



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102112157 B

(45) 授权公告日 2013. 05. 29

(21) 申请号 200980130961. 1

A61P 7/04 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 08. 06

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

08161905. 8 2008. 08. 06 EP

W0 2006013202 A, 2006. 02. 09, 权利要求

11.

W0 2008003750 A, 2008. 01. 10, 第 20 页第 1

行—第 22 页第 5 行.

W0 2005027978 A, 2005. 03. 31, 权利要求

38.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2011. 02. 01

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/EP2009/060186 2009. 08. 06

审查员 刘启明

(87) PCT 申请的公布数据

W02010/015668 EN 2010. 02. 11

(73) 专利权人 诺沃—诺迪斯克保健股份有限公

司

地址 瑞士苏黎世

(72) 发明人 C·贝伦斯 P·W·加里贝

S·奥斯特加尔德 H·S·安德森

N·L·约翰森 B·佩施克 S·巴克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李进 李炳爱

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006. 01)

权利要求书10页 说明书83页

(54) 发明名称

具有延长的体内效能的缀合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及缀合蛋白、尤其但非唯一的凝血因子、用于制备所述缀合物的方法、包含所述缀合物的药物组合物以及所述缀合物在治疗中的用途、尤其但非唯一地在治疗由凝血因子缓解的疾病例如预防性治疗血友病中的用途。

1. 一种用于制备缀合蛋白或缀合糖蛋白的方法,其包括以下步骤:在任选取代的环糊精分子存在下,使蛋白或糖蛋白与水不溶性的白蛋白结合物反应。

2. 权利要求1的方法,其中所述环糊精分子包括任选被一个或多个 C_{1-6} 烷基取代的环糊精,所述 C_{1-6} 烷基中的每一个可任选被一个或多个羟基取代。

3. 权利要求2的方法,其中所述 C_{1-6} 烷基选自甲基、乙基或丙基。

4. 权利要求3的方法,其中所述环糊精选自羟乙基-环糊精或羟丙基-环糊精。

5. 权利要求2的方法,其中所述环糊精为 β -环糊精。

6. 权利要求5的方法,其中所述环糊精为 2-羟乙基- β -环糊精。

7. 权利要求1或权利要求2的方法,其中所述任选取代的环糊精分子以 1%至 10% 的浓度加入。

8. 权利要求7的方法,其中所述浓度为 5%。

9. 权利要求1或权利要求2的方法,其包括在含水缓冲溶液中反应。

10. 权利要求9的方法,其中所述含水缓冲溶液为 Hepes 缓冲液。

11. 权利要求9的方法,其中所述含水缓冲溶液为 50mM Hepes, 100mM NaCl 和 10mM $CaCl_2$ 。

12. 权利要求1或权利要求2的方法,其中所述白蛋白结合物在 1-辛醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯中都具有 > 1 的 $cLog P$ 。

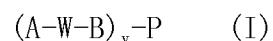
13. 权利要求12的方法,其中 $cLog P > 2$ 。

14. 权利要求13的方法,其中 $cLog P > 3$ 。

15. 权利要求14的方法,其中 $cLog P > 4$ 。

16. 权利要求15的方法,其中 $cLog P > 5$ 。

17. 权利要求1或权利要求2的方法,其中所述蛋白缀合物为下式 (I) 的蛋白缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药:



其中

P 表示蛋白或糖蛋白;

B 表示亲水间隔物;

W 为连接 A 和 B 的化学基团;

A 表示白蛋白结合残基;以及

y 表示选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 的整数;

使得所述 A-W-B- 部分包含水不溶性部分。

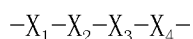
18. 权利要求1或权利要求2的方法,其中所述蛋白表示凝血因子。

19. 权利要求18的方法,其中所述凝血因子选自 FVII、FX、FII、FV、蛋白 C、蛋白 S、tPA、PAI-1、组织因子、FXI、FXII 和 FXIII 以及其序列 FVIII、FIX 变体。

20. 权利要求18的方法,其中所述凝血因子为 FVII。

21. 权利要求18的方法,其中所述凝血因子为 FVIIa。

22. 权利要求17的方法,其中所述亲水间隔物具有下式:



其中

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

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

X_3 为 $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$,

X_4 为 $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$,

$I1$ 、 $I2$ 、 $I3$ 、 $I4$ 、 $I5$ 和 $I6$ 独立选自 0-16,

$m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 和 $m7$ 独立选自 0-10,

$m2$ 和 $m5$ 独立选自 0-25,

$n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 和 $n4$ 独立选自 0-16,

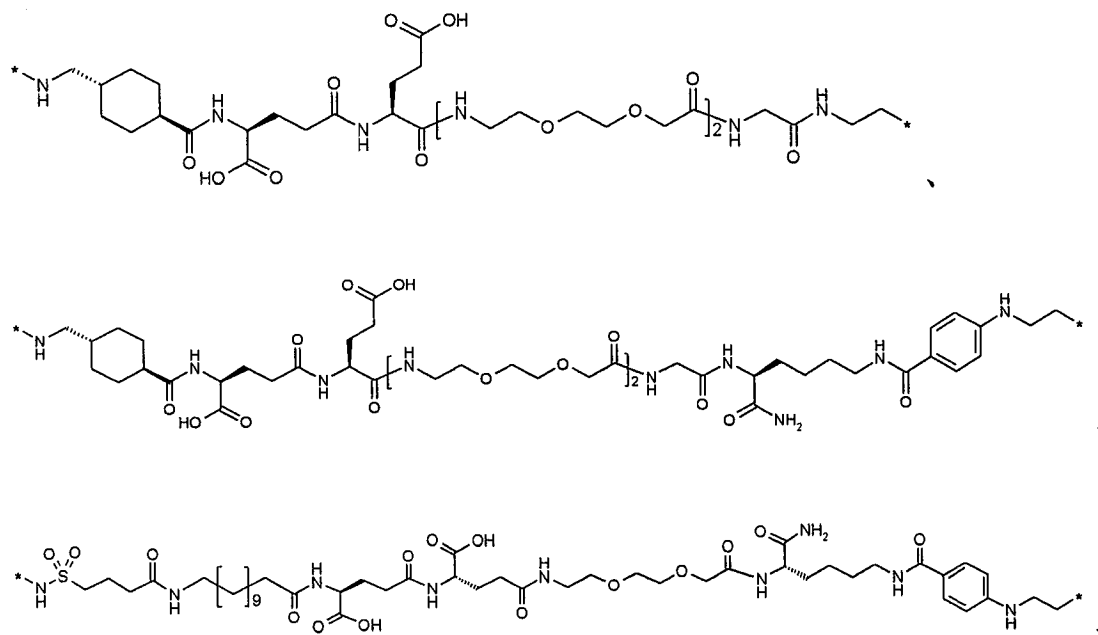
F 为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮 c , 其中所述芳基和杂芳基任选用卤素、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} -烷基取代,

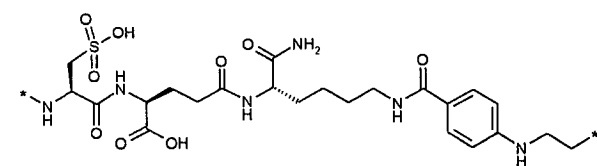
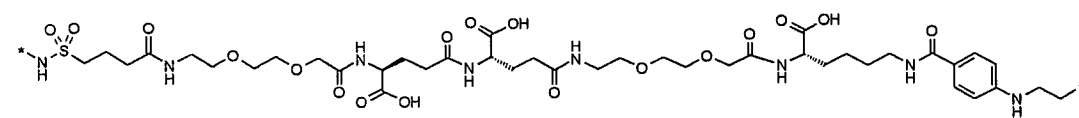
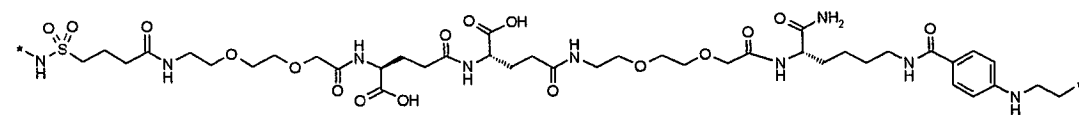
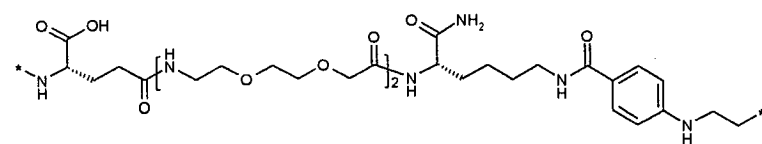
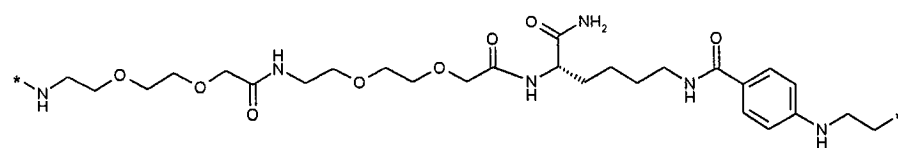
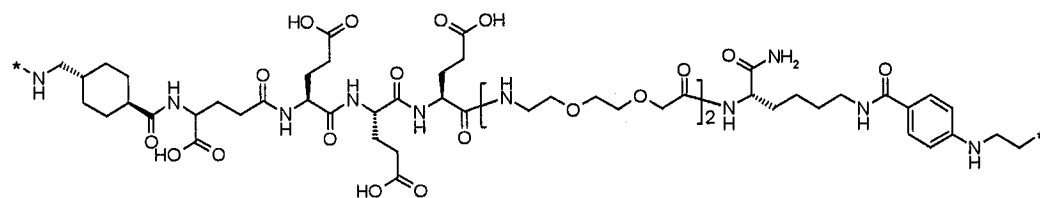
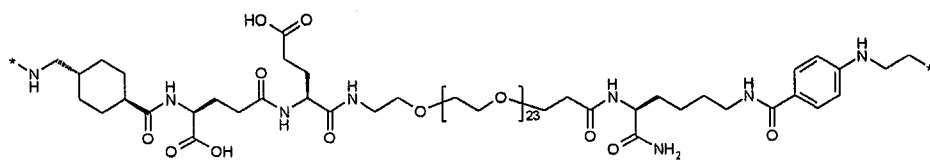
R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 独立选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 C_{1-6} -烷基、芳基或杂芳基; 其中所述烷基、芳基和杂芳基任选用卤素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ 或 $-OH$ 取代,

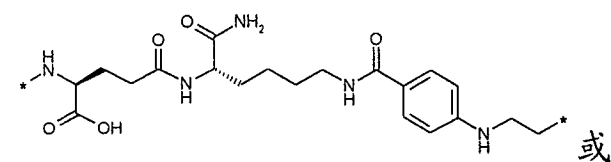
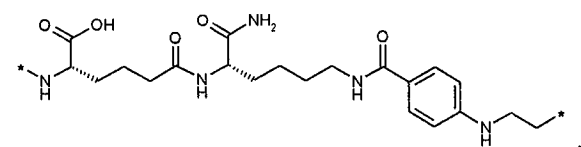
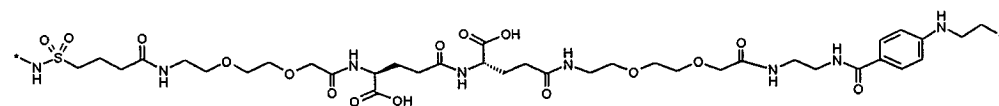
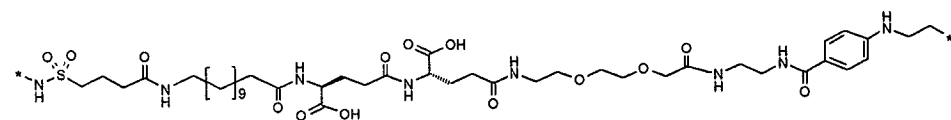
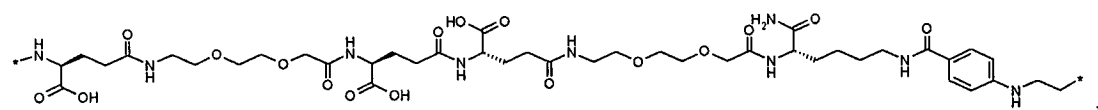
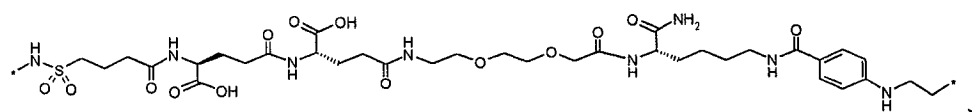
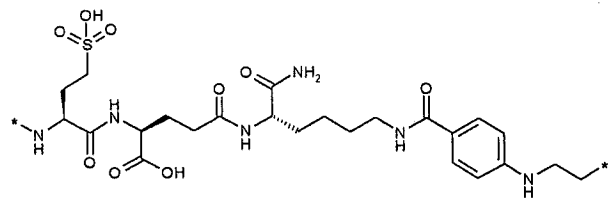
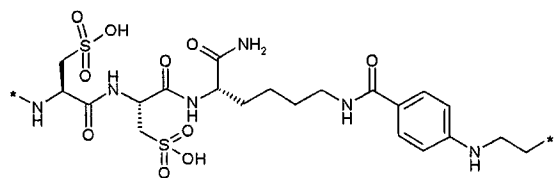
$D1$ 、 $D2$ 、 $E1$ 和 $E2$ 独立选自 $-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-N(COR^7)-$ 或价键; 其中 R^6 和 R^7 独立表示氢或 C_{1-6} -烷基,

W_1 至 W_6 独立选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或价键; 其中 $s2$ 为 0 或 1。

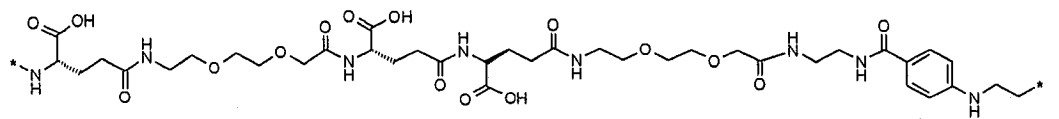
23. 权利要求 17 的方法, 其中所述亲水间隔物选自:



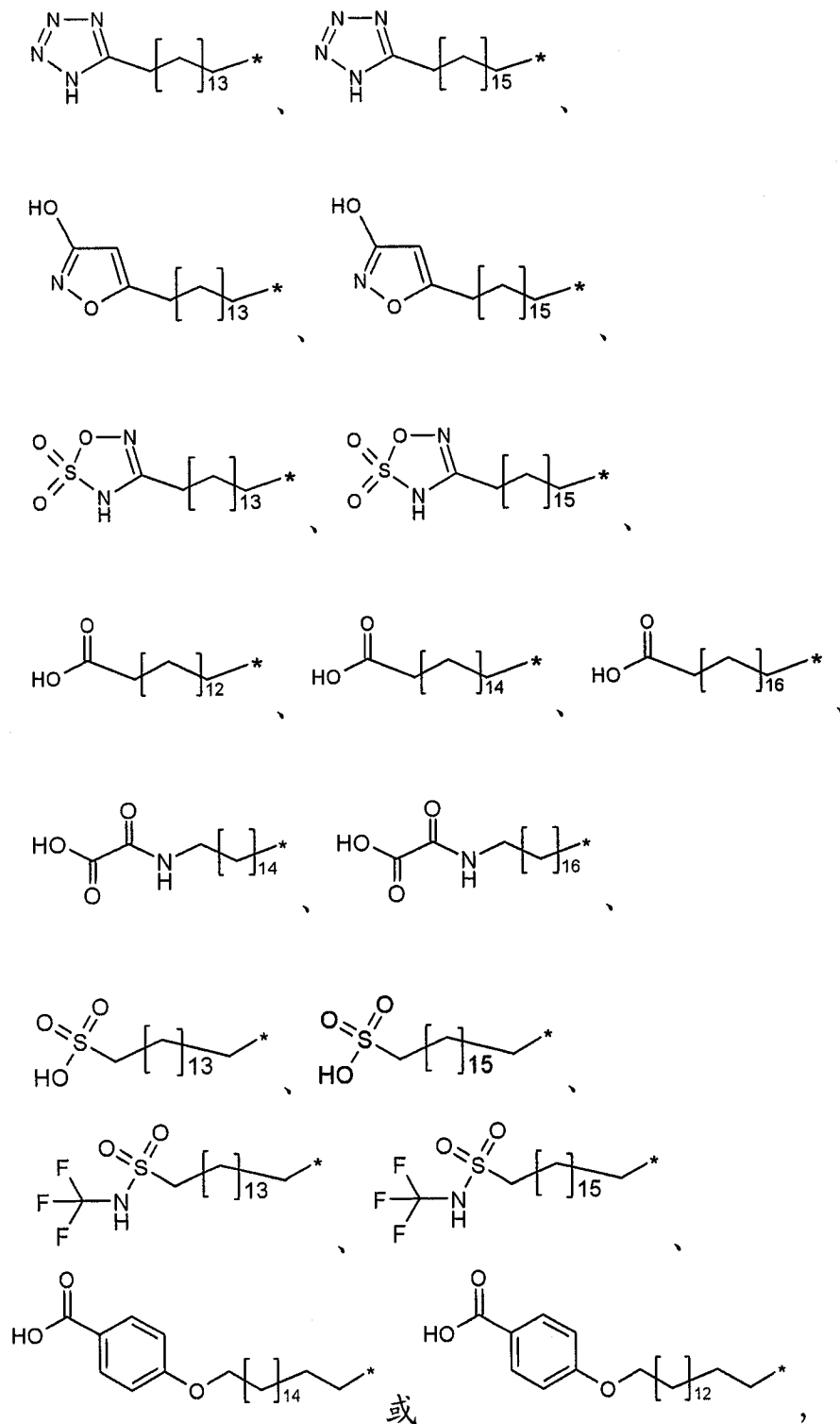




或



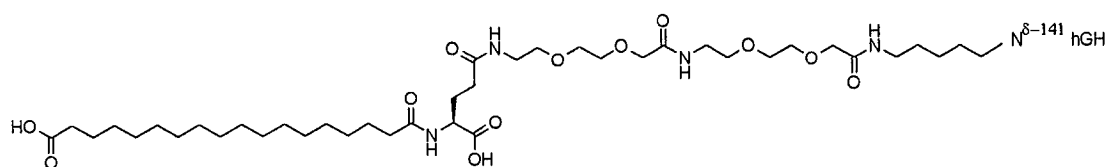
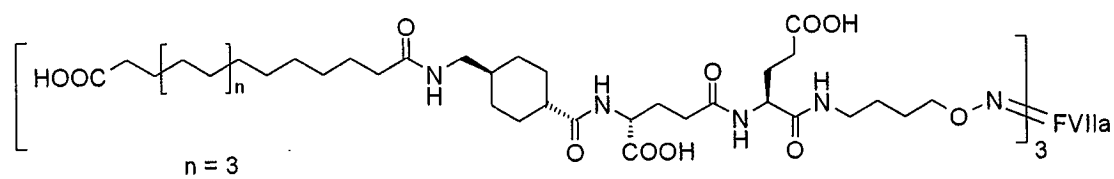
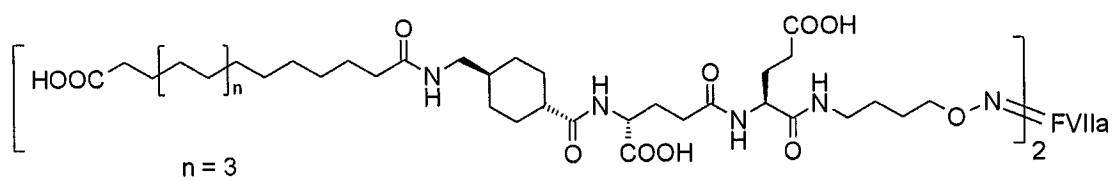
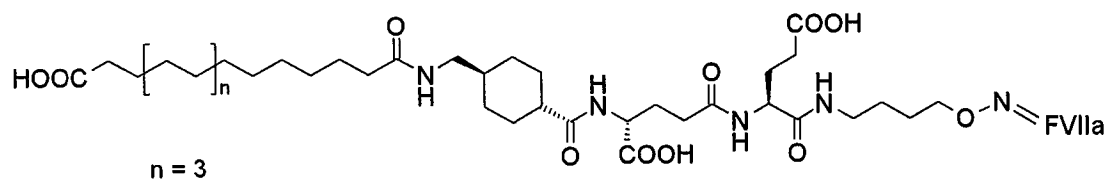
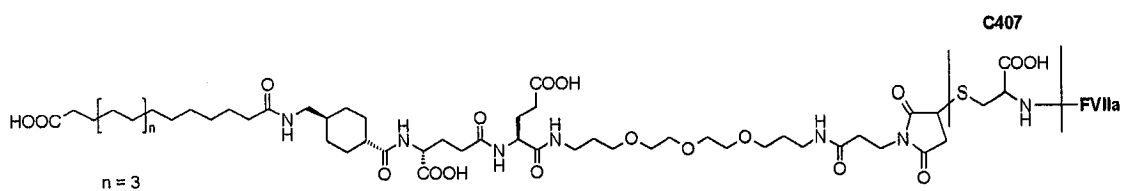
24. 权利要求 17 的方法, 其中所述白蛋白结合物选自:

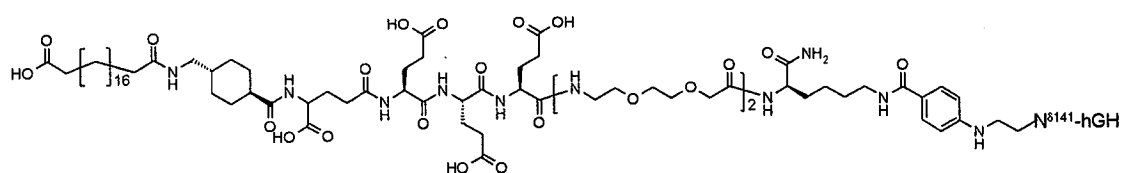
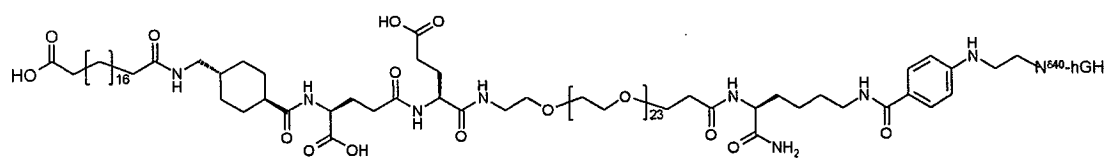
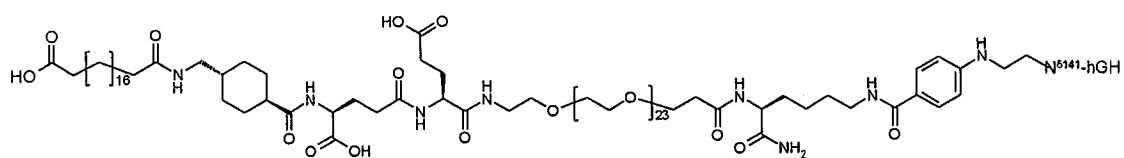
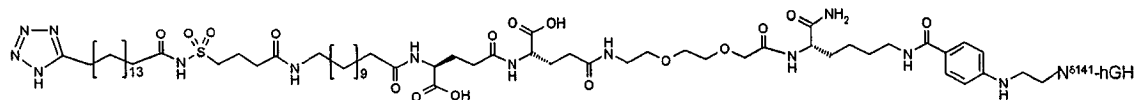
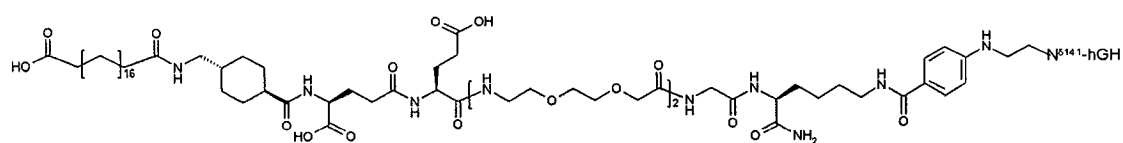
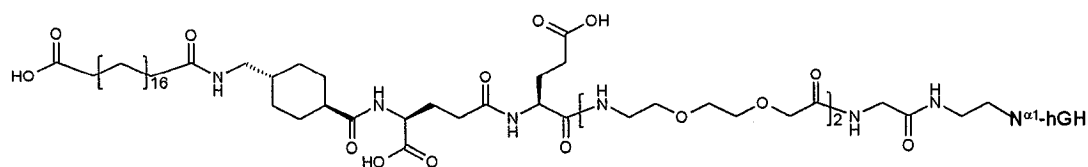
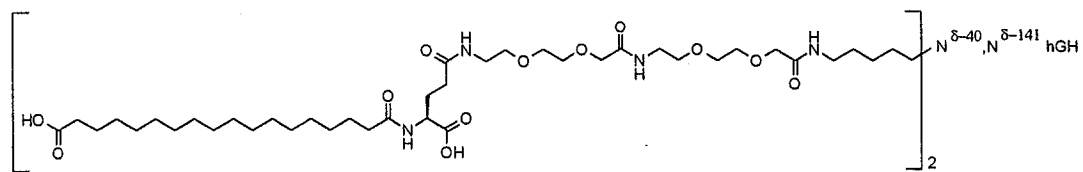


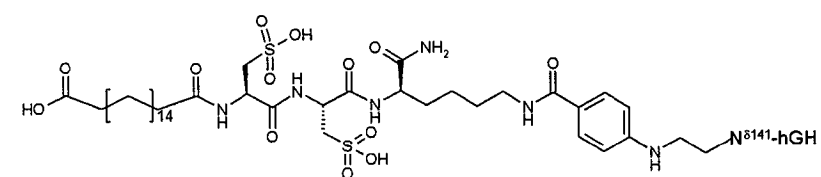
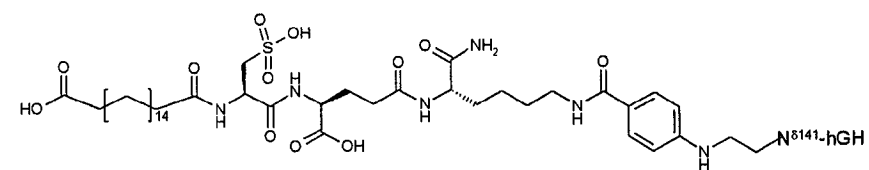
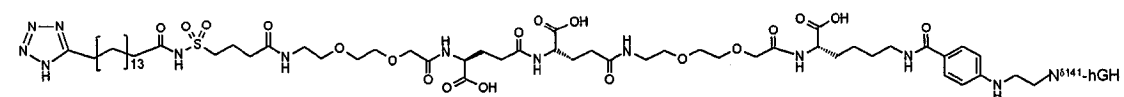
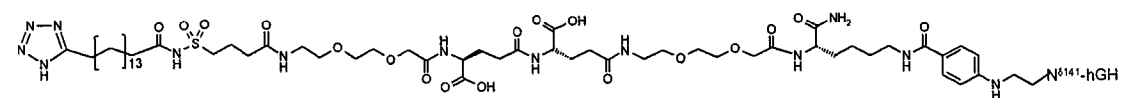
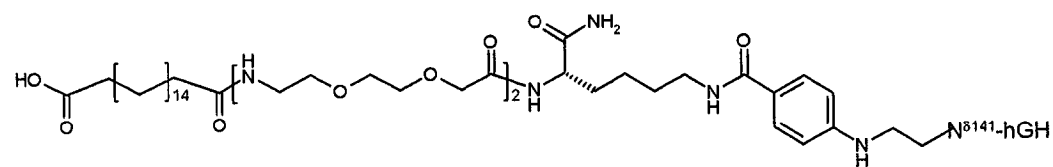
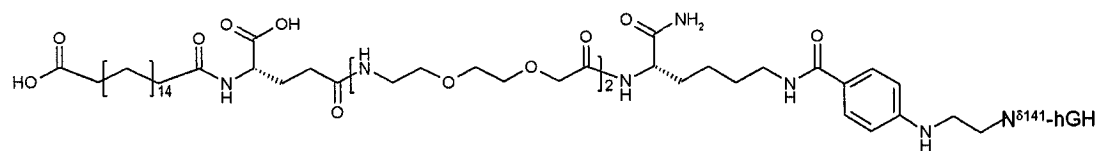
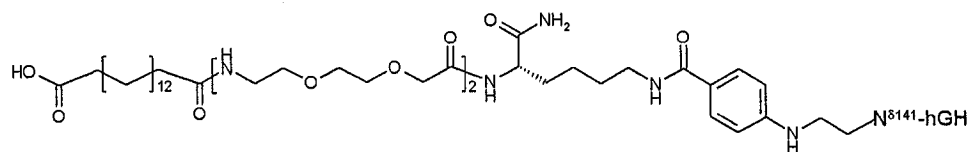
其中 * 表示通过 W 连接至 B。

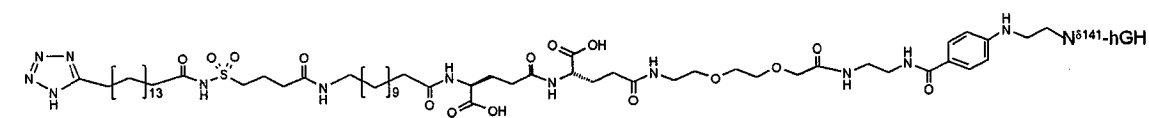
25. 一种通过权利要求 17-24 中任一项的方法得到的缀合蛋白。

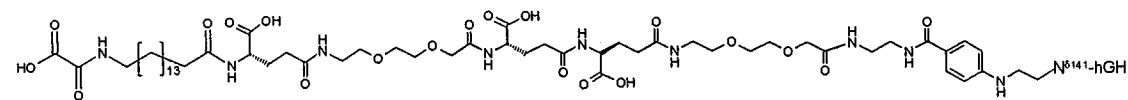
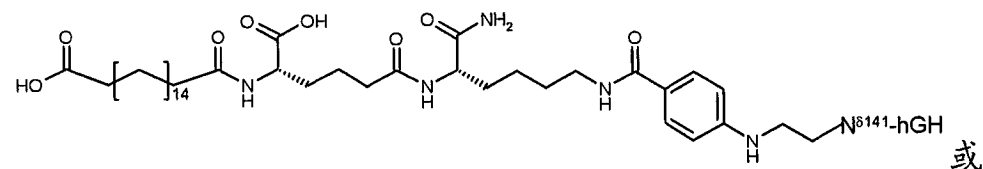
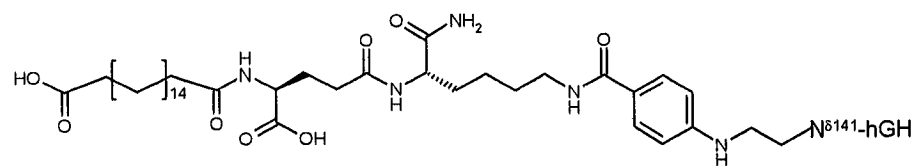
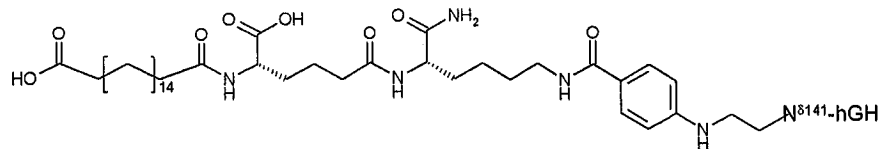
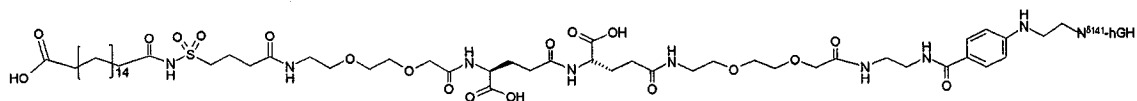
26. 一种选自以下的蛋白缀合物:











27. 一种用于治疗的权利要求 25 或权利要求 26 的蛋白缀合物。

28. 一种药物组合物,其包含任选与药学上可接受的赋形剂联合的权利要求 25 或权利要求 26 的蛋白缀合物。

29. 一种用于血友病的预防性治疗的按照权利要求 18 的方法得到的缀合蛋白。

具有延长的体内效能的缀合蛋白

发明领域

[0001] 本发明涉及缀合蛋白、尤其但非唯一的凝血因子、用于制备所述缀合物的方法、包含所述缀合物的药物组合物以及所述缀合物在治疗中的用途、尤其但非唯一地在治疗由凝血因子缓解的疾病例如预防性治疗血友病中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 凝血为由各种血液组分（或因子）的复杂相互作用组成的过程，其最终形成纤维蛋白凝块。一般而言，参与称为凝血“级联”的血液组分，为酶促无活性蛋白（酶原（proenzyme 或 zymogen）），其通过激活剂（其自身为活化的凝血因子）的作用转化为蛋白水解酶。经过这样的转化的凝血因子通常称为“活性因子”，并且通过加字母“a”至该凝血因子名称中来命名（例如因子 VII(a)）。

[0004] 对于重度血友病患者而言，有需要从按需治疗向预防性方案转变以防止出血和继发的关节损伤。然而，由于其循环半寿期短，凝血因子例如 FVIII、FIX 和 FVIIa 对长期预防性治疗是特别不理想的，因为需要高剂量和频繁注射两者以维持药理学相关的血浆水平。因此，目前的焦点针对开发较适于预防性用途的长效类似物。

[0005] 聚乙二醇化（Pegylation）为用于延长蛋白的循环半寿期的已确立方法。然而，由于细胞膜内的凝血因子、其它凝血因子和辅因子的相互作用界面大，因此进行化学修饰而不会导致活性有害丧失的可能性很小。

[0006] 因此，有极大的需要为血友病的预防性治疗提供具有血浆半寿期增加的凝血因子。

[0007] WO 2005/027978 (Novo Nordisk A/S) 描述了具有作用延长特性的胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 的衍生物，其中所述多肽通过亲水间隔物连接至白蛋白结合残基。

[0008] 因此，本发明提供具有改进的药理学性质的新型蛋白缀合物以及其制备方法。

[0009] 发明简述

[0010] 本发明的第一个方面提供用于制备缀合蛋白或缀合糖蛋白的方法，所述方法包括以下步骤：在任选取代的环糊精分子存在下，使蛋白或糖蛋白与水不溶性的白蛋白结合物反应。

[0011] 本发明的第二个方面提供蛋白缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药，所述蛋白缀合物包含通过亲水间隔物连接至白蛋白结合残基的蛋白或糖蛋白。

[0012] 本方面的另一个方面提供下式 (I) 的蛋白缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药：

[0013] $(A-W-B)_y-P$ (I)

[0014] 其中

[0015] P 表示蛋白或糖蛋白；

[0016] B 表示亲水间隔物；

[0017] W 为连接 A 和 B 的化学基团；

[0018] A 表示白蛋白结合残基；以及

[0019] y 表示选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 的整数。

[0020] 本发明的第三个方面提供用于制备缀合凝血因子的方法,所述方法包括以下步骤:使如本文所定义的凝血因子与如本文所定义的修饰基团(modifier group)反应。

[0021] 本发明的另一个方面提供缀合凝血因子,其包含缀合至如本文所定义的修饰基团的如本文所定义的凝血因子。

[0022] 本发明的另一个方面提供治疗血友病的方法,所述方法包括给予患者治疗有效量的如本文所定义的缀合凝血因子。

[0023] 定义

[0024] 本文所用术语“蛋白”“多肽”和“肽”意指由经肽键连接的至少五个组成性氨基酸(constituent amino acid)组成的化合物。所述组成性氨基酸可来自遗传密码编码的氨基酸,而且它们可为非由遗传密码编码的天然氨基酸以及合成氨基酸。非由遗传密码编码的天然氨基酸例如:羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、鸟氨酸、磷酸丝氨酸、D-丙氨酸和 D-谷氨酰胺。合成的氨基酸包括通过化学合成制备的氨基酸,即由遗传密码编码的氨基酸的 D-异构体例如 D-丙氨酸和 D-亮氨酸、Aib(α -氨基异丁酸)、Abu(α -氨基丁酸)、Tle(叔丁基甘氨酸)、 β -丙氨酸、3-氨基甲基苯甲酸和邻氨基苯甲酸。应认识到的是,本文所用关于蛋白或糖蛋白的术语“缀合(的)”是指与本发明白蛋白结合残基的特定缀合。还应认识到的是,用于本发明缀合方法的蛋白或糖蛋白可已经与其它部分例如糖部分缀合。

[0025] 本文所用术语“糖蛋白”是指包含共价连接至其多肽侧链的寡糖链(聚糖)的蛋白。应认识到的是,当糖蛋白用于本发明缀合方法中时,白蛋白结合残基可通过聚糖残基连接至所述糖蛋白。

[0026] 在本文范围之内,本文所用术语“生长激素化合物”意指哺乳动物源的生长激素(例如人、牛或猪生长激素)和重组生长激素(例如重组人、牛或猪生长激素)以及这类生长激素的变体。本文所用“GH”和“生长激素化合物”为可交换的。当 GH 为哺乳动物源生长激素的变体例如 hGH 和重组 hGH 时,所述变体应理解为通过以下步骤获得的化合物:用另一种天然或非天然氨基酸取代生长激素例如 hGH 序列中的一个或多个氨基酸残基;和/或将一个或多个天然或非天然氨基酸添加至生长激素例如 hGH 序列中;和/或在生长激素例如 hGH 序列中缺失一个或多个氨基酸残基,其中任何这些步骤可任选后接一个或多个氨基酸残基的进一步衍生。具体而言,在一个氨基酸残基被来自相同组别的另一个氨基酸残基(即被具有类似性质的另一个氨基酸残基)所取代的情况下,这类取代为保守的。根据其性质,氨基酸可适宜地分为以下组别:碱性氨基酸(例如精氨酸、赖氨酸、组氨酸)、酸性氨基酸(例如谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(例如谷氨酰胺、半胱氨酸和天冬酰胺)、疏水氨基酸(例如亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸)、芳族氨基酸(例如苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸)和小氨基酸(例如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸)。通常,GH 与 hGH 具有至少 80% 的同一性,并且通常具有如本文测定 I 中测定的 hGH 生长激素活性的至少 20%。

[0027] 在本文范围之内,本文所用术语“白蛋白结合残基”意指非共价地结合至人血清白蛋白的残基。连接至蛋白或糖蛋白的白蛋白结合残基通常具有低于约 $10\ \mu\text{M}$ 或甚至低于约 $1\ \mu\text{M}$ 的对人血清白蛋白的结合亲和力。已知白蛋白结合残基的范围在含 12-40 个碳原子的直链和支链亲脂部分、具有环戊烷并菲骨架的化合物和/或具有 10-45 个氨基酸残基的肽等之中。白蛋白结合特性可通过如 J. Biol. Chem. 277(38), 35035-35042, (2002) 中所述的

表面等离子共振法测量。

[0028] 本文所用术语“亲水间隔物”意指用化学部分将蛋白或糖蛋白与白蛋白结合残基间隔开的间隔物,所述化学部分包含至少 5 个非氢原子,其中非氢原子的 30-50% 为 N 或 O。

[0029] 术语“水不溶性的”是指具有 $cLogP > 0$ 的部分。

[0030] 术语“水溶性的”是至具有 $cLogP < 0$ 的部分。

[0031] 在本文范围之内,术语“转氨基作用”和相关术语旨在表示以下反应:其中谷氨酰胺侧链的酰胺氮被来自另一种化合物的氮尤其是来自另一种含氮亲核体的氮所交换。

[0032] 在本文范围之内,术语“不可接近的”旨在表示从其不能被触及的意义而言,某物不存在或实际上不存在。当表明在待缀合的蛋白中官能团不可接近时,这旨在表示所述官能团不存在于蛋白中或者如果存在,在某种程度上被妨碍参与反应。作为实例,所述官能团可深埋于蛋白结构中,使得其被屏蔽而不能参与反应。应认识到的是,官能团是否可接近依赖于反应条件。可设想的是,例如在存在变性剂或在高温下,蛋白可解折叠而暴露另外的不可接近的官能团。应理解的是,“不可接近的”意指“在为特定目标反应所选定的反应条件下不可接近”。

[0033] 术语“烷烃”或“烷基”旨在表示饱和、直链、支链和 / 或环烃。除非用另一个碳原子数指明,否则所述术语旨在表示具有 1-30 个 (包括端值) 碳原子的烃,例如 1-20 个 (包括端值),例如 1-10 个 (包括端值),例如 1-5 个 (包括端值)。术语烷基和亚烷基分别是指对应的自由基和双自由基。

[0034] 术语“ C_{1-6} 烷基”是指包含 1-6 个碳原子的在内直链或支链饱和烃。这类基团的实例包括但不限于甲基、2- 丙基、1- 丁基、2- 丁基、2- 甲基 -2- 丙基、2- 甲基 -1- 丁基和正己基。

[0035] 术语“ C_{3-10} 环烷基”通常是指环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环壬基和环癸基。

[0036] 术语“烯烃”旨在表示包含至少一个碳 - 碳双键的直链、支链和 / 或环烃。除非用另一个碳原子数指明,否则所述术语旨在表示具有 2-30 个 (包括端值) 碳原子的烃,例如 2-20 个 (包括端值),例如 2-10 个 (包括端值),例如 2-5 个 (包括端值)。术语烯基和亚烯基分别是指对应的自由基和双自由基。

[0037] 术语“炔烃”旨在表示包含至少一个碳 - 碳三键的直链、支链和 / 或环烃,并且其可任选包含一个或多个碳 - 碳双键。除非用另一个碳原子数指明,否则所述术语旨在表示具有 2-30 个 (包括端值) 碳原子的烃,例如 2-20 个 (包括端值),例如 2-10 个 (包括端值),例如 2-5 个 (包括端值)。术语炔基和亚炔基分别是指对应的自由基和双自由基。

