が、独立に、 $-O-$ または $-N(R^6)-$ または原子価結合から選択される、実施形態42から54のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0500】

56. $E1$ および $E2$ が、独立に、 $-O-$ または $-N(R^6)-$ または原子価結合から選択される、実施形態42から55のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0501】

57. W_1 から W_8 までが、独立に、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-NHC(O)C_1 \sim 6$ -アルキルまたは $-C(O)NHC_1 \sim 6$ -アルキルまたは原子価結合からなる群から選択され；アルキル基が、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,5-ジオン、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ または $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ で置換されており；(*)は、CHの炭素原子から X_4 への付着点を示す、実施形態42から56のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0502】

10

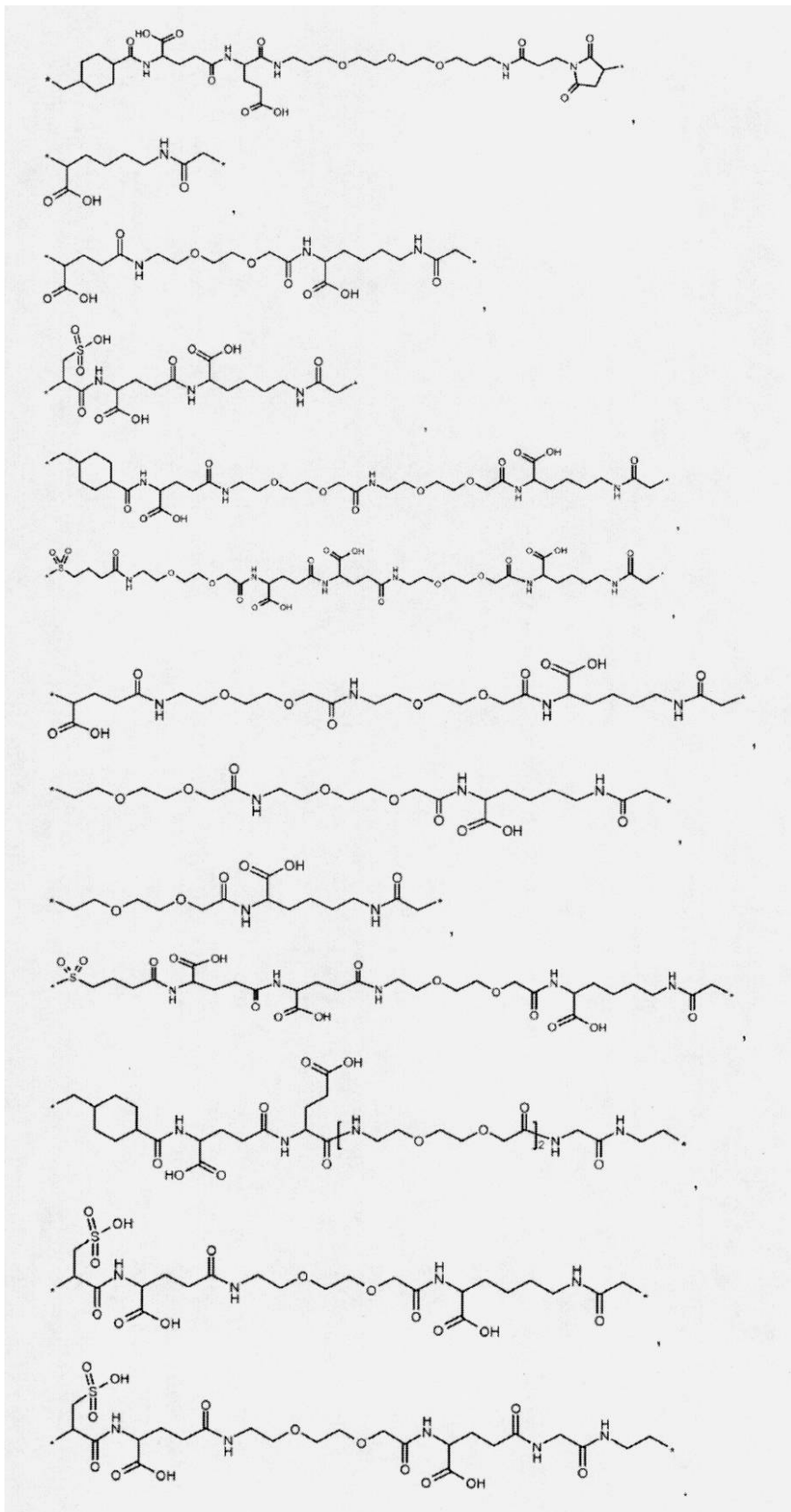
20

30

40

50

【化48】



【0508】

から選択される、実施形態42から59のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0509】

61.Aが、Bを介してhGH配列番号1の40位または141位に対応する位置、または成長ホルモン化合物のN末端残基のグルタミン残基に付着している、実施形態42から60のいずれか1つ

10

20

30

40

50

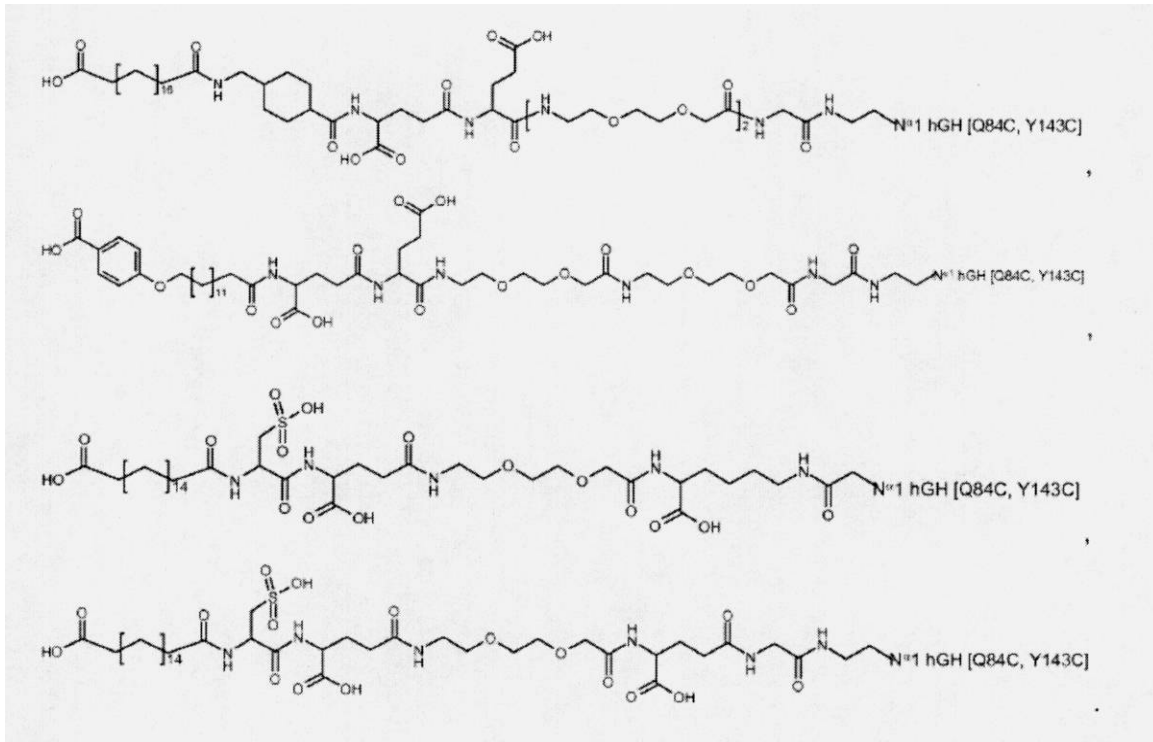
に記載のコンジュゲート。

【 0 5 1 0 】

62. 前記化合物が式

【 0 5 1 1 】

【 化 4 9 】



【 0 5 1 2 】

から選択される、実施形態42から61のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 5 1 3 】

63. 以下の式(I):

A-W-B-GH (I)

(式中、

GHは単一Cys変異および追加的なジスルフィド架橋を有する成長ホルモン化合物を表し、

BはCysへの変異の硫黄残基に連結した親水性スパーサーを表し、

Wは、AとBを連結する化学基であり、

Aはアルブミン結合残基を表す)

を有する成長ホルモンコンジュゲート、およびその薬学的に許容される塩。

【 0 5 1 4 】

64. GHが、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有する、例えば、hGHに対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す、またはGHがhGH(配列番号1)である、実施形態63に記載のコンジュゲート。

【 0 5 1 5 】

65. GHまたはGHコンジュゲートが、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも80%を有する、実施形態64に記載のコンジュゲート。

【 0 5 1 6 】

66. 単一Cys変異が、GHのN末端、H1、H2、L2またはH3から選択される領域のいずれか1つの位置にある、実施形態63から65のいずれかに記載のコンジュゲート。

【 0 5 1 7 】

67. GHが、T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98

10

20

30

40

50

C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187CおよびG190Cのいずれか1つ、例えば、;T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122CおよびG126Cのいずれか1つなどから選択される単一cys変異を有する、実施形態63から66のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0518】

68. 追加的なジスルフィド結合が、ループセグメントとヘリックスセグメントとの間またはループセグメントの内部またはループセグメント間またはヘリックスセグメント間にある、実施形態63から67のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

10

【0519】

69. GHが、システインの少なくとも1つがアミノ酸残基128~154(L3)などのループセグメントに存在する追加的なジスルフィド結合を含む、実施形態63から68のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0520】

70. 追加的なジスルフィド結合が、ループセグメントと、H2などのヘリックスセグメントをつなぐ、実施形態63から69のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0521】

71. 追加的なジスルフィド結合がL3とヘリックスH2をつなぐ、実施形態63から70のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

20

【0522】

72. 追加的なジスルフィド架橋が、hGH(配列番号1)のR16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148Cおよび/またはV185C/S188Cに対応する位置、例えば、Q84C/Y143Cなどにあるアミノ酸の対の少なくとも1つの間にある、実施形態63から71のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

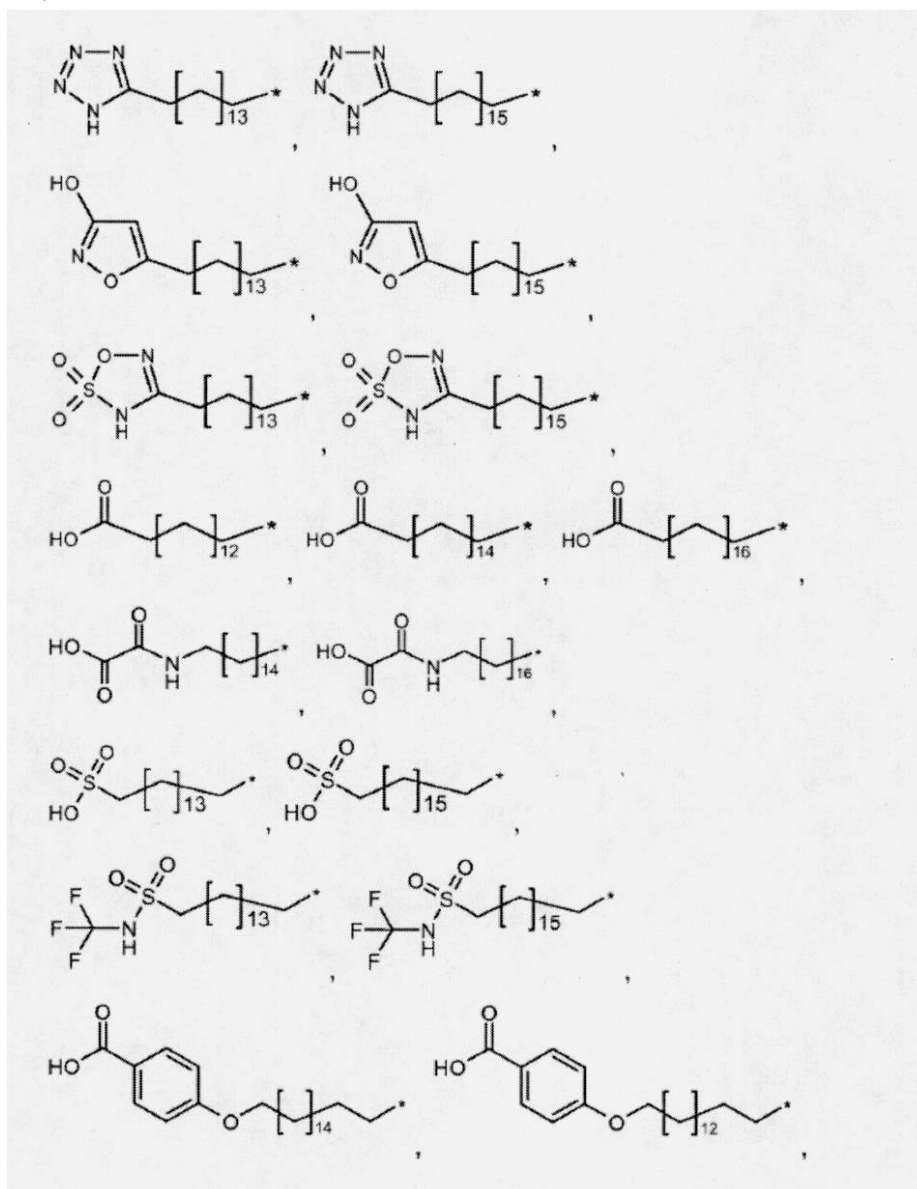
【0523】

73. Aが、

30

【0524】

【化50】



10

20

30

【0525】

(式中、*は、Wを通じたBへの付着を示す)

から選択される、実施形態63から72のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0526】

74.Wが、式

-W₇-Y-

(式中、

Yは(CH₂)₁₇-C₃₋₁₀-シクロアルキル-W₈-または原子価結合であり、
17は0~6であり、

W₇は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、
-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s3}-
、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s3は0または1であり、
W₈は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、
-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s4}-
、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され;s4は0または1である)

を有する、実施形態63から73のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0527】

75.Bが式

40

50

$-X_1-X_2-X_3-X_4-$

(式中、

X_1 は $-W_1-[(CHR^1)_{11}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{12}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ であり、

X_2 は $-[(CHR^3)_{13}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{14}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ であり、

X_3 は $-[(CHR^5)_{15}-W_6]_{m7}-$ であり、

X_4 は $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ であり、

11 、 12 、 13 、 14 、 15 および 16 は、独立に、 $0 \sim 16$ から選択され、

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ は、独立に、 $0 \sim 10$ から選択され、

$m2$ および $m5$ は、独立に、 $0 \sim 25$ から選択され、

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ は、独立に、 $0 \sim 16$ から選択され、

F はアリール、ヘタリール、ピロリジン-2,5-ジオンまたは原子価結合であり、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ または $C_1 \sim 6$ -アルキルで置換されており、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 は、独立に、水素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 $C_1 \sim 6$ -アルキル、アリールまたはヘタリールから選択され；アルキル基、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ または $-OH$ で置換されており、

$D1$ 、 $D2$ 、 $E1$ および $E2$ は、独立に、 $-O-$ 、 $-N(R^6)-$ 、 $-N(C(O)R^7)-$ または原子価結合から選択され； R^6 および R^7 は、独立に、水素または $C_1 \sim 6$ -アルキルを示し、

$W_1 \sim W_5$ は、独立に、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、または原子価結合から選択され； $s2$ は 0 または 1 であり、

W_6 は、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s1}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-NHC(O)C_1 \sim 6$ -アルキル、 $-C(O)NHC_1 \sim 6$ -アルキルまたは原子価結合から選択され； $s1$ は 0 または 1 であり、 $C_1 \sim 6$ -アルキル基は、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,5-ジオン、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ または $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ で置換されており；(*) は CH の炭素原子から X_4 への付着点を示す)

を有する、実施形態63から74のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0528】

76. 11 、 12 、 13 、 14 、 15 および 16 が、独立に、 $0 \sim 6$ であり、

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ が、独立に、 $0 \sim 6$ であり、

$m2$ および $m5$ が、独立に、 $0 \sim 10$ であり、

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ が、独立に、 $0 \sim 10$ である、実施形態63から75のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0529】

77. $D1$ および $D2$ が、独立に、 $-O-$ または $-N(R^6)-$ または原子価結合から選択される、実施形態63から75のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0530】

78. $E1$ および $E2$ が、独立に、 $-O-$ または $-N(R^6)-$ または原子価結合から選択される、実施形態63から77のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0531】

79. W_1 から W_8 までが、独立に、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-NHC(O)C_1 \sim 6$ -アルキル、または $-C(O)NHC_1 \sim 6$ -アルキルまたは原子価結合からなる群から選択され；アルキル基が、場合によって、オキソ、ピロリジン-2,5-ジオン、 $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ または $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$ で置換されており；(*) は、 CH の炭素原子から X_4 への付着点を示す、実施形態63から78のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0532】

80. R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 が、独立に、水素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ または C_1

10

20

30

40

50

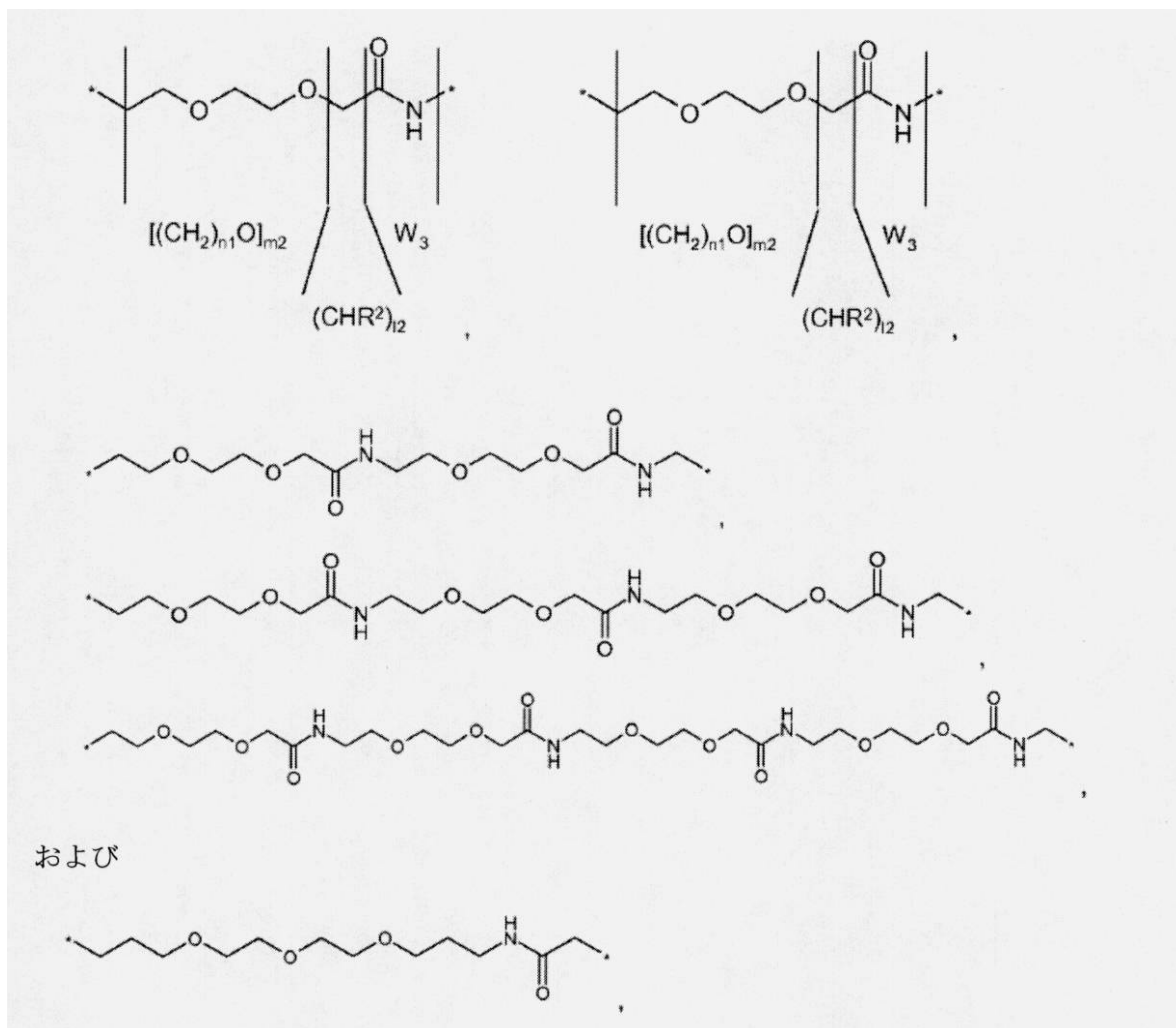
-₆-アルキルから選択され;アルキル基が、場合によって、-C(O)OH、-C(O)NH₂または-S(O)₂OHで置換されている、実施形態63から79のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0533】

81.E1およびE2が-O-である- $\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}$ -および- $\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{l4}-W_5]_{m6}\}_{n4}$ -が、

【0534】

【化51】



【0535】

(式中、*は、付着点、すなわち開結合を示す)

から選択される、実施形態63から80のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0536】

82.X₄が、原子価結合であり、W₆がピロリジン-2,5-ジオン、-NHC(O)CH*CH₂COOHまたは-NHC(O)CH₂CH*COOHのいずれかから選択され、(*)が、CHの炭素原子からGHへの付着点を示す、実施形態63から81のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0537】

83.Bが

【0538】

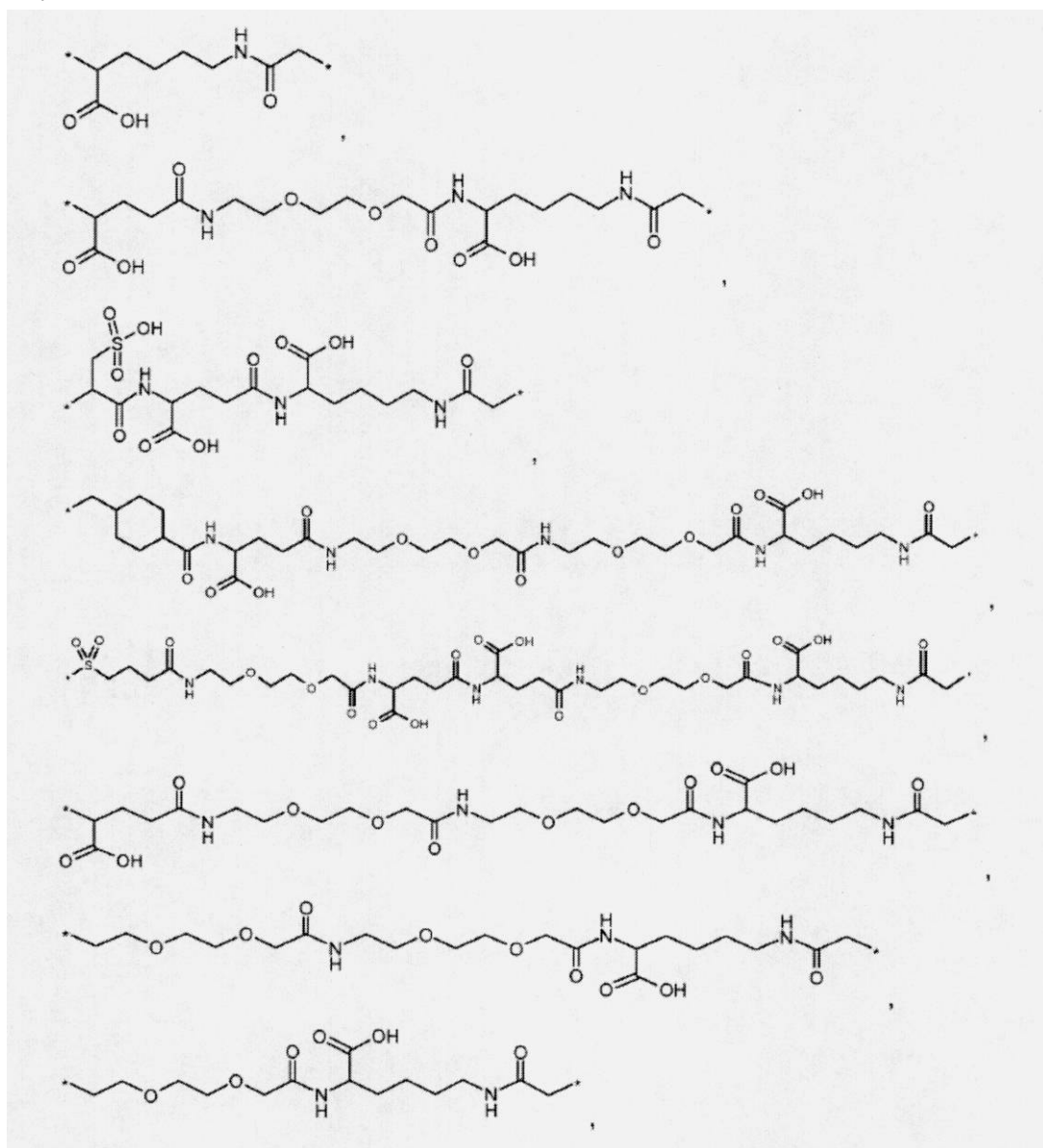
10

20

30

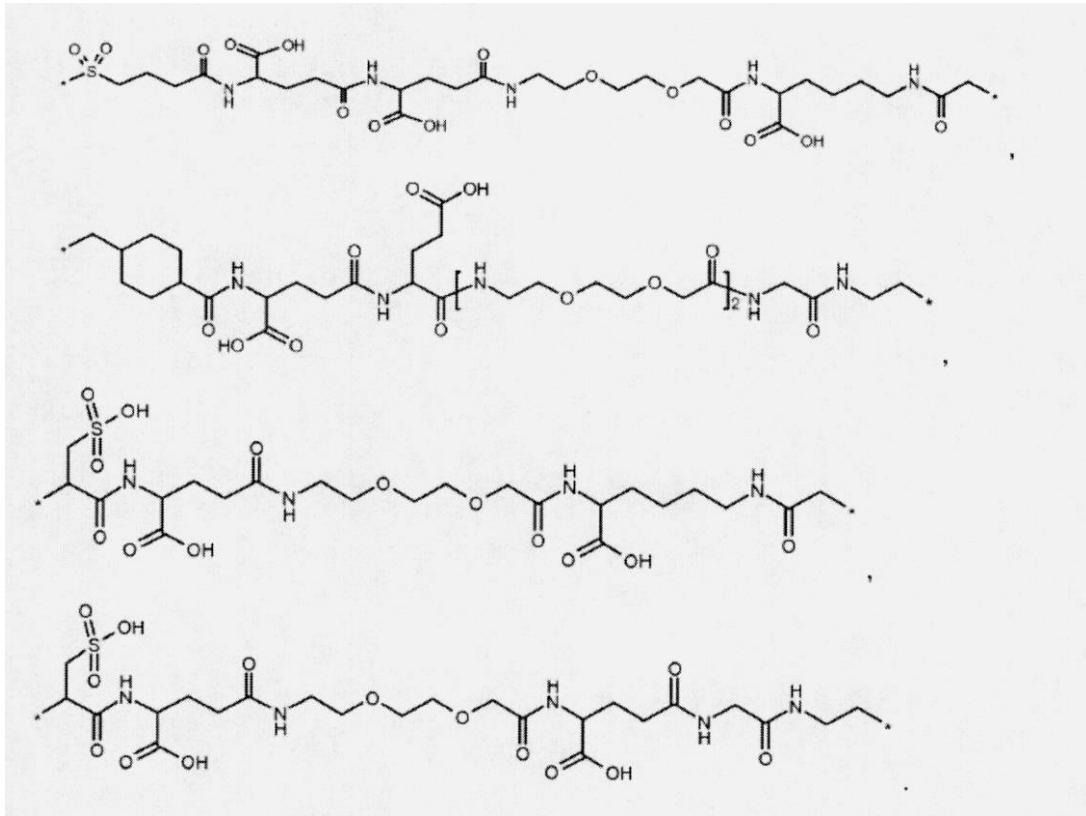
40

【化 5 2】



【 0 5 3 9 】

【化 5 3】



10

20

【 0 5 4 0】

から選択される、実施形態63から82のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【 0 5 4 1】

84. 1つのアルブミン結合残基(A)が、親水性スペーサー(B)を介して前記GHに連結している、実施形態1から83のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

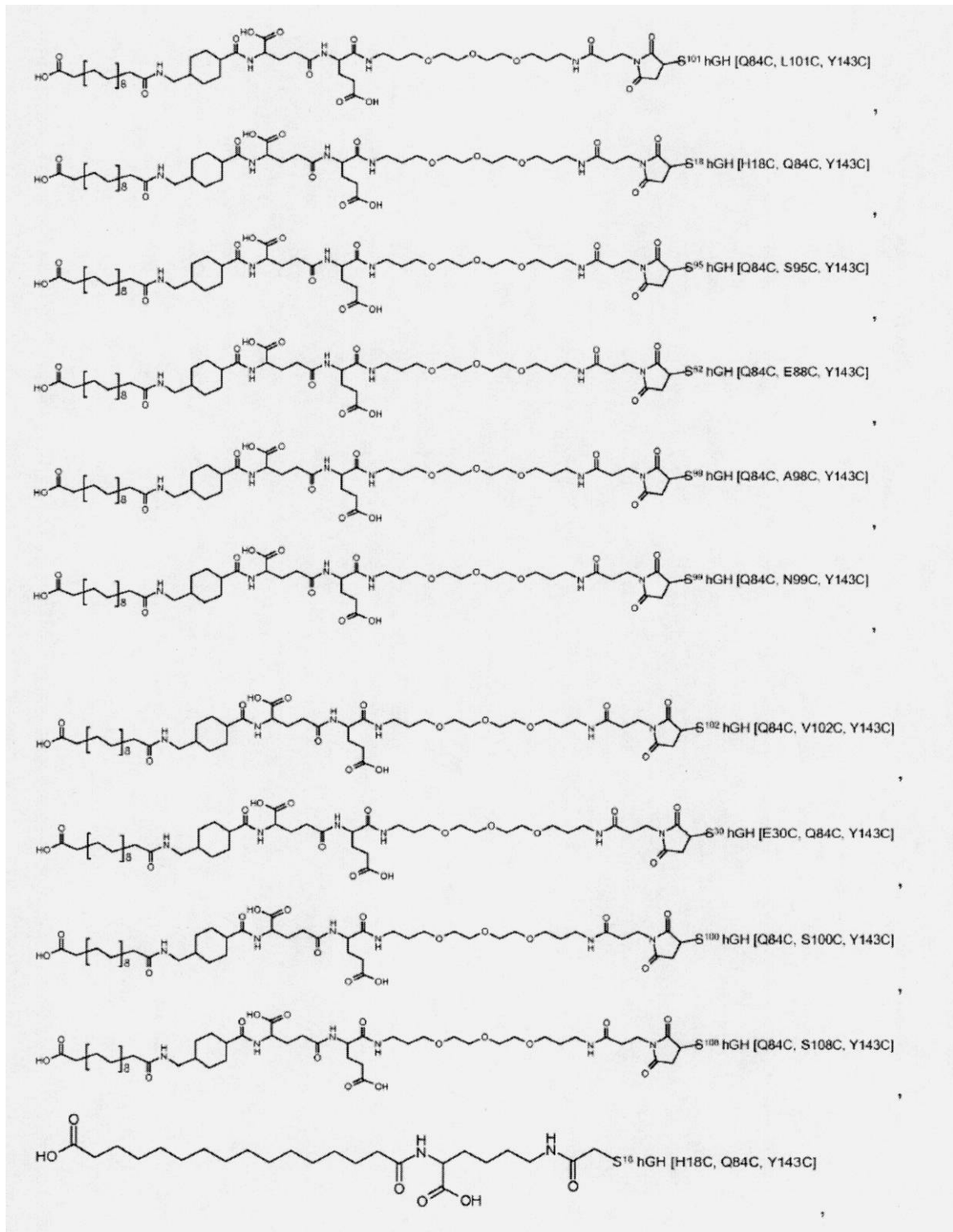
【 0 5 4 2】

85. 前記化合物が、

30

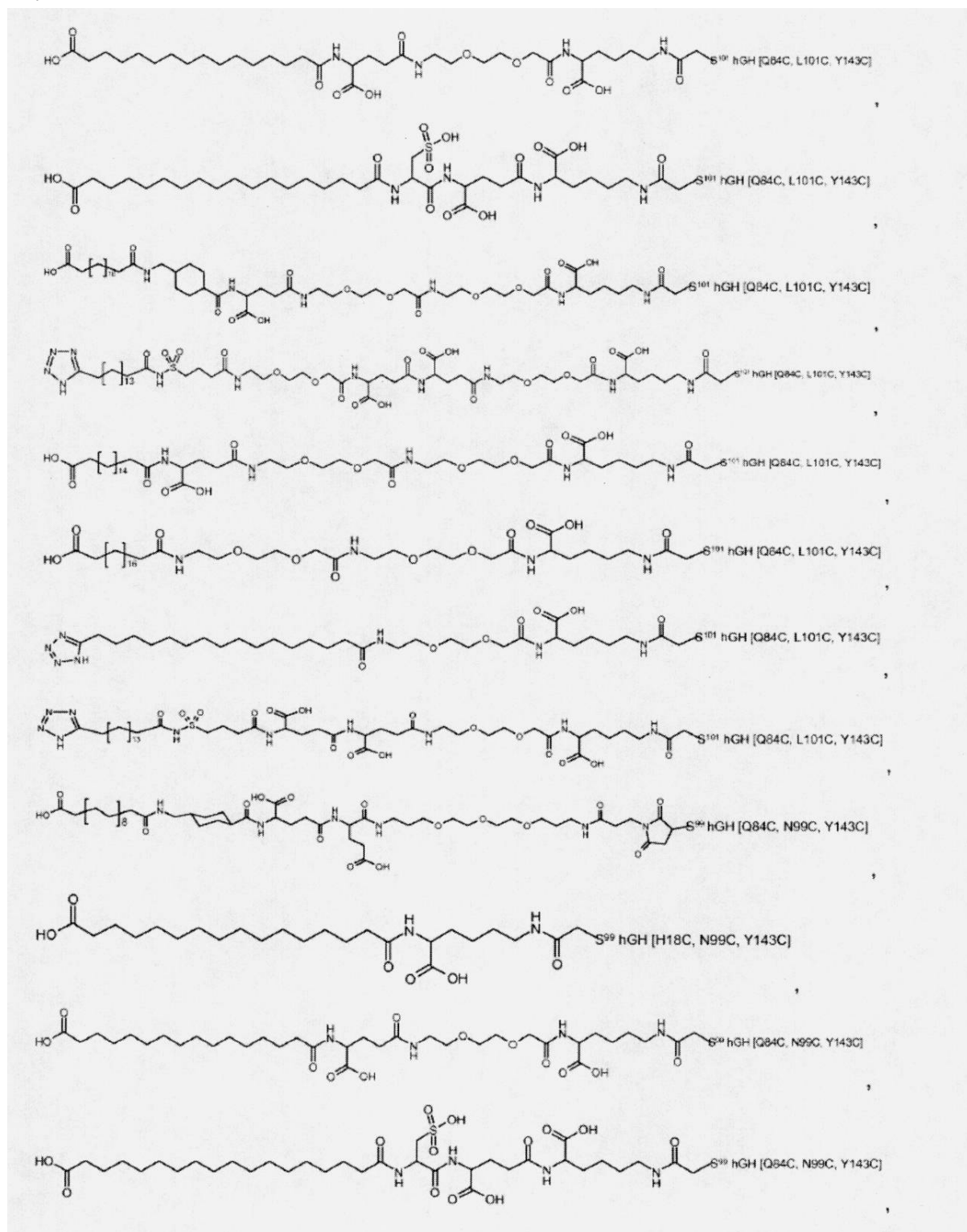
【 0 5 4 3】

【化 5 4】



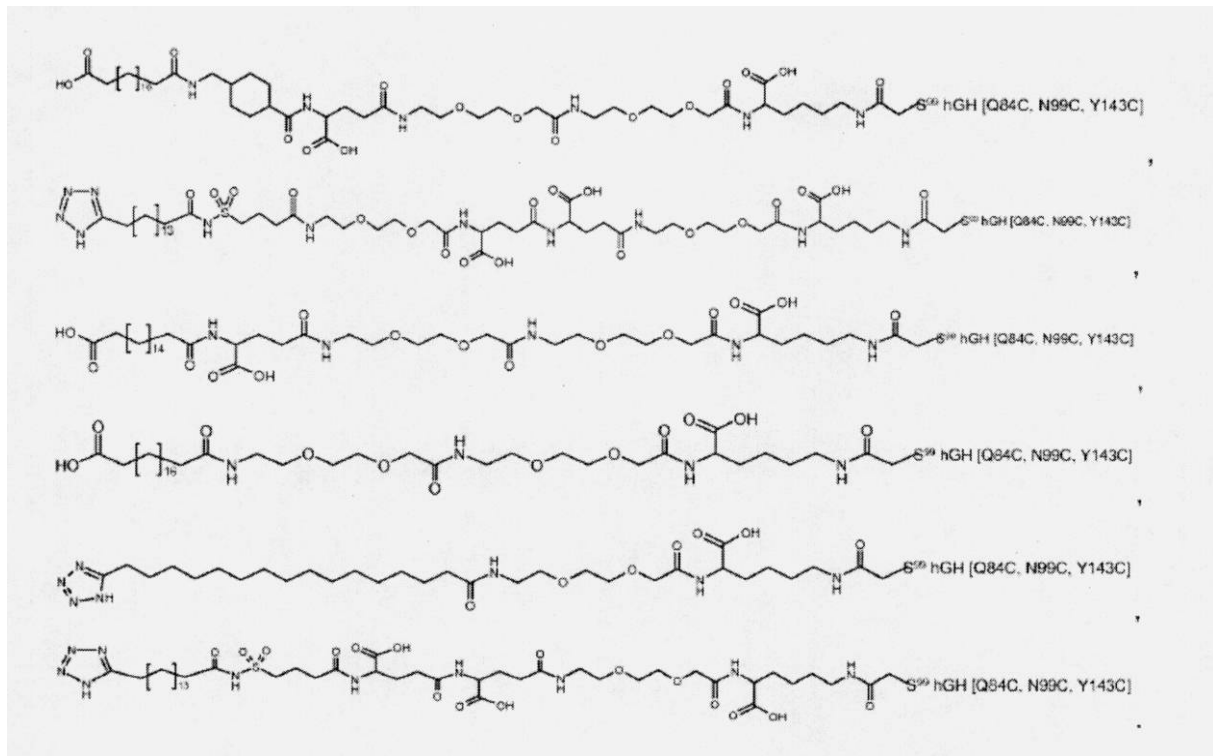
【 0 5 4 4 】

【 0 5 4 5 】



40

【化56】



【0546】

から選択される、実施形態63から84のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0547】

86. 親水性スパーサーが $m\text{LogP} < 0$ を有する、実施形態1から85のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0548】

87. 前記親水性スパーサーのモル重量が、80Dから1500Dまでにわたる、または300Dから1100Dまでにわたる、実施形態1から86のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0549】

88. 前記アルブミン結合残基が親油性残基である、実施形態1から87のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0550】

89. 前記アルブミン結合残基がアルブミンに非共有結合する、実施形態1から88のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0551】

90. 前記アルブミン結合残基が生理的なpHで負に荷電している、実施形態1から89のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0552】

91. 前記アルブミン結合残基のヒト血清アルブミンに対する結合親和性が、約 $10\mu\text{M}$ を下回る、または約 $1\mu\text{M}$ を下回る、実施形態1から90のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0553】

92. 前記アルブミン結合残基が、直鎖アルキル基、分岐アルキル基、 α -カルボン酸基または β -カルボン酸アイソスターを有する基から選択される、実施形態1から91のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0554】

93. 前記アルブミン結合残基が、6個から40個までの炭素原子、8個から26個までの炭素原子または8個から20個までの炭素原子を有する、実施形態1から92のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0555】

94. 前記アルブミン結合残基が、40個未満のアミノ酸残基を含むペプチドなどのペプチドである、実施形態1から93のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0556】

95. 2つのアルブミン結合残基(A)が、親水性スペーサー(B)を介して前記GHに連結している、実施形態1から94のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0557】

96. 治療において使用するための、実施形態1から95のいずれか1つに記載のコンジュゲート。

【0558】

97. 場合によって薬学的に許容される賦形剤と組み合わせる、実施形態1から95のいずれか1つに記載のコンジュゲートを含む医薬組成物。

10

【0559】

98. 舌に、舌下に、頬側に、口腔内に、経口的に、胃腸内に、鼻に、肺に、上皮に、皮膚に、経皮的に、および非経口的に患者へ投与することができる、実施形態97の医薬組成物。

【0560】

99. 成長ホルモン欠乏症(GHD)を治療する方法であって、有効量の治療有効量の実施形態1から95のいずれか1つに記載のコンジュゲートを、それを必要とする患者に投与することを含む方法。

【0561】

20

100. ターナー症候群; プラダー・ウィリー症候群(PWS); ヌーナン症候群; ダウン症候群; 慢性腎疾患、若年性関節リウマチ; 嚢胞性線維症、HAART治療を受けている小児のHIV感染(HIV/HALS小児); 妊娠期間に比して背が低く生まれた背の低い小児(SGA); 出生時超低体重(VLBW)だがSGAで生まれた小児の低身長; 骨格形成異常; 低軟骨形成症; 軟骨無形成症; 特発性低身長(ISS); 成人GHD; 長骨、例えば、脛骨、腓骨、大腿骨、上腕骨、橈骨、尺骨、鎖骨、中手骨、中足骨および指などにおける骨折もしくはその骨折; 頭蓋骨、手根部、および足根部などの海綿様骨における骨折もしくはその骨折; 例えば手、膝、または肩の腱または靭帯の外科手術を受けた後の患者; 仮骨延長を有する、もしくは仮骨延長を経験している患者; 例えば膝、股関節、肩、肘、手首または顎などにおいて、股関節もしくは円板の交換、半月板修復術、脊髄癒合または人工器官の固定を受けた後の患者; 釘、ねじおよび板などの骨接合材料が固定されている患者; 骨折が偽関節または変形治癒になっている患者; 例えば、脛骨または母趾からの骨切り術を受けた後の患者; グraftの移植を受けた後の患者; 外傷または関節炎によって引き起こされる膝の関節軟骨変性; ターナー症候群の患者における骨粗鬆症; 男性の骨粗鬆症; 慢性的に透析を受けている成人患者(APCD); APCDにおける栄養不良に関連する心臓血管疾患; APCDにおける悪液質の反転; APCDにおける癌; APCDにおける慢性閉塞性肺疾患; APCDにおけるHIV; APCDである高齢者; APCDにおける慢性肝疾患; APCDにおける疲労症候群; クロウン病; 肝機能障害; HIV感染している男性; 短腸症候群; 中心性肥満; HIV関連リポジストロフィー症候群(HALS); 男性不妊症; 主要な待機的手術、アルコール/薬物の解毒または神経外傷を受けた後の患者; 加齢; 虚弱高齢者; 変形性関節症; 外傷性の損傷を受けた軟骨; 勃起不全; 線維筋痛症; 記憶障害; うつ病; 外傷性脳損傷; くも膜下出血; 出生時超低体重; メタボリックシンドローム; グルココルチコイドミオパチー; 小児におけるグルココルチコイド治療が原因の低身長治療する方法、筋肉組織、神経組織または創傷の治癒を加速する方法; 損傷を受けた組織への血流を加速または改善する方法; または損傷を受けた組織における感染率を減少させる方法であって、有効量の治療有効量の実施形態1から95のいずれか1つに記載のコンジュゲートを、それを必要とする患者に投与することを含む方法。

30

40

【0562】

101. 成長ホルモン欠乏症(GHD)を治療するための医薬品の製造における、実施形態1から95のいずれか1つに記載のコンジュゲートの使用。

【0563】

50

102.ターナー症候群;プラダー・ウィリー症候群(PWS);ヌーナン症候群;ダウン症候群;慢性腎疾患、若年性関節リウマチ;嚢胞性線維症、HAART治療を受けている小児のHIV感染(HIV/HALS小児);妊娠期間に比して背が低く生まれた背の低い小児(SGA);出生時超低体重(VLBW)だがSGAで生まれた小児の低身長;骨格形成異常;低軟骨形成症;軟骨無形成症;特発性低身長(ISS);成人GHD;長骨、例えば、脛骨、腓骨、大腿骨、上腕骨、橈骨、尺骨、鎖骨、中手骨、中足骨および指などにおける骨折もしくはその骨折;頭蓋骨、手根部、および足根部などの海綿様骨における骨折もしくはその骨折;例えば手、膝、または肩の腱または靱帯の外科手術を受けた後の患者;仮骨延長を有する、もしくは仮骨延長を経験している患者;例えば膝、股関節、肩、肘、手首または顎などにおいて、股関節もしくは円板の交換、半月板修復術、脊髄癒合または人工器官の固定を受けた後の患者;釘、ねじおよび板などの骨接合材料が固定されている患者;骨折が偽関節または変形治癒になっている患者;例えば、脛骨または母趾からの骨切り術を受けた後の患者;グラフトの移植を受けた後の患者;外傷または関節炎によって引き起こされる膝の関節軟骨変性;ターナー症候群の患者における骨粗鬆症;男性の骨粗鬆症;慢性的に透析を受けている成人患者(APCD);APCDにおける栄養不良に関連する心臓血管疾患;APCDにおける悪液質の反転;APCDにおける癌;APCDにおける慢性閉塞性肺疾患;APCDにおけるHIV;APCDである高齢者;APCDにおける慢性肝疾患、APCDにおける疲労症候群;クローン病;肝機能障害;HIV感染している男性;短腸症候群;中心性肥満;HIV関連リポジストロフィー症候群(HALS);男性不妊症;主要な待機的手術、アルコール/薬物の解毒または神経外傷を受けた後の患者;加齢;虚弱高齢者;変形性関節症;外傷性の損傷を受けた軟骨;勃起不全;線維筋痛症;記憶障害;うつ病;外傷性脳損傷;くも膜下出血;出生時超低体重;メタボリックシンドローム;グルココルチコイドミオパチー;小児におけるグルココルチコイド治療が原因の低身長の治療、筋肉組織、神経組織または創傷の治癒の加速;損傷を受けた組織への血流の加速または改善;あるいは損傷を受けた組織における感染率の減少のための医薬品の製造における、実施形態1から95のいずれか1つに記載のコンジュゲートの使用。

10

20

【0564】

103.式(III)

A-W-B1-U (III)

(式中、Aはアルブミン結合残基を示し、

B1は、親水性スペーサーを表し、

Wは、AとB1を連結する化学基であり、Uは、コンジュゲート部分を示す)

の化合物。

30

【0565】

104.AおよびWが、上記の実施形態のいずれかにおいて定義されている通りである、実施形態103に記載の化合物。

【0566】

105.Uが、アリアル、ヘテロアリアル、置換されたマレイミドまたは-NHC(O)CH₂CH₂-ピロリジン-2,5-ジオンなどのピロリジン-2,5-ジオンを含む、またはそれからなる、実施形態103または実施形態104に記載の化合物。

【0567】

106.Uが、D1-(CH₂)₆-D2を含み、D1およびD2が、独立に、-O-、-N(R₆)-、-NC(O)R₇-または原子価結合から選択され;R₆およびR₇が、独立に、水素またはC₁-₆-アルキルを示す、実施形態103または実施形態104に記載の化合物。

40

【0568】

107.Uが、Cl、Br、I、-OH、-OS(O)₂Me、-OS(O)₂CF₃、-Otsなどの脱離基を含む、またはそれからなる、実施形態103または実施形態104に記載の化合物。