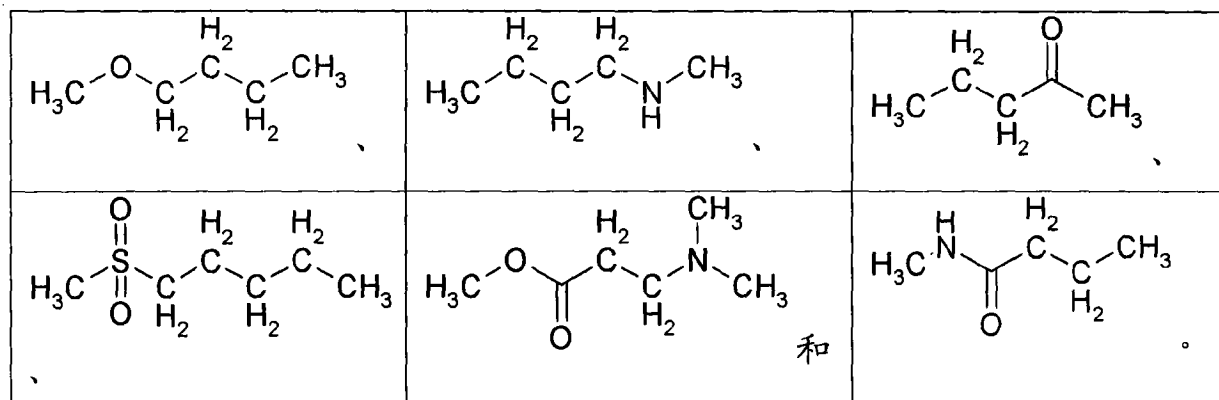
[0038] 术语“同素环状芳族化合物”旨在表示芳族烃,例如苯和萘。

[0039] 术语“杂环化合物”旨在表示以下环状化合物:其包含 5、6 或 7 个环原子,其中 1、2、3 或 4 个环原子为选自 N、O 和 / 或 S 的杂原子。实例包括杂环芳族化合物,例如噻吩、呋喃、吡喃、吡咯、咪唑、吡唑、异噻唑、异噁唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪以及其部分或完全氢化的同等物,例如哌啶、吡唑烷 (pirazolidine)、吡咯烷、吡咯啉 (pyrroline)、咪唑烷、咪唑啉、哌嗪和吗啉。

[0040] 术语“杂烷烃”“杂烯烃”和“杂炔烃”旨在表示其中一个或多个杂原子或基团已插入所述部分的结构中的如上文所定义的烷烃、烯烃和炔烃。杂基团和杂原子的实例包括 -O

—、—S—、—S(O)—、—S(O)₂—、—C(O)—、—C(S)—和—N(R*)—, 其中 R* 表示氢或 C₁–C₆–烷基。杂烷烃的实例包括:

[0041]



[0042] 术语“自由基”或“双自由基”旨在表示已从其中分别除去一个或两个氢原子的化合物。当具体指出时, 自由基还可表示通过从化合物中形式上除去较大原子基团例如羟基所形成的部分。

[0043] 术语“卤素”旨在表示周期表的第七主族的成员, 例如 F、Cl、Br 和 I。

[0044] 在本文范围之内, 术语“芳基”旨在表示碳环芳环自由基或其中至少一个环为芳族的稠合芳环系统自由基。典型的芳基包括苯基、联苯基、萘基等。

[0045] 本文单独或联合使用的术语“杂芳基 (heteroaryl 或 hetaryl)”是指包含一个或多个选自氮、氧或硫杂原子的杂原子作为环原子的具有例如 5–7 个环原子的芳环自由基或具有例如 7–18 个环原子的稠合芳环系统自由基 (其中至少一个环为芳族的), 其中 N 氧化物和硫一氧化物和硫 dioxide 为允许的芳杂环取代物 (heteroaromatic substitution)。实例包括呋喃基、噻吩基、苯硫基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、噻唑基、**噁**唑基、**噁**二唑基、噻二唑基、异噻唑基、吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、嘧啶基、喹啉基、异喹啉基、苯并呋喃基、苯并苯硫基、吲哚基和吲唑基等。

[0046] 本文用于化学结构中的星号标记表示存在适于连接的断开键 (open bond)。

[0047] 术语“缀合 (物)”作为名词时旨在表示修饰蛋白, 即具有连接至所述蛋白以改变其性质的部分的蛋白。作为动词, 所述术语旨在表示连接部分至蛋白以改变所述蛋白性质的过程。

[0048] 本文所用术语“前药”表示可生物水解的酰胺和可生物水解的酯并且还包括 a) 以下化合物: 其中在这类前药中的可生物水解的官能团 (functionality) 包含在本发明的化合物之内; 和 b) 以下化合物: 其在给定的官能团上可被生物氧化或还原以产生本发明药物。这些官能团的实例包括 1,4-二氢吡啶、N-烷基羰基-1,4-二氢吡啶、1,4-环己二烯、叔丁基等。

[0049] 本文所用术语“可生物水解的酯”为药物 (在本情形中为本发明化合物) 的酯, 其 a) 不会干扰母体物质的生物活性但赋予该物质有利的体内特性, 例如作用持久、起效等, 或 b) 为生物无活性的但在体内容易被受试者转化为生物活性要素。优势在于例如溶解度增加或可生物水解的酯口服后被肠道吸收, 然后在血浆中转化为本发明化合物。此类可生物水解的酯的许多实例为本领域已知并包括作为实例的低级烷基酯 (例如 C₁–C₄)、低级酰氧基

烷基酯、低级烷氧基酰氧基烷基酯、烷氧基酰氧基酯、烷基酰氨基烷基酯和胆碱酯。

[0050] 本文所用术语“可生物水解的酰胺”为药物（在本情形中为本发明化合物）的酰胺，其 a) 不会干扰母体物质的生物活性但赋予该物质有利的体内特性，例如作用持久、起效等，或 b) 为生物无活性的但在体内容易被受试者转化为生物活性要素。优势在于例如溶解度增加或可生物水解的酰胺口服后被肠道吸收，然后在血浆中转化为本发明化合物。此类可生物水解的酰胺的许多实例为本领域已知并包括作为实例的低级烷基酰胺、 α -氨基酸酰胺、烷氧基酰基酰胺和烷基氨基烷基羰基酰胺

[0051] 在本文的范围之内，术语“药学上可接受的盐”旨在表示对患者无不利作用的盐。这类盐包括药学上可接受的酸加成盐、药学上可接受的金属盐、铵盐和烷化铵盐。酸加成盐包括无机酸和有机酸的盐。合适的无机酸的代表性实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硫酸、硝酸等。合适的有机酸的代表性实例包括甲酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、丙酸、苯甲酸、肉桂酸、柠檬酸、延胡索酸、乙醇酸、乳酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、杏仁酸、草酸、苦味酸、丙酮酸、水杨酸、琥珀酸、甲磺酸、乙磺酸、酒石酸、抗坏血酸、扑酸、双亚甲基水杨酸、乙二磺酸、葡萄糖酸、柠康酸、天冬氨酸、硬脂酸、棕榈酸、EDTA、乙醇酸、对氨基苯甲酸、谷氨酸、苯磺酸、对甲苯磺酸等。药学上可接受的无机酸或有机酸加成盐的另外的实例包括 J. Pharm. Sci. 66, 2, (1977) 中所列的药学上可接受的盐，所述文献通过引用结合于本文中。金属盐的实例包括锂盐、钠盐、钾盐、镁盐等。铵盐和烷化铵盐的实例包括铵盐、甲基铵盐、二甲基铵盐、三甲基铵盐、乙基铵盐、羟乙基铵盐、二乙基铵盐、丁基铵盐、四甲基铵盐等。

[0052] 本文所用的化合物的“治疗有效量”意指足以治愈、减轻或部分阻止既定疾病和其并发症的临床表现的量。足以实现此效果的量定义为“治疗有效量”。用于各种目的的有效量取决于疾病或损伤的严重程度以及受试者的重量和一般状况。应理解的是，确定合适的剂量可利用常规试验，通过构建值的矩阵并测试矩阵中的不同点来实现，这全部在受过训练的医师或兽医的普通技术范围内。

[0053] 本文所用术语“疗法”和“治疗”意指以对抗诸如疾病或病症等的病状为目的处理和护理患者。所述术语旨在包括针对患者正在遭受的既定病状的全方位的治疗，例如给予活性化合物，以缓解症状或并发症、以推迟疾病、病症或病状的进展、以缓解或减轻症状和并发症、和 / 或以治愈或消除疾病、病症或病状以及以预防病状，其中预防应理解为出于对抗疾病、病状或病症的目的处理和护理患者并且包括给予活性化合物以预防症状或并发症的发病。待治疗的患者优选为哺乳动物、特别为人，但其还可包括动物，例如狗、猫、牛、绵羊和猪。

[0054] 本文所用的提及多肽的术语“类似物”意指修饰的肽，其中所述肽的一个或多个氨基酸残基已被其它氨基酸残基所取代，和 / 或其中已从所述肽中缺失一个或多个氨基酸残基，和 / 或其中一个或多个氨基酸残基已被添加至所述肽中。氨基酸残基的此类添加或缺失可发生在肽的 N 端和 / 或肽的 C 端。对于未说明旋光异构类型的所有氨基酸，其都应理解为意指 L- 异构体。

[0055] 术语“体内功能半寿期”以其常规含义使用，即修饰蛋白或参比分子的生物活性的 50% 仍存在于身体 / 靶器官时的时间，或者修饰蛋白或参比分子的活性降至其峰值的 50% 所需的时间。作为测定体内功能半寿期的备选，可测定“体内血浆半寿期”，即在被清除之前，50% 修饰蛋白或参比分子循环于血浆或血流中时的时间。测定血浆半寿期通常比测定

功能半寿期更简单,而且血浆半寿期量值通常为体内功能半寿期量值的良好指标。血浆半寿期的其它术语包括血清半寿期、循环半寿期、循环的半寿期、血清清除率、血浆清除率和清除半寿期。待保留的功能通常选自与特定蛋白相关的促凝活性、蛋白水解活性、辅因子结合活性、受体结合活性或其它类型的生物活性。

[0056] 体内生物半寿期的测量可以如文献中所述的许多方式进行。用于测量 rFVIIa 和其变体的体内半寿期的测定法的使用修饰 FVIIa (凝血因子 VIIa) 的一个实例描述于 FDA 参考号 96-0597 中。简而言之,在血浆中测量 FVIIa 凝血活性,所述血浆在给予修饰蛋白之前和之后的 24 小时期间抽取。测量在稳态下分布的中值表观容积并确定中值清除率。

[0057] 所用关于体内功能半寿期或血浆半寿期的术语“增加的”表示修饰蛋白的相关半寿期相对于参比分子的为统计学显著增加的,参比分子为例如其它同样的但未经过本发明方法处理的蛋白。因此,半寿期在可作比较的条件下测定。例如相关半寿期可增加至少约 25%,例如至少约 50%,例如至少约 100%、150%、200%、250%或 500%。在某些实施方案中,与未修饰蛋白的半寿期相比,本发明修饰蛋白显示半寿期增加至少约 0.25h、优选至少约 0.5h、更优选至少约 1h、最优选至少约 2h。

[0058] 术语“生物利用度”是指在给药后的预定时间于血浆中可检测的缀合物的给予剂量的比例。通常,生物利用度在测试动物中如下进行测量:给予一剂约 25-250 μ g/kg 的制剂;在给药后的预定时间获得血浆样品;以及使用合适的生物测定法或免疫测定法或等价测定法测定样品中蛋白的含量。数据通常图示为[蛋白]与时间的关系曲线,而生物利用度表示为曲线下面积(AUC)。测试制剂的相对生物利用度是指测试制剂的 AUC 与未修饰蛋白的 AUC 的比值。

[0059] 术语制剂的“免疫原性”是指当给予人时,制剂引起有害免疫应答(体液免疫应答、细胞免疫应答或两者的免疫应答)的能力。在任何人类亚群中,可存在对特定给予蛋白表现敏感性的个体。可通过使用本领域已知的常规方法定量敏感个体中存在的抗-蛋白抗体和/或蛋白反应性 T 细胞,来测定免疫原性。在某些实施方案中,与未修饰蛋白对敏感个体的免疫原性相比,本发明修饰蛋白显示该个体中的免疫原性减少至少约 10%、优选至少约 25%、更优选至少约 40%、最优选至少约 50%。

[0060] 药物的免疫原性还与以下事实有关:蛋白类药物在非敏感受试者中可为免疫原性的,这意味重复给予药物导致针对该药物的免疫应答的持续加强。这在大多数情况下是不合乎需要的,因为该免疫应答会干扰药物的活性,因而有需要随着时间增加所给予的药物剂量以提供疗效。在某些实施方案中,与未修饰蛋白对非敏感受试者的免疫原性相比,本发明修饰蛋白显示该个体中的免疫原性减少至少约 10%、优选至少约 25%、更优选至少约 40%、最优选至少约 50%。

[0061] 本文所用提及蛋白的术语“蛋白酶保护的”意指以下蛋白:其已经过化学修饰以赋予所述化合物对血浆肽酶或蛋白酶的抗性。已知血浆中的蛋白酶参与数种肽激素的降解并且还在降解较大的蛋白中起一定的作用。

[0062] 蛋白对例如二肽基氨肽酶 IV (DPPIV) 的降解的抗性通过以下降解测定法测定:在 37°C 下于 100 μ L 0.1M pH 7.4 三乙胺-HCl 缓冲液中,将等分的蛋白(5nmol)与 1 μ L 纯化二肽基氨肽酶 IV(相应酶活为 5mU)一起保温 10-180 分钟。通过加入 5 μ L 10%三氟乙酸终止酶促反应,然后使用 HPLC 分析分离和定量肽降解产物。用于进行该分析的一种方法

为:将混合物施加至 Vydac C18 大孔 (30nm 孔, 5 μ m 颗粒) 250 $\times$ 4.6mm 柱中, 按照 Siegel 等, Regul. Pept. 1999 ;79 :93-102 和 Mentlein 等 Eur. J. Biochem. 1993 ;214 :829-35, 用在 0.1% 三氟乙酸中的乙腈的线性阶式梯度 (0% 乙腈持续 3 分钟, 0-24% 乙腈持续 17 分钟, 24-48% 乙腈持续 1 分钟) 以 1ml/ 分钟的流速洗脱。肽及其降解产物可通过其在 220nm (肽键) 或 280nm (芳族氨基酸) 下的吸光度监测, 并通过其相对于标准品的峰面积积分进行定量。二肽基氨肽酶 IV 水解肽的速率在导致少于 10% 的肽被水解的保温时间下进行评估。所述实验可任选在白蛋白存在下进行, 以便研究白蛋白络合作用产生的屏蔽特性。

[0063] 术语“含水制剂”定义为含至少 50% 重量 / 重量水的制剂。同样, 术语“水溶液”定义为含至少 50% 重量 / 重量水的溶液, 而术语“含水混悬剂”定义为含至少 50% 重量 / 重量水的混悬剂。

[0064] 本领域已知的术语“同一性”是指通过比较序列而确定的两种或更多种蛋白的序列之间的关系。在本领域中, “同一性”还意指由两条或更多条氨基酸残基链之间的匹配数确定的蛋白之间的序列相关程度。“同一性”衡量由特定数学模型或计算机程序 (即“算法”) 得出的两条或更多条具有空位比对 (如果有的话) 的序列中较小一者之间的相同匹配百分比。相关蛋白的同一性可容易地通过已知方法计算。这类方法包括但不限于描述于以下文献中的方法: Computational Molecular Biology (计算分子生物学), Lesk, A. M., 编辑, Oxford University Press, New York, 1988 ; Biocomputing: Informatics and Genome Projects (生物计算: 信息和基因工程), Smith, D. W., 编辑, Academic Press, New York, 1993 ; Computer Analysis of Sequence Data (序列数据的计算机分析), 第 1 部分, Griffin, A. M., 和 Griffin, H. G., 编辑, Humana Press, New Jersey, 1994 ; Sequence Analysis in Molecular Biology (分子生物学中的序列分析), von Heinje, G., Academic Press, 1987 ; Sequence Analysis Primer (序列分析引物), Gribskov, M. 和 Devereux, J., 编辑, M. Stockton Press, New York, 1991 ; 和 Carillo 等, SIAM J. Applied Math., 48, 1073, (1988)。

[0065] 将测定同一性的优选方法设计以得到受测序列之间的最大匹配。测定同一性的方法描述于公众可获得的计算机程序。测定两个序列之间的同一性的优选计算机程序方法包括 GCG 程序包 (包括 GAP (Devereux 等, Nucl. Acid. Res., 12, 387, (1984) ; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.))、BLASTP、BLASTN、和 FASTA (Altschul 等, J. Mol. Biol., 215, 403-410, (1990))。BLASTX 程序公众可获得自国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) 和其它来源 (BLAST Manual (BLAST 手册), Altschul 等 NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894 ; Altschul 等, 见上文)。熟知的 Smith Waterman 算法也可用于测定同一性。

[0066] 例如, 使用计算机算法 GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), 对待测定百分比序列同一性的两种蛋白进行比对以使其各自的氨基酸最大匹配 (“匹配全长 (matched span)”, 由所述算法测定)。空位开放罚分 (其计算为 3 乘以平均对角线 ; “平均对角线” 为正在使用的比较矩阵的对角线的平均值 ; “对角线” 为由特定比较矩阵分配至各个完全匹配氨基酸的分数或数字) 和空位延伸罚分 (其通常为 { 分数 (1/10) } 乘以空位开放罚分) 以及比较矩阵例如 PAM 250 或 BLOSUM 62 与所述算法一起使用。所述算法也使用标准比较矩阵 (关于 PAM 250 比较矩阵参见 Dayhoff

等, Atlas of Protein Sequence and Structure(蛋白序列和结构图谱), 第5卷, 增刊3(1978); 关于BLOSUM 62比较矩阵参见Henikoff等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10915-10919, (1992))。

[0067] 用于蛋白序列比较的优选参数包括以下:

[0068] 算法: Needleman等, J. Mol. Biol, 48, 443-453, (1970); 比较矩阵: BLOSUM 62, 来自Henikoff等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10915-10919, (1992); 空位罚分: 12, 空位长度罚分: 4, 相似性阈值: 0。

[0069] 使用上述参数的GAP程序为可用的。上述参数为使用GAP算法的蛋白比较的缺省参数(连同对末端空位不罚分)。

[0070] 发明详述

[0071] 本发明的第一个方面提供用于制备缀合蛋白或缀合糖蛋白的方法, 所述方法包括以下步骤: 在任选取代的环糊精分子存在下, 使蛋白或糖蛋白与水不溶性的白蛋白结合物反应。

[0072] 在一个实施方案中, 蛋白缀合物为下式(I)的蛋白缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药:

[0073] $(A-W-B)_y-P$ (I)

[0074] 其中

[0075] P表示蛋白或糖蛋白;

[0076] B表示亲水间隔物;

[0077] W为连接A和B的化学基团;

[0078] A表示白蛋白结合残基; 以及

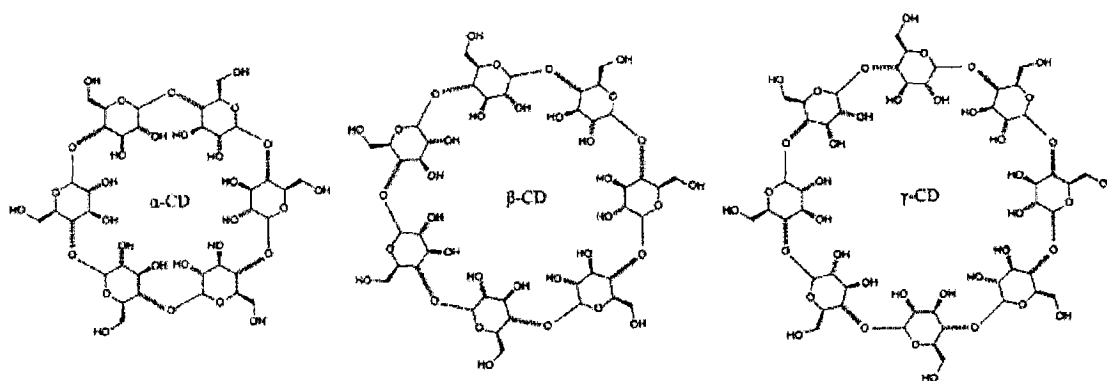
[0079] y表示选自1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的整数;

[0080] 使得所述A-W-B-部分包含水不溶性部分。

[0081] 本发明导致产生与未修饰蛋白或糖蛋白相比, 具有改进的药理学性质的修饰蛋白或糖蛋白。例如, 所述改进的药理学性质选自生物利用度增加、体内功能半寿期增加、体内血浆半寿期增加、免疫原性降低、蛋白酶抗性提高、对白蛋白的亲合力增加、对受体的亲合力提高、储存稳定性增加、体内功能半寿期减少和体内血浆半寿期减少。

[0082] 环糊精(也称为环链淀粉)构成环状寡糖家族, 与在直链淀粉(淀粉片断)中一样由1- > 4连接的5个或更多个 α -D-吡喃葡萄糖苷单元组成。典型的环糊精在环中包含许多葡萄糖单体(六至八个单元), 形成圆锥形。这类环糊精的实例包括如下所示的 α -环糊精(α -CD; 六元糖环分子)、 β -环糊精(β -CD; 七元糖环分子)和 γ -环糊精(γ -CD; 八元糖环分子):

[0083]