【0569】

108.脱離基が、Cl、BrおよびI、好ましくはBrから選択される、ハロゲン化合物である、実施例107に記載の化合物。

【0570】

50

109.Uが、 $-C(O)NHCH_2-CH=CH_2$ などのアリルアミン($H_2C=CH-CH_2-NH_2$)を含む、またはそれからなる、実施形態103または実施形態104に記載の化合物。

【0571】

110.Uが、 $-NH_2$ などのアミンを含む、またはそれからなる、実施形態103または実施形態104に記載の化合物。

【0572】

111.治療用化合物がポリペプチドである、実施形態103～110に記載の化合物。

【0573】

112.治療用化合物が単一遊離シスチンを有するポリペプチドである、実施形態103～110に記載の化合物。

【0574】

113.Uが、 $-CHO$ などのアルデヒドを含む、またはそれからなる、実施形態103または実施形態104に記載の化合物。

【0575】

114.親水性スパーサーB1が式

$-X_1-X_2-X_3-X_4-$

(式中、

X_1 は $-W_1-[(CHR^1)_{l_1}-W_2]_{m_1}-\{[(CH_2)_{n_1}E1]_{m_2}-[(CHR^2)_{l_2}-W_3]_{m_3}\}_{n_2}-$ であり、

X_2 は $-[(CHR^3)_{l_3}-W_4]_{m_4}-\{[(CH_2)_{n_3}E2]_{m_5}-[(CHR^4)_{l_4}-W_5]_{m_6}\}_{n_4}-$ であり、

X_3 は $-[(CHR^5)_{l_5}]_{m_7}-$ であり、

X_4 は原子価結合であり、

l_1 、 l_2 、 l_3 、 l_4 および l_5 は、独立に、0～16から選択され、

m_1 、 m_3 、 m_4 、 m_6 および m_7 は、独立に、0～10から選択され、

m_2 および m_5 は、独立に、0～25から選択され、

n_1 、 n_2 、 n_3 および n_4 は、独立に、0～16から選択され、

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 は、独立に、水素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 $C_1 \sim 6$ -アルキル、アリールまたはヘタリールから選択され；アルキル基、アリール基およびヘタリール基は、場合によってハロゲン、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ または $-OH$ で置換されており、

$E1$ および $E2$ は、独立に、 $-O-$ 、 $-N(R^6)-$ 、 $-N(C(O)R^7)-$ または原子価結合から選択され； R^6 および R^7 は、独立に、水素または $C_1 \sim 6$ -アルキルを示し、

$W_1 \sim W_5$ は、独立に、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s_2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、または原子価結合から選択され； s_2 は0または1である)

を有する、実施形態103から113のいずれかに記載の化合物。

【0576】

1つの要素または複数の要素に関して、「含む(comprising)」、「有する(having)」、「含む(including)」または「含有する(containing)」などの用語を使用する本発明の任意の態様または実施形態の本明細書における説明は、特に指定のある場合、または文脈から明らかに矛盾する場合を除き、その特定の要素または複数の要素「からなる(consists of)」、「から本質的になる(consists essentially of)」、または「を実質的に含む(substantially comprises)」本発明の同様の態様または実施形態の裏づけを提供するものとする(例えば、特定の要素を含む(comprising)と本明細書に記載されている組成物は、特に指定のある場合、または文脈から明らかに矛盾する場合を除き、その要素からなる(consists of)組成物も説明していると理解されるべきである)。

【0577】

本発明は、本明細書で提示されている態様または特許請求の範囲において列挙されている主題の改変および等価物の全てを、適用法によって認可される最大の程度まで包含する。

10

20

30

40

50

【 0 5 7 8 】

本発明は以下の実施例によってさらに例示されているが、その実施例は保護の範囲を限定すると解釈されるべきではない。前述の説明および以下の実施例に開示されている特徴は、どちらも、別々に、およびその任意の組み合わせで、本発明をその多様な形態で実現するための材料であってよい。

【 0 5 7 9 】

(実施例)

略語:

amu=原子質量単位

CV=カラム体積

hr=時間

Hz=ヘルツ

L=リットル

M=モル濃度

mbar=ミリバール

mg=ミリグラム

min.=分

mL=ミリリットル

mM=ミリモル

mm=ミリメートル

mmol=ミリモル

nmol=ナノモル

mol=モル

μ L=マイクロリットル

N=正常

nm=ナノメートル

sec=秒

ppm=百万分率

ESI=エレクトロスプレーイオン化

i.v.=静脈内

m/z=質量電荷比

MS=質量分析

HPLC=高圧液体クロマトグラフィー

RP=逆相

HPLC-MS=高圧液体クロマトグラフィー-質量分析

NMR=核磁気共鳴分光法

p.o.=経口的な

rtまたはRT=室温

s.c.=皮下の

tr=保持時間

Boc=tert-ブチルオキシカルボニル

O-t-Bu=tert-ブチルエステル

t-Bu=tert-ブチル

Boc-4-ABZ-OH=4-tert-ブトキシカルボニルアミノ-安息香酸

DCM=ジクロロメタン、 CH_2Cl_2 、塩化メチレン

DIC=ジイソプロピルカルボジイミド

DIPEA=N,N-ジイソプロピルエチルアミン

DMF=N,N-ジメチルホルムアミド

DMSO=ジメチルスルホキシド

DTT=ジチオスレイトール

10

20

30

40

50

EDAC=1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩

Et₂O=ジエチルエーテル

EtOAc=酢酸エチル

Fmoc=9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニル

Fmoc-Glu-O-t-Bu=N-Fmoc-グルタミン酸-1-t-ブチルエステル

Fmoc-Lys(Mtt)-OH=-6-[(ジフェニル-p-トリル-メチル)-アミノ]-2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-ヘキサン酸

Fmoc-OEG-OH=(2[2-(Fmoc-アミノ)エトキシ]エトキシ)酢酸

OEG=(2[2-(アミノ)エトキシ]エトキシ)アセチル

Fmoc-Thx-OH=N-Fmoc-トランス-4-アミノメチルシクロヘキサンカルボン酸

H₂O=水

HOBt=1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

MeCN=アセトニトリル

MeOH=メタノール

MTP=3-メチル-チオ-1-プロパノール

NaCl=塩化ナトリウム

NaOH=水酸化ナトリウム

NMP=N-メチルピロリジン-2-オン

OEG=(2[2-(アミノ)エトキシ]エトキシ)酢酸

TFA=トリフルオロ酢酸

THF=テトラヒドロフラン

TIS=トリイソプロピルシラン

CDCl₃=ジユウテリオクロホルム

CD₃OD=テトラジユウテリオメタノール

DMSO-d₆=ヘキサジユウテリオジメチルスルホキシド

TNBS=トリニトロベンゼンスルホン酸

TSTU=O-(N-スクシンイミジル)-1,1,3,3-テトラメチルウランテトラフルオロボレート

【0580】

実施例では、以下の一般的な方法も使用する：

【0581】

hGH化合物を調製するための一般的な方法。

成長ホルモン化合物をコードする遺伝子を、組換えによってプラスミドベクターに挿入した。その後、プラスミドベクターを使用して適切な大腸菌(E.coli)株を形質転換した。hGHまたはGH変異体は、N末端メチオニンを伴って、または、後でそれからMEAE配列を切断するMEAE融合物として発現させることができる。

【0582】

細胞ストックを25%のグリセロール中で調製し、-80℃で貯蔵した。グリセロールストック株をLBプレートに接種し、その後、37℃で一晩インキュベートした。発現のために、各プレートの内容物をLB培地で洗浄し、LB培地500mLに希釈した。培養物を37℃で、220rpmで振とうしながら、OD₆₀₀ 0.6に達するまでインキュベートした。続く誘導を、0.2mMのIPTGを使用して25℃で6時間行った。最後に遠心分離によって細胞を回収した。

【0583】

その後、細胞を、0.05%のTween20、2.5mMのEDTA、10mMのシステアミンおよび4mMの尿素を含有する10mMのトリス-HCl、pH=9.0に懸濁させ、細胞破砕器を使用して30kPSIで破砕した。遠心分離によって上清を採取し、その後、クロマトグラフィーによる精製に供した。

【0584】

イオン交換クロマトグラフィーおよび疎水性相互作用を用いて精製を行い、その後CHO細胞で発現させたヒトジペプチジルペプチダーゼI(hDPPI)を使用してペプチドタグを除去した。最終的な精製をイソ沈殿(isoprecipitation)およびイオン交換クロマトグラフィーによって実現した。精製は、これらに限定されないが、イオン交換クロマトグラフィー、

10

20

30

40

50

疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよび当業者に公知の膜に基づく分離技法を用いることによって実現することができる。

【0585】

精製された成長ホルモン化合物のタンパク質化学的な特徴付け。

インタクトな精製タンパク質を、MALDI-MSを使用して分析した。観察された質量は、アミノ酸配列から推定される理論的質量に対応した。

【0586】

予測された連結ジスルフィド結合は、トリプシンおよびAspNによって消化し、その後、消化物を、ジスルフィド結合をDTTで還元する前および還元した後にMALDI-MS分析することを用いるペプチドマッピングによって実証することができる。

10

【0587】

GHおよびhGH化合物コンジュゲートのプロテアーゼ分解の速度を測定するためのアッセイ

対象の化合物を、関連性のあるプロテアーゼ(トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、エラスターゼ、第VIIa因子、第Xa因子、プロテイナーゼK、カルボキシペプチダーゼ、D PPIV、中性エンドペプチダーゼ、グランザイムB、プロリンエンドペプチダーゼ、ブドウ球菌ペプチダーゼI、サーモリシン、トロンピン、Arg-Cプロテイナーゼ、Asp-Nエンドペプチダーゼ、カスパーゼ1~10、クロストリパイン、エンテロキナーゼ、グルタミルエンドペプチダーゼ、グランザイムB、LysC、LysN、プロリンエンドペプチダーゼおよびブドウ球菌ペプチダーゼIまたは組織抽出物)により、適切な緩衝液(例えば、PBSまたは炭酸水素アンモニウム)中、37 °Cで、24時間に至るまで消化する。タンパク質分解をHPLCアッセイによって評価する。

20

【0588】

タンパク質分解

1mg/mLの炭酸水素アンモニウム緩衝液中試験化合物溶液100 µLを、37 °Cで24時間に至るまで酵素によって分解する。種々の時点で小口試料を取り、1%のTFA中に10回希釈することによって試料を酸性化することにより、タンパク質分解反応を停止させる。これらの希釈された試料を逆相HPLCによって分析してタンパク質分解性の消化の程度を推定する。

【0589】

HPLC法

上記の溶液10 µLを、逆相Vydac C4 2 × 150mmカラムに注入し、水中0.1%のTFAから0.1%のTFAを含有する100%アセトニトリルまでの直線勾配を用いて、流速0.2mL/分で30分にわたって溶出した。214nmのUV吸収でピークの検出を行った。t=Tの時点におけるインタクトな化合物の百分率(%)を、t=T(A_T)時点のピーク領域およびt=0(A₀)におけるピーク領域から、(A_T/A₀) × 100%として算出する。インタクトな化合物の百分率(%)を、GraphPad Primsソフトウェアver.5.01を使用して時間に対してプロットする。半減期(T_{1/2})を、同じくGraphPad Prismソフトウェアによって、単相減衰(one phase decay)として算出する。使用することができる酵素の例は、エラスターゼ(Sigma、ブタの膵臓由来)およびキモトリプシン(Roche sequencing grade)である。緩衝液の例は、50mMの炭酸水素アンモニウム、pH=8.5である。

30

40

【0590】

キャピラリー電気泳動:

Agilent Technologies 3DCE系(Agilent Technologies)を使用してキャピラリー電気泳動を行った。Agilent Technologies 3DCE ChemStationを使用してデータの取得および信号処理を行った。キャピラリーは、Agilentの64.5cm(有効長56.0cm)50 µm i.d「Extended Light Path Capillary」であった。200nmでのUV検出を行った(16nm Bw、参照として380nmおよび50nm Bw)。流動電解質は、50mMのリン酸緩衝液、pH7であった(方法A)。キャピラリーを、0.1MのNaOHを3分間、次いでMilli-Q水を2分間、そして電解質を3分間用いて適当な状態にした。各流動後、キャピラリーをMilli-Q水で2分間、次いでリン酸で2分間、そ

50

してMilli-Q水で2分間、で洗い流した。水圧注入(hydrodynamic injection)を、50mbarで4.0秒行った。電位は+25kVであった。キャピラリーの温度は30 であり、実行時間は10.5分であった。

【 0 5 9 1 】

Maldi-Tof質量分析:

Autoflex Maldi-Tof計器(Bruker)を使用して分子量を決定した。アルファ-シアノ-4-ヒドロキシ-桂皮酸を基質として使用して試料を調製した。

【 0 5 9 2 】

RP-HPLC:

Agilent 1100システムで、Vydac 218TP54 4.6mm×250mm、5 μ MのC-18シリカカラム(The Separations Group、Hesperia)を使用してRP-HPLC分析を行った。214nm、254nm、280nmおよび301nmでUV検出した。カラムを、0.1%トリフルオロ酢酸/H₂Oを用いて平衡化し、0.1%トリフルオロ酢酸/H₂Oに対して0~90%アセトニトリルの適切な勾配によって試料を溶出した。

【 0 5 9 3 】

LC-MS:

2つのPerkin Elmer Series 200マイクロポンプ、Perkin Elmer Series 200オートサンプラー、Applied Biosystems 785A UV検出器およびSedex 75蒸発光散乱検出器を備えたPE-Sciex API 100質量分析計、またはPE-Sciex API 150質量分析計でLC-MS分析を行った。Waters Xterra 3.0mm×50mm 5 μ のC-18シリカカラムから、室温、1.5ml/分で溶出した。5%のMeCN/0.1%のTFA/H₂Oを用いてカラムを平衡化し、5%のMeCN/0.1%のTFA/H₂Oを用いて1.0分間、次いで、7分間にわたって90%のMeCN/0.1%のTFA/H₂Oまでの直線勾配で溶出した。214nmでのUV検出および蒸発光散乱によって検出を行った。カラム溶出液の画分をPE-Sciex API 100質量分光計のイオンスプレーインターフェースに導入した。300~2000amuの質量範囲を実行中2秒ごとにスキャンした。

【 0 5 9 4 】

タンパク質の数量化

タンパク質の濃度を、NanoDrop ND-1000 UV-分光光度計を使用して280nmにおける吸収を測定することによって推定した。

【 0 5 9 5 】

誘導化部位を決定するための、酵素によるペプチドマッピング

還元され、アルキル化されたタンパク質をAsp-Nによって消化することを用いてペプチドマッピングを行った。まず、タンパク質を、DTTおよびヨードアセトアミドで標準の手順に従って処理した。アルキル化生成物を、HPLCを使用して精製した。その後、アルキル化され、精製された生成物を、エンドプロテアーゼであるAsp-N(Boehringer)を酵素:基質比1:100で用いて一晩消化した。消化物を、C-18カラムおよび標準のTFA/MeCN緩衝系を使用してHPLCによって分離した。生じたペプチドマップを、誘導体化されていないhGHのペプチドマップと比較し、異なる保持時間の画分を採取し、Maldi-tof質量分析を使用してさらに解析した。

【 0 5 9 6 】

SDS page

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を、NuPAGE 4%~12%ビス-トリスゲル(Invitrogen NP0321BOX)を使用して行った。ゲルを銀染色(Invitrogen LC6100)またはクーマシー染色(Invitrogen LC6065)し、および必要に応じて、M.M.Kurfurst in Anal.Biochem.200(2)、244~248頁、(1992)に記載されている通り、PEGをヨウ化バリウムでも染色した。

【 0 5 9 7 】

タンパク質クロマトグラフィー

Akta Explorerクロマトグラフィーシステム、およびGE Health Careのカラムでタンパク質クロマトグラフィーを行った。Q-Sepharose HP26/10カラムを使用して陰イオン交換を行った。開始緩衝液は20mMのトリエタノールアミン緩衝液、pH8.5であり、溶出緩衝液

10

20

30

40

50

は、開始緩衝液に0.2MのNaClを加えたものであった。一般に、化合物を、溶出緩衝液0～75%の勾配で15のカラム容量にわたって溶出した。HiPrep26/10カラムを使用して脱塩および緩衝液の交換を行った。

【 0 5 9 8 】

TNBS試験

DMF中10%のDIPEAの溶液(溶液1)および1Mの水性TNBSの溶液(溶液2)を調製した。いくつかの樹脂ビーズを小さな試験管内に置き、各溶液(1および2)を1～3滴加えた。簡単に混合した後、混合物を室温で10分間放置し、ビーズを検査した。強いオレンジ色または赤色のビーズにより、陽性の結果(すなわち、遊離のアミンが存在すること)が示され;黄色またはわずかにオレンジ色のビーズにより、わずかに陽性であることが示され、無色のビーズは陰性である。

【 0 5 9 9 】

LogPの算出

LogP値は、公開されているアルゴリズムを使用して、アルブミン結合剤部分および/または親水性 Spacer 部分についてのmLogPおよび/またはcLogPとして算出することができる(J. Am. Chem. Soc., 86, 5175～5180頁、(1964)「A New Substituent Constant, σ , Derived from Partition Coefficients」、C.A. LipinskiらAdvanced Drug Delivery Reviews, 23, 3～25頁(1997)、「Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings」およびI. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, Chem. and Pharm. Bull., 42, 976～978頁、(1994)「Comparison of Reliability of LogP Values for Drugs Calculated by Several Methods」。本明細書において、cLogP-Pomona College LogP(オクタノール/水分分配係数)は、BioByte Corp(<http://www.biobyte.com/>)によって提供されるcLogPアルゴリズムのTripos(<http://www.tripos.com>)バージョン4.2およびその関連する断片データベースのおよびバージョン22のSybyl 7.0を用いて算出する。

【図面の簡単な説明】

【 0 6 0 0 】

【図1】成長ホルモンは、タンパク質の成長ホルモンファミリーの他のメンバー、プロラクチン(PRL)および胎盤性ラクトゲン(PL)と一般的なトポロジーを共有する。成長ホルモンは、2つの保存されたジスルフィド結合を有する「上上下下(up-up-down-down)」トポロジーを示す4ヘリックスバンドルタンパク質に分類される。詳細には、野生型ヒト成長ホルモン(hGH)は、191アミノ酸残基で構成され、53位、165位、182位および189位に、4つのシステイン残基を有し、それらは、それぞれC53とC165、およびC182とC189をつなぐ2つの分子内のジスルフィド結合を形成することによってタンパク質の3次構造を安定化する。

【図2】野生型ヒト成長ホルモン(hGH)は、191アミノ酸残基で構成される。

【 0 6 0 1 】

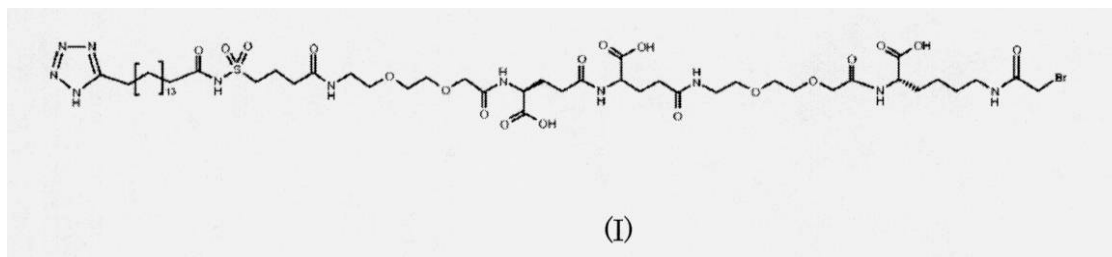
アルブミン結合剤の調製

(実施例1)

4-(1H-テトラゾール-16-イル-ヘキサデカノイルスルファモイル)ブタノイル-OEG- Glu - Glu-OEG-N (C(O)CH₂Br)Lys-OH(I):

【 0 6 0 2 】

【化57】



【 0 6 0 3 】

10

20

30

40

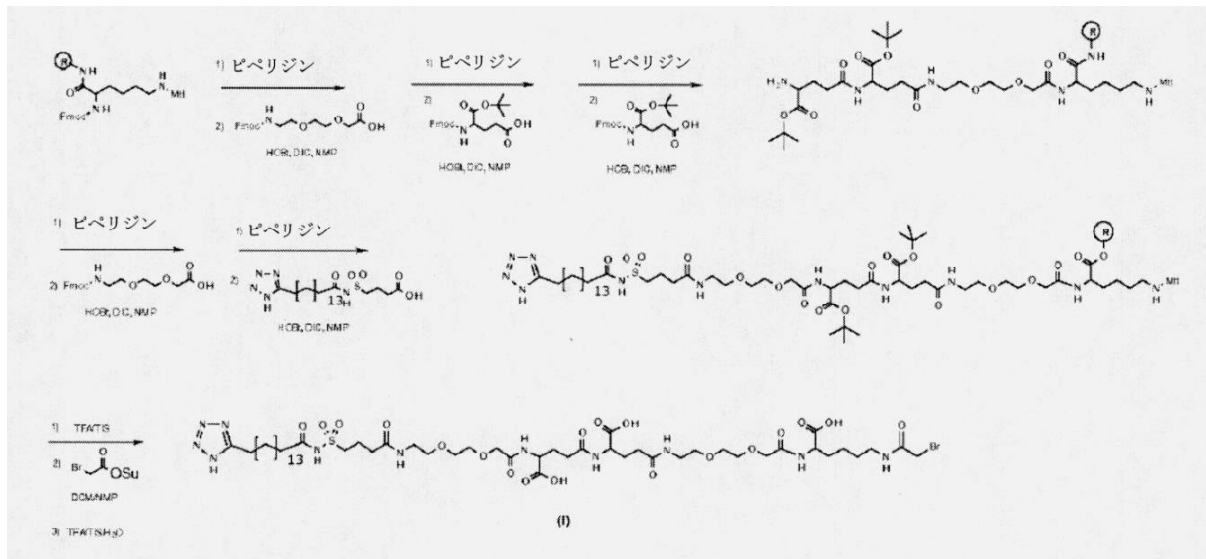
50

化合物(1)を、スキーム1に従って、ABI433合成機で標準のFmoc-ペプチド化学反応を用いて、1mMの規模で、固体支持体上で合成した。ペプチドを、Fmoc-Lys(MTT)-Wang樹脂上でFmoc-OEG-OHおよびFmoc-Glu-OtBu保護アミノ酸を用いて組み立てた。4-(16-1H-テトラゾール-5-イル-ヘキサデカノイルスルファモイル)酪酸を、DCM/NMP中DIC/NHS、2当量を用いて一晩手でカップリングし、TNBS試験により、完了する反応が示された。次いで、樹脂を、フロースルー配置の50mLのDCM/TFA/TIS/水(94:2:2:2)で黄色が消失するまで、約20分処理した。その後、DIPEA/DMFを用いて洗浄し、中和した。DCM/NMP(1:1)中プロモ酢酸(4mM)を、NHSとDICの1mMの混合物を用いて活性化し、濾過し、樹脂に加え、さらに1mMのDIPEAを加えた。1時間後に反応を完了させた。樹脂を80mLのTFA/TIS/水(95:2.5:2.5)で1時間処理した。N₂の流れで蒸発させ、Et₂Oを加えることによって沈殿させ、Et₂Oで洗浄し、乾燥させた。粗生成物を、調製用HPLCで、水中0.1%のTFAに対する30~80%の0.1 TFA/MeCNの勾配を用いて精製した(2回の実行)。画分を採取し、約50%のMeCNを用いて凍結乾燥させて、化合物(1)をもたらした。

TOF-MS: 質量1272.52(M+1)