[0084] 在一个实施方案中,环糊精分子包括任选取代的 β -环糊精。

[0085] 环糊精的任选取代基包括一个或多个 C_{1-6} 烷基(例如甲基、乙基或丙基),其每一个可任选被一个或多个羟基取代(例如羟乙基-环糊精或羟丙基-环糊精)。在一个实施方案,任选取代的环糊精包括 2-羟乙基- β -环糊精。

[0086] 任选取代的环糊精分子可以 1% 与 10% 之间(例如 5%) 的浓度加入。

[0087] 在一个实施方案中,缀合反应包括在含水缓冲溶液例如 Hepes 缓冲液(例如 50mM Hepes、100mM NaCl 和 10mM $CaCl_2$) 中反应。在一个实施方案中,缀合反应包括在恒定 pH(例如 pH 7.0) 和恒定温度(例如 25°C) 下反应。在恒定 pH 和温度下进行缀合反应的优势在于减少使凝血因子变性的可能性。

[0088] 除凝血因子之外,本发明还适用于与凝血因子不相关或仅远缘相关的大蛋白。大蛋白在本文范围之内为具有分子量高于 10,000Da 的蛋白。

[0089] 因此,在一个实施方案中,P 表示具有分子量高于 10,000Da 的蛋白。

[0090] 在另一个实施方案中,P 表示具有分子量高于 20,000Da 的蛋白。

[0091] 在另一个实施方案中,P 表示具有分子量高于 30,000Da 的蛋白。

[0092] 在另一个实施方案中,P 表示具有分子量高于 40,000Da 的蛋白。

[0093] 在 P 范围之内的蛋白和肽包括但不限于血红蛋白、血清蛋白例如血液因子包括因子 VII、FX、FII、FV、蛋白 C、蛋白 S、tPA、PAI-1、组织因子、FXI、FXII 和 FXIII 以及其序列 FVIII 和 FIX 变体;免疫球蛋白、细胞因子例如白介素、 α 干扰素、 β 干扰素和 γ 干扰素、包括粒细胞集落刺激因子在内的集落刺激因子、血小板衍生生长因子和磷脂酶激活蛋白(PUP)。

[0094] 其它一般生物学及治疗目标蛋白和肽包括胰岛素、植物蛋白例如凝集素和蓖麻毒蛋白、肿瘤坏死因子和相关等位基因、肿瘤坏死因子受体的可溶形式、白介素受体和白介素受体的可溶形式、生长因子例如组织生长因子(例如 TGF α 's 或 TGF β s) 和表皮生长因子、激素、生长调节素、红细胞生成素、色素激素(pigmentary hormone)、下丘脑释放因子、抗利尿激素、促乳素、绒毛膜促性腺激素、促卵泡激素、促甲状腺激素、组织纤溶酶原激活物等。目标免疫球蛋白包括 IgG、IgE、IgM、IgA、IgD 及其片段。

[0095] 在本发明的一个实施方案中,肽为抑酶肽、组织因子途径抑制剂或其它蛋白酶抑制剂、胰岛素或胰岛素前体、人或牛生长激素、白介素、胰高血糖素、泌酸调节肽、GLP-1、GLP-2、IGF-I、IGF-II、组织纤溶酶原激活物、转化生长因子 γ 或 β 、血小板衍生生长因子、GRF(生长激素释放因子)、人生长因子、免疫球蛋白、EPO、TPA、蛋白 C、凝血因子例如 FVII、FVIII、FIX、FX、FII、FV、蛋白 C、蛋白 S、PAI-1、组织因子、FXI、FXII 和 FXIII、毒蜥外泌肽-3、

exentidin-4 及其酶或功能类似物。在本文范围之内,术语“功能类似物”旨在表示具有与天然蛋白类似的功能的蛋白。所述蛋白可在结构上类似于天然蛋白并且可通过以下衍生自天然蛋白:在天然蛋白的C端和/或N端添加一个或多个氨基酸、在天然氨基酸序列的一个或多个不同位点取代一个或多个氨基酸、在天然蛋白的一端或两端或在氨基酸序列的一个或数个位点缺失一个或多个氨基酸、或者在天然氨基酸序列的一个或多个位点插入一个或多个氨基酸。此外,蛋白可在一个或多个位置酰化,参见例如 WO 98/08871,其公开了 GLP-1 和其类似物的酰化,和 WO 98/08872,其公开了 GLP-2 和其类似物的酰化。酰化 GLP-1 衍生物的实例为 Lys26(N^ε-十四酰)-GLP-1(7-37),其为其中第 26 位的 Lys 残基的 ε-氨基已被十四酰化的 GLP-1(7-37)。

[0096] 蛋白或其部分可通过使用本领域普通技术人员已知的技术例如组织培养、从动物来源中提取或通过重组 DNA 方法学来制备或分离。也考虑转基因来源的蛋白、肽、氨基酸序列等。这类物质获自转基因动物即小鼠、猪、牛等,其中蛋白在奶、血液或组织中表达。也考虑转基因昆虫和杆状病毒表达系统作为来源。此外,蛋白的突变型例如突变 TNF' s 和/或突变干扰素也在本发明范围之内。其它目标蛋白为变应原蛋白例如豚草、抗原 E、蜜蜂毒液、螨变应原等。

[0097] 在一个实施方案中,P 表示凝血因子。合适的凝血因子的实例包括:I(纤维蛋白原)、II(凝血酶原)、组织因子、V(前加速素)、VI、VII、VIII、IX(克里斯马斯因子)、X(斯图亚特因子)、XI(血浆凝血激酶前质)、XII(Hageman 因子)、XIII(纤维蛋白稳定因子)、von Willebrand 因子、前激肽释放酶、高分子量激肽原(HMWK)、纤连蛋白、抗凝血酶 III、肝素辅因子 II、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、蛋白 Z 相关蛋白酶抑制剂(ZPI)、血纤维蛋白溶酶原、α2-抗纤维蛋白溶素、组织纤溶酶原激活物(tPA)、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI1)、纤溶酶原激活物抑制剂-2(PAI2)和癌前凝血剂。在另一个实施方案中,凝血因子选自 FVII、FX、FII、FV、蛋白 C、蛋白 S、tPA、PAI-1、组织因子、FXI、FXII 和 FXIII 以及其序列 FVIII、FIX 变体。

[0098] 在另一个实施方案中,凝血因子为 FVII(即 FVIIa)。

[0099] 在备选实施方案中,P 表示生长激素(GH)。

[0100] 在一个实施方案中,y 表示选自 1、2 或 3 的整数。该实施方案尤其适于其中 P 表示生长激素的实施方案,因为所述生长激素具有用于这类 A-W-B- 部分的 3 个连接点,即 N 端、Gln40 和 Gln141。

[0101] 在一个实施方案中,y 表示选自 1、2、3、4、5 或 6 的整数。在另一个实施方案中,y 表示 2。在备选实施方案中,y 表示 1。

[0102] 上述实施方案以及下文所述的实施方案应看作是指本文所述方面中的任一个以及本文所述实施方案中的任一个,除非具体指出实施方案涉及本发明的某个方面或某些方面。

[0103] 在本发明的一个实施方案中,亲水间隔物 B 具有 $cLogP < 0$,其如 J. Am. Chem. Soc., 86(1964)5175-5180 “A New Substituent Constant, Π , Derived from Partition Coefficients(新取代常数, Π , 衍生自分配系数)”中定义并且可使用来自 Tripos(Tripos Associates, 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144-2319 USA) 的 Sybyl 软件包计算。

[0104] 在式 (I) 缀合物的另一个实施方案中, 亲水间隔物 B 具有下式:

[0105] $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0106] 其中

[0107] X_1 为 $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

[0108] X_2 为 $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

[0109] X_3 为 $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$,

[0110] X_4 为 $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$,

[0111] $I1$ 、 $I2$ 、 $I3$ 、 $I4$ 、 $I5$ 和 $I6$ 独立选自 0-16,

[0112] $m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 和 $m7$ 独立选自 0-10,

[0113] $m2$ 和 $m5$ 独立选自 0-25,

[0114] $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 和 $n4$ 独立选自 0-16,

[0115] F 为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮, 其中所述芳基和杂芳基任选用卤素、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} -烷基取代,

[0116] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 独立选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 C_{1-6} -烷基、芳基或杂芳基; 其中所述烷基、芳基和杂芳基任选用卤素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ 或 $-OH$ 取代,

[0117] $D1$ 、 $D2$ 、 $E1$ 和 $E2$ 独立选自 $-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-N(COR^7)-$ 或价键; 其中 R^6 和 R^7 独立表示氢或 C_{1-6} -烷基,

[0118] W_1 至 W_6 独立选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或价键; 其中 $s2$ 为 0 或 1。

[0119] 在另一个实施方案中, W_1 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 或价键。通常, W_1 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 或 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。

[0120] 在另一个实施方案中, W_2 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 或价键。通常, W_2 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 或 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。

[0121] 在另一个实施方案中, W_3 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 或价键。通常, W_3 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 或 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。

[0122] 在另一个实施方案中, W_4 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 或价键。通常, W_4 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 或 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。

[0123] 在另一个实施方案中, W_5 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 或价键。通常, W_5 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 或 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。

[0124] 在另一个实施方案中, W_6 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 或价键。通常, W_6 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 或 $-C(O)NHS(O)_2-$ 。

[0125] 在另一个实施方案中, R^1 选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} -烷基;其中所述烷基任选用 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 取代。通常, R^1 选自 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 C_{1-6} -烷基;其中所述烷基任选用 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 $-S(O)_2OH$ 取代。

[0126] 在另一个实施方案中, R^2 选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} -烷基;其中所述烷基任选用 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 取代。通常, R^2 选自 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 C_{1-6} -烷基;其中所述烷基任选用 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 $-S(O)_2OH$ 取代。

[0127] 在另一个实施方案中, R^3 选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} -烷基;其中所述烷基任选用 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 取代。通常, R^3 选自 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 C_{1-6} -烷基;其中所述烷基任选用 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 $-S(O)_2OH$ 取代。

[0128] 在另一个实施方案中, R^4 选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} -烷基;其中所述烷基任选用 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 。通常, R^4 选自 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 C_{1-6} -烷基;其中所述烷基任选用 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 $-S(O)_2OH$ 取代。

[0129] 在另一个实施方案中, R^5 选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} -烷基;其中所述烷基任选用 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 取代。通常, R^5 选自 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 C_{1-6} -烷基;其中所述烷基任选用 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 $-S(O)_2OH$ 取代。

[0130] 在另一个实施方案中, $E1$ 选自 $-O-$ 或 $-NR^6-$ 或价键。通常, $E1$ 选自 $-O-$ 。

[0131] 在另一个实施方案中, $E2$ 选自 $-O-$ 或 $-NR^6-$ 或价键。通常, $E2$ 选自 $-O-$ 。

[0132] 在另一个实施方案中, $E1$ 和 $E2$ 都为 $-O-$ 。

[0133] 在另一个实施方案, $E1$ 和 $E2$ 都为 $-NR^6$ 。

[0134] 在另一个实施方案中, F 为苯基、吡咯烷-2,5-二酮或价键。

[0135] 在另一个实施方案中, $D1$ 选自 $-O-$ 或 $-NR^6-$ 或价键。通常, $D1$ 选自 $-NR^6$ 。

[0136] 在另一个实施方案中, $D2$ 选自 $-O-$ 或 $-NR^6-$ 或价键。通常, $D1$ 选自 $-NR^6$ 。

[0137] 在另一个实施方案中, $I1$ 为 0-6, 例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0138] 在另一个实施方案中, $I2$ 为 0-6, 例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0139] 在另一个实施方案中, $I3$ 为 0-6, 例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0140] 在另一个实施方案中, $I4$ 为 0-6, 例如 0、1、2、3、4、5 或 6。在另一个实施方案中, $I5$ 为 0-6, 例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0141] 在另一个实施方案中, $I6$ 为 0-6, 例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0142] 在另一个实施方案中, $m1$ 为 0-6, 例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0143] 在另一个实施方案中, $m2$ 为 0-10, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

[0144] 在另一个实施方案中, $m3$ 为 0-6, 例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0145] 在另一个实施方案中, $m4$ 为 0-6, 例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0146] 在另一个实施方案中, $m5$ 为 0-10, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

[0147] 在另一个实施方案中, $m6$ 为 0-6, 例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0148] 在另一个实施方案中, $m7$ 为 0-6, 例如 0、1、2、3、4、5 或 6。

[0149] 在另一个实施方案中, $n1$ 为 0-10, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

[0150] 在另一个实施方案中, $n2$ 为 0-10, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

[0151] 在另一个实施方案中, $n3$ 为 0-10, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

[0152] 在另一个实施方案 $n4$ 为 0-10, 例如 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。

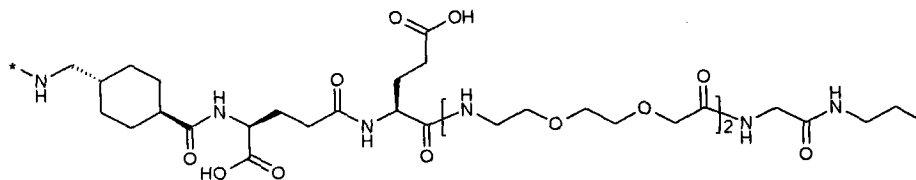
NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)- 或价键。通常, W₇ 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂。

[0166] 在另一个实施方案中, W₈ 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)- 或价键。通常, W₈ 选自 -C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂。

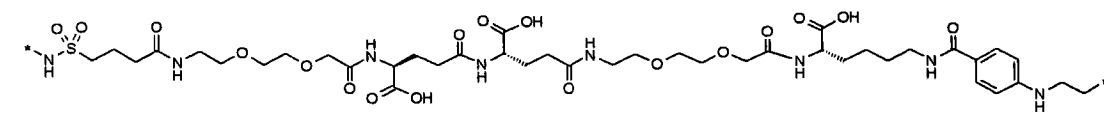
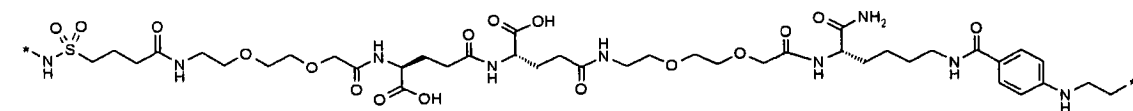
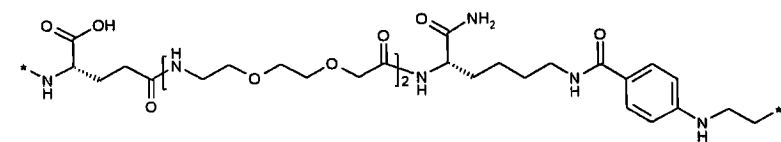
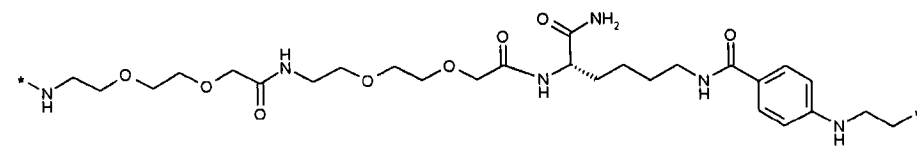
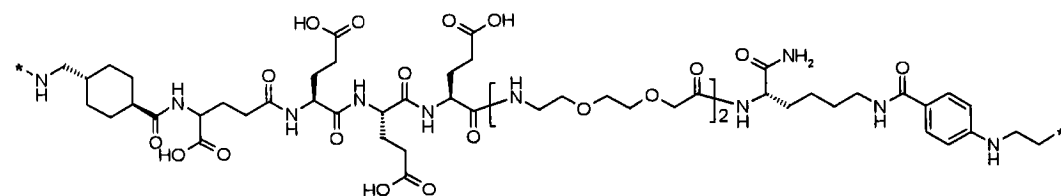
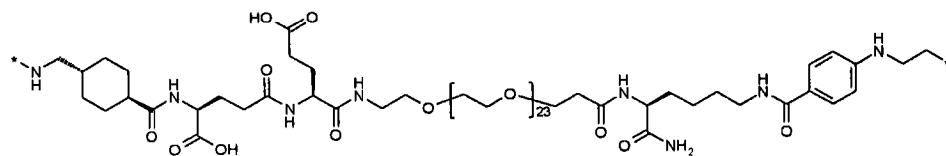
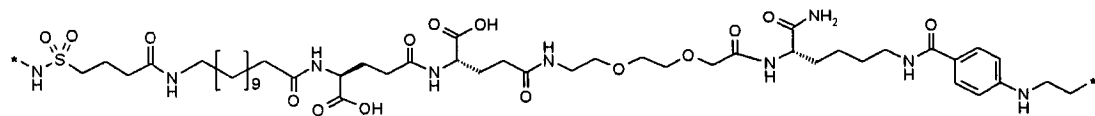
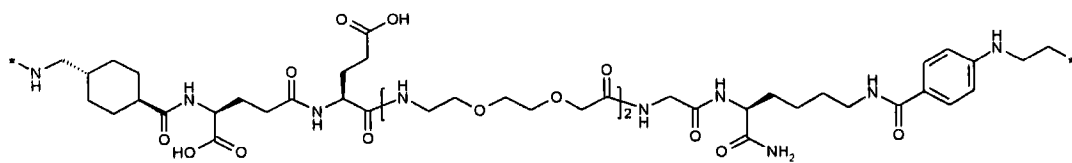
[0167] 在另一个实施方案中, I₇ 为 0 或 1。

[0168] 在另一个实施方案中, 本发明亲水间隔物 B 选自:

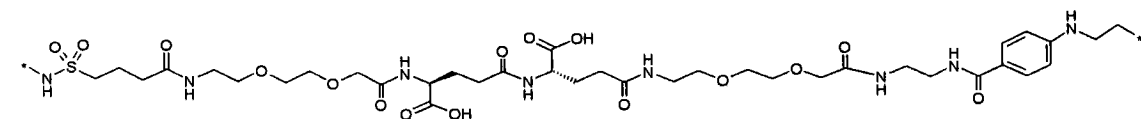
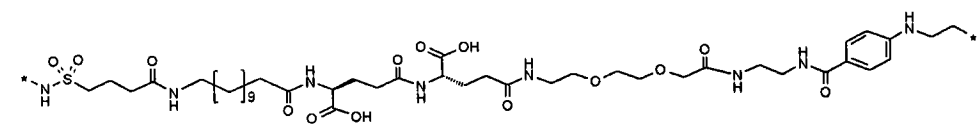
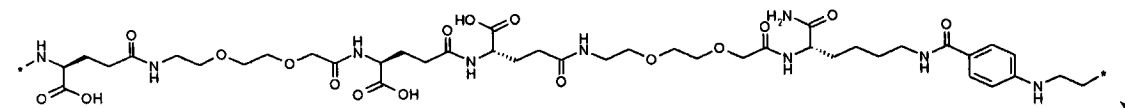
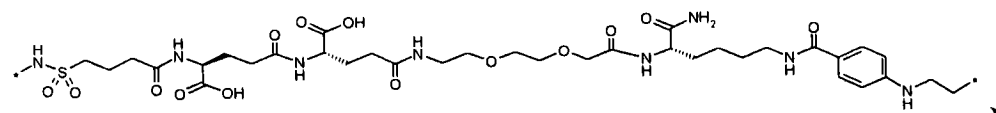
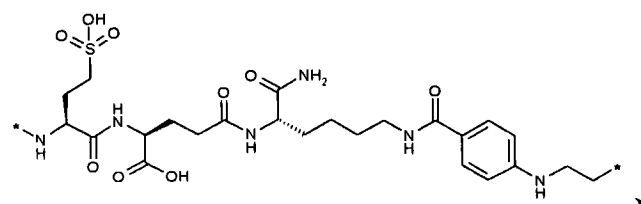
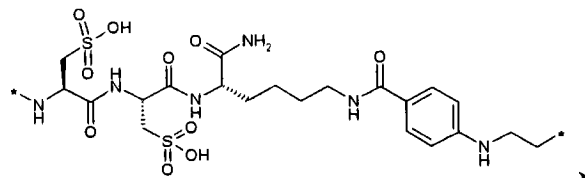
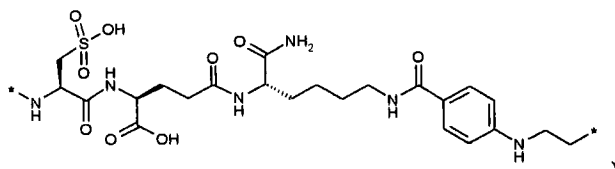
[0169]



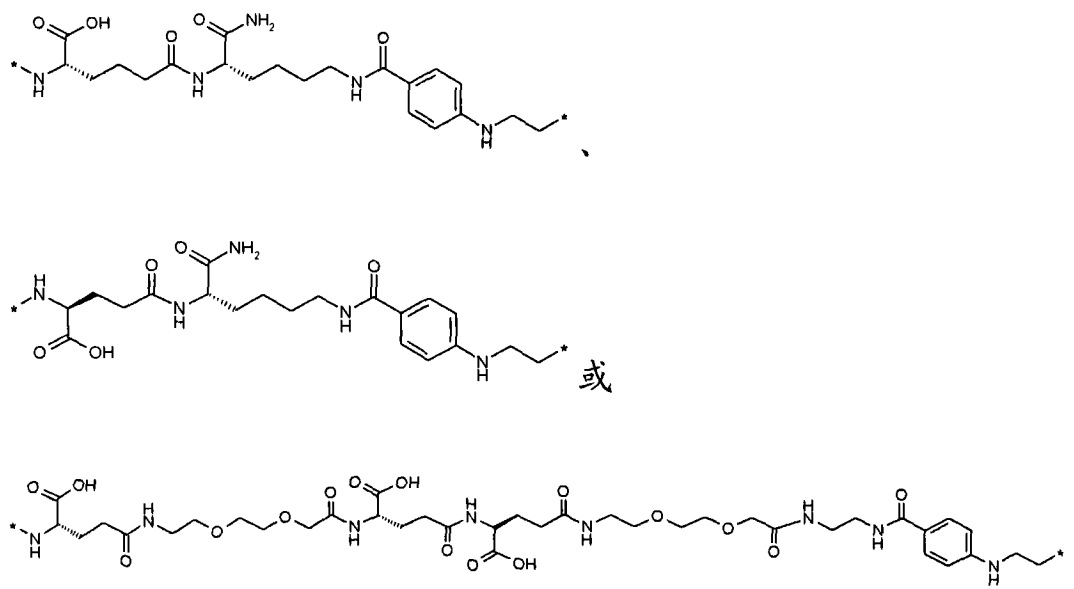
[0170]



[0171]



[0172]



[0173] 连接至 P 的白蛋白结合残基（上式 (I) 的取代基 A）为亲脂残基，其非共价地结合至白蛋白。通常，所述白蛋白结合残基在生理 pH 下带负电荷，并且具有低于约 $10\ \mu\text{M}$ 或甚至低于约 $1\ \mu\text{M}$ 的对人血清白蛋白的结合亲和力。

[0174] 本发明中所用的白蛋白结合物通常为在水溶液中具有低溶解度的脂肪酸衍生物。白蛋白结合物的溶解度可由其 $\log P$ 值描述。 $\log P$ ，也称为分配系数，为在平衡时化合物在两种不混溶溶剂混合物的两相中的浓度比的对数。通常一种溶剂为水，而第二种选自 1-辛醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP)。在这些不同的溶剂中测得的 $\log P$ 值不同，主要由于氢键效应。辛醇可提供和接受氢键而环己烷为惰性的。氯仿可提供氢键而 PGDP 仅可接受氢键。

[0175] 在本发明的一个实施方案中，白蛋白结合物在 1-辛醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP) 中都具有 > -3 的 $\log P$ 。

[0176] 在另一个实施方案中，白蛋白结合物在 1-辛醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP) 中都具有大于 -4 的 $\log P$ 。

[0177] 在又一个实施方案中，白蛋白结合物在 1-辛醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP) 中都具有大于 -5 的 $\log P$ 。

[0178] 或者，可对白蛋白结合物部分使用以下公开算法计算 $c\log P$ ：(J. Am. Chem. Soc., 86(1964)5175-5180 “新取代常数, Π , 衍生自分配系数”、C. A. Lipinski 等 Advanced Drug Delivery Reviews, 23(1997)3-25, “Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings (在药物发现和开发调节中估计溶解度和渗透性的实验和计算方法)” 和 I. Moriguchi, S. Hirano, I. Nakagome, H. Hirano, Chem. and Pharm. Bull., 42(1994)976-978 “Comparison of Reliability of $\log P$ Values for Drugs Calculated by Several Methods (由数种方法计算的药物 $\log P$ 值的可靠性比较)”。

[0179] 在本发明一个实施方案中，白蛋白结合物在 1-辛醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP) 中都具有 > 1 的 $c\log P$ 。在本发明另一个实施方案中，白蛋白结合物在 1-辛醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP) 中都具有 > 2 的 $c\log P$ 。在本发明又一个实施方案中，白蛋白结合物在 1-辛醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP) 中都具有 > 3 的

cLog P。在又一个实施方案中,白蛋白结合物在 1-辛醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP) 中都具有 > 4 的 clog P。在又一个实施方案中,白蛋白结合物在 1-辛醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯 (PGDP) 中都具有 > 5 的 clog P。

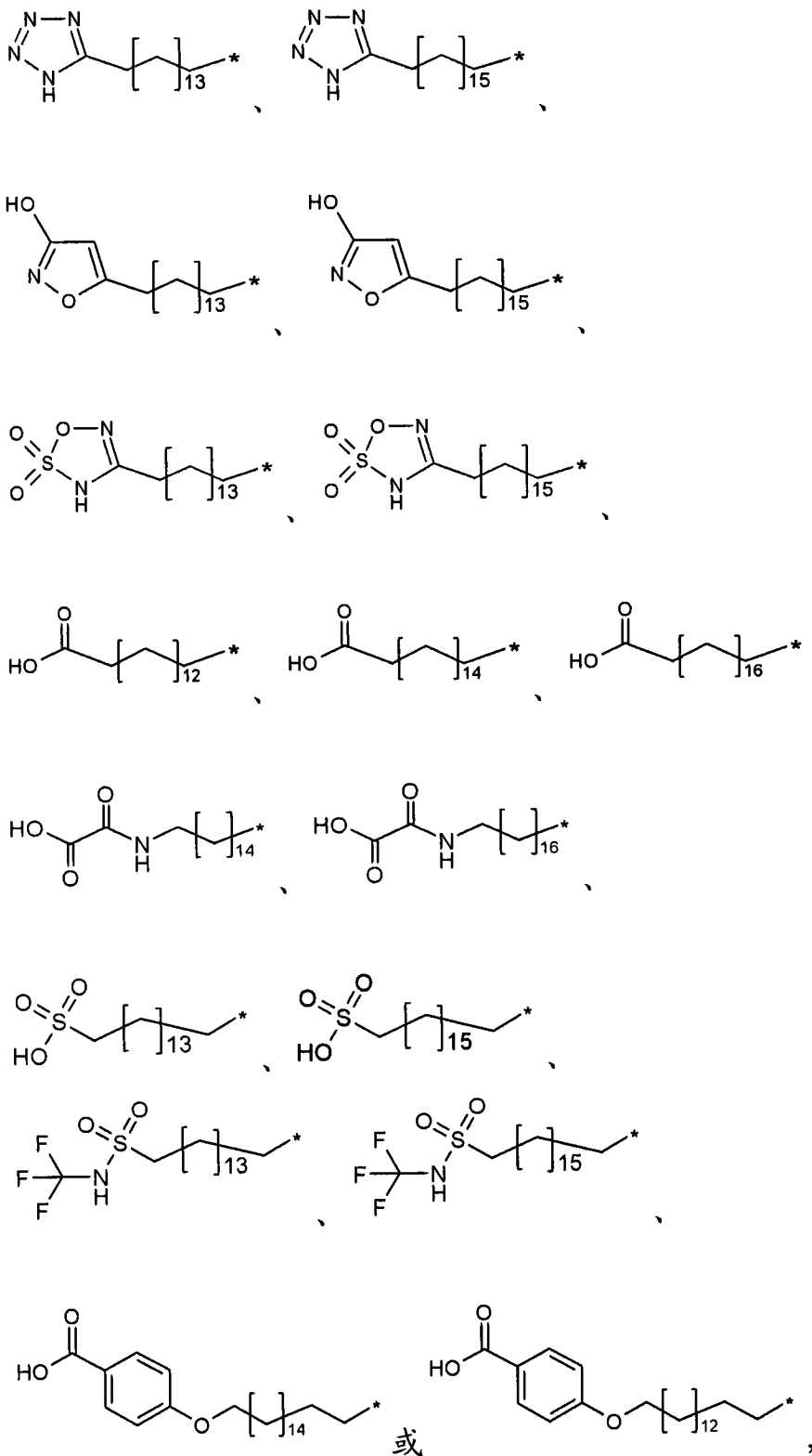
[0180] 在另一个实施方案中,白蛋白结合残基选自直链烷基、支链烷基、具有 ω -羧酸基或 ω -羧酸等排体 (isoster) 的基团。通常,白蛋白结合残基具有 6-40 个碳原子。在另一个实施方案中,白蛋白结合残基具有 8-26 个碳原子。在另一个实施方案中,白蛋白结合残基具有 8-20 个碳原子。

[0181] 在另一个实施方案中, A 具有 14-26 个碳原子并包含 ω -羧酸基。在另一个实施方案中, A 具有 14-26 个碳原子并包含 ω -羧酸等排体,例如四唑 (tetrazol)。

[0182] 白蛋白结合性质可通过如 J. Biol. Chem. 277 (38), 35035-35042, 2002 中所述的表面等离子共振法测量。

[0183] 在另一个实施方案中, A 选自:

[0184]



[0185] 其中*表示通过W连接至B。

[0186] 在一个实施方案中,白蛋白结合残基A通过亲水间隔物B连接至蛋白P的谷氨酰胺残基。

[0187] 在另一个实施方案中,白蛋白结合残基A通过亲水间隔物B连接至蛋白P的半胱氨酸(cystein)残基。

[0188] 在另一个实施方案中,白蛋白结合残基A通过亲水间隔物B连接至蛋白P的N端

残基。

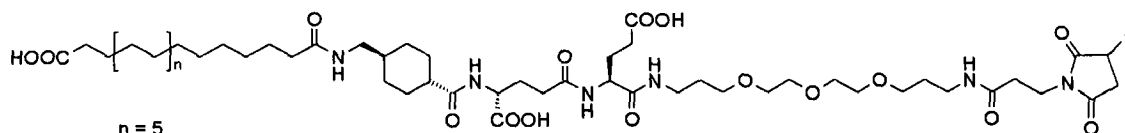
[0189] 在另一个实施方案中,白蛋白结合残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至蛋白 P 的 C 端残基。

[0190] 在另一个实施方案中,白蛋白结合残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至蛋白 P 的赖氨酸残基。

[0191] 在又一个实施方案中,白蛋白结合残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至糖蛋白 P 的氧化聚糖残基。

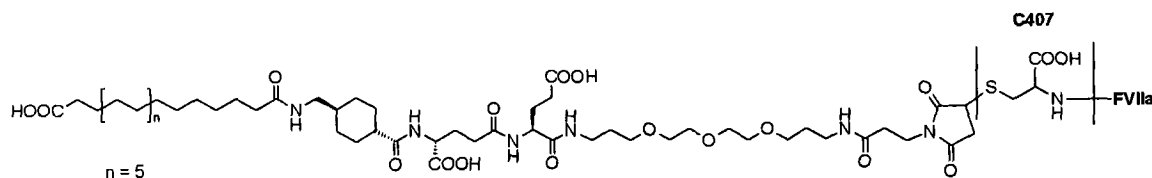
[0192] 在一个实施方案中, A-W-B- 为

[0193]



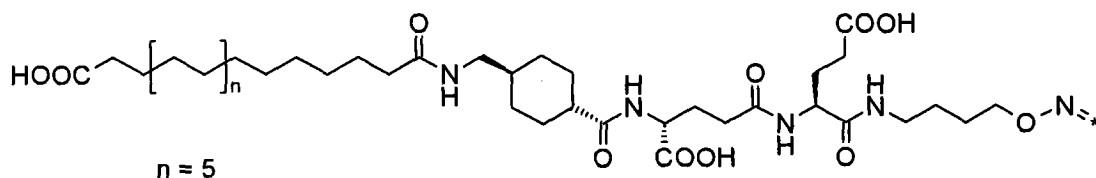
[0194] 在一个实施方案中, P 为 FVIIa-C407, 而 A-W-B-P 为

[0195]



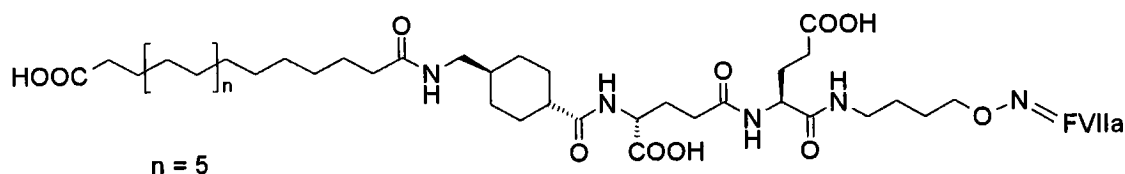
[0196] 在一个实施方案中, A-W-B = 为

[0197]



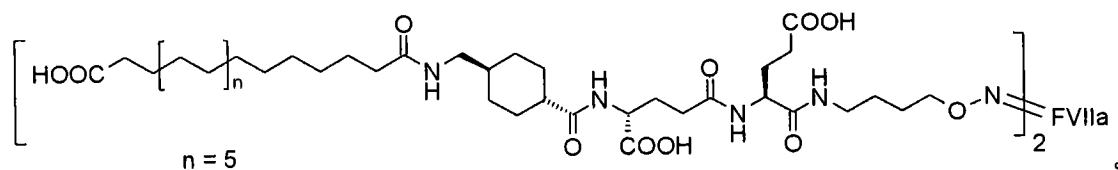
[0198] 在一个实施方案中, P 为糖氧化 (glycooxidize) 的 FVIIa, 而 A-W-B = P 为

[0199]



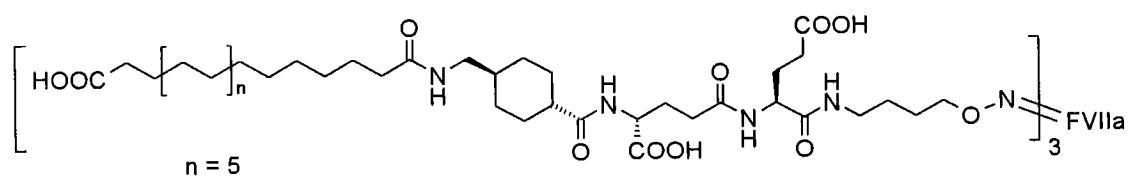
[0200] 在一个实施方案中, P 为糖氧化的 FVIIa, $y = 2$ 且 (A-W-B =)_yP 为

[0201]



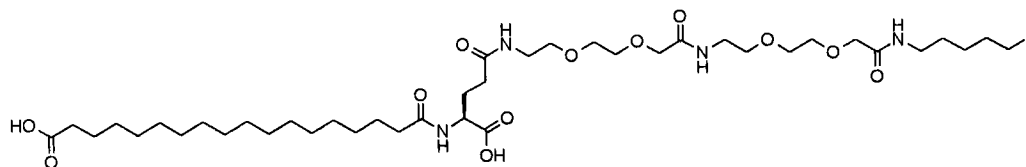
[0202] 在一个实施方案中, P 为糖氧化的 FVIIa, $y = 3$ 且 (A-W-B =)_yP 为

[0203]



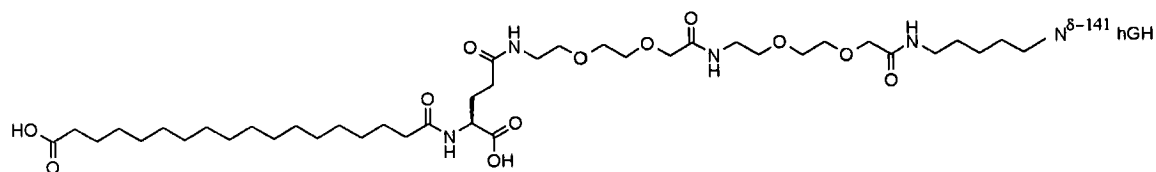
[0204] 在一个实施方案中, A-W-B- 为

[0205]



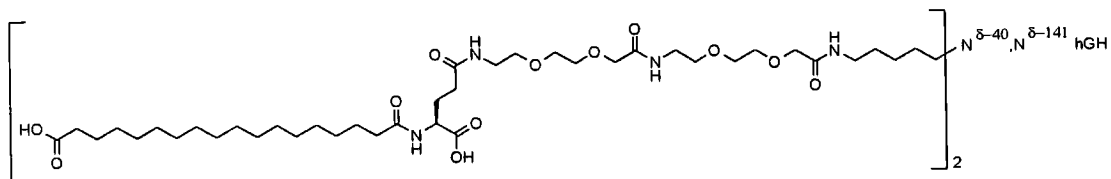
[0206] 在一个实施方案中, P 为 hGH, 而 A-W-B-P 为

[0207]

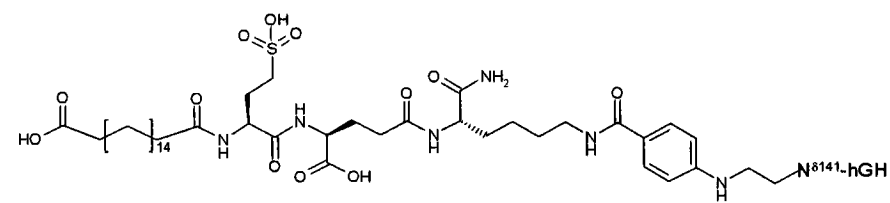
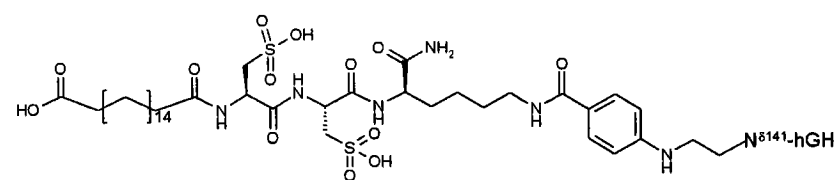
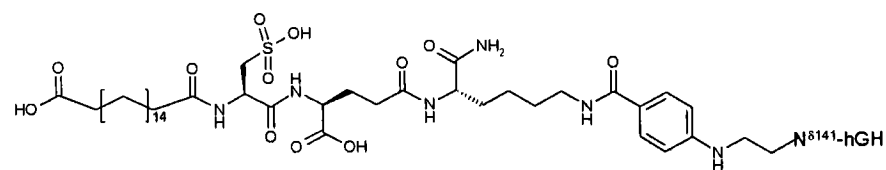
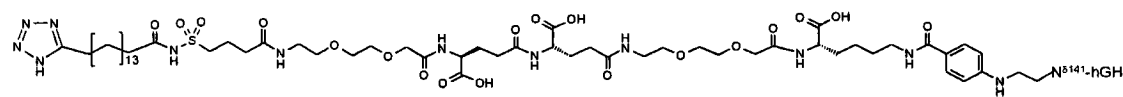
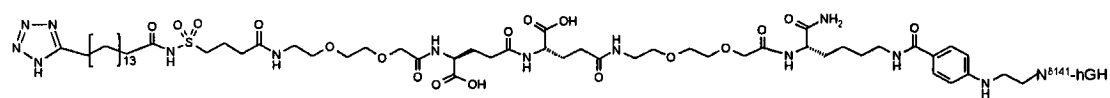
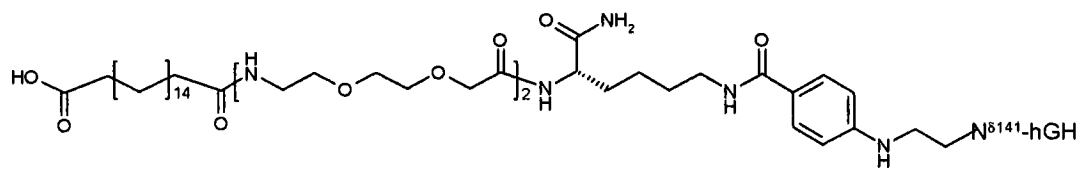
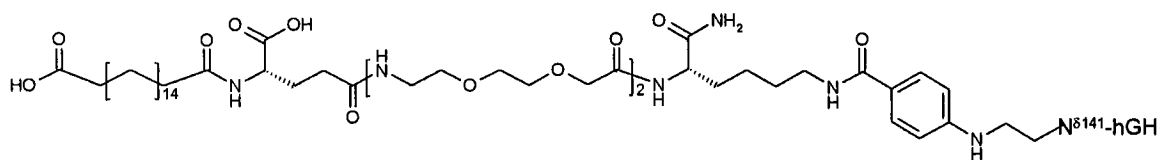