【0604】

【化58】



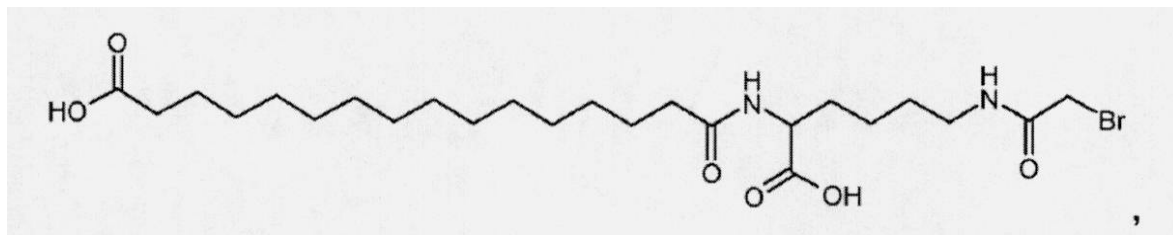
【0605】

(実施例2)

上記の実施例1に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【0606】

【化59】



【0607】

TOF-MS: 質量536.52(M+1)

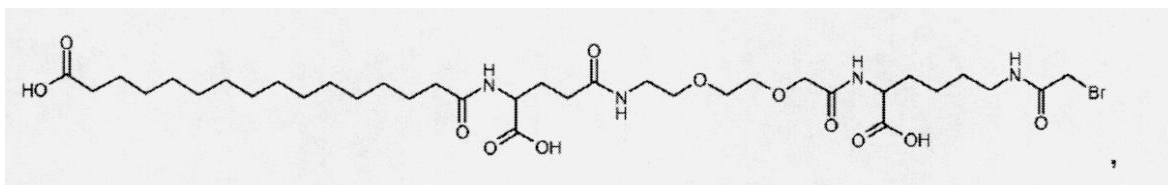
【0608】

(実施例3)

上記の実施例1に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 0 9 】

【 化 6 0 】



【 0 6 1 0 】

TOF-MS: 質量810.80(M+1)

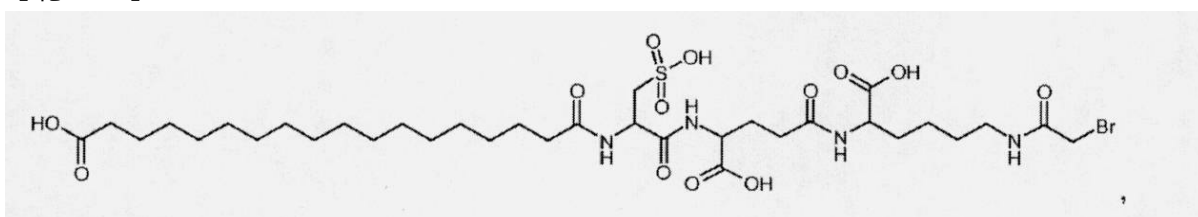
【 0 6 1 1 】

(実施例4)

上記の実施例1に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 1 2 】

【 化 6 1 】



【 0 6 1 3 】

TOF-MS: 質量844.84(M+1)

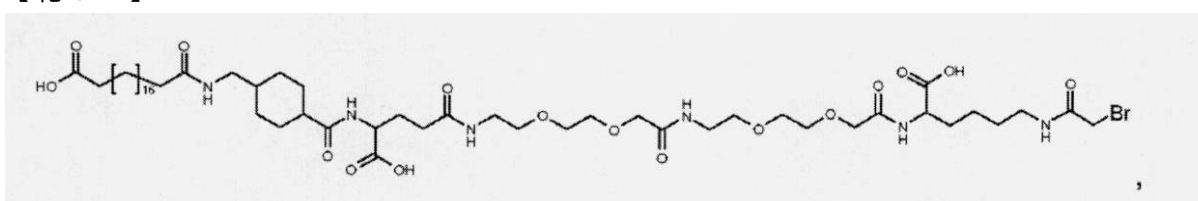
【 0 6 1 4 】

(実施例5)

上記の実施例1に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 1 5 】

【 化 6 2 】



【 0 6 1 6 】

TOF-MS: 質量1151.27(M+1)

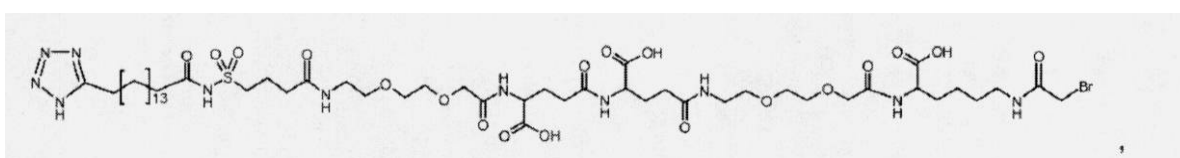
【 0 6 1 7 】

(実施例6)

上記の実施例1に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 1 8 】

【 化 6 3 】



【 0 6 1 9 】

TOF-MS: 質量1272.30(M+1)

【 0 6 2 0 】

10

20

30

40

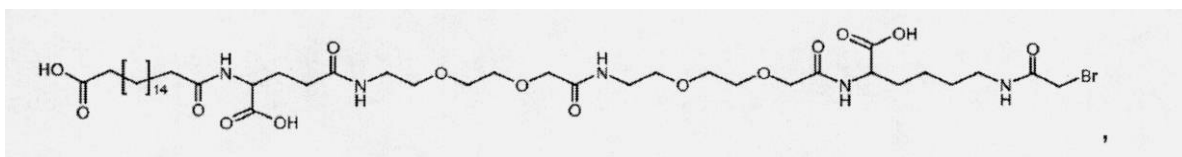
50

(実施例7)

上記の実施例1に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【0621】

【化64】



【0622】

TOF-MS: 質量984.01(M+1)

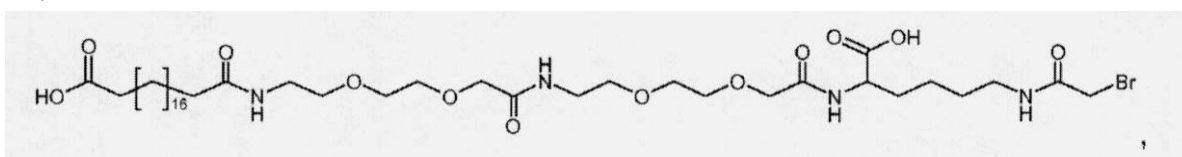
【0623】

(実施例8)

上記の実施例1に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【0624】

【化65】



【0625】

TOF-MS: 質量882.95(M+1)

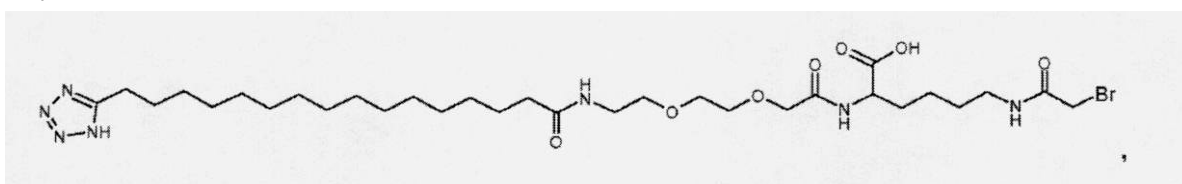
【0626】

(実施例9)

上記の実施例1に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【0627】

【化66】



【0628】

TOF-MS: 質量782.74(M+1)

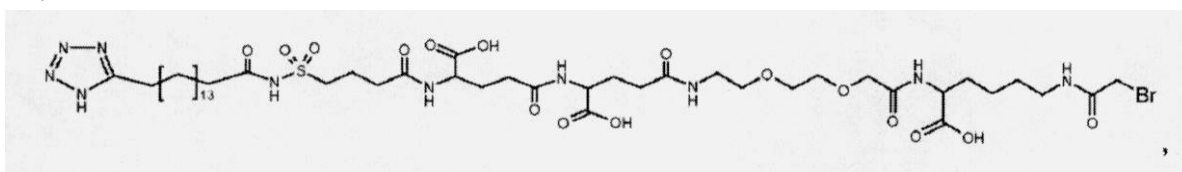
【0629】

(実施例10)

上記の実施例1に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【0630】

【化67】



【0631】

TOF-MS: 質量1127.14(M+1)

【0632】

10

20

30

40

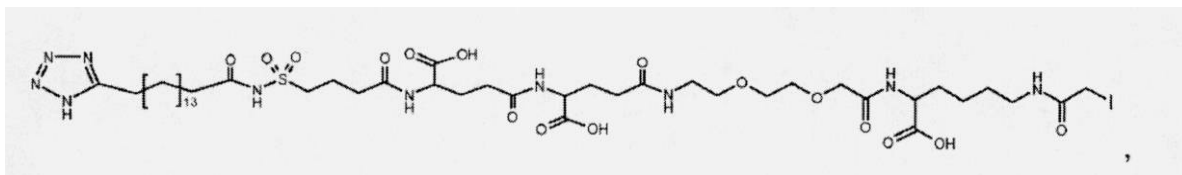
50

(実施例11)

上記の実施例1に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OH、ヨード酢酸およびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【0633】

【化68】



10

【0634】

TOF-MS: 質量1174.14(M+1)

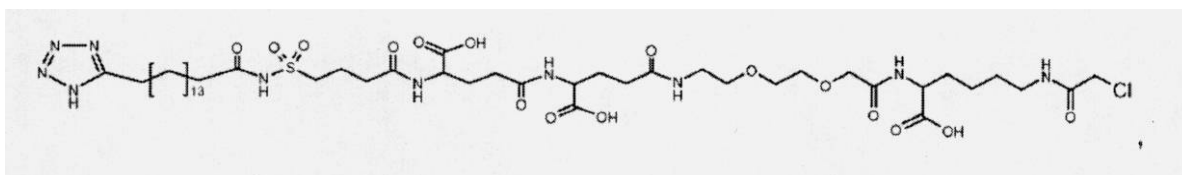
【0635】

(実施例12)

上記の実施例1に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OH、クロロ酢酸およびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【0636】

【化69】



20

【0637】

TOF-MS: 質量1061.89(M+1)

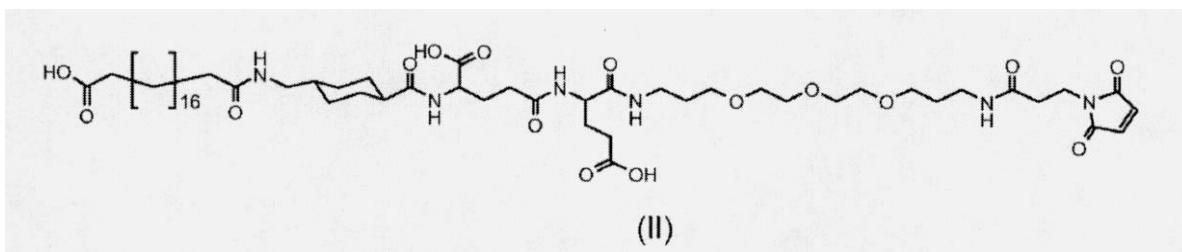
【0638】

(実施例13)

(19-カルボキシノナデカノイル)-Thx- Glu-Glu-N-{3-[2-(2-{3-[3-マレイミドプロピオニルアミノ]プロポキシ}エトキシ)エトキシ]プロピル}アミド(II)

【0639】

【化70】



(II)

30

【0640】

2-クロロトリチル樹脂(2.0g、2.6mmol)を、DCM中で0.5時間膨張させた。DCM中4.7,10-トリオキサ-1,13-ジアミンの溶液(30mL)を加えた。樹脂を室温で1時間攪拌した。樹脂を、DCMで1回洗浄し、次いで、DIPEA:MeOH:DCM(15mL:15mL:20mL)の溶液を加えた。樹脂を0.5時間振とうし、次いでDCMで2回洗浄した。次いで、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Glu-OtBuおよびFmocThexOHを、標準のペプチド化学反応によって以下の通り逐次的にカップリングさせた:NMP中のFmoc-AA-OH/DIC/HOBt (11.7mL)の、各0.5Mの溶液を混合し、2分後に樹脂に加えた。樹脂を室温で45分間振とうし、次いで、5×NMPおよび5×DCMで洗浄した。Ac₂O/DIPEA/NMP(1:1:5)の溶液を加え、樹脂を室温で10分間攪拌した。樹脂を洗浄した(5×NMPおよび5×DCM)。次いで、樹脂をNMP中30%のピペリジンで2×10分間処理し、最後に5×NMPおよび5×DCMで洗浄した。次いで、ペプチドを、0.125MのHOAt(3当量)、0.125MのDIC(3当量)および0.125Mのルチジン(3当量)を含有する0.25Mのエイコサン二酸(6当量)の溶液に加

40

50

えた。樹脂を室温で2時間振とうし、その後、5×NMPおよび8×DCMで洗浄した。生成物を、10%のTFA-DCMを20分間使用して樹脂から切断した。樹脂を濾過し、もう一度10%のTFA-DCMでさらに20分間処理した。全部合わせた濾液を採取し、蒸発させて乾燥状態にした。

【0641】

上記による乾燥生成物をDMF(6mL)に溶解させ、TSTU-活性化された3マレイミドプロピオン酸(TSTUを3マレイミドプロピオン酸とDMF(2mL)中で45分間反応させることによって予め作製した)およびDIPEA(200μL)を加えた。混合物を室温で1時間攪拌した。反応混合物を蒸発させて乾燥状態にし、残留物を95%のTFA-MilliQ水に溶解させ、室温で20分間攪拌した。混合物を蒸発させて乾燥状態にした。残留物に最小限の水を加えて固体を沈殿させた。沈殿物を濾過し、MeCNから再結晶させた。結晶を採取し、主にEt₂Oで洗浄して化合物(11)を白色固体としてもたらした。

TOF-MS: 質量1094.39(M+1)。

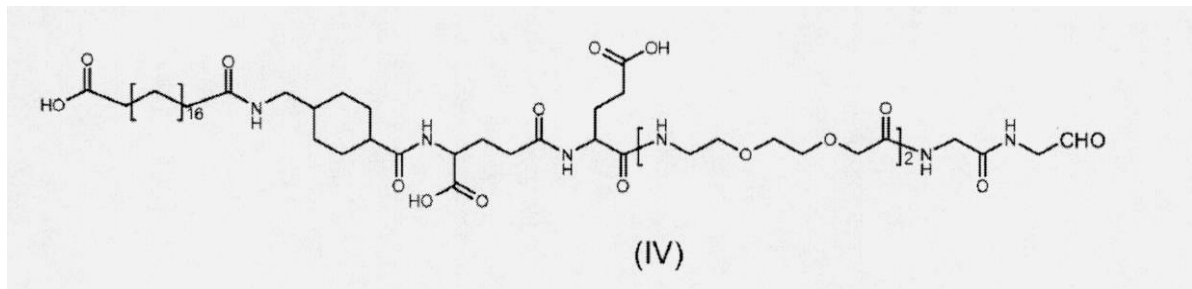
【0642】

(実施例14)

上記の実施例1に記載され、下記のスキーム2に示されているのと同様に、Boc-Gly-PAM樹脂を出発材料として、およびモノ-tert-ブチル-エイコサン酸、4-Boc-アミノ安息香酸、Fmoc-Thx-OH、Fmoc-OEG-OH、Fmoc-Glu(O-t-Bu)-OH、Fmoc-Glu(OH)-t-Bu保護アミノ酸を使用して以下の化合物を調製した。穏やかに脱保護した後、ペプチド生成物を、2,2-ジメトキシエチルアミンを使用して樹脂から切断し、その後、TFAを使用して脱アセタール化して、アルブミン結合剤(IV)をもたらした。

【0643】

【化71】

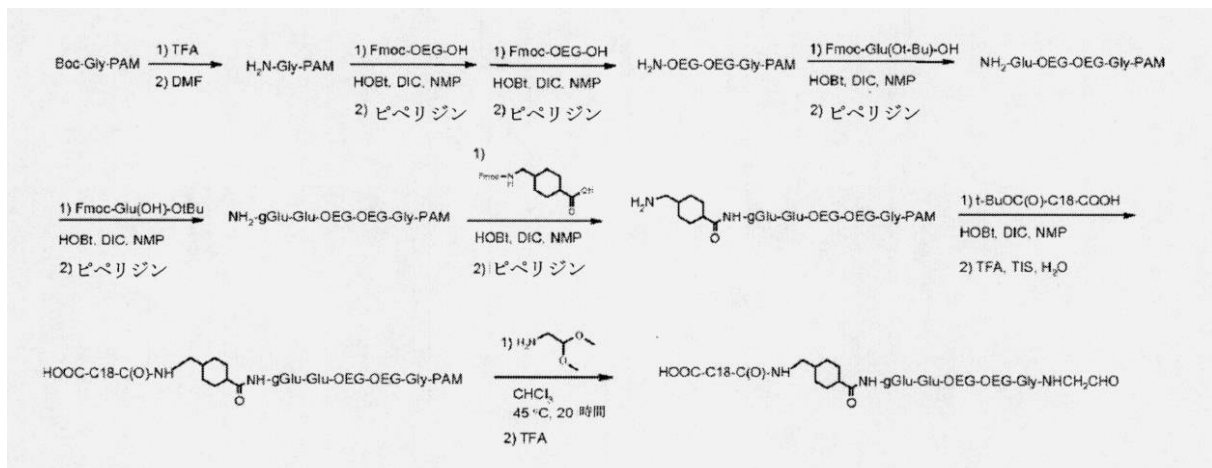


【0644】

TOF-MS: 質量1128.38(M+1)

【0645】

【化72】



【0646】

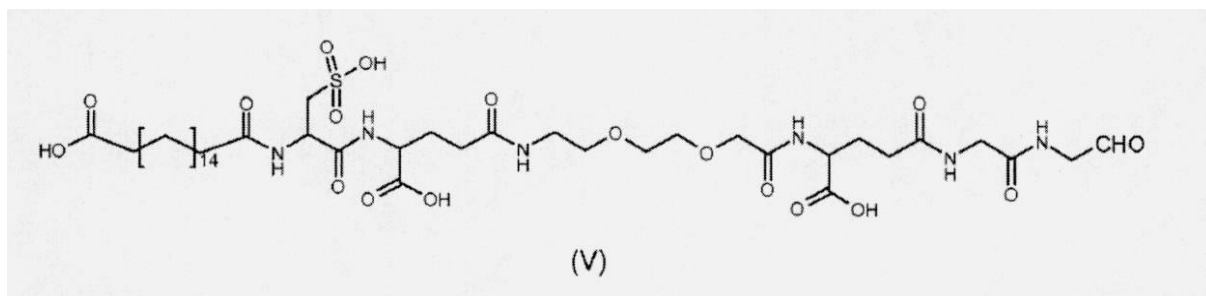
(実施例15)

上記の実施例14に記載されているのと同様に、Boc-Gly-PAM樹脂を出発材料として、お

よびモノ-*tert*-ブチル-エイコサン酸、4-Boc-アミノ安息香酸、Fmoc-Thx-OH、Fmoc-OEG-OH、Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH、Fmoc-Glu(OH)-*t*-Bu保護アミノ酸を使用して以下の化合物を調製した。穏やかに脱保護した後、ペプチド生成物を、2,2-ジメトキシエチルアミンを使用して樹脂から切断し、その後、TFAを使用して脱アセタール化して、アルブミン結合剤(V)をもたらした。

【0647】

【化73】



10

【0648】

TOF-MS: Rt=15.2分、質量=967.11(M+1)

【0649】

(実施例16)

上記の実施例14に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-Wang Resinを出発材料として、およびモノ-*tert*-ブチル-オクタデカン二酸、Boc-Ser(*t*-Bu)-OH、Fmoc-OEG-OH、Fmoc-Glu(O-*t*-Bu)-OH、および酸化型Fmoc-Cys-OH保護アミノ酸を使用して化合物(VI)を調製した。ペプチド生成物を、THF中2.5%のTIS、2.5%のH₂Oを3時間使用して樹脂から切断し、prep-HPLCによって精製した。:

20

カラム: 2cmのC18

溶離液A : 0.1%のTFA i Milli-Q水

溶離液B : 0.1%のTFA i MeCN

開始%のB : 40%

終了%のB : 75%

勾配: 10%のMeCNで5分、開始%Bに至るまで5~10分、開始%Bで51分超、終了%Bで5分+10%のMeCNでおよそ1時間

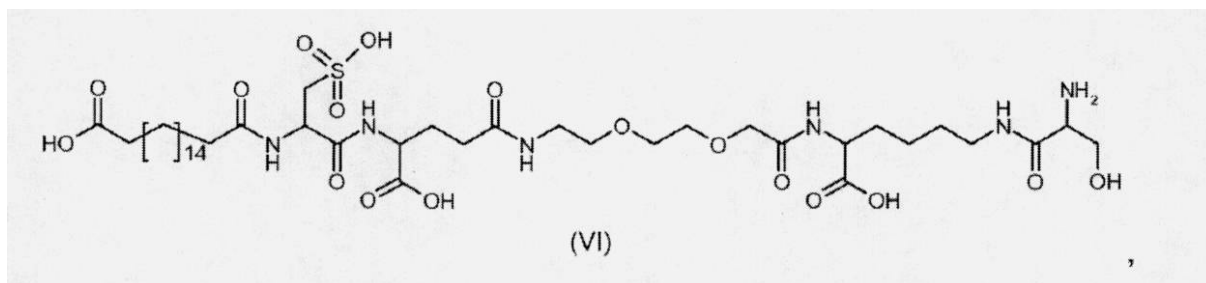
30

画分をLC-MS-TOFによって分析した。

所望の画分を採取し、プールし、凍結乾燥して化合物(VI)をもたらした

【0650】

【化74】



40

【0651】

TOF-MS: Rt=6.3分、質量=955.1(M+1)

【0652】

(VI)の酸化:

MTP-溶液:

3-メチル-チオ-1-プロパノール(290mg)を25mMのHEPES、pH=7.00 4mLに溶解させた。

過ヨウ素酸溶液:

50

96mgの NaIO_4 をMilli-Q水2mLに溶解させた

【0653】

Milli-Q水中化合物(VI)の溶液(1mL)を、MTP溶液(3.6mL)+過ヨウ素酸溶液(560 μL)に加え、1NのNaOHを1滴用いてpHを9.5に調整した。反応フラスコをスズ箔で覆い、室温で1時間攪拌した。追加的な一部分の過ヨウ素酸溶液(560 μL)を加え、反応混合物を外界温度で4.5時間放置した。生じた混合物を、 NaIO_4 を取り除くために2つのNAPカラムに流した。カラムを25mMのHEPES($5 \times 2.5\text{mL}$)、pH=7.0で予洗した。

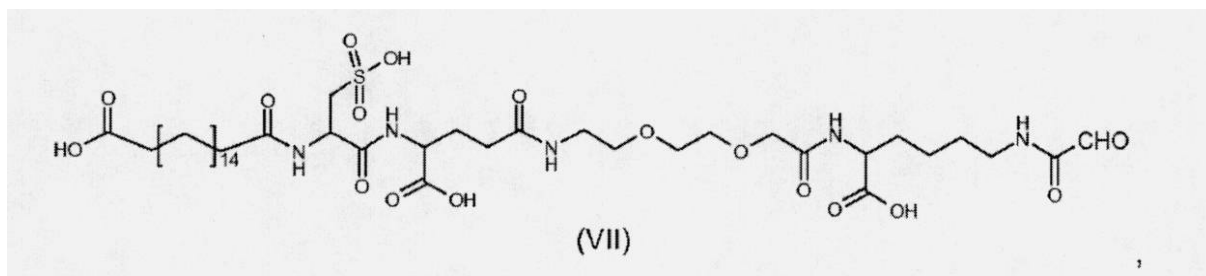
【0654】

各カラムに添加し、25mMのHEPES、pH=7.00 $2 \times 3.5\text{mL}$ を用いて溶出した試料(2.5mL)を、GH類似体とコンジュゲートするために直接使用したケト-アルデヒド(VII)を含有する全部

10

【0655】

【化75】



20

【0656】

TOF-MS: 質量=924.08(M+1)