[0208] 在一个实施方案中, P 为 hGH, $y = 2$ 且 $(A-W-B)_y$ -P 为

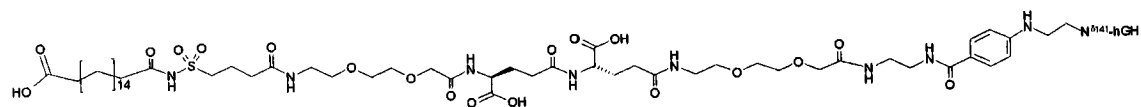
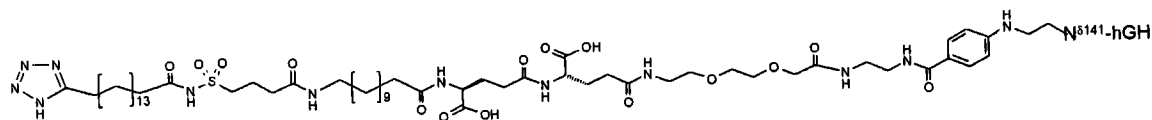
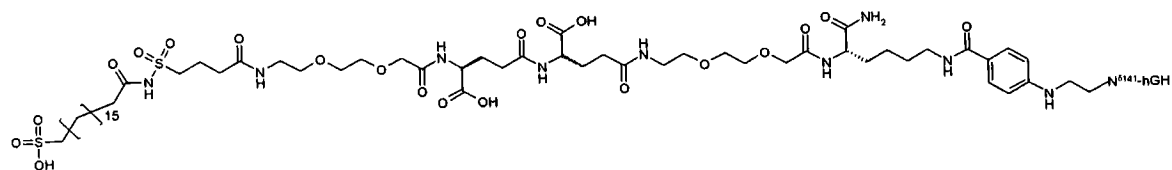
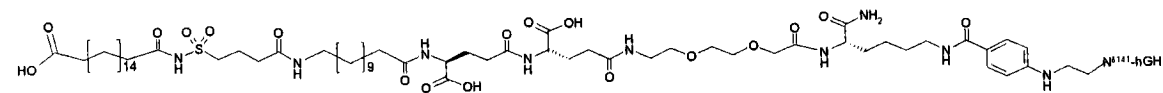
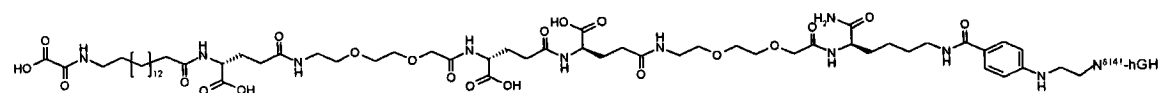
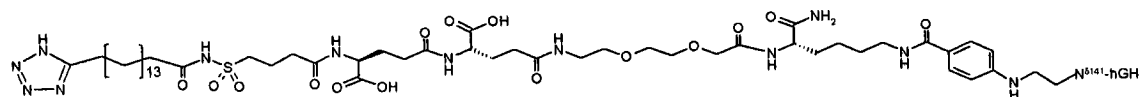
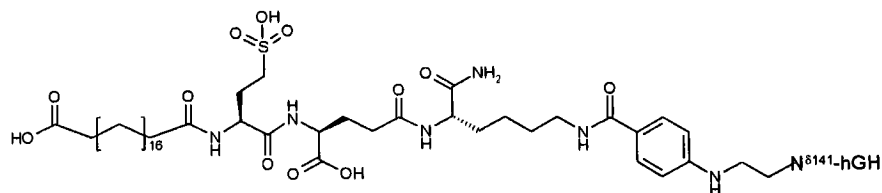
[0209]



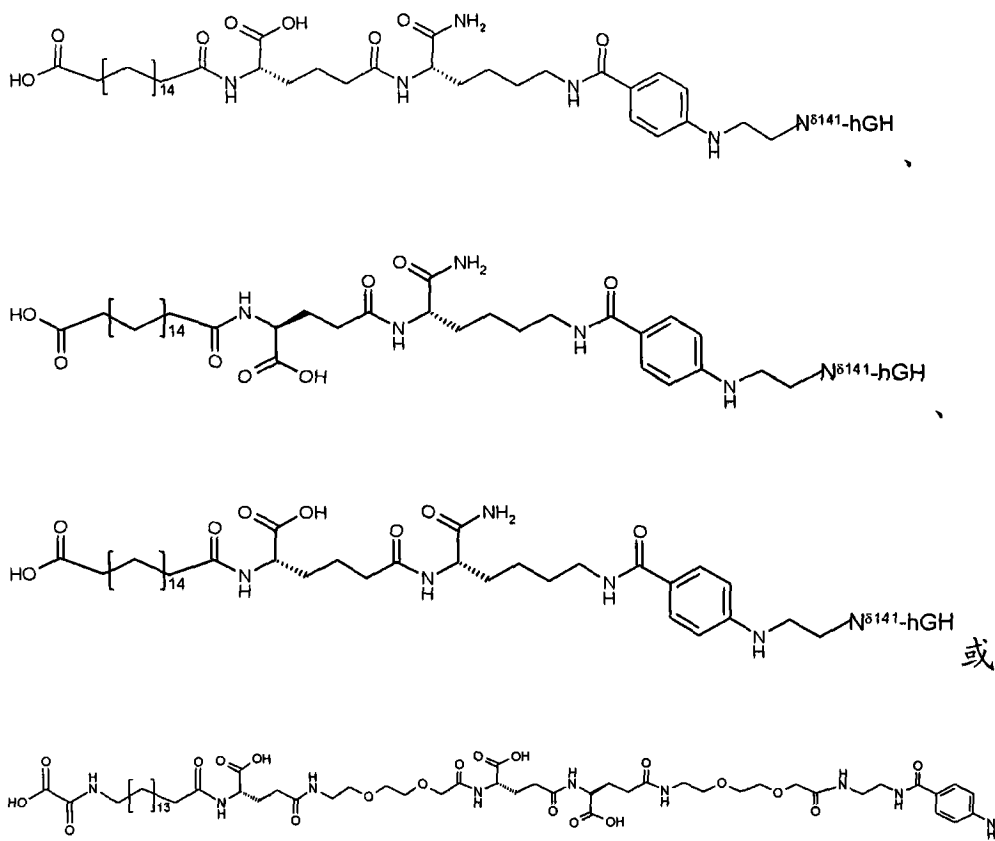
[0210]



[0212]



[0213]



[0214] 本发明另一个方面提供用于治疗用途的如本文中定义的蛋白缀合物。

[0215] 在另一个方面中,本发明涉及药物组合物,其包含任选与药学上可接受的赋形剂联合的如本文所定义的蛋白缀合物。

[0216] 本发明另一个方面提供蛋白缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,所述蛋白缀合物包含通过亲水间隔物连接至白蛋白结合残基的蛋白或糖蛋白。

[0217] 本发明另一个方面提供用于制备缀合凝血因子的方法,其包括以下步骤:使如本文定义的凝血因子与如本文定义的修饰基团反应。

[0218] 本发明方法导致产生与未修饰的凝血因子相比具有改进的药理学性质的修饰凝血因子。例如,所述改进的药理学性质选自生物利用度增加、体内功能半寿期增加、体内血浆半寿期增加、免疫原性降低、蛋白酶抗性提高、对白蛋白的亲合力增加、对受体的亲合力提高、储存稳定性增加、体内功能半寿期减少和体内血浆半寿期减少。

[0219] 在一个实施方案中,所述方法还包括加入增溶剂。当修饰基团包括脂肪酸时,这类增溶剂的存在提供以下优势:增加脂肪酸在水溶液中的溶解度,从而提高缀合反应的效率。

[0220] 在一个实施方案中,所述增溶剂包括任选取代的环糊精分子。

[0221] 因此,本发明另一个方面提供用于制备缀合蛋白或缀合糖蛋白的方法,其包括以下步骤:在任选取代的环糊精分子存在下,使如本文定义的蛋白或糖蛋白与如本文定义的白蛋白结合物反应。在一个实施方案中,白蛋白结合物包括水不溶性的白蛋白结合物,而蛋白或糖蛋白包括水溶性蛋白或糖蛋白。

[0222] 某些凝血因子(例如 FVIIa、FIXa、FXa、FIIa)在血液级联中起蛋白酶作用,并且熟知的是,其在溶液中长时间静置时通过自催化降解。

[0223] 因此,除当改性剂包含脂肪酸时使用增溶剂外,反应混合物可另外包含可逆封闭

剂,其抑制蛋白酶类型凝血因子(例如 FVIIa、FIXa、FXa、FVIIa 等)的活性位点。

[0224] 因此,在一个实施方案中,凝血因子与修饰基团之间的缀合在以下条件下进行:所述凝血因子的功能性位点(即蛋白酶位点)被辅助分子例如丝氨酸蛋白酶抑制剂封闭。优选的是,所述辅助分子为以下分子:其以可逆方式特异性识别蛋白酶位点,并且可容易地在随后的纯化步骤中除去。例如,苄脒为 FVIIa 的合适的可逆活性位点抑制剂。

[0225] 本发明另一个方面提供通过如上文所定义的方法可得到的缀合蛋白或缀合糖蛋白。

[0226] 本发明另一个方面提供通过如上文所定义的方法可得到的缀合凝血因子。

[0227] 本发明另一个方面提供缀合凝血因子,其包括缀合至如本文定义的修饰基团的如本文定义的凝血因子。

[0228] 合适的凝血因子的实例包括:I(纤维蛋白原)、II(凝血酶原)、组织因子、V(前加速素)、VI、VII、VIII、IX(克里斯马斯因子)、X(斯图亚特因子)、XI(血浆凝血酶原激酶前身物)、XII(Hageman 因子)、XIII(纤维蛋白稳定因子)、von Willebrand 因子、前激肽释放酶、高分子量激肽原(HMWK)、纤连蛋白、抗凝血酶 III、肝素辅因子 II、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、蛋白 Z 相关蛋白酶抑制剂(ZPI)、血纤维蛋白溶酶原、 α 2-抗纤维蛋白溶素、组织纤溶酶原激活物(tPA)、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI1)、纤溶酶原激活物抑制剂-2(PAI2)和癌前凝血剂。

[0229] 本发明还包括人工改造的具有凝血活性的蛋白,例如对活化血小板的亲合力提高的组织因子(TF)类似物、TF 融合蛋白或 TF 嵌合体,例如 TF-膜联蛋白 V、TF-抗体融合蛋白和其它 TF-融合蛋白,包括以下嵌合体:其中非 TF 组分增加对活化血小板上表达的表位的结合亲合力。具有凝血活性的蛋白的其它实例包括组织因子途径抑制物拮抗剂(包括抗 TFPI 抗体或其片段)以及凝血酶可活化的因子 X。另外的实例包括 FVIII-模拟双特异性 MAB。

[0230] 在一个实施方案中,凝血因子为因子 VIIa(FVIIa)、因子 VIII(FVIII)或因子 IX(FIX)。在另一个实施方案中,凝血因子为因子 VIIa(FVIIa)。

[0231] 在一个实施方案中,凝血因子为因子 VIIa(FVIIa)、因子 VIII(FVIII)或因子 IX(FIX)类似物。在另一个实施方案中,凝血因子为因子 VIIa(FVIIa)类似物。

[0232] 在一个实施方案中,修饰基团通过结合至白蛋白显示延长作用。白蛋白,其在血液中大量存在,以微摩尔至纳摩尔亲和力结合小分子脂肪酸。如果脂肪酸连接至较大的分子例如肽,则该缀合物可特异地结合至存在于血液中的白蛋白。然后白蛋白可起大载体分子的作用,所述大载体分子通过其大小保护所述肽免遭肾清除或蛋白水解攻击。该原理对于较小的肽例如 GLP-1 和胰岛素已很好地证明,但意想不到的,我们发现该类型的修饰基团还延长与白蛋白具有类似大小的较大蛋白例如凝血因子,即其自身应足够大以免遭肾清除的蛋白。

[0233] 此外,意想不到的,可大小相当的大蛋白之间的复合体可通过如本文定义的修饰基团、尤其是包含式 I 化合物的修饰基团施加的亲脂力维持在一起。

[0234] 因此如上所指出,白蛋白结合物与蛋白或肽的连接已显示潜在增加所述蛋白或肽的血浆半寿期。一类典型的白蛋白结合物来源于脂肪酸,因为白蛋白能够结合至高度疏水的分子。因此,在本发明范围内,具有一 $(CH_2)_{12}$ -部分的化合物为可能的白蛋白结合物。如

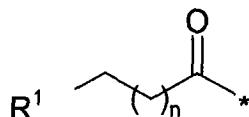
果将如上所定义的白蛋白结合物连接至蛋白或肽并导致所述蛋白或肽的血浆半寿期增加,则应理解的是,所述白蛋白结合物为以下部分:其增加如本发明中所述的血浆半寿期,通过结合至白蛋白和/或通过其它延长机理例如非特异性结合至脂质层等有助于血浆半寿期的总体增加。

[0235] 在某些实施方案中,本发明制剂显示相对生物利用度为相应未修饰蛋白生物利用度的至少约 110%、优选至少约 120%、更优选至少约 130% 和最优选至少约 140%。生物利用度可在任何哺乳动物(优选狗)中测量,并且用于计算 AUC 的预定时间可包括 10 分钟-8h 的不同增量。生物利用度可例如如下在狗模型中测量:实验在分成 4 个组别的 12 只 Beagle 狗中以四腿交叉研究(four leg cross-over study)进行。所有动物接受在合适缓冲液中的剂量为约 90 μ g/kg 的测试制剂 A 和参比制剂 B,所述合适缓冲液为例如含氯化钠(2.92mg/ml)、氯化钙二水合物(1.47mg/ml)、甘露醇(30mg/ml)和聚山梨酯 80 的甘氨酸缓冲液(pH 5.5)。在初始给药后的 10、30 和 60 分钟以及 2、3、4、6 和 8 小时抽取血液样品。从样品中获得血浆并通过 ELISA 定量蛋白。

[0236] 在一个实施方案中,修饰基团包括脂肪酸衍生物。在另一个实施方案中,修饰基团包括 C12、C14、C16、C18 和 C20 脂肪酸衍生物。不被理论所束缚并且如先前所述,据认为在血液中大量存在的白蛋白以微摩尔至纳摩尔亲和力结合小分子脂肪酸。因此,白蛋白起载体分子的作用,所述载体分子保护所述肽免遭肾清除、中和抗体、受体介导的清除或蛋白水解攻击。因此,本发明提供与相应的未缀合因子相比体内血浆半寿期增加的缀合凝血因子类似物。

[0237] 在一个实施方案中,修饰基团包括下式(II)的化合物:

[0238]



(II)

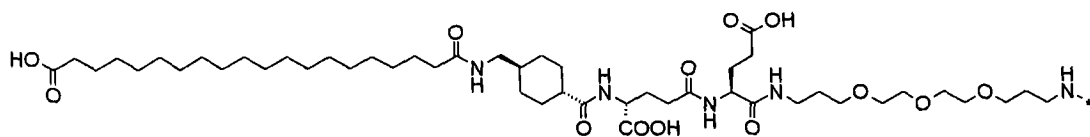
[0239] 其中 R^1 表示氢、-COOH、四唑基或 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NHS}(=\text{O})_2-\text{R}^2$; n 为选自 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 中的任一个的整数;以及

[0240] R^2 表示 C_{1-6} 烷基、苯基、 C_{1-6} 烷基苯基、 C_{1-20} 烷基四唑基或 C_{1-20} 烷基羧基。

[0241] 在一个实施方案中, R^1 表示 -COOH, 而 n 表示选自 12-18 的整数(例如 12、14、16 或 18)。

[0242] 在一个实施方案中,修饰基团包括下式(III)的化合物:

[0243]



(III)

[0244] 在一个实施方案中,修饰基团和 / 或凝血因子另外包含配以促进缀合的缀合部分。例如,在一个实施方案中,修饰基团包含选自羟胺部分的缀合部分。这类羟胺部分适用于缀合至各种官能化的凝血因子(例如凝血因子的氧化衍生物)。凝血因子的这类氧化衍生物可通过直接氧化(例如用高碘酸)制备(当聚糖部分存在于凝血因子上时)(如 WO 2008/025856 中所述),或适当地切除以允许用半乳糖氧化酶氧化来制备(如 WO 2005/014035 中所述)。在暴露的半乳糖残基或唾液酸残基不存在于凝血因子上的情况下,在氧化前可用半乳糖基转移酶或唾液酸转移酶将其半乳糖基化或唾液酸化。

[0245] 在备选实施方案中,修饰基团包含选自马来酰亚胺或卤代乙酸酯(haloacetate)部分的缀合部分。这类马来酰亚胺和卤代乙酸酯适用于缀合至各种官能化的凝血因子(例如具有游离或部分游离半胱氨酸残基的凝血因子)。应认识到的是,凝血因子可改造以具有游离或部分游离的半胱氨酸残基(如 WO 2006/134174 中所述)。在某些情形下,半胱氨酸残基可被混合的二硫化物例如谷胱甘肽部分封闭。在这种情形下,其可在缀合之前通过在存在谷氧还蛋白下小心地调整氧化还原电位(GSSG/GSH)来除去。裸露于表面的半胱氨酸还可通过使用例如膦基还原剂(例如三羧基乙基膦或三(3-磺酸钠基苯基)膦)化学去封闭(如 US2006/0115876 中所述)。在凝血因子上的游离硫醇也可与活化硫化物例如硫代吡啶基活化硫化物反应以形成混合二硫化物。

[0246] 在备选实施方案中,凝血因子可利用 N 端丝氨酸氧化,接着例如脩化(如 WO 2006/122982 中所述)、使用羧肽酶的 C 端转肽作用(如 WO 2005/035553 中所述)缀合至修饰基团,和可通过使用转谷氨酰胺酶(如 WO 2005/070468 中所述)或通过使用例如 NHS 酯或羟苯并三唑酯(hydroxybenzotriazolyl ester)活化修饰基团直接在赖氨酸侧链上酰化缀合至适当设计的修饰基团衍生物。

[0247] 本发明缀合凝血因子和包含缀合凝血因子的药物组合物可用于治疗通过给予凝血因子(例如 FVII(a)、FVIII 或 FIX)能缓解的疾病或因子替代疗法,所述疾病例如为:出血障碍例如血友病、血液病、关节积血、血肿、粘膜皮肤出血、遗传性血液病、家族性出血障碍或家族性血液病。在一个实施方案中,通过给予凝血因子能缓解的疾病为血友病,例如血友病 B 或克里斯马氏病(Christmas disease)。

[0248] 因此,本发明的另一个方面提供一种治疗血友病的方法,所述方法包括给予患者治疗有效量的如上文定义的缀合凝血因子。

[0249] 还提供用于治疗血友病的如上文定义的缀合凝血因子。

[0250] 还提供如上文定义的缀合凝血因子在制备用于治疗血友病的药物中的用途。

[0251] 还提供了用于治疗血友病的包含如上文定义的缀合凝血因子的药物组合物。

[0252] 应理解的是,治疗性方案和预防性(预防的)方案表示本发明的单独的方面。具体而言,应理解的是,本发明提供具有增加的血浆半寿期的缀合凝血因子,所述增加的血浆半寿期使得其对血友病的预防性治疗为理想的。血友病的这类预防性治疗构成本发明的优选实施方案。

[0253] 本发明的另一个方面提供包含如上文定义的缀合凝血因子的药物制剂。

[0254] 所述制剂还可包含缓冲系统、防腐剂、张度剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在本发明的一个实施方案中,所述药物制剂为水性制剂,即含水的制剂。这类制剂通常为溶液剂或混悬剂。在本发明的一个实施方案中,所述药物制剂为水溶液剂。

[0255] 在一个实施方案中,所述药物制剂为冻干剂,医师或患者在使用前向其加入溶剂和/或稀释剂。

[0256] 在一个实施方案中,所述药物制剂为无需任何预先溶解便可即时使用的干燥制剂(例如冷冻干燥的或喷雾干燥的)。

[0257] 在一个实施方案中,本发明涉及包含本发明缀合凝血因子的水溶液及缓冲液的药物制剂,其中所述缀合凝血因子以 0.1-100mg/ml 的浓度存在,并且其中所述制剂的 pH 为约 2.0-约 10.0。

[0258] 在本发明的一个实施方案中,所述制剂的 pH 选自:2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 和 10.0。

[0259] 在本发明的一个实施方案中,所述缓冲剂选自:乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、甘氨酸、甘氨酸、(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、N-环己基-3-氨基丙磺酸(CAPS)、N-环己基-2-氨基乙磺酸(CHES)、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟甲基)氨基甲烷、N-二(羟乙基)甘氨酸、曲辛、苹果酸、琥珀酸盐、马来酸、延胡索酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些特定缓冲液中的每一种构成本发明的备选的实施方案。

[0260] 在本发明的一个实施方案中,所述制剂还包含活性位点抑制剂。

[0261] 在本发明的一个实施方案中,所述制剂还包含药学上可接受的防腐剂。在本发明的一个实施方案中,所述防腐剂选自苯酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯基乙醇、苯甲醇、氯代丁醇和硫柳汞(thiomerosal)、溴硝丙二醇、苯甲酸、咪唑、氯己定(chlorohexidine)、脱氢乙酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苄索氯铵、氯苯甘醚(chlorphenesine)(3-对-氯苯氧基丙烷-1,2-二醇)或其混合物。

[0262] 在本发明的一个实施方案中,所述防腐剂以 0.1mg/ml-20mg/ml 的浓度存在。在本发明的一个实施方案中,所述防腐剂以 0.1mg/ml-5mg/ml 的浓度存在。在本发明的一个实施方案中,所述防腐剂以 5mg/ml-10mg/ml 的浓度存在。在本发明的一个实施方案中,所述防腐剂以 10mg/ml-20mg/ml 的浓度存在。这些特定防腐剂中的每一种构成本发明的备选的实施方案。防腐剂在药物组合物中的用途为技术人员所熟知。为了方便,作出对 Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第 20 版,2000 的引用。

[0263] 在本发明的一个实施方案中,所述制剂还包含等渗剂。在本发明的一个实施方案中,所述等渗剂选自:盐(例如氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(例如 L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、糖醇(例如丙三醇(甘油)、1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)、聚乙二醇(例如 PEG400)或其混合物。可使用任何糖,例如单糖、二糖或多糖,或水溶性葡聚糖,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、葡聚糖、普鲁兰、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素-Na。在一个实施方案中,糖添加剂为蔗糖。糖醇定义为具有至少一个-OH 基的 C4-C8 烃,并包括例如甘露醇、山梨糖醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿拉伯糖醇。在

一个实施方案中,所述糖醇添加物为甘露醇。上述糖或糖醇可单独或联合使用。所用量没有固定的限制,只要所述糖或糖醇可溶于液体制剂中并且不会不利地影响利用本发明方法所达到的稳定作用即可。在一个实施方案中,所述糖或糖醇的浓度为约 1mg/ml- 约 150mg/ml。在本发明的一个实施方案中,所述等渗剂以 1mg/ml-50mg/ml 的浓度存在。在本发明的一个实施方案中,所述等渗剂以 1mg/ml-7mg/ml 的浓度存在。本发明的一个实施方案中,所述等渗剂以 8mg/ml-24mg/ml 的浓度存在。本发明的一个实施方案中,所述等渗剂以 25mg/ml-50mg/ml 的浓度存在。这些特定等渗剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。等渗剂在药物组合物中的用途为技术人员所熟知。为了方便,作出对 Remington :The Science and Practice of Pharmacy,第 20 版,2000 的引用。

[0264] 在本发明的一个实施方案中,所述制剂还包含螯合剂。在本发明的一个实施方案中,所述螯合剂选自:乙二胺四乙酸(EDTA)盐、柠檬酸盐、天冬氨酸盐或其混合物。在本发明的一个实施方案中,所述螯合剂以 0.1mg/ml-5mg/ml 的浓度存在。在本发明的一个实施方案中,所述螯合剂以 0.1mg/ml-2mg/ml 的浓度存在。在本发明的一个实施方案中,所述螯合剂以 2mg/ml-5mg/ml 的浓度存在。这些特定螯合剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。螯合剂在药物组合物中的用途为技术人员所熟知。为了方便,作出对 Remington :The Science and Practice of Pharmacy,第 20 版,2000 的引用。

[0265] 在本发明的一个实施方案中,所述制剂还包含稳定剂。稳定剂在药物组合物中的用途为技术人员所熟知。为了方便,作出对 Remington :The Science and Practice of Pharmacy,第 20 版,2000 的引用。

[0266] 更具体地,本发明的组合物为稳定的液态药物组合物,其治疗活性组分包括在以液态药物制剂储存期间可能表现出聚集体形成的多肽。“聚集体形成”意指多肽分子之间的物理相互作用,其导致寡聚体的形成,该寡聚体可保持可溶的或从溶液中沉淀出来的可见大聚集体。“储存期间”意指液体药物组合物或制剂制得后并不立即给予受试者。而是在制备后,以液态形式、以冷冻状态或以干燥形式包装用于储存,用于以后重构成适于给予受试者的液态形式或其它形式。“干燥形式”意指通过冷冻干燥(即冻干;参见例如 Williams 和 Polli(1984)J. Parenteral Sci. Technol. 38 :48-59)、喷雾干燥(参见 Spray-Drying Handbook 中的 Masters(1991)(第 5 版;Longman Scientific and Technical,Essex, U. K.),第 491-676 页;Broadhead 等(1992)Drug Devel. Ind. Pharm. 18 :1169-1206 和 Mumenthaler 等(1994)Pharm. Res. 11 :12-20)或风干(Carpenter 和 Crowe(1988)Cryobiology 25 :459-470;和 Roser(1991)Biopharm. 4 :47-53)来干燥液体药物组合物或制剂。

[0267] 在液体药物组合物的储存期间多肽聚集体形成可对该多肽的生物活性产生不利影响,导致所述药物组合物疗效损失。此外,聚集体形成可引起其它问题,例如当使用输注系统给予含多肽的药物组合物时管道、膜或泵的阻塞

[0268] 本发明药物组合物还可包含足以减少在所述组合物储存期间多肽聚集体形成的量的氨基酸碱。“氨基酸碱”意指氨基酸或氨基酸的组合,其中任何既定的氨基酸以其游离碱的形式或以其盐的形式存在。当使用氨基酸的组合时,所有氨基酸可以其游离碱的形式存在、所有可以其盐的形式存在、或者一些可以其游离碱的形式存在而其它以其盐的形式存在。在一个实施方案中,用于制备本发明组合物的氨基酸为携带带电侧链的氨基酸,例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。特定氨基酸(例如甲硫氨酸、组氨酸、咪唑

(imidazole)、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸及其混合物)的任何立体异构体(即L、D或其混合物)或这些立体异构体的组合,可存在于本发明药物组合物中,只要所述特定氨基酸以其游离碱的形式或其盐的形式存在即可。在一个实施方案中,使用L-立体异构体。本发明组合物还可使用这些氨基酸的类似物配制。“氨基酸类似物”意指天然存在的氨基酸的衍生物,其引起减少在本发明液体药物组合物储存期间多肽聚集体形成的所需作用。合适的精氨酸类似物包括例如氨基胍、鸟氨酸和N-单乙基L-精氨酸,合适的甲硫氨酸类似物包括乙硫氨酸和丁硫氨酸(buthionine),合适的半胱氨酸类似物包括S-甲基-L-半胱氨酸。如同其它的氨基酸一样,所述氨基酸类似物以其游离碱的形式或其盐的形式掺入至组合物中。在本发明的一个实施方案中,所述氨基酸或氨基酸类似物以足以防止或延迟蛋白聚集的浓度使用。

[0269] 在本发明的一个实施方案中,当充当治疗剂的多肽为包含至少一个容易氧化成甲硫氨酸亚砷的甲硫氨酸残基时,可加入甲硫氨酸(或其它含硫氨基酸或氨基酸类似物)以抑制这种氧化。“抑制”意指甲硫氨酸的氧化形式随时间的累积最小化。抑制甲硫氨酸的氧化导致多肽更大程度地以其适当的分子形式保留。可使用甲硫氨酸的任何立体异构体(L、D或其混合物)或其组合。加入量应为足以抑制甲硫氨酸残基氧化的量,使得甲硫氨酸亚砷的量可为管理机构所接受。通常,这意味着所述组合物含有不超过约10%–约30%的甲硫氨酸亚砷。一般而言,这可通过加入甲硫氨酸,使得所加甲硫氨酸与甲硫氨酸残基的比在约1:1–约1000:1的范围,例如10:1–约100:1的范围来实现。

[0270] 在本发明的一个实施方案中,所述制剂还包含选自高分子量聚合物或低分子化合物的稳定剂。在本发明的一个实施方案中,所述稳定剂选自:聚乙二醇(例如PEG 3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基纤维素/羟基纤维素或其衍生物(例如HPC、HPC-SL、HPC-L和HPMC)、环糊精、含硫物质如单硫代甘油、巯基乙酸和2-甲硫基乙醇以及不同的盐(例如氯化钠)。这些特定稳定剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。

[0271] 所述药物组合物还可包含另外的稳定剂,其进一步提高其中的治疗性活性多肽的稳定性。本发明特别感兴趣的稳定剂包括但不限于甲硫氨酸和EDTA,其使多肽免受甲硫氨酸的氧化;以及非离子型表面活性剂,其使多肽免受冻融或机械剪切相关的聚集作用。

[0272] 在本发明的一个实施方案中,所述制剂还包含表面活性剂。在本发明的一个实施方案中,所述表面活性剂选自洗涤剂、乙氧基化蓖麻油、聚乙二醇化(polyglycolyzed)甘油酯、乙酰化单甘油酯、山梨糖醇酐脂肪酸酯、聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物(例如泊洛沙姆例如Pluronic®F68、泊洛沙姆188和407、Triton X-100)、聚氧乙烯化山梨糖醇酐脂肪酸酯、聚氧乙烯和聚乙烯衍生物例如烷基化和烷氧基化衍生物(吐温例如Tween-20、Tween-40、Tween-80和Brij-35)、单甘油酯或其乙氧基化衍生物、二甘油酯或其聚氧乙烯衍生物、醇类、甘油、凝集素类和磷脂类(例如磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、双磷脂酰甘油和鞘磷脂)、磷脂衍生物(例如二棕榈酰磷脂酸)和溶血磷脂衍生物(例如棕榈酰溶血磷脂酰-L-丝氨酸和乙醇胺、胆碱、丝氨酸或苏氨酸的1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酯)及溶血磷脂酰胆碱和磷脂酰胆碱的烷基、烷氧基(烷基酯)、烷氧基(烷基醚)衍生物,例如溶血磷脂胆碱的月桂酰和肉豆蔻酰衍生物、二棕榈酰磷脂酰胆碱以及极性头基团(即胆碱类、乙醇胺类、磷脂酸、丝氨酸类、苏氨酸类、甘油、肌醇)的修饰物,和带正电的DODAC、DOTMA、DCP、BISHOP、溶血磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰苏氨酸以及甘

油磷酸脂类（例如脑磷脂）、甘油糖脂类（例如吡喃型半乳糖苷（galactopyransoide））、鞘糖脂类（例如神经酰胺、神经节苷脂）、十二烷基磷酸胆碱、鸡蛋溶血卵磷脂、梭链孢酸衍生物（例如牛磺二氢梭链孢酸钠等）、长链脂肪酸及其 C6-C12 盐（例如油酸和辛酸）、酰基肉毒碱类及衍生物、赖氨酸、精氨酸或组氨酸的 N^α- 酰化衍生物、或者赖氨酸或精氨酸的侧链酰化衍生物、包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸与中性或酸性氨基酸的任何组合的二肽的 N^α- 酰化衍生物、包括一个中性氨基酸与两个带电氨基酸的任何组合的三肽的 N^α- 酰化衍生物、DSS（多库酯钠，CAS 登记号 [577-11-7]）、多库酯钙，CAS 登记号 [128-49-4]）、多库酯钾，CAS 登记号 [7491-09-0]）、SDS（十二烷基硫酸钠或月桂基硫酸钠）、辛酸钠、胆酸或其衍生物、胆汁酸及其盐、甘氨酸或牛磺酸缀合物、熊脱氧胆酸、胆酸钠、脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨酸胆酸钠、N- 十六烷基 -N,N- 二甲基 -3- 胺基 -1- 丙磺酸盐、阴离子（烷基 - 芳基 - 磺酸盐类）一价表面活性剂、两性离子表面活性剂（例如 N- 烷基 -N,N- 二甲基胺基 -1- 丙磺酸盐、3- 氯酰氨基 -1- 丙基二甲基胺基 -1- 丙磺酸盐、阳离子表面活性剂（季铵碱）（例如溴化十六烷基三甲胺、氯化十六烷基吡啶鎓）、非离子型表面活性剂（例如十二烷基 β-D- 吡喃葡萄糖苷）、poloxamine（例如 Tetronic' s），其为衍生自依次将环氧丙烷和环氧乙烷加成至乙二胺的四官能嵌段共聚物，或者所述表面活性剂可选自咪唑啉衍生物或其混合物。这些特定表面活性剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。

[0273] 表面活性剂在药物组合物中的用途为技术人员所熟知。为了方便，作出对 Remington :The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, 2000 的引用。

[0274] 可能的是本发明药物制剂中可存在其它成分。所述另外的成分可包括：湿润剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张度改性剂、螯合剂、金属离子、油脂载体、蛋白（例如人血清白蛋白、明胶或蛋白类）和两性离子（例如氨基酸，例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸）。所述另外的成分无疑不应对本发明药物制剂的整体稳定性造成不利影响。

[0275] 含有本发明缀合凝血因子的药物组合物可在数个部位给予到需要这样的治疗的患者，例如在局部部位，例如皮肤和粘膜部位；在旁路吸收部位，例如给予到动脉中、静脉中、心脏中；和在涉及吸收的部位，例如给予到皮内、皮下、肌肉或腹内。

[0276] 本发明药物组合物的给予可通过数种给药途径给予需要这种治疗的患者，所述给药途径例如舌部给药、舌下给药、含服给药、口腔内给药、口服给药、胃肠内给药、鼻部给药、肺部给药例如通过细支气管和肺泡或其组合、表皮给药、皮肤给药、透皮给药、阴道给药、直肠给药、眼部给药如通过结膜、输尿管给药和经胃肠外给药。

[0277] 本发明的组合物可以以若干剂型给予，例如作为溶液剂、混悬剂、乳剂、微乳剂、复合型乳剂、泡沫剂、药膏、糊剂、硬膏、软膏、片剂、包衣片剂、冲洗剂、胶囊如硬胶囊和软胶囊、栓剂、直肠用胶囊、滴剂、凝胶剂、喷雾剂、散剂、气雾剂、吸入剂、滴眼剂、眼用软膏、眼用冲洗剂、阴道栓剂、阴道环、阴道软膏、注射液、原位转化溶液剂如原位胶凝剂、原位沉降剂、原位沉淀剂、原位结晶剂、输液剂和埋植剂。

[0278] 本发明的组合物可进一步例如通过共价、疏水和静电相互作用复合或连接至药物载体、药物递送系统和改良药物递送系统，以便进一步增强本发明肽的稳定性、提高生物利用度、增大溶解度、减少不良作用、实现本领域技术人员所熟知的按时疗法和提高患者顺应性或其任何组合。载体、药物递送系统和改良药物递送系统的实例包括但不限于：聚合物例如纤维素及衍生物、多糖例如葡聚糖及衍生物、淀粉及衍生物、聚（乙烯醇）、丙烯酸酯聚

合物和甲基丙烯酸酯聚合物、聚乳酸和聚乙醇酸及其嵌段共聚物、聚乙二醇、载体蛋白例如白蛋白、凝胶例如热胶凝体系,例如本领域技术人员熟知的嵌段共聚物体系、胶束、脂质体、微球、纳米颗粒、液晶及其分散体、脂质-水体系中相特性领域的技术人员熟知的 L2 相及其分散体、聚合胶束、复合型乳剂、自乳化、自微乳化、环糊精及其衍生物,以及树枝状大分子(dendrimer)。

[0279] 本发明的组合物可用于配制用于肺部给予本发明肽的固体制剂、半固体制剂、散剂和溶液剂,肺病给予使用例如定量吸入器、干粉吸入器和喷雾器,所有这些装置都为技术领域技术人员所熟知。

[0280] 本发明组合物尤其可用于配制控释、持续释放、延释、阻释和缓释的药物递送系统。更具体地但不限于,组合物可用于配制本领域技术人员所熟知的肠胃外控释系统和缓释系统(两种系统均导致给药次数减少许多倍)。更优选的是,控释系统和缓释系统经皮下给予。在不限制本发明范围下,有用的控释系统和组合物的实例为水凝胶、油凝胶、液晶、聚合胶束、微球和纳米粒。

[0281] 制备可用于本发明组合物的控释系统的方法包括但不限于:结晶、冷凝、共结晶、沉淀、共沉淀、乳化、分散、高压匀浆化、包囊化、喷雾干燥、微胶囊化、凝聚、相分离、溶剂蒸发以制备微球、挤压和超临界流体法。对以下文献作出整体参考:Handbook of Pharmaceutical Controlled Release(Wise, D.L. 编辑 Marcel Dekker, New York, 2000) 和 Drug and the Pharmaceutical Sciences 第 99 卷:Protein Formulation and Delivery(MacNally, E. J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000)。

[0282] 肠胃外给药可通过注射器、任选笔型(pen-like)注射器经皮下注射、肌肉注射、腹膜内注射或静脉注射来进行。或者,肠胃外给药可以依靠输液泵进行。另一个选择为以下组合物:其可为以鼻用喷雾或肺部喷雾形式给予本发明肽的溶液剂或混悬剂。作为又一个选择,含有本发明肽的药物组合物还可以适合于透皮给药,例如通过无针注射或贴剂(任选离子电渗贴剂)来进行;或跨粘膜给药例如含服给药。

[0283] 术语“稳定化组合物”是指物理稳定性增加、化学稳定性增加或物理和化学稳定性增加的组合物。

[0284] 本文所用关于蛋白组合物的术语“物理稳定性”是指由于蛋白暴露至热-机械应力和/或与失稳的界面和表面(例如疏水表面和界面)的相互作用,所述蛋白形成蛋白的生物失活和/或不溶性聚集体的趋势。在将装于合适的容器(例如药筒或小瓶)中的组合物于不同温度下暴露于机械/物理应力(例如搅拌)中达各种时期后,通过目视检查和/或浊度测定评估含水蛋白组合物的物理稳定性。组合物的目视检查在黑暗背景下于聚焦强光中进行。组合物的浊度通过将浊度分级为例如 0 至 3 等级的目视评分来表征(未呈现混浊的组合物对应于目视评分 0,而在日光中呈现可视混浊的组合物对应于目视评分 3)。当其在日光中呈现可视混浊时,将组合物分类为关于蛋白聚集的物理不稳定。或者,可通过技术人员熟知的简易浊度测量来评估组合物的浊度。含水蛋白组合物的物理稳定性还可通过使用蛋白构象状态的光谱剂或光谱探测物来评估。所述探测物优选为优先结合至蛋白的非天然构象异构体的小分子。蛋白结构的小分子光谱探测物的一个实例为硫磺素 T。硫磺素 T 为已广泛用于检测淀粉状原纤维的荧光染料。在存在原纤维以及也可能的其它蛋白构型下,硫磺素 T 当结合至原纤维蛋白形式时在约 450nm 下产生新的激发极值并在约 482nm 下

发射增强。未接合的硫磺素 T 在所述波长下基本无荧光。

[0285] 其它小分子可用作蛋白结构从天然状态向非天然状态变化的探测物。例如优先结合至蛋白的外露疏水补丁 (hydrophobic patch) 的“疏水补丁”探测物。所述疏水补丁通常埋藏于处于其天然状态的蛋白三级结构之内,但随着蛋白开始解折叠或变性而暴露。这些小分子光谱探测物的实例为芳族疏水染料,例如蒽 (anthracene)、吖啶、菲咯啉等。其它光谱探测物为金属-氨基酸络合物,例如疏水氨基酸 (例如苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸) 的钴金属络合物等。

[0286] 本文所用关于蛋白组合物的术语“化学稳定性”是指蛋白结构的化学共价变化,所述变化导致形成与天然蛋白结构相比具有潜在较小生物潜能和 / 或潜在增加的免疫原性的化学降解产物。根据天然蛋白的类型和性质以及所述蛋白所暴露的环境,可形成各种化学降解产物。如本领域技术人员所熟知,几乎不可能完全避免化学降解的消除,并且在储存和使用蛋白组合物期间常常见到化学降解产物的量不断增加。多数蛋白容易发生脱酰胺作用,其中谷氨酰胺或天冬酰胺残基的侧链酰胺基被水解而形成游离羧酸的过程。其它降解途径涉及高分子量转化产物的形成,其中两个或更多个蛋白分子通过转酰胺基作用和 / 或二硫化物相互作用相互共价结合,导致形成共价结合的二聚体、寡聚体和多聚体降解产物 (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T. J. 和 Manning M. C., Plenum Press, New York 1992)。可提及作为化学降解另一种变体的氧化 (例如甲硫氨酸残基的氧化)。可通过在暴露至不同环境条件 (可通常通过例如增加温度来加速降解产物的形成) 下之后的各个时间点测量化学降解产物的量,来评估蛋白组合物的化学稳定性。通常通过利用各种色谱技术 (例如 SEC-HPLC 和 / 或 RP-HPLC) 根据分子大小和 / 或电荷将降解产物分离来测量各种降解产物的量。

[0287] 因此,如上文所概述,“稳定化组合物”是指物理稳定性增加、化学稳定性增加或物理和化学稳定性增加的组合物。总之,组合物在使用和储存 (依照推荐的使用和储存条件) 期间必须稳定直至达到失效期。

[0288] 在本发明的一个实施方案中,包含式 (I) 蛋白缀合物的药物组合物对于超过 6 周的使用和超过 3 年的储存为稳定的。

[0289] 在本发明的另一个实施方案中,包含式 (I) 蛋白缀合物的药物组合物对于超过 4 周的使用和超过 3 年的储存为稳定的。

[0290] 在本发明的又一个实施方案中,包含式 (I) 蛋白缀合物的药物组合物对于超过 4 周的使用和超过 2 年的储存为稳定的。

[0291] 在本发明的再一个实施方案中,包含式 (I) 蛋白缀合物的药物组合物对于超过 2 周的使用和超过 2 年的储存为稳定的。

[0292] 在本发明的又一个实施方案中,包含式 (I) 蛋白缀合物的药物组合物对于超过 1 周的使用和超过 6 个月的储存为稳定的。

[0293] 制备的通用方法

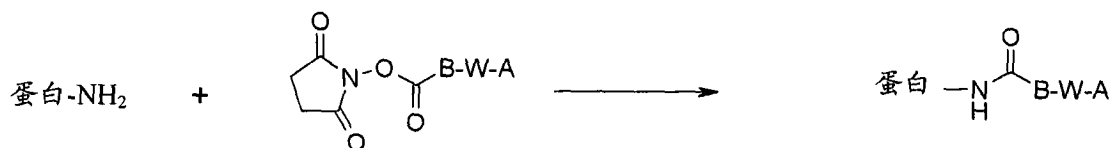
[0294] A-W-B- 部分可酶促或通过化学反应基团连接至蛋白。反应基团的选择取决于存在于白蛋白结合物上的官能团和在待修饰的蛋白上的官能团。

[0295] (a) 化学反应基团

[0296] 活化酯

[0297] 活化酯通常与氨基官能团(function)例如赖氨酸残基上的 ϵ 氨基和存在于肽/蛋白链N端的氨基反应。

[0298]