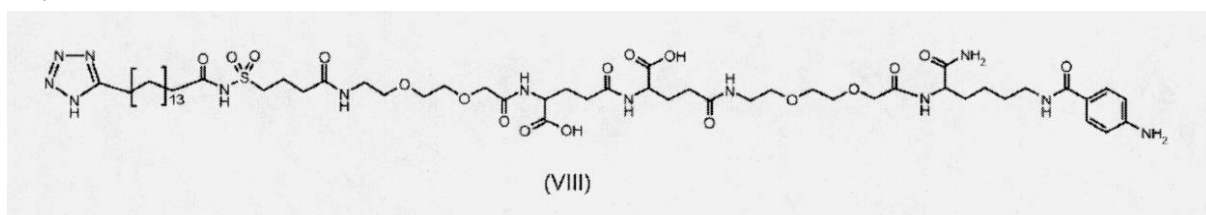
【0657】

(実施例17)

4-(1H-テトラゾール-16-イル-ヘキサデカノイルスルファモイル)ブタノイル-OEG- Glu - Glu-OEG-N (4-アミノベンゾイル)Lys- NH_2 (VIII):

【0658】

【化76】



30

【0659】

化合物(VIII)を、スキーム3に従って固体支持体上で合成した。Fmocで保護されたRink-アミド-樹脂(2.2g、0.6mmol/g)を秤量してフラスコに入れた。樹脂をNMP($3 \times 30\text{mL}$)で2時間膨張させた。樹脂を、NMP中25%ピペリジン(30mL)と一緒に10分間振とうした。樹脂から排液し、NMP中25%ピペリジン(30mL)で1時間処理し、その後、排液し、NMP($6 \times 30\text{mL}$)で洗

40

浄した。Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびHOBtを秤量してフラスコに入れ、NMP中プロモフェノールブルー(30mL、0.5mM)に溶解させた。この溶液を上で排液した樹脂に加え、その後、DICを加えた。反応物を外界温度で21時間振とうした。樹脂から排液し、NMP($6 \times 30\text{mL}$)で洗浄し、その後、DCM($3 \times 30\text{mL}$)で洗浄した。樹脂を、ヘキサフルオロイソプロパノール(20mL)で10分間処理した。10分間振とうした。樹脂から排液し、DCM($3 \times 30\text{mL}$)で洗浄した。樹脂を、再度ヘキサフルオロイソプロパノール(20mL)で10分間処理し、10分間振とうした。樹脂から排液し、DCM($3 \times 30\text{mL}$)で洗浄し、その後、排液し、NMP($3 \times 30\text{mL}$)で洗浄した。4-(Boc-アミノ)安息香酸およびHOBtを秤量してフラスコに入れ、NMP中プロモフェノールブルー(30mL、0.5mM)に溶解させた。この溶液を上記で排液した樹脂に加え、その後、DICを加えた。反応物を外界温度で振とうした。樹脂から排液し、NMP($6 \times 30\text{mL}$)で洗浄した。樹脂

50

をNMP中25%ピペリジン(10mL)で10分間振とうした。樹脂から排液し、NMP中25%ピペリジン(10mL)で1時間処理し、その後、排液し、NMP(6×15mL)で洗浄した。Fmoc-OEG-OHおよびHOBtを秤量してフラスコに入れ、NMP中プロモフェノールブルー(15mL、0.5mM)に溶解させた。この溶液を排液した樹脂に加え、その後、DICを加えた。反応物を外界温度で23時間振とうした。樹脂から排液し、NMP(6×15mL)で洗浄した。樹脂をNMP中25%ピペリジン(10mL)で10分間振とうした。樹脂から排液し、NMP中25%ピペリジン(10mL)で1時間処理し、その後、排液し、NMP(6×15mL)で洗浄した。Fmoc-Glu-O-t-BuおよびHOBtを秤量してフラスコに入れ、NMP中プロモフェノールブルー(15mL、0.5mM)に溶解させた。この溶液を排液した樹脂に加え、その後、DICを加えた。反応物を外界温度で18時間振とうした。樹脂から排液し、NMP(6×15mL)で洗浄した。樹脂をNMP中25%ピペリジン(10mL)で10分間振とうした。樹脂から排液し、NMP中25%ピペリジン(10mL)で1時間処理し、その後、排液し、NMP(6×15mL)で洗浄した。Fmoc-Glu-O-t-BuおよびHOBtを秤量してフラスコに入れ0.5mMのNMP中プロモフェノールブルー15mlに溶解させた。この溶液を排液した樹脂に加え、その後、DICを加えた。反応物を外界温度で18時間振とうした。樹脂から排液し、NMP(6×15mL)で洗浄した。樹脂をNMP中25%ピペリジン(10mL)で10分間振とうした。樹脂から排液し、NMP中25%ピペリジン(10mL)で1時間処理し、その後、排液し、NMP(6×15mL)で洗浄した。Fmoc-OEG-OHおよびHOBtを秤量してフラスコに入れ、NMP中プロモフェノールブルー(15mL、0.5mM)に溶解させた。この溶液を排液した樹脂に加え、その後、DICを加えた。反応物を外界温度で振とうした。樹脂から排液し、NMP(6×15mL)で洗浄した。樹脂をNMP中25%ピペリジン(10mL)で10分間振とうした。樹脂から排液し、NMP中25%ピペリジン(10mL)で1時間処理し、その後、排液し、NMP(6×15mL)で洗浄した。

10

20

【0660】

4-(16-1H-テトラゾール-5-イル-ヘキサデカノイルスルファモイル)酪酸およびHOBtを秤量してフラスコに入れ、NMP中プロモフェノールブルー(15mL、0.5mM)に溶解させた。この溶液を排液した樹脂に加え、その後、DICを加えた。反応物を外界温度で21時間振とうした。樹脂から排液し、NMP(6×15mL)で洗浄し、その後、排液し、DCM(6×15mL)で洗浄した。樹脂を、水中95%のTFA(10mL)+DCM(0.25mL)とTIS(0.25mL)の混合物を用いて切断した。樹脂を外界温度で2時間振とうし、濾過して氷冷のEt₂O(75mL)中に入れた。生じた沈殿物を、遠心分離によって単離し、その後、Et₂O(3×)で洗浄し、真空中で48時間乾燥させて、粗化合物(VIII)300mgをもたらした。

30

【0661】

粗化合物(VIII)を、prep-HPLC(GILSON)、30 80%のMeCNで精製した。プールした画分を蒸発させて乾燥状態にし、残留物をH₂O/MeCN 1:1に溶解させ、一晚フリーズドライして化合物(VIII)170mgをもたらした。

TOF-MS:Rt=4.7分、質量1268.71(M+1)

【0662】

[illegible]Nc1ccc(NC(=O)NCCC(=O)NCCOCOCOC(=O)NCCC(=O)NCC(=O)O)cc1Nc1ccc(NC(=O)NCCCCNC(=O)[C@@H](N)CCNC(=O)NCCCNC(=O)OC(=O)NCCOCCOCCOCC(=O)NCC(=O)N[C@H](Cc2ccccc2C(=O)NCC(=O)O)CC3CCCCC3NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O)cc1

【 0 6 6 9 】

10

20

30

40

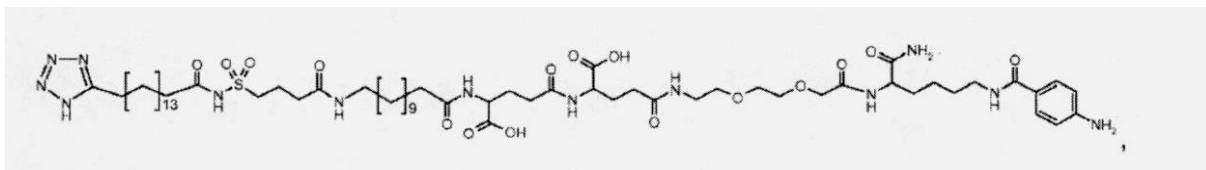
50

(実施例20)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 7 0 】

【 化 8 0 】



10

【 0 6 7 1 】

TOF-MS: 質量1320.67(M+1)

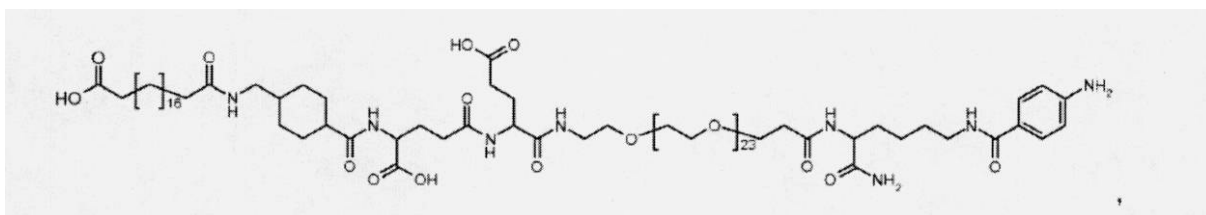
【 0 6 7 2 】

(実施例21)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 7 3 】

【 化 8 1 】



20

【 0 6 7 4 】

TOF-MS: 質量2114.64(M+1)

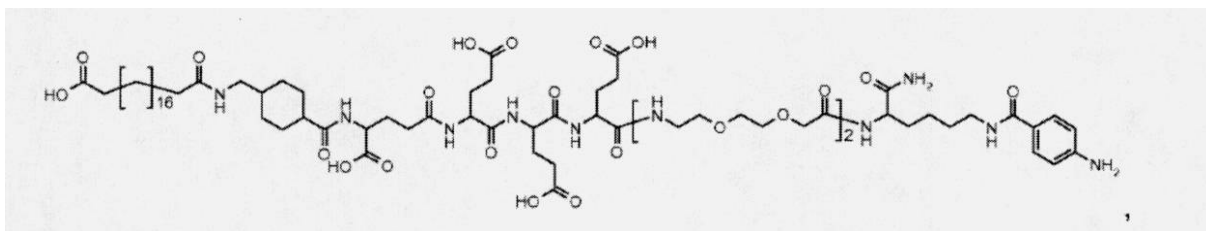
【 0 6 7 5 】

(実施例22)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 7 6 】

【 化 8 2 】



30

【 0 6 7 7 】

TOF-MS: 質量1534.82(M+1)

【 0 6 7 8 】

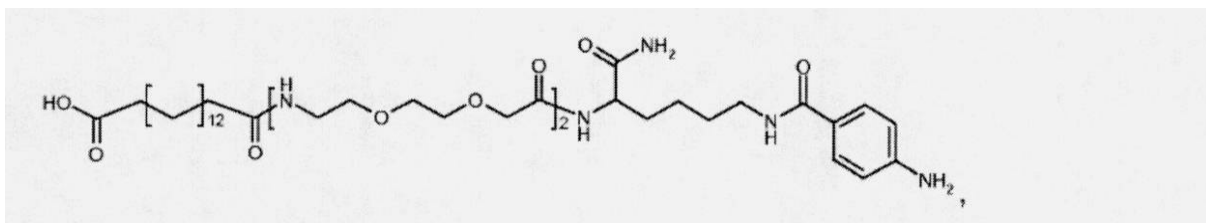
(実施例23)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 7 9 】

40

【化 8 3】



【 0 6 8 0】

TOF-MS: 質量823.05(M+1)

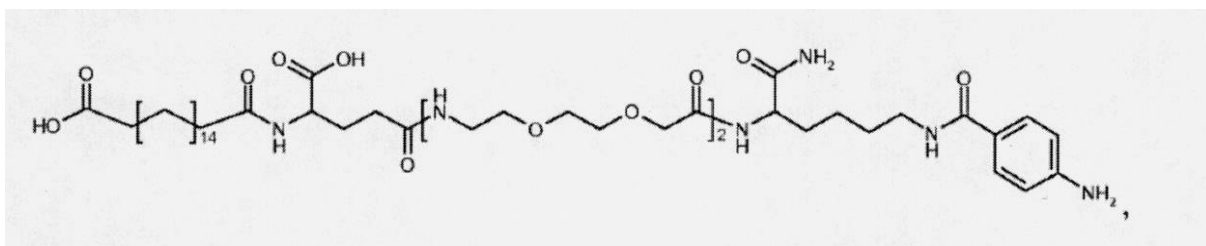
【 0 6 8 1】

(実施例24)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 8 2】

【化 8 4】



【 0 6 8 3】

TOF-MS: 質量980.22(M+1)

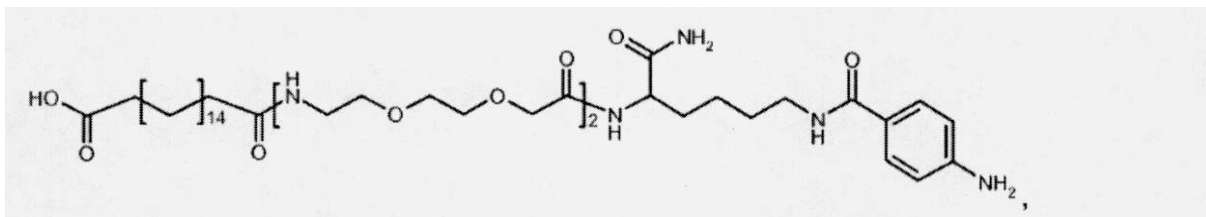
【 0 6 8 4】

(実施例25)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 8 5】

【化 8 5】



【 0 6 8 6】

TOF-MS: 質量851.10(M+1)

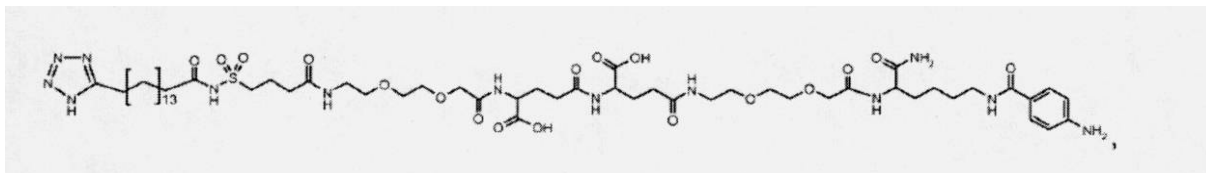
【 0 6 8 7】

(実施例26)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 8 8】

【化 8 6】



【 0 6 8 9】

TOF-MS: 質量1258.51 (M+1)

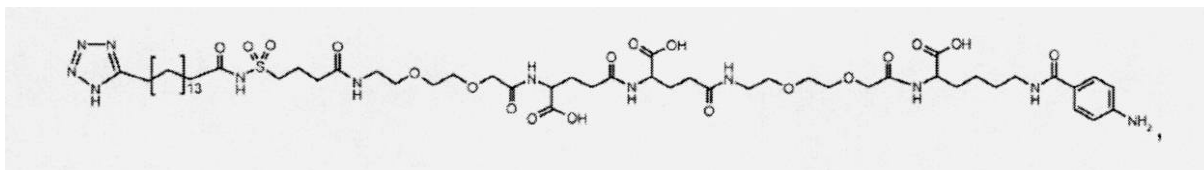
【 0 6 9 0 】

(実施例27)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang Resinを使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 9 1 】

【 化 8 7 】



10

【 0 6 9 2 】

TOF-MS: 質量1269.49 (M+1)

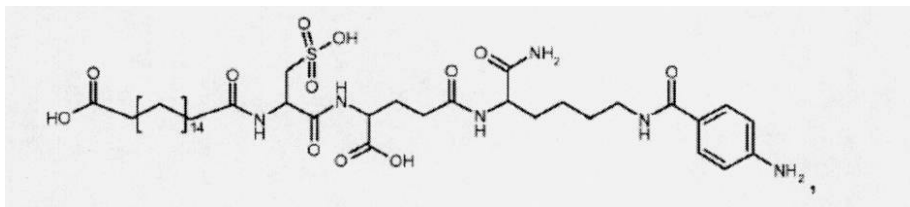
【 0 6 9 3 】

(実施例28)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 9 4 】

【 化 8 8 】



20

【 0 6 9 5 】

TOF-MS: 質量841.04 (M+1)

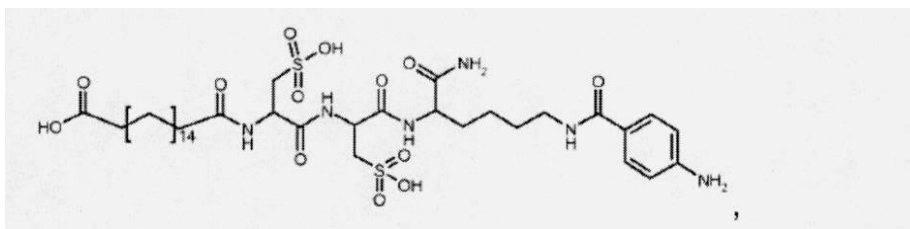
【 0 6 9 6 】

(実施例29)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 6 9 7 】

【 化 8 9 】



30

【 0 6 9 8 】

TOF-MS: 質量863.07 (M+1)

【 0 6 9 9 】

(実施例30)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 7 0 0 】

40

TOF-MS: Rt=4.7分、質量1267.45(M+1)

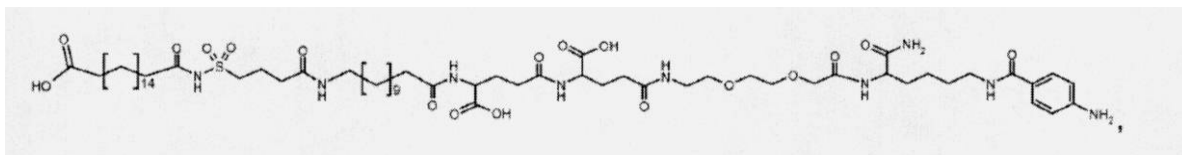
【 0 7 1 1 】

(実施例34)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 7 1 2 】

【 化 9 4 】



10

【 0 7 1 3 】

TOF-MS: 質量1310.67(M+1)

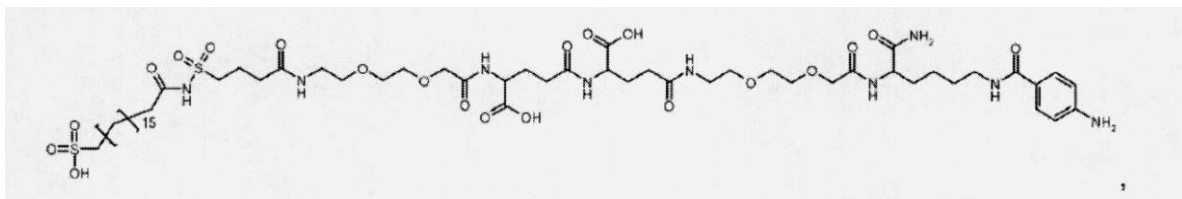
【 0 7 1 4 】

(実施例35)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 7 1 5 】

【 化 9 5 】



20

【 0 7 1 6 】

TOF-MS: 質量1308.58(M+1)

【 0 7 1 7 】

(実施例36)

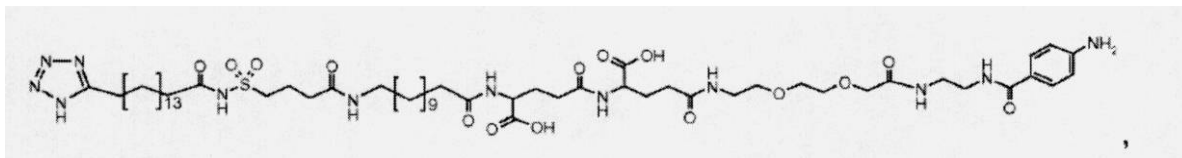
上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Glu(ODmab)-OHおよび2-クロロトリ

30

チルクロリド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 7 1 8 】

【 化 9 6 】



【 0 7 1 9 】

TOF-MS: 質量1235.56(M+1)

【 0 7 2 0 】

(実施例37)

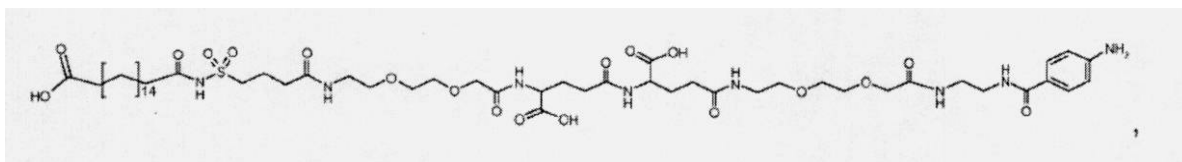
上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Glu(ODmab)-OHおよび2-クロロトリ

40

チルクロリド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 7 2 1 】

【化 9 7】



【 0 7 2 2 】

TOF-MS: 質量1173.40(M+1)

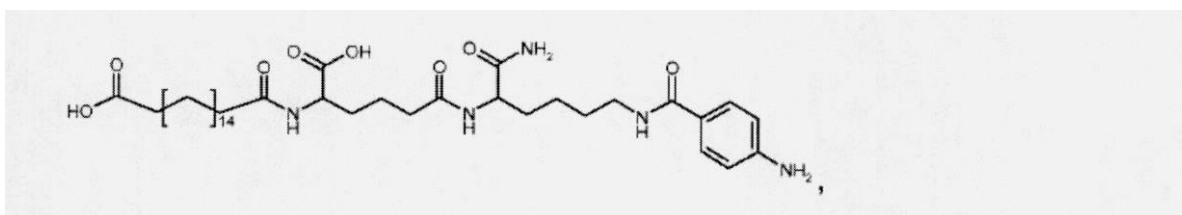
【 0 7 2 3 】

(実施例38)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 7 2 4 】

【化 9 8】



【 0 7 2 5 】

TOF-MS: 質量703.93(M+1)

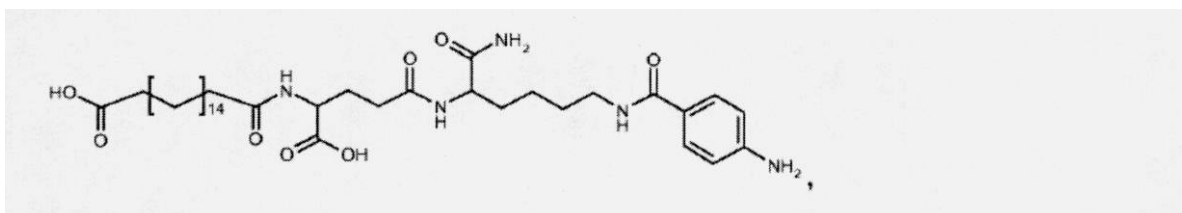
【 0 7 2 6 】

(実施例39)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびRinkアミド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 7 2 7 】

【化 9 9】



【 0 7 2 8 】

TOF-MS: 質量689.90(M+1)

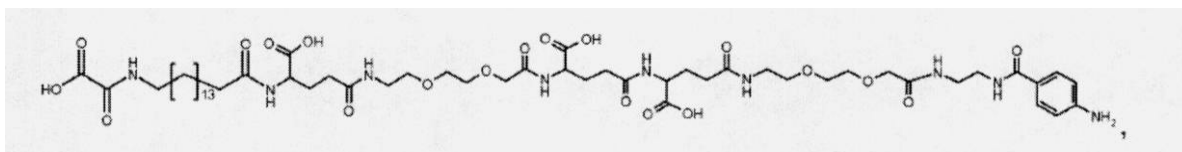
【 0 7 2 9 】

(実施例40)

上記の実施例17に記載されているのと同様に、Fmoc-Glu(ODmab)-OHおよび2-クロロトリチルクロリド樹脂を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 7 3 0 】

【化 1 0 0】



【 0 7 3 1 】

TOF-MS: 質量1182.34(M+1)

【 0 7 3 2 】

(実施例41)

10

20

30

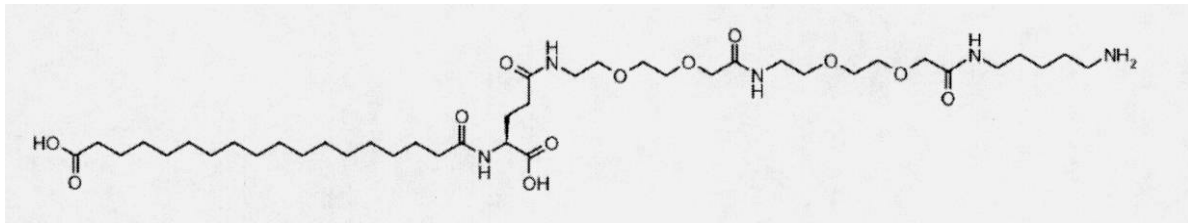
40

50

17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(5-アミノペンチルカルバモイル)メトキシ]エトキシ}エチルカルバモイル)-メトキシ]エトキシ}エチルカルバモイル)-1-カルボキシ-プロピルカルバモイル]-ヘプタデカン酸:

【0733】

【化101】



10

【0734】

N-tert-ブトキシカルボニルカダベリン(24.3mg;0.12mmol)を、THF(2.0ml)中17-((S)-1-カルボキシ-3-{2-[2-((2-[2-(2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルオキシカルボニルメトキシ)-エトキシ]エチルカルバモイル}メトキシ)エトキシ]エチルカルバモイル}プロピルカルバモイル)-ヘプタデカン酸(100mg;0.12mmol)およびDIPEA(46.68mg;0.36mmol)の溶液に加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌し、次いで、減圧下で濃縮した。残留物を水(5ml)とTHF(2ml)の混合物に溶解させ、調製用HPLC(RP18カラム)によって精製した。Boc-保護されたカップリング産物を含有する画分をプールし、乾燥状態にした。残留物を50%のTFA-DCM(4ml)に溶解させ、室温で1時間攪拌し、減圧下で濃縮して、表題の材料をそのトリフル

20

TOF-MS: 質量815.5(M+1)

【0735】

GHアルブミン結合剤化合物の調製

(実施例42)

GHに取っ手を付着させるためのトランスグルタミナーゼの使用は、以前にW02005/070468に記載されており、アルブミン結合剤を付着させるために本発明に従って使用することができる。使用するTGaseは、US5156956によるストレプトベルチシリウム・モバラエンス由来の微生物トランスグルタミナーゼである。一般的な方法は、化学反応Iの項において上記されている。

30

【0736】

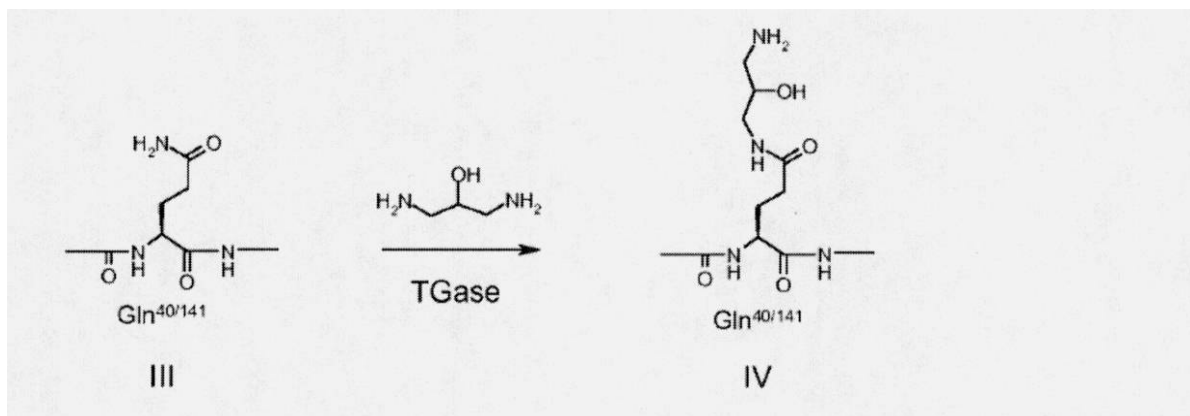
1. アミノ基転移し、酸化したGH化合物(I)とアルブミン結合剤(II)のカップリング
以下の溶液を調製した:

緩衝液A: トリエタノールアミン(119mg、0.8mmol)を水(40mL)中に溶解させ、pHを8.5に調整した。

(A)1,3-ジアミノ-2-プロパノールを用いたhGH(III)のアミノ基転移

【0737】

【化102】



40

【0738】

50

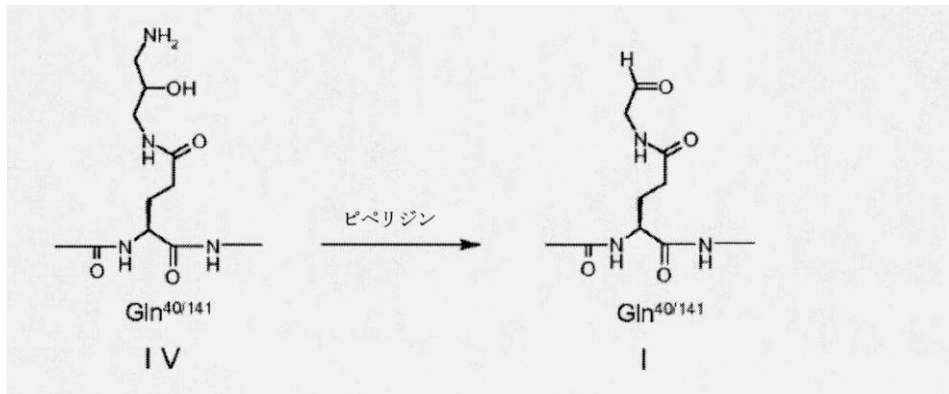
次のステップでは、アミノ基転移したGH(III)に過ヨウ素酸を加える。一般には、酸化は、低温、例えば4～10℃で30分、場合によって暗闇中で行う。過ヨウ素酸によってGH中のメチオニン残基が酸化されてそれらの対応するメチオニンスルホキシド残基になる可能性がある。この酸化の危険性を最小限にするために、過ヨウ素酸による酸化の間に小分子有機チオエーテルを加えることができる。適切な有機チオエーテルは3-メチルチオプロパン-1-オールであるが、当業者は、他のものを思いつくことができるであろう。

【0739】

アミノ基転移したGH化合物(IV)の酸化：

【0740】

【化103】



【0741】

シアノ水素化ホウ素ナトリウムを効率的に還元するために必要な酸性溶液を得るために、緩衝液の変更を行うことができる。一般には、過剰なA-W-B1-NH₂アミンを使用し、ある期間にわたって少量のシアノ水素化ホウ素ナトリウムを加えることができる。

【0742】

以下の溶液を調製した：

緩衝液A: トリエタノールアミン(119mg、0.8mmol)を水(40mL)中に溶解させ、pHを8.5に調整した。

緩衝液B: 3-メチルチオプロパンオール(725mg、7.1mmol)を緩衝液A(10mL)に溶解させた

。

緩衝液C: HEPES(5.96g)を水(1.0L)に溶解させ、pHを7.0に調整した。

過ヨウ素酸: NaIO₄(48.1mg、0.225mmol)を水(1.0mL)に溶解させた。

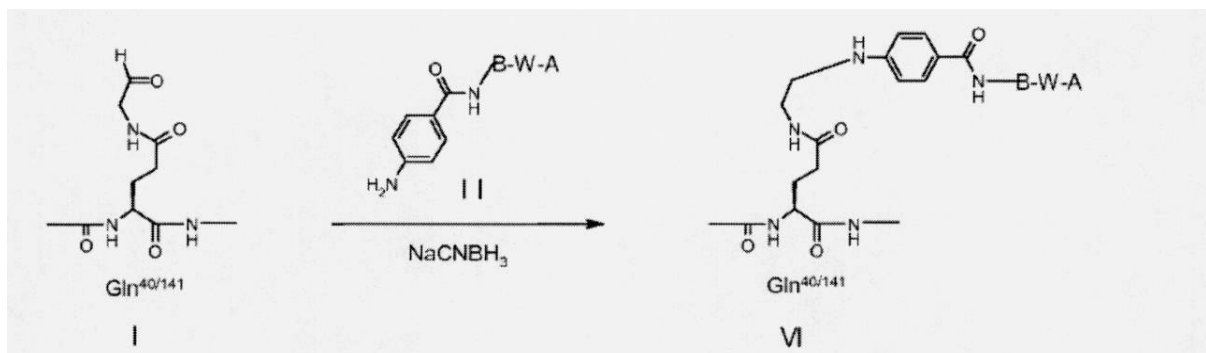
(IV)(10mg、0.5 μmol)の溶液に、緩衝液B(0.2mL)を加え、その後、過ヨウ素酸溶液(0.03mL)を加えた。低温で20分インキュベートした後、緩衝液Cを用いて混合物を4回透析する。残留物を1mLまで濃縮する。

【0743】

(C)アルブミン結合剤(II)を用いた(I)の還元的アミノ化

【0744】

【化104】



10

20

30

40

50

【 0 7 4 5 】

実施例17から40までに記載のアルブミン結合剤(II)を使用することができる。

【 0 7 4 6 】

(B)からの最終的な溶液(1mL、10mg、0.45 μmol (I))を、25mMのHEPES緩衝液、pH7.0中アルブミン結合剤溶液(II)(2mL、10mg、0.3 μmol)と混合し、生じた混合物を室温で1時間、ゆっくり回転させた。1時間後にNaCNBH₃(水(0.5mL)中NaCNBH₃(20mg)の溶液100 μL)を分割して(portionwise)加えた。混合物を暗闇中、室温で18~24時間保持する。

【 0 7 4 7 】

後の反応は、以下の通り実施することができる：

酸化し、アミノ基転移したGHの溶液を、AcOH(1.5mL)と50mMのMES(0.5mL)、pH6.00の混合物中のアルブミン結合リンカーの溶液に加える。生じた反応混合物を室温で30分間穏やかに振とうし、その時点でNaCNBH₃溶液(15 μL 、(Milli-Q水500 μL に溶解させた22mgのNaCNBH₃+AcOH(15 μL)))を加える。試料をスズ箔で覆い、室温で一晩攪拌する。

【 0 7 4 8 】

コンジュゲートは、以下の通り、陰イオン交換クロマトグラフィーによって単離することができる：

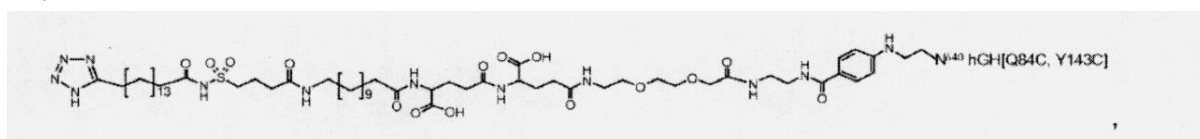
Amicon Ultra15デバイス(Ultracel 10Kチューブ)を用いて純水(3 \times)で緩衝液変更し、4000rpm/分で3 \times 8分遠心分離することによって酢酸を除去する。次いで、混合物を、Amicon Filterデバイスを使用して20mMのTEA、pH:8.50に緩衝液変更し、20mMのTEAで希釈して最終的な体積を50mLにした後、HiLoad Qセファロース、26/10カラムにローディングする。カラムを、最初に20mMのTEA、pH8.50(緩衝液A)で洗浄し、次いで20mMのTEA、500mMのNaCl、pH8.50(緩衝液B)を用いて、20CVにわたって0~100%(B)の勾配を使用し、2mL/分の流速で溶出した。プールした画分を、Amicon Ultra15デバイス(Ultracel 10Kチューブ)を使用し、4000rpm/分で3 \times 8分遠心分離することによって、純水中10mMの炭酸水素アンモニウム緩衝液に5回緩衝液変更した。

【 0 7 4 9 】

実施例18からのアルブミン結合剤を使用することにより、以下の化合物がもたらされる

【 0 7 5 0 】

【 化 1 0 5 】



【 0 7 5 1 】

TOF-MS: 質量23301.63

【 0 7 5 2 】

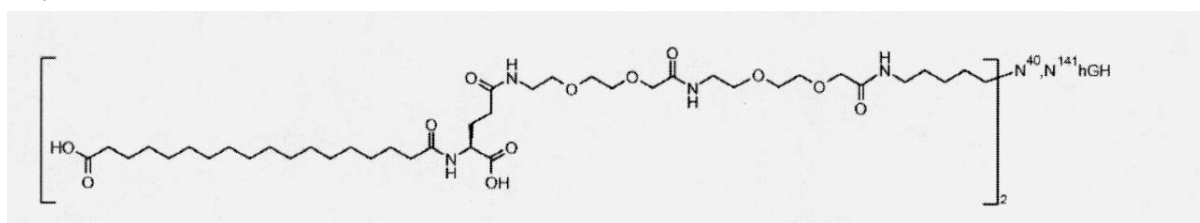
実施例41からのアルブミン結合剤を使用して以下の化合物を調製した。

【 0 7 5 3 】

42.2

【 0 7 5 4 】

【 化 1 0 6 】



【 0 7 5 5 】

TOF-MS: 質量23727.6245

【 0 7 5 6 】

10

20

30

40

50

20mMのトリエタノールアミン(1000 μ l; pH8.5)中のhGH(1mg、45nmol)および17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(5-アミノペンチルカルバモイル)メトキシ]エトキシ}エチルカルバモイル)メトキシ]エトキシ}エチルカルバモイル)-1-カルボキシ-プロピルカルバモイル]ヘプタデカン酸(2.10mg; 2250nmol)の溶液に、TGase(0.12nmol; ストレプトベルチシリウム・モバラエンス)を加えた。反応混合物を25℃で146時間インキュベートし、上記の式の2重に誘導体化されたhGH類似体を得た。

【0757】

(実施例43)

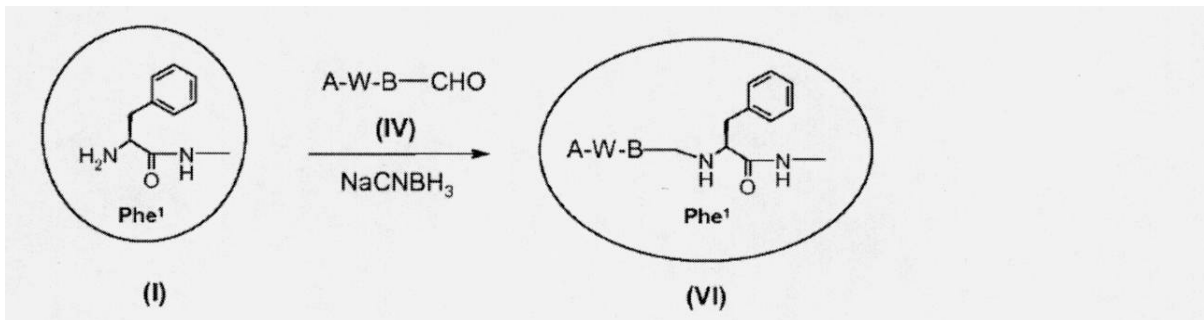
1. GH化合物(I)のN末端とアルブミン結合剤(IV)のカップリング

(A) アルブミン結合剤アルデヒド(IV)を用いた(I)の還元的アルキル化

10

【0758】

【化107】



20

【0759】

上記の誘導体化プロセスでは、アルブミン結合性リンカーA-W-Bを利用し、Bは末端アルデヒド官能性を有する。hGHとA-W-B-CHOのコンジュゲーションは、還元的アルキル化によって起こる(hGH VI)。還元的アルキル化は本明細書において例示されており、また、当該技術分野においてよく認識されており、それによりN末端の位置で修飾されたhGH化合物がもたらされる。

【0760】

実施例14に記載の通りアルブミン結合剤(IV)を得た。

【0761】

30

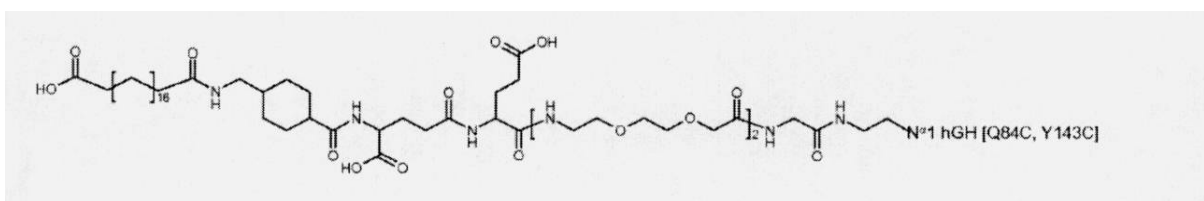
2-(C₂₀二酸-Trx- Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-グリシンアミド)-エチル-N¹-hGH[Q84C、Y143C]の合成

【0762】

43.0

【0763】

【化108】



40

【0764】

hGH[Q84C、Y143C](23mg)を、Hepes緩衝液(2.3mL 0.25mM pH7.0)に溶解させた。C₂₀二酸-Trx- Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly-ジメチルアセタール(2mg、上記の実施例14を参照されたい)をTFA(50 μ L)で6分間処理し、真空中で蒸発させて乾燥状態にした。残留物をEtOH(200 μ L)で取り出し、真空中で蒸発させて乾燥状態にした。残留物をDMF(100 μ L)に溶解させ、hGH溶液に加えた。沈殿物が形成され、DMF(1mL)を加えることによってそれを再溶解させた。1時間後に、NaCNBH₃の溶液(0.5mLのMeCN(230 μ L)中20mg)を分割して(portionwise)加え、20時間放置した。AcOH(2mL)を加えることによって反応をクエンチし、水で希釈

50

して総体積を20mLにし、prep.HPLC、C18カラムで、水中0.1%のTFAに対して40～80%のMeCN中0.1%のTFAの勾配を用いて精製した。最後の溶出ピークを収集し、70%のMeCNから10%まで水で希釈し、凍結乾燥して4.51mgの2-(C₂₀二酸-Trx- Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-グリシンアミド)-エチル-N¹-hGH[Q84C、Y143C]をもたらした。

TOF-MS:Rt=15.25分、質量=23150

【0765】

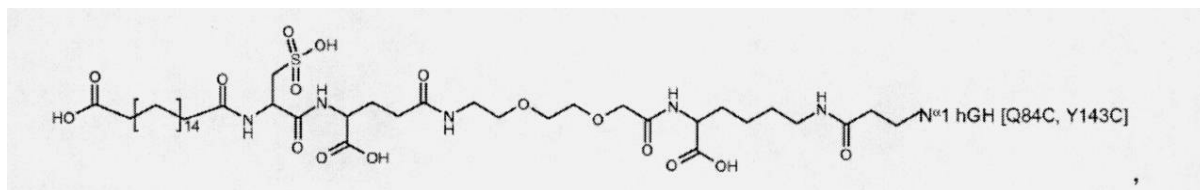
上記と同様に、実施例16のアルブミン結合剤を使用して以下の化合物を調製した。

【0766】

43.1

【0767】

【化109】



【0768】

TOF-MS:Rt=15.2分、質量=23033

【0769】

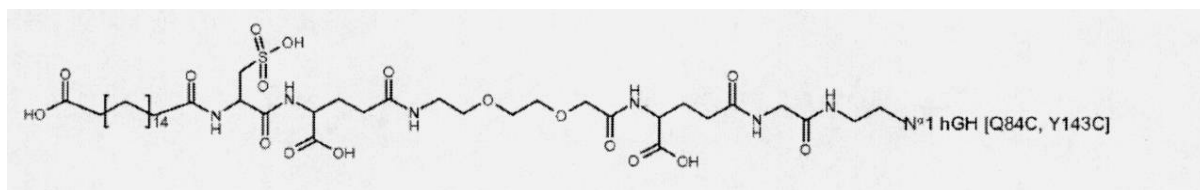
上記と同様に、実施例15のアルブミン結合剤を使用して以下の化合物を調製した。

【0770】

43.2

【0771】

【化110】



【0772】

TOF-MS:Rt=15分、質量=22989.1

【0773】

(実施例44)

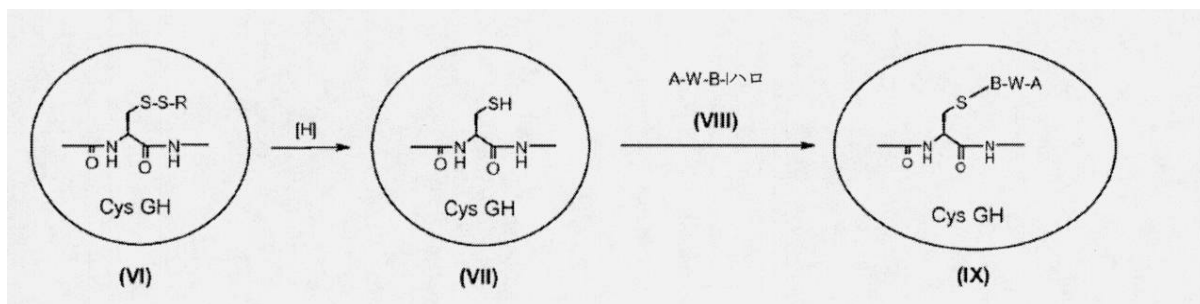
1. 内部の遊離の単一-cysを有するGH化合物(VII)とアルブミン結合剤(VIII)のカップリング

1)ジスルフィド(VI)を適切な選択的還元剤で還元することによる遊離のCys GH(VII)の遊離:

2)CysコンジュゲートしたGH化合物(IX)をもたらす、ハロゲンで活性化されたアルブミン結合剤(VIII)を用いた遊離のCys GH(VII)のアルキル化

【0774】

【化111】



【0775】

10

20

30

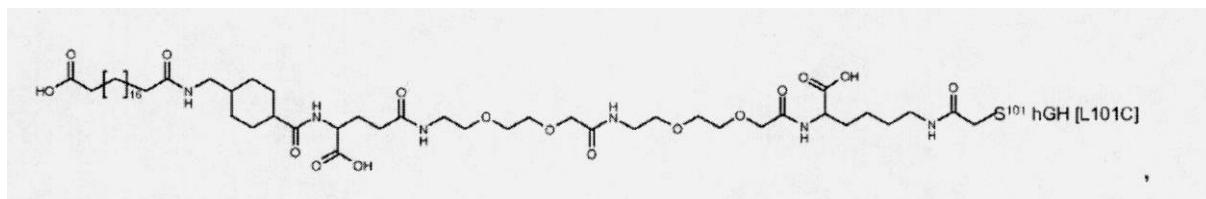
40

50

44.1

【 0 7 7 6 】

【 化 1 1 2 】



【 0 7 7 7 】

10

2-(C₂₀二酸-Trx- Glu-OEG-OEG- Lys)-カルボニルメチレン-S¹⁰¹-hGH[L101C]

【 0 7 7 8 】

hGH[L101C] (VII) の調製:

上記で得られるhGH[L101C]は、グルタチオンおよびシスタミンで遮断されたその遊離のシステインの一部を有する。GSHおよびGSSGを含有する平衡緩衝液中でグルタレドキシンI (Grx2) を使用して酵素による脱遮断を行った。脱遮断されたhGH[L101C]を、Sephadex G25カラムで緩衝液交換によって低分子量GSH/GSSGから分離した。

【 0 7 7 9 】

アルブミン結合剤(VIII)とhGH[L101C] (VII) のコンジュゲーション:

実施例5からのアルブミン結合剤(78mg、5当量)を、HEPES/EDTA緩衝液170mLに5%のヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンと一緒に溶解させ、MTP(2.1mL、1%)および0.5MのNaCl(6.34g)を加えた。この混合物に、濃縮したhGH[L101C](1当量、46mL)を加え、混合物を室温で一晩放置した。溶液は一晩で濁った。HPLCにより未反応の出発材料が示されたので、最小限のNMPに溶解させた新たな5当量の実施例5からのアルブミン結合剤を加えた。生じた混合物を室温でさらに16時間撹拌した。

20

【 0 7 8 0 】

精製:

使用した緩衝液:

緩衝液A

20mMのトリエタノールアミン(TEA)+10%のエチレングリコール

30

トリエタノールアミン5.96g

エチレングリコール200mL

MQ水を加えて2Lにした

1NのHClを用いてpHを8.5に調整した

緩衝液B:

20mMのトリエタノールアミン(TEA)+1.0MのNaCl+10%のエチレングリコール

トリエタノールアミン5.96g

NaCl 116.88g

エチレングリコール200mL

MQ水を加えて2Lにした

40

1NのHClを用いてpHを8.5に調整した

反応緩衝液を、Sephadexカラムに3回流してエチレングリコールを伴うエチレングリコールTEA緩衝液Aに変更した:

カラム:50/30Sephadex G25 fine

緩衝液A:

流量:10mL/分

温度:室温(12℃で画分採取)

画分:画分当たり30mL

所望の画分を採取し、プールし、次いで、Qセファロースカラムで精製した:

カラム:26/10QセファロースHP

50

緩衝液A:

緩衝液B:

勾配1:1CVにわたって0～10%の緩衝液B

勾配2:20CVにわたって10～40%の緩衝液B

勾配3:1CVにわたって40～100%の緩衝液B

流量:8mL/分

温度:室温(室温で画分採取)

画分:画分当たり5mL

所望の画分を採取し、プールし、Sephadex G25カラムで10mMの重炭酸アンモニウム、pH

8.0に緩衝液交換した:

カラム:50/30 Sephadex G25 fine

緩衝液A:10mMの炭酸水素アンモニウム、pH8.0

流量:10mL/分

温度:室温(12 で画分採取)

画分:画分当たり30mL

5つの画分をプールし、フリーズドライした。

プールを、MSによって分析し、大量の二量体(MS 44491.7)が見られた。

フリーズドライしたバイアルを緩衝液Aに溶解させ、新しいQセファロースカラムで再度精製した:

カラム:26/10 QセファロースHP

緩衝液A:

緩衝液B:

勾配1:1CVにわたって0～10%の緩衝液B

勾配2:20CVにわたって10～40%の緩衝液B

勾配3:1CVにわたって40～100%の緩衝液B

流量:8mL/分

温度:室温(室温で画分採取)

画分:画分当たり5mL

画分をプールし、限外濾過することによって脱塩/10mMの炭酸水素アンモニウムに緩衝液交換した。プールを25mLまで濃縮し、RP-HPLCおよびMS-TOFによって数量化した:

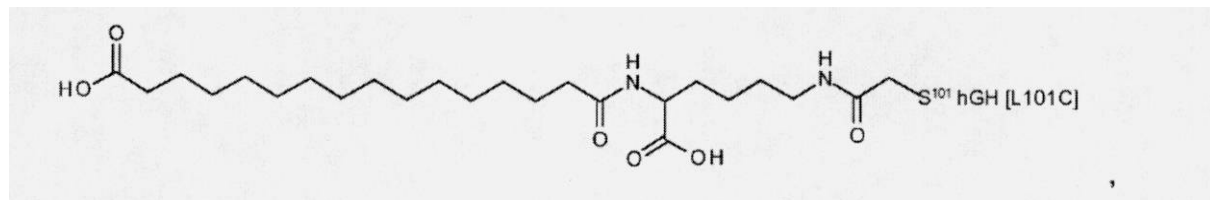
TOF-MS:Rt=16.15分、質量=23315.96

【 0 7 8 1 】

同じ方法を用いて以下の化合物を精製した。

【 0 7 8 2 】

【 化 1 1 3 】



【 0 7 8 3 】

TOF-MS:Rt=15.24分、質量=22676.8

【 0 7 8 4 】

44.3

【 0 7 8 5 】

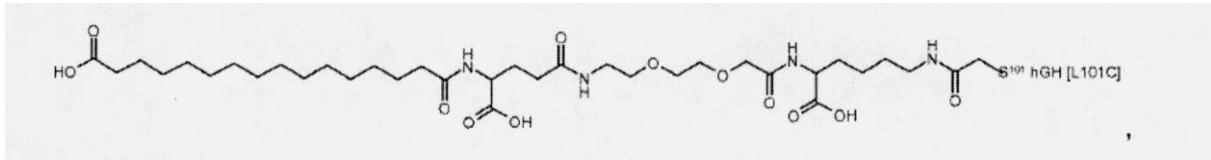
10

20

30

40

【化 1 1 4】



【 0 7 8 6 】

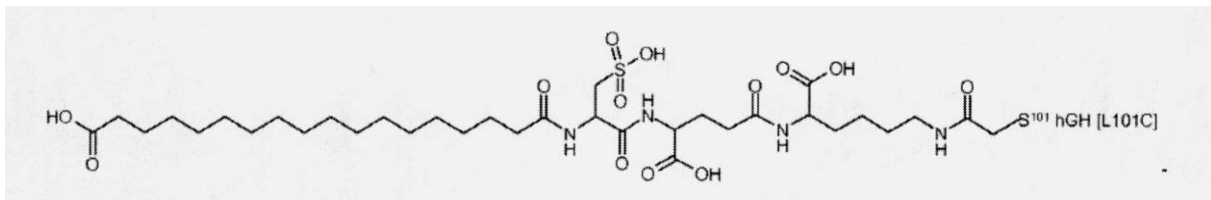
TOF-MS:Rt=10.5分、質量=22975.1

【 0 7 8 7 】

44.4

【 0 7 8 8 】

【化 1 1 5】



【 0 7 8 9 】

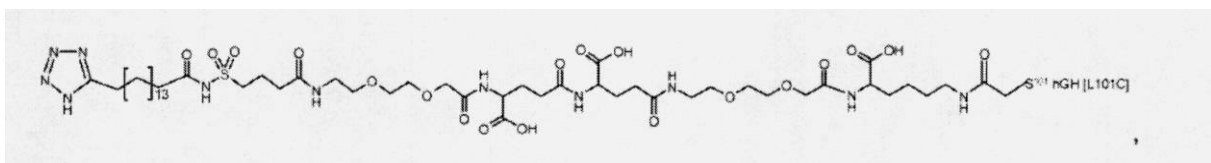
TOF-MS:Rt=15.5分、質量=23009

【 0 7 9 0 】

44.5

【 0 7 9 1 】

【化 1 1 6】



【 0 7 9 2 】

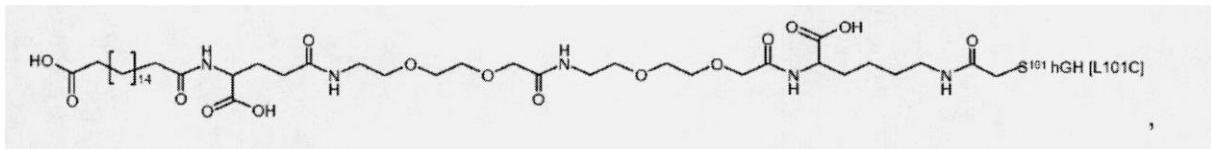
TOF-MS:Rt=14.0分、質量=23305.5

【 0 7 9 3 】

44.6

【 0 7 9 4 】

【化 1 1 7】



【 0 7 9 5 】

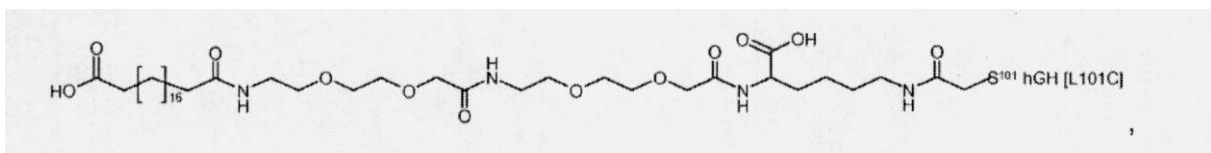
TOF-MS:Rt=15.27分、質量=23148

【 0 7 9 6 】

44.7

【 0 7 9 7 】

【化 1 1 8】



【 0 7 9 8 】

10

20

30

40

50

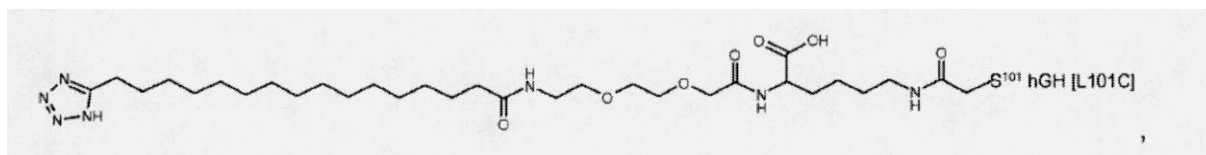
TOF-MS: Rt=16.40分、質量=23048

【 0 7 9 9 】

44.8

【 0 8 0 0 】

【 化 1 1 9 】



【 0 8 0 1 】

10

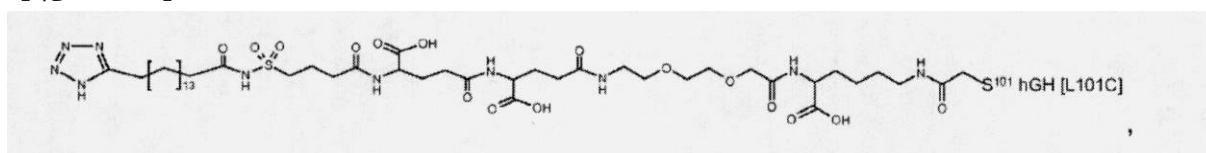
TOF-MS: Rt=15.3分、質量=22884.4

【 0 8 0 2 】

44.9

【 0 8 0 3 】

【 化 1 2 0 】



【 0 8 0 4 】

20

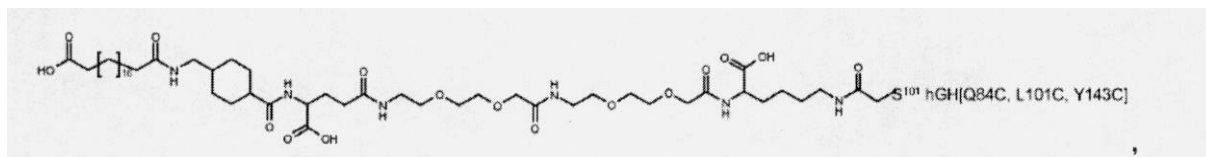
TOF-MS: Rt=14.6分、質量=23291.4

【 0 8 0 5 】

44.10

【 0 8 0 6 】

【 化 1 2 1 】



【 0 8 0 7 】

30

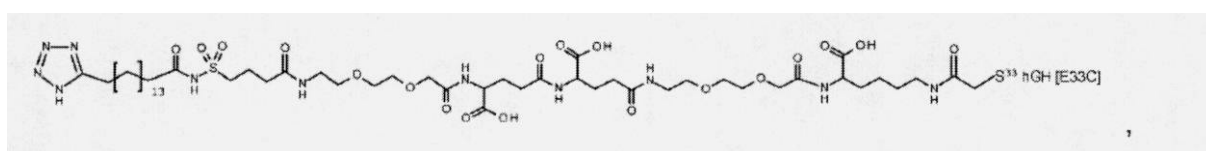
TOF-MS: Rt=15.05分、質量=23097.76

【 0 8 0 8 】

44.11

【 0 8 0 9 】

【 化 1 2 2 】



【 0 8 1 0 】

40

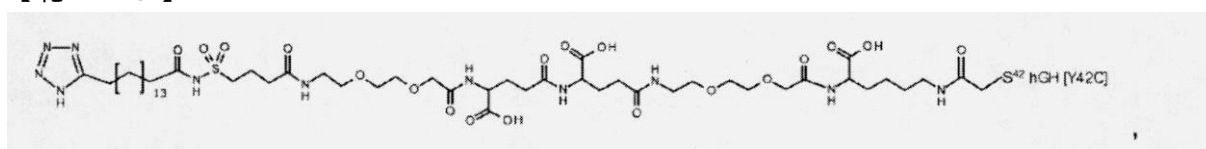
TOF-MS: Rt=14.2分、質量=23420.83

【 0 8 1 1 】

44.12

【 0 8 1 2 】

【 化 1 2 3 】



50

【 0 8 1 3 】

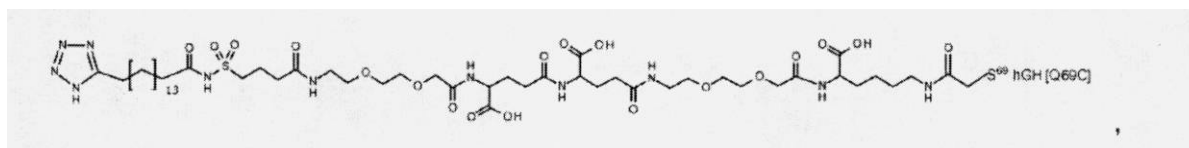
TOF-MS:Rt=15.7分、質量=23289.6

【 0 8 1 4 】

44.13

【 0 8 1 5 】

【 化 1 2 4 】



10

【 0 8 1 6 】

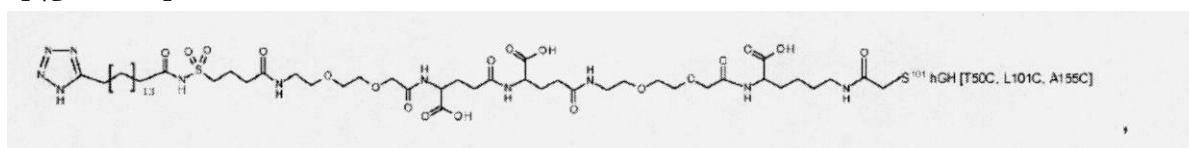
TOF-MS:Rt=17.0分、質量=23324.55

【 0 8 1 7 】

44.15

【 0 8 1 8 】

【 化 1 2 5 】



20

【 0 8 1 9 】

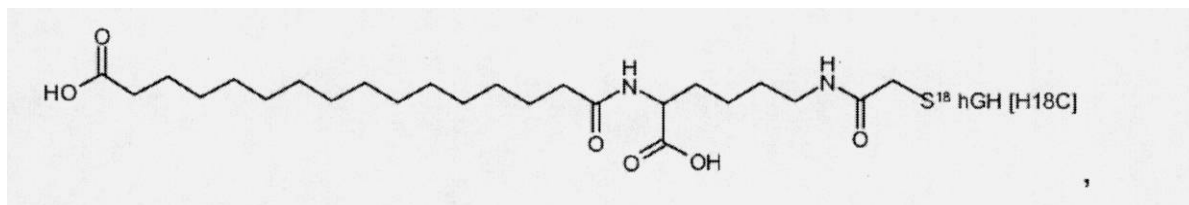
TOF-MS:Rt=12.85分、質量=23337.5

【 0 8 2 0 】

44.16

【 0 8 2 1 】

【 化 1 2 6 】



30

【 0 8 2 2 】

TOF-MS:Rt=15.24分、質量=22676.8

【 0 8 2 3 】

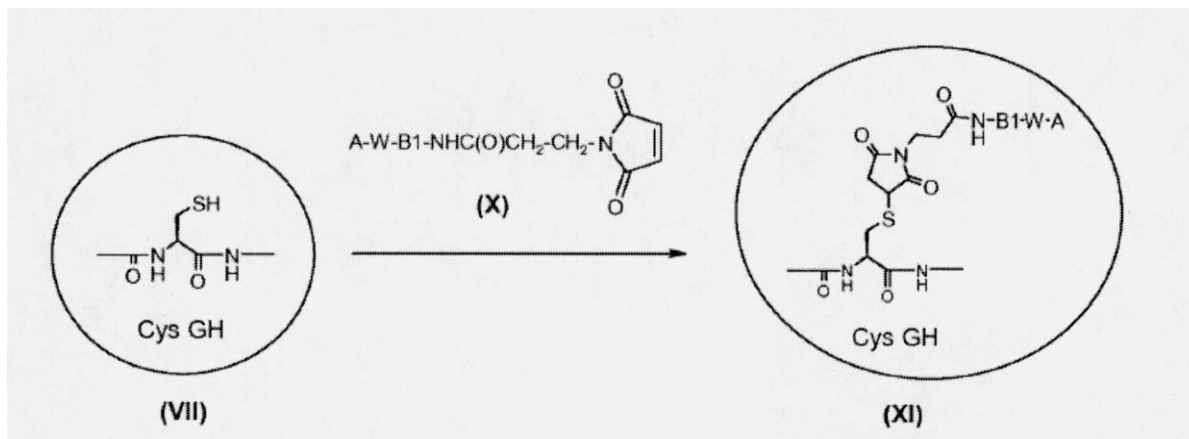
(実施例45)

1. 内部の遊離の単一cysを有するGH化合物(VII)とアルブミン結合剤(X)のカップリング
 1) CysコンジュゲートしたGH化合物(XI)をもたらす、マレイミド置換されたアルブミン結合剤(X)を用いた遊離のCys GH(VII)のアルキル化

【 0 8 2 4 】

40

【化 1 2 7】



10

【 0 8 2 5】

上記の実施例44において得られた脱保護されたCys GH化合物(VII)を、マレイミド置換されたアルブミン結合リンカー(X)と反応させてGHコンジュゲートA-W-B1-NHC(O)CH₂CH₂-ピロリジン-2,5-ジオン-3-hGH(XI)をもたらすことができ、B1は、上記の化学反応IVに記載の通り定義される。

【 0 8 2 6】

マレイミドの官能性をもたせたアルブミン結合剤(X)とhGH L101Cのコンジュゲーションステップ(a)システイン残基の脱遮断

20

グルタチオン/システアミンで遮断されたCys hGH(VI)を、GSHおよびGSSGを含有する平衡緩衝液中のグルタレドキシニンII(Grx2)を使用して酵素によって脱遮断した。脱遮断されたCys hGH(VII)を、Sephadex G25カラムで緩衝液交換することによって低分子GSH/GSSGから分離した。

【 0 8 2 7】

ステップ(b)マレイミドの官能性をもたせたアルブミン結合剤(X)へのカップリング

マレイミドの官能性をもたせたアルブミン結合剤(X)を、5%のヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを含有する緩衝液に溶解させた。次いで、溶液を脱遮断されたCys hGH(VII)に加え、室温で一晩反応させた。

30

【 0 8 2 8】

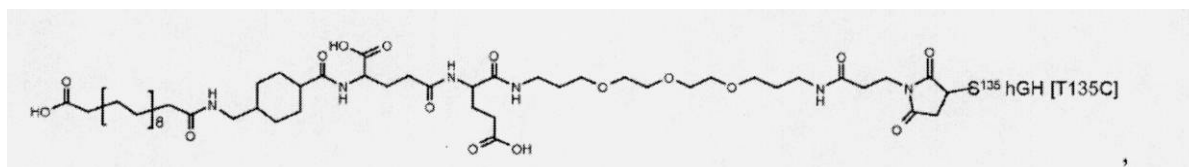
コンジュゲーション後、コンジュゲートしたタンパク質を、QセファロースHiLoadカラムで、10%のエチレングリコールを含有する20mMのトリエタノールアミン緩衝液中、pH8.5で、塩化ナトリウムの勾配を用いて精製した。採取した画分をプールし、G25カラムを使用して10mMの重炭酸アンモニウムに移し、凍結乾燥した。

【 0 8 2 9】

45.1

【 0 8 3 0】

【化 1 2 8】



40

【 0 8 3 1】

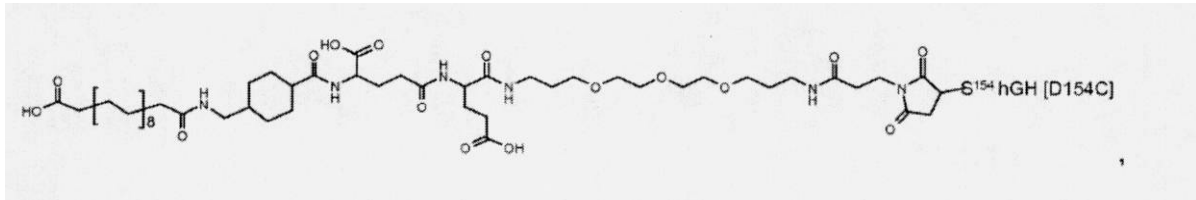
TOF-MS:Rt=16.0分、質量=23352

【 0 8 3 2】

45.2

【 0 8 3 3】

【化 1 2 9】



【 0 8 3 4 】

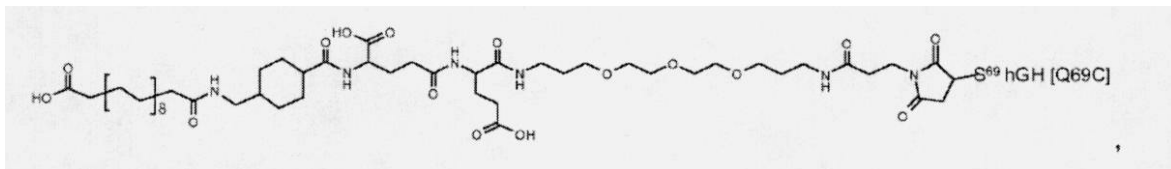
TOF-MS:Rt=15.98分、質量=23338

【 0 8 3 5 】

45.3

【 0 8 3 6 】

【化 1 3 0】



【 0 8 3 7 】

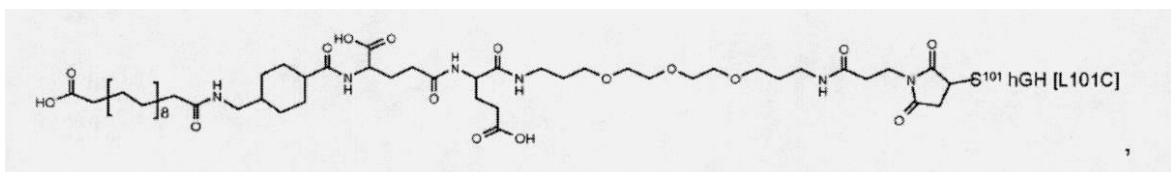
TOF-MS:Rt=16.62分、質量=23324.6

【 0 8 3 8 】

45.4

【 0 8 3 9 】

【化 1 3 1】



【 0 8 4 0 】

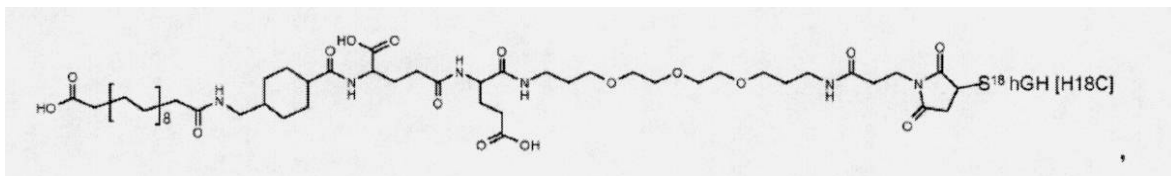
TOF-MS:Rt=16.20分、質量=23339.7

【 0 8 4 1 】

45.5

【 0 8 4 2 】

【化 1 3 2】



【 0 8 4 3 】

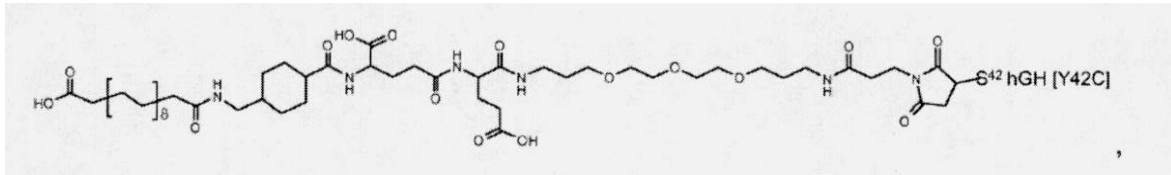
TOF-MS:Rt=15.72分、質量=23316.35

【 0 8 4 4 】

45.6

【 0 8 4 5 】

【化 1 3 3】



【 0 8 4 6 】

TOF-MS:Rt=17.2分、質量=23365.9

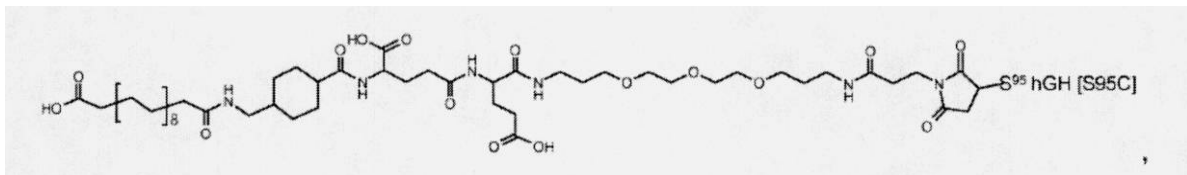
【 0 8 4 7 】

45.7

10

【 0 8 4 8 】

【化 1 3 4】



【 0 8 4 9 】

TOF-MS:Rt=17.2分、質量=23366

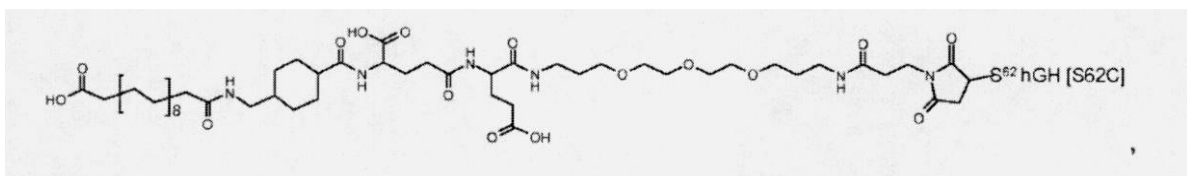
【 0 8 5 0 】

45.8

20

【 0 8 5 1 】

【化 1 3 5】



【 0 8 5 2 】

TOF-MS:Rt=16.5分、質量=23366

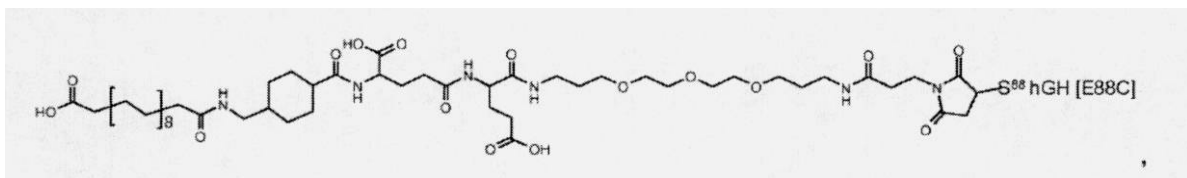
【 0 8 5 3 】

45.9

30

【 0 8 5 4 】

【化 1 3 6】



【 0 8 5 5 】

TOF-MS:Rt=16.8分、質量=23323.8

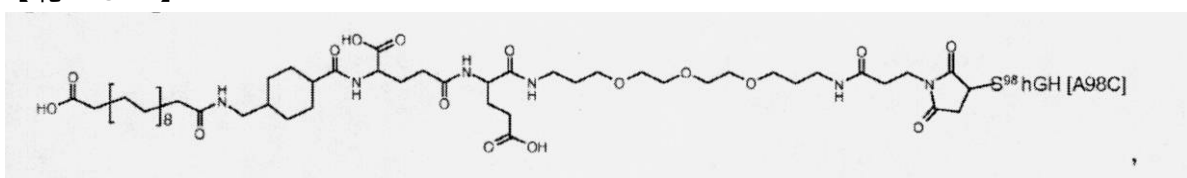
【 0 8 5 6 】

45.10

40

【 0 8 5 7 】

【化 1 3 7】



50

【 0 8 5 8 】

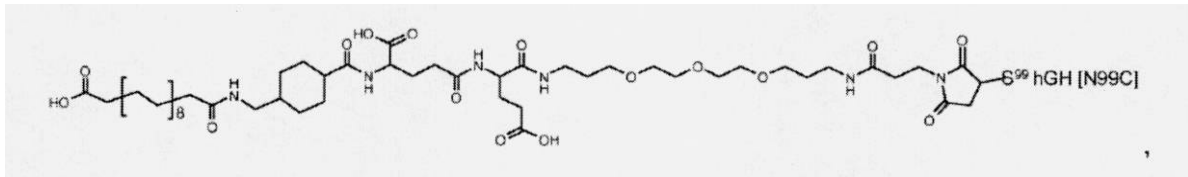
TOF-MS:Rt=17.1分、質量=23382

【 0 8 5 9 】

45.11

【 0 8 6 0 】

【 化 1 3 8 】



10

【 0 8 6 1 】

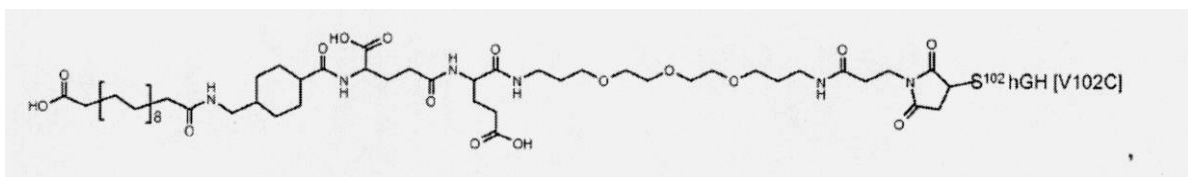
TOF-MS:Rt=17.2分、質量=23338.8

【 0 8 6 2 】

45.12

【 0 8 6 3 】

【 化 1 3 9 】



20

【 0 8 6 4 】

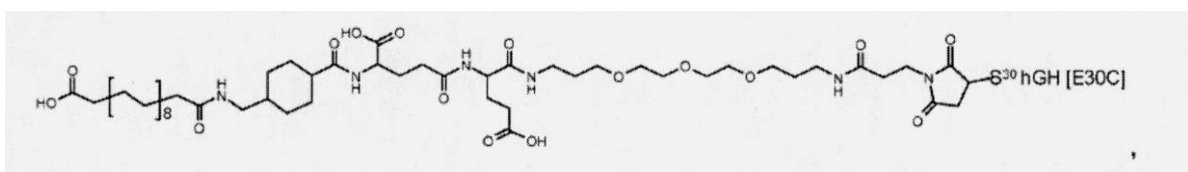
TOF-MS:Rt=17分、質量=23353.9

【 0 8 6 5 】

45.13

【 0 8 6 6 】

【 化 1 4 0 】



30

【 0 8 6 7 】

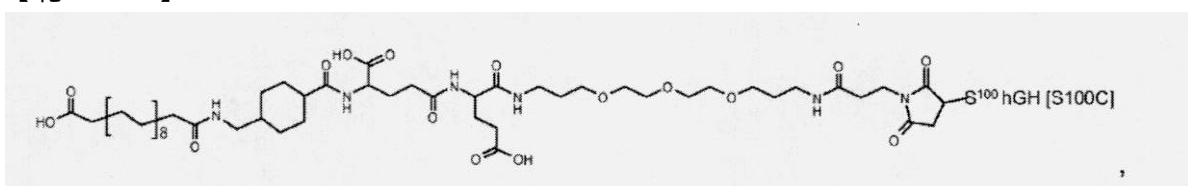
TOF-MS:Rt=15.65分、質量=23323.7

【 0 8 6 8 】

45.14

【 0 8 6 9 】

【 化 1 4 1 】



40

【 0 8 7 0 】

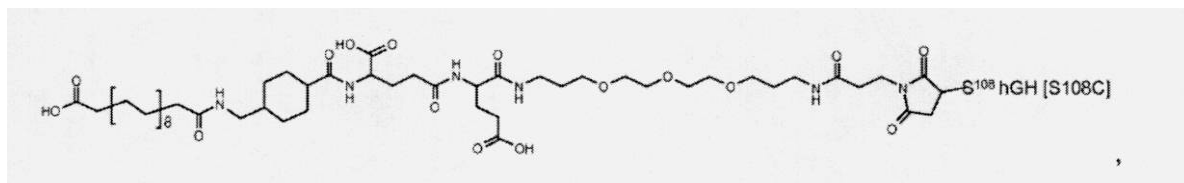
TOF-MS:Rt=16.5分、質量=23365.8

【 0 8 7 1 】

45.15

【 0 8 7 2 】

【化 1 4 2】



【 0 8 7 3 】

TOF-MS:Rt=17.2分、質量=23365.9

【 0 8 7 4 】

(実施例46)

アッセイ(1)成長ホルモン活性を決定するためのBAF-3GHRアッセイ

BAF-3細胞(骨髓に由来するマウスのプロBリンパ様細胞系)は、本来、成長および生存に関してIL-3依存的であった。IL-3は、刺激によりGHが活性化すると同じ介在物質であるJAK-2およびSTATを活性化する。ヒト成長ホルモン受容体をトランスフェクトした後、細胞系は、成長ホルモン依存性の細胞系に変わった。このクローンを使用して、BAF-3GHRの生存に対する種々の成長ホルモン試料の影響を評価することができる。

【 0 8 7 5 】

BAF-3GHR細胞を、飢餓培地(成長ホルモンを伴わない培地)中、37℃、5%のCO₂で24時間成長させる。

【 0 8 7 6 】

細胞を洗浄し、飢餓培地に再懸濁させ、プレートに播種する。10 μLの、種々の濃度の成長ホルモン化合物もしくはヒト成長ホルモンまたは対照を細胞に加え、プレートを37℃、5%のCO₂で68時間インキュベートする。

【 0 8 7 7 】

AlamarBlue(登録商標)を各ウェルに加え、次いで細胞をさらに4時間インキュベートする。AlamarBlue(登録商標)は、酸化還元指標であり、細胞の代謝に生得的な反応によって低下し、したがって、生存可能な細胞数の間接的な測定値をもたらす。

【 0 8 7 8 】

最終的に、細胞の代謝活性を蛍光プレートリーダーで測定する。試料における吸収は、成長ホルモン化合物または対照で刺激されない細胞の百分率(%)で表され、濃度反応曲線から活性(50%の細胞を刺激する化合物の量)を算出することができる。

【 0 8 7 9 】

BAF-3 hGH受容体アッセイにおける化合物45.4のin vitroでの効力が以下のTable 1(表2)に示されている。

【 0 8 8 0 】

化合物45.5のプロテアーゼに対する安定性を、一般的な方法に記載の通り、化合物をキモトリプシンまたはエラスターゼと一緒に4時間インキュベートすることによって決定した。インタクトなGH化合物のパーセントを測定し、その結果はTable 1(表2)に含まれている。

【 0 8 8 1 】

10

20

30

40

【表 2】

表 1. 化合物 45.4 に関するデータ

化合物	EC50 (nM)	比率 (EC ₅₀ cmp/EC ₅₀ hGH)	n	キモトリプシン(イン タクトな GH 化 合物の%)	エラスターゼ(イン タクトな GH 化 合物の%)
hGH	0.026±0.012	1	6	40	25
45.4	0.09±0.043	3.5	6	75	65

10

【0882】

(実施例47)

薬物動態

実施例の化合物の薬物動態を、雄のSprague Dawleyラットにおいて、静脈内(i.v.)および皮下に(s.c.)単回用量を投与した後に調査する。

【0883】

試験化合物を、グリシン20mg/mL、マンニトール2mg/mL、NaHCO₃ 2.5mg/mLからなり、pHを8.2に調整した希釈緩衝液中に希釈して最終濃度を1mg/mLにした。

20

【0884】

試験化合物を、体重250gの雄のSprague Dawleyラットにおいて試験する。試験化合物を、25Gのニードルを用い、体重1kg当たり60nmolの用量で尾静脈i.v.または頸部s.c.のいずれかで単回の注射として投与する。

【0885】

それぞれの試験化合物について、以下のTable 2(表3)に示されているスケジュールに従って血液試料採取を行う。

【0886】

【表 3】

表 2. それぞれの試験化合物についての血液試料採取スケジュール

30

動物番号	RoA	試料採取時間 (h)												
		投与前	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			

40

【0887】

50

各試料採取時間に、25Gのニードルを使用して尾静脈から血液0.25mLを抜き取る。血液をEDTAでコーティングした試験管中に試料採取し、4℃、1200×Gで10分間遠心分離するまで氷上で貯蔵する。血漿をMicronicチューブに移し、分析するまで-20℃で貯蔵する。

【0888】

試験化合物の濃度を、モルモット抗hGHポリクローナル抗体を捕抗体として、およびビオチン化したhGH結合性タンパク質(ヒトGH受容体の可溶性部分)を検出抗体として使用するサンドイッチELISAによって決定する。アッセイの検出限界は0.2nMであった。

【0889】

それぞれの試験化合物の平均の濃度-時間プロファイルに対して、WinNonlin Professional(Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA)を使用して非コンパートメント薬物動態解析を実施する。末端半減期($t_{1/2}$)および平均滞留時間(MRT)の薬物動態パラメータ推定値を算出する。

【0890】

【表4】

Table 3. Sprague Dawley ラットにおける、実施例からの GH 化合物を単回用量で i.v.投与および s.c.投与した後の半減期($t_{1/2}$)および平均滞留時間(MRT)。

化合物 (実施例番号)	RoA	$T_{1/2}$ (h)	MRT (h)
43.0	i.v.	7.2	9.8
43.2	i.v.	4.4	7.4
44.1	i.v.	5.6	7.2
44.3	i.v.	1.3	0.9
44.4	i.v.	2.5	2.7
44.5	i.v.	4.1	6.8
44.6	i.v.	3.2	4.0
44.7	i.v.	3.8	6.0
44.9	i.v.	4.2	6.5
44.10	i.v.	4.1	7.1
45.4	i.v.	8.6	9.8
45.4	s.c.	19.8	31.2
45.12	i.v.	5.8	6.8

【0891】

実施例45.4の生物学的利用能は48.3%と推定された。皮下投与後に血漿濃度が最大になるまでの時間(t_{max})は8.0時間であった。C_{max}は、i.v.投与後およびs.c.投与後に、それぞれ1670nMおよび151nMであった。i.v.投与後ゼロ時間における推定血漿濃度は1710nMであった。

【0892】

(実施例48)

一連の化合物のin vitroでの効力および半減期を上記の通り決定した。化合物のコンジュゲートは同一であるが、Table 4(表5)に記載の変異によって導入された代替のシステインによって付着している。

【0893】

【表 5】

Table 4. *in vitro* での効力および半減期($t_{1/2}$)

化合物	<i>In vitro</i> での効力	$T_{1/2}$ (i.v.ラット) (時間)	MRT (時間)	付着部位 (変異体)
hGH	1.0 (def)	0.23		-
45.1		2.6	3.8	T135C
45.2		2.8	8.7	D154C
45.3		2.1	3.1	Q69C
45.4	2.9	6.3/8.6	7.8/9.8	L101C
45.5		4.1	4.5	L18C
45.6		4.1	5.5	Y42C
45.7		0.72	6.5	S95C
45.8		0.59	2.0	S62C
45.9		1.8	4.1	E88C
45.10	2.6	3.4	4.3	A98C
45.11	3.1	5.8	6.8	N99C
45.12	2.5	1.9	3.0	V102C
45.13	16.5	1.9	2.6	E30C
45.14	4.4	1.5	2.0	S100C

【0894】

(実施例49)

下垂体切除したスプライングドーリー (Sprague Dawley) ラットにおける *in vivo* 用量-反応試験

下垂体切除した雄のスプライングドーリー (Sprague Dawley) ラットにおいて *in vivo* 用量反応関係を試験した。下垂体切除したラットは下垂体を外科的除去した後に成長ホルモンの産生が起らない成長ホルモン欠乏症の動物モデルとして周知であり認められている。これにより、ヒトにおける成長ホルモン欠乏症の別の重要な臨床的特徴であるインスリン様増殖因子1(IGF-1)の循環レベルの低下も導かれる。

【0895】

体重90~100gの4週齢の雄のラットに対して下垂体切除を実施する。外科手術の3~4週間後に体重100~110gの動物を試験に参加させる。外科手術後3~4週間の間に体重が10%増加した動物はこの試験に参加させない。

【0896】

ラット当たり1~150nmolの5つの用量レベルの化合物45.4を使用して用量反応試験を実施する。

【0897】

下垂体切除したスプライングドーリー (Sprague Dawley) ラットにおける血漿IGF-1の基線レベルは、全ての投薬群においておよそ80~100ng/mLであった。単回投与後、1日目にIGF-1レベルは用量とはほとんど関係なく800~1000ng/mLに急速に増加した。血漿IGF-1レベルは、次の数日の間、用量依存的に再び減退し、最低用量で最も速い減退が見られ、最高用量で最も遅い減退が見られた。最高用量では、IGF-1血漿レベルは3日間800~900ng/mL

で維持され、その後、より急速に減退し始めた。IGF-1の血漿濃度レベルは、ビヒクル対照群と比較して、全ての投薬群について3日目まで上昇した。10nmol投薬群、50nmol投薬群および150nmol投薬群については、IGF-1の血漿濃度レベルは、試験全体(7日間)の間、上昇した。

【0898】

(実施例50)

消失

吸収速度は、分子サイズに関連する性質である、分子の、皮下の毛細血管のタイトジャンクションを通過する能力に関連することが仮定される。40kDaのPEGを有するPEG-hGHは、150~250kDaの見かけの分子量(mw)を有する。アルブミンが共有結合したhGH分子はmw=87kDaを有するが、一方アルブミンが非共有結合したhGH分子は、時々アルブミンから解離し、したがってmw=22kDaを有する。解離した状態に費やされる時間は、アルブミン結合部分の親和性に左右される。したがって、そのような化合物の吸収速度は、PEG-hGHよりも速いはずであり、アルブミンに対する親和性がより低いアルブミン結合部分を使用すると速度は増加するはずである。

【0899】

試験溶液を、グリシン20mg/mL、マンニトール2mg/mL、NaHCO₃ 2.4mg/mLからなり、pHを8.2に調整した標準緩衝液に希釈した。

【0900】

Chemistry & Isotope Lab.Novo Nordisk A/Sにより、¹²⁵Iを用いたヨウ素化を行った。最終的な放射性製剤は、3μCi/mLの特異的な放射性の活性を有し、3mLのペンフィル(Penfil)で供給された。

【0901】

溶液を、使用するまで2~8 で貯蔵した。

【0902】

選択された化合物についての消失速度を、交雑したLYDの雌のブタ5匹において測定した。試験を開始する前にブタの体重を量り、絶食させ、ガンマカウンターおよびトランスミッターを保持させるために、特別な「ブタの皮(pig coat)」を給し、単一のペンの中に置いた。

【0903】

全てのブタを、試験前に18時間絶食させた。

【0904】

動物の頸部の左側面および右側面の皮下に、それぞれ、黒い針止めが固定されたNovope n3(登録商標)およびNovoFine(登録商標)の28Gのニードルを用いて投薬した(60nmol)。注射の深さは5mmであった。

【0905】

放射性デポ剤の消失を持ち運びできる装置によって約24~48時間測定した。

【0906】

個々の動物について、結果をTable 5(表6)に示されているようにAUC(0~45時間)として示した。

【0907】

一連の化合物のin vitroでの効力、半減期および別の特性を上記の通り決定し、それがTable 5(表6)に示されている。

【0908】

10

20

30

40

【表 6】

Table 5. 化合物の特性

化合物	<i>In vitro</i> での 効力	$T_{1/2}$ (i.v.ラット) (時間)	消失 AUC (0~45 時間)	IGF-1 の持続時間 増加(時間)
hGH	1.0 (def)	0.23	519	-
44.9	8.2	4.2	2259	>48
44.8	1.8	2.6	1490	>24
44.1	4.7	5.6	1750	>48
44.3	1.5	1.3	2152	<24
44.6	4.7	3.2	1558	<24
44.7	4.5	3.8	2039	<24
44.5	5.8	4.1	1599	>48
44.4	3.9	2.5	1588	>48

【 0 9 0 9 】

(実施例51)

ブタにおける *in vivo* 試験

本発明によるhGHアルブミンコンジュゲートの官能性をさらに確認するために、ブタにおける追加的な薬物動態試験のために3種の化合物を選択した。化合物44.1、44.4および44.5に相当する化合物を、MAEA精製タグを除去した後にアルブミン結合剤とhGH変異体をコンジュゲートして調製した。

【 0 9 1 0 】

試験化合物を希釈して標準緩衝液(20mg/mLのグリシン、2mg/mLのマニトール、2.4mg/mLの NaHCO_3 、pHを8.2に調整した)中の最終濃度を100nmol/mLにした。5ヶ月齢で体重9~12kgの雄のGottingenミニブタ24匹を試験に使用した。それぞれの試験化合物を、8匹の動物に投薬し、うち4匹のミニブタには静脈内ボラス投与を受けさせ、4匹の動物には皮下投与を受けさせた。静脈内注射を耳への24GのVenflonによって与えた。用量を最大5秒間にわたるボラスとして与え、その後0.9%のNaCl 2mLを与えた。皮下注射は、頸部の右側の側面、耳からおよそ5~7cmのところ、および頸部の中央から7~9cmのところを与えた。各動物に、10nmol/kgの試験化合物の単回投与を受けさせた。各動物から以下の時点で血液試料を採取した:投薬前、注射の0.08時間後、0.25時間後、0.5時間後、1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、8時間後、18時間後、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後、120時間後、168時間後、240時間後および336時間後。血漿を各血液試料から単離し、試験化合物について分析する前に-20℃で貯蔵した。血漿濃度-時間データを非コンパートメント薬物動態法によって解析した。

【 0 9 1 1 】

【表 7】

Table 6. 10nmol/kg を皮下の単回投与した後の薬物動態パラメータ推定値

化合物	同様の ABW-ハ口	AUC/用量 (h*kg/l)	T _½ (h)	MRT (h)	MAT (h)	F (%)
51.1	44.1	139 (37.5)	11 (1.2)	30.6 (4.1)	10.0	38.6
51.2	44.5	101 (22.5)	12 (2.7)	25.2 (3.9)	11.6	60.8
51.3	44.4	144 (34.7)	12.6 (3.5)	33.1 (1.7)	12.1	35.6

()内は平均 \pm SDである。

【 0 9 1 2 】

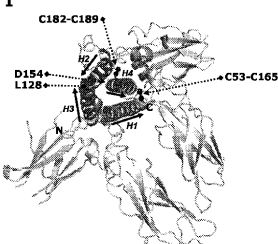
Table 6(表7)は、3種の試験化合物についての重要な薬物動態パラメータを示している。AUC/用量は、試験化合物の用量補正した曝露量の推定値である。 $T_{1/2}$ は、吸収相が完了した後の試験化合物の終末相半減期である。MRTは、平均の試験化合物分子が体内にある時間に対応する試験化合物の平均滞留時間である。MATは、平均吸収時間に対応し、分子が吸収相にある平均時間の推定値である。Fは、静脈内投与と比較した、試験化合物の絶対的な生物学的利用能である。

10

20

【图 1】

Figure 1



【圖 2】

Figure 2

1 FPTTIPLEPLD DDAIMRANNNI HOIARSTYGR PREARYIPKQ KYSFLQNPQT SLGFSKSIPT
61 PSNRRETPQQR SNILSLRLGI LLIOSLPPT GELSTSTNS LVIYGASDNN YLLIKOLGG
121 YQTNGRLSD GSPRTGQIFK QTYGKFDINS RNDALLNQT GLYICFASH TRVETPLSTY
181 QRSVEGSCG F

【配列表】

0005875527000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ニルス・ランゲラン・ヨハンセン
デンマーク・DK - 2 8 8 0 ・バウスベア・ノヴォ・アレ・（番地なし）・ノヴォ・ノルディスク
・アーノエス
- (72)発明者 ヘンリク・スーン・アンデルセン
デンマーク・DK - 2 8 8 0 ・バウスベア・ノヴォ・アレ・（番地なし）・ノヴォ・ノルディスク
・アーノエス
- (72)発明者 ライフ・ナアスコフ・ローリッセン
デンマーク・DK - 2 8 8 0 ・バウスベア・ノヴォ・アレ・（番地なし）・ノヴォ・ノルディスク
・アーノエス
- (72)発明者 イェンス・ブッチャート
デンマーク・DK - 2 8 8 0 ・バウスベア・ノヴォ・アレ・（番地なし）・ノヴォ・ノルディスク
・アーノエス

審査官 野村 英雄

- (56)参考文献 国際公開第2010/029159(WO, A1)
国際公開第2010/015668(WO, A1)
特表2004-524020(JP, A)
特表2007-505840(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 14/61
CAplus/REGISTRY(STN)
MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)