[0299] 合适的活化酯包括N-羟基琥珀酰亚胺酯,但其它活化酯为技术人员已知,例如羟基苯并三唑酯、3,4-二氢-3-羟基-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪、7-氮杂苯并三唑-1-基酯等。

[0300] 在一个实施方案中,在环糊精或环糊精衍生物存在下于水溶液中,将蛋白用衍生为活化酯的水不溶性白蛋白结合物酰化。

[0301] 偶联至游离巯基

[0302] 蛋白可包含游离巯基,其可如下所述与马来酰亚胺衍生的白蛋白结合物反应:

[0303]



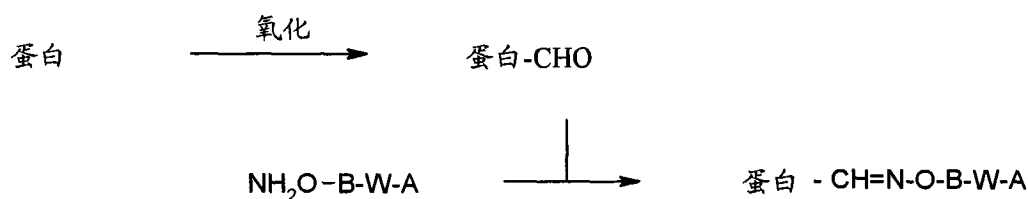
[0304] 其它巯基反应基团包括卤代乙酰胺例如碘乙酰胺或溴乙酰胺,以及S-硫代吡啶基。

[0305] 在一个实施方案中,在环糊精或环糊精衍生物存在下于水溶液中,使含游离巯基的蛋白与用马来酰亚胺基团官能化的水不溶性白蛋白结合物反应。

[0306] 偶联至醛基

[0307] 可通过轻度氧化N端丝氨酸或苏氨酸残基或如WO 2008/025856A2所述通过轻度氧化糖蛋白上的聚糖部分来在蛋白上产生醛官能团。随后可将用羟胺、肼或酰肼官能化的白蛋白结合物按如下所述偶联至蛋白:

[0308]



[0309] 在一个实施方案中,将蛋白氧化使得其包含醛官能团,随后在环糊精或环糊精衍生物存在下于水溶液中,与用羟胺基团官能化的水不溶性白蛋白结合物反应。

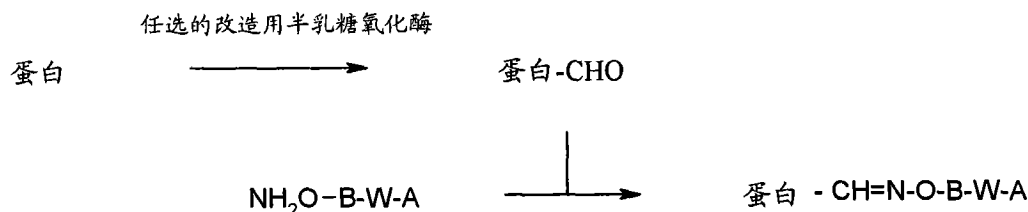
[0310] (b) 酶促偶联

[0311] 白蛋白结合物可使用酶偶联至蛋白。

[0312] 半乳糖氧化酶

[0313] 如WO 2005/014035A2中所述,可使用半乳糖氧化酶(EC. 1.1.3.9)酶促氧化含半乳糖端的糖蛋白。糖蛋白上的半乳糖残基通常对酶促氧化并不直接可接近,因为其被唾液酸的存在所封闭。在这种情况下,在可氧化之前,需要通过使用唾液酸酶/神经氨酸酶或者通过温和酸水解(hydrolysis)来除去唾液酸。

[0314]



[0315] 在一个实施方案中,将糖蛋白用半乳糖氧化酶氧化使得其包含醛官能团,随后在环糊精或环糊精衍生物存在于水溶液中,与用羟胺基团官能化的水不溶性白蛋白结合物反应。

[0316] 转谷氨酰胺酶

[0317] 转谷氨酰胺酶 (E. C. 2. 3. 2. 13) 也称为蛋白-谷氨酰胺- γ -谷氨酰转移酶,并催化以下一般反应:

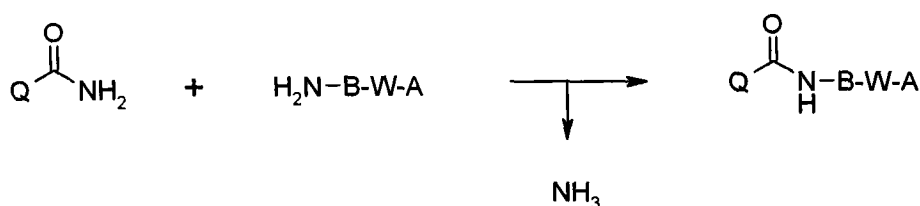
[0318]



[0319] $\text{Q}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ (胺受体) 可表示含谷氨酰胺残基的肽或蛋白,而 $\text{Q}'-\text{NH}_2$ (胺供体) 表示含胺亲核体。或者, $\text{Q}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ 和 $\text{Q}'-\text{NH}_2$ 可分别表示胺受体和含赖氨酸的肽或蛋白。然而,在本发明中, $\text{Q}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ 表示含谷氨酰胺残基的蛋白,而 $\text{Q}'-\text{NH}_2$ 表示如上文所指出的含胺亲核体。

[0320] 可用的转谷氨酰胺酶的实例包括微生物转谷氨酰胺酶,例如来自以下的转谷氨酰胺酶: 茂原链霉菌 (*Streptomyces mobaraense*)、肉桂链霉菌 (*Streptomyces cinnamomeum*) 和灰肉链霉菌 (*Streptomyces griseocarneum*) (所有都公开于 US 5,156,956 中,其通过引用结合于本文中),以及淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*) (公开于 US 5,252,469 中,其通过引用结合于本文中) 和拉达卡链霉菌 (*Streptomyces ladakanum*) (JP 2003/199569,其通过引用结合于本文中)。应注意的是,以前链轮丝菌 (*Streptoverticillium*) 属的成员现包括在链霉菌属中 (Kaempfer, J. Gen. Microbiol. 137,1831-1892(1991))。其它可用的微生物转谷氨酰胺酶分离自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (公开于 US 5,731,183 中,其通过引用结合于本文中) 和来自各种粘菌 (*Myxomycetes*)。可用的微生物转谷氨酰胺酶的其它实例为公开于 WO 96/06931 (例如来自 *Bacillus lydicus* 的转谷氨酰胺酶) 和 WO 96/22366 中的转谷氨酰胺酶,这两篇参考文献都通过引用结合于本文中。可用的非微生物转谷氨酰胺酶包括豚鼠肝转谷氨酰胺酶,以及来自各种海洋来源如扁鱼真鲷 (*Pagrus major*) (公开于 EP-0555649 中,其通过引用结合于本文中) 和日本牡蛎长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) (公开于 US 5,736,356 中,其通过引用结合于本文中) 的转谷氨酰胺酶。

[0321]

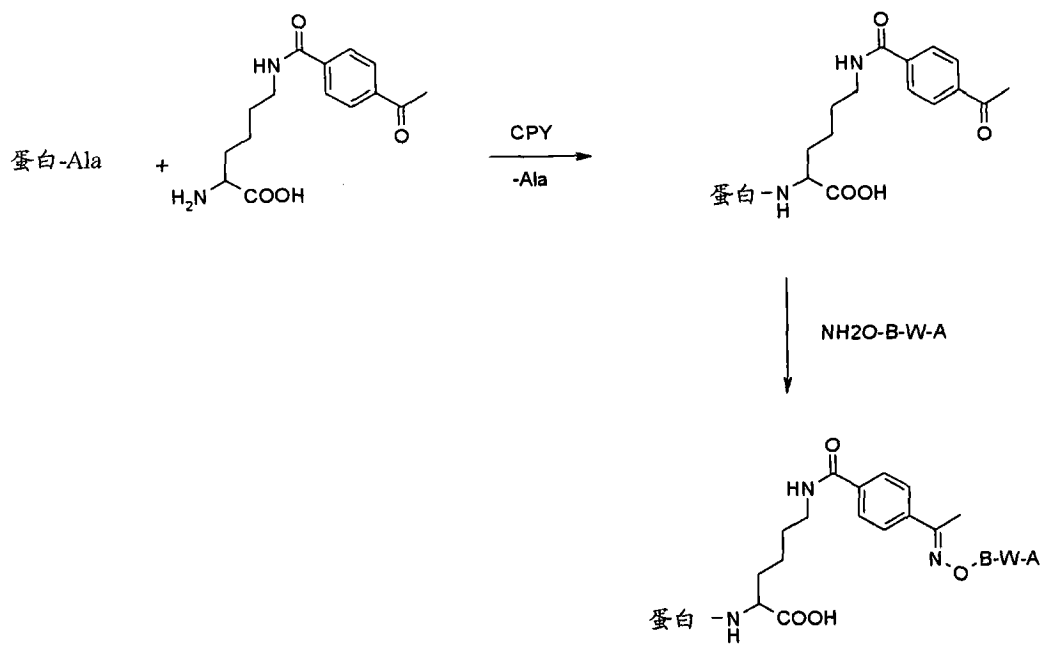


[0322] 在一个实施方案中,在环糊精或环糊精衍生物存在于水溶液中,将蛋白用转谷氨酰胺酶和用胺处理衍生的水不溶性白蛋白结合物处理。

[0323] 羧肽酶 Y

[0324] 可通过使用羧肽酶 Y (EC. 3. 4. 16. 5) 和如 WO 2007/093594 中所述的合适修饰底物来在其 C 端修饰蛋白。如所阐述显示了如 B. Peschke 等“C-Terminally PEGylated hGH derivatives (C 端聚乙二醇化的 hGH 衍生物)”Bioorg. Med. Chem. 15 (2007) 4382-4395 中所述的两步法,其中酶促地将 C 端丙氨酸与 N^ε-(4-乙酰基苯甲酰基)赖氨酸交换,接着与白蛋白结合物衍生物 A-W-B-OH₂ 反应:

[0325]



[0326] 在一个实施方案中,在环糊精或环糊精衍生物存在于水溶液中,将蛋白用羧肽酶 Y 和 N^ε-(4-乙酰基苯甲酰基)赖氨酸处理,接着与用氨基处理衍生的水不溶性白蛋白结合物反应。

[0327] 现参考以下非限制性实施例描述本发明:

[0328] 实施例

[0329] 所用缩写:

[0330] amu = 原子质量单位

[0331] hr = 小时

[0332] Hz = 赫兹

[0333] L = 升

[0334] M = 摩尔

[0335] mbar = 毫巴

[0336] mg = 毫克

[0337] min = 分钟

[0338] mL = 毫升

[0339] mM = 毫摩尔

[0340] mm = 毫米

- [0341] mmol = 毫摩尔
[0342] nmol = 纳摩尔
[0343] mol = 摩尔
[0344] MW = 分子量
[0345] N = 正常
[0346] nm = 纳米
[0347] sec = 秒
[0348] ppm = 百万分之一
[0349] ESI = 电喷射离子化
[0350] i. v. = 静脉内
[0351] m/z = 质荷比
[0352] MS = 质谱
[0353] HPLC = 高压液相色谱法
[0354] RP = 反相
[0355] HPLC-MS = 高压液相色谱 - 质谱
[0356] NMR = 核磁共振谱法
[0357] p. o. = 口服
[0358] rt 或 RT = 室温
[0359] s. c. = 皮下
[0360] tr = 保留时间
[0361] Boc = 叔丁氧羰基
[0362] OtBu = 叔丁酯
[0363] tBu = 叔丁基
[0364] Boc-4-ABZ-OH = 4-叔丁氧羰基氨基 - 苯甲酸
[0365] CH₃CN = 乙腈
[0366] DCM = 二氯甲烷, CH₂Cl₂, 亚甲基氯
[0367] DIC = 二异丙基碳二亚胺 (diisopropylcarbodiimide)
[0368] DIPEA = N, N-二异丙基乙胺
[0369] DMF = N, N-二甲基甲酰胺
[0370] DMSO = 二甲亚砜
[0371] DTT = 二硫苏糖醇
[0372] EDAC = 盐酸 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺
[0373] Et₂O = 二乙醚
[0374] EtOAc = 乙酸乙酯
[0375] Fmoc = 9H-芴-9-基甲氧羰基
[0376] Fmoc-Glu-O-t-Bu = N-Fmoc-谷氨酸-1-叔丁酯
[0377] Fmoc-Lys(Mtt)-OH = (S)-6-[(二苯基-对甲苯基-甲基)-氨基]-2-(9H-芴-9-基甲氧羰基氨基)-己酸
[0378] Fmoc-OEG-OH = (2[2-(Fmoc-氨基)乙氧基]乙氧基)乙酸

- [0379] H_2O = 水
- [0380] HBTU = 2-(1H- 苯并三唑 -1- 基 -)-1,1,3,3 四甲基脒鎓六氟磷酸盐
- [0381] HOAt = 1- 羟基 -7- 氮杂苯并三唑
- [0382] HOBt = 1- 羟基苯并三唑
- [0383] MeCN = 乙腈
- [0384] MeOH = 甲醇
- [0385] NaCl = 氯化钠
- [0386] NaOH = 氢氧化钠
- [0387] NMP = N- 甲基吡咯烷 -2- 酮
- [0388] OEG = (2[2-(氨基) 乙氧基] 乙氧基) 乙酸
- [0389] OtBu = 叔丁酯
- [0390] TFA = 三氟乙酸
- [0391] THF = 四氢呋喃
- [0392] TIS = 三异丙基甲硅烷
- [0393] Trt = 三苯甲基
- [0394] TSTU = O-(N- 琥珀酰亚胺基)-1,1,3,3- 四甲基脒鎓四氟硼酸盐
- [0395] $CDCl_3$ = 氘氯仿
- [0396] CD_3OD = 四氘甲醇
- [0397] $DMSO-d_6$ = 六氘二甲亚砜
- [0398] 用于实施例中的 TGase 为来自 US 5,156,956 的 茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*) 的微生物转谷氨酰胺酶。
- [0399] 实施例还包含以下通用方法：
- [0400] 毛细管电泳
- [0401] 使用 Agilent Technologies 3DCE 系统 (Agilent Technologies) 进行毛细管电泳。使用 Agilent Technologies 3DCE ChemStation 进行数据采集和信号处理。毛细管为来自 Agilent 的 64.5cm (56.0cm 有效长度) 50 μm 内径 “Extended Light Path Capillary”。在 200nm (16nm Bw, 参考 380nm 和 50nm Bw) 下进行 UV 检测。工作电解液为磷酸盐缓冲液 50mM pH 7 (方法 A)。将毛细管用 0.1M NaOH 调适 3min, 然后用 Milli-Q 水调适 2min 以及用电解液调适 3min。在每次运行后, 将毛细管用 milli-Q 水冲洗 2min, 然后用磷酸冲洗 2min, 再用 milli-Q 水冲洗 2min。液力注射在 50mbar 下持续 4.0sec 完成。电压为 +25kV。毛细管温度为 30°C, 而运行时间为 10.5min。
- [0402] MalDI-ToF 质谱
- [0403] 使用 Autoflex MalDI-ToF 设备 (Bruker) 测定分子量。用 α - 氰基 -4- 羟基 - 肉桂酸作为基质制备样品。
- [0404] RP-HPLC
- [0405] RP-HPLC 分析在 Agilent 1100 系统上使用 Vydac 218TP544.6mm $\times$ 250mm 5 μm C-18 二氧化硅柱 (The Separations Group, Hesperia) 进行。在 UV 214nm、254nm、280nm 和 301nm 下进行检测。将柱用 0.1% 三氟乙酸 / H_2O 平衡, 而样品通过 0-90% 乙腈对 0.1% 三氟乙酸 / H_2O 的合适梯度进行洗脱。

[0406] LC-MS

[0407] 在配备有两个 Perkin Elmer Series 200 微型泵、Perkin Elmer Series 200 自动取样器、Applied Biosystems 785A UV 检测器和 Sedex 75 Evaporative Light 散射检测器的 PE-Sciex API 100 或 150 质谱仪上进行 LC-MS 分析。将 Waters Xterra 3.0mm×50mm 5 μ C-18 二氧化硅柱于室温下以 1.5ml/min 洗脱。其用 5% MeCN/0.1% TFA/H₂O 平衡,并用 5% MeCN/0.1% TFA/H₂O 洗脱 1.0min,然后用 90% MeCN/0.1% TFA/H₂O 在 7min 内的线性梯度洗脱。通过在 214nm 下的 UV 检测和 Evaporative light Scattering 进行检测。将一部分柱洗脱液引入 PE-Sciex API 100 质谱仪的离子喷射接口内。在运行期间,每 2 秒扫描质量范围 300-2000amu。

[0408] 蛋白定量

[0409] 通过使用 NanoDrop ND-1000UV- 分光光度计测量在 280nm 下的吸光度来估计蛋白浓度。

[0410] 用于确定衍生化位点的酶促肽作图法

[0411] 使用 Asp-N 消化还原且烷基化的蛋白进行肽作图法。首先,按照标准程序将蛋白用 DTT 和碘乙酰胺处理。将烷基化产物用 HPLC 纯化。随后将纯化的烷基化产物用内切蛋白酶 Asp-N(Boehringer) 以 1 : 100 的酶:底物比消化过夜。使用 C-18 柱和标准 TFA/MeCN 缓冲系统 HPLC 分离消化物。将所得肽图与未衍生化 hGH 的肽图进行比较,并收集具有不同保留时间的流分,然后进一步用 Maldi-tof 质谱法分析。

[0412] SDS page

[0413] 使用 NuPAGE 4% -12% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen NP0321BOX) 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。如 M. M. Kurfurst 在 Anal. Biochem. 200 (2), 244-248, (1992) 中所述,将凝胶银染 (Invitrogen LC6100) 或考马斯染色 (Invitrogen LC6065) 并且还在相应位置用碘化钡染色用于 PEG。

[0414] 蛋白色谱法

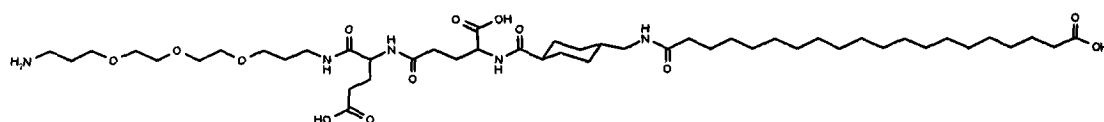
[0415] 在来自 GE Health Care 的 Äkta Explorer 色谱系统和柱上进行蛋白色谱法。使用 Q-Sepharose HP 26/10 柱进行阴离子交换。起始缓冲液为 20mM pH 8.5 三乙醇胺缓冲液,而洗脱缓冲液为起始缓冲液 +0.2MNaCl。通常用 0-75%洗脱缓冲液在 15 个柱体积内的梯度洗脱化合物。使用 HiPrep 26/10 柱进行脱盐和缓冲液更换。

[0416] 实施例 A

[0417] 缀合因子 VIIa 的制备

[0418] 步骤 (a)- 白蛋白结合物 (1) 的制备

[0419]



(1)

[0420] 使用 2- 氯三苯甲基氯树脂通过常规固相合成装配白蛋白结合物 (1):将树脂在 DCM 中溶胀,然后加入 10 倍过量的 4,7,10- 三氧杂 -1,13- 二胺。在洗涤之后,利用 HOBt/DIC 和 30% 哌啶 -DMF 将 Fmoc-Glu(OtBu)OH、Fmoc-Glu-OtBu 和 Fmoc-Thex-OH(凝血酸)依

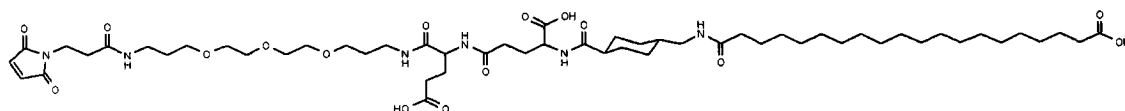
次偶联和脱保护。最后利用 HOAc、DIC、二甲基吡啶将完全未保护的二十烷二酸以过量偶联。然后使用含 10% TFA 的 DCM 使白蛋白结合物从树脂中裂解。

[0421] 步骤 (a) - 备选程序

[0422] 将 2-氯三苯甲基树脂 (2.0g, 2,6mmol) 在 DCM 中溶胀 1/2h。将 4,7,10-三氧杂-1,13-二胺的 DCM 溶液 (30ml) 加入。在 rt 下搅拌树脂 1h。将树脂用二氯甲烷洗涤一次, 然后加入 DIPEA : MeOH : DCM (15ml : 15ml : 20ml) 溶液。将树脂振摇 30min, 然后用 DCM 洗涤两次。然后按照标准肽化学如下依次偶联 FmocGlu(OtBu)OH、FmocGluOtBu 和 FmocThexOH : 将 0.5M Fmoc-AA-OH/DIC/HOBt 各自的 NMP 溶液 (11.7ml) 混合, 然后在 2min 后加至树脂中。将树脂在 rt 下振摇 45min, 然后用 5×NMP 和 5×DCM 洗涤。将 Ac20/DIPEA/NMP (1 : 1 : 5) 的溶液加入并将树脂在 rt 下搅拌 10min。将树脂洗涤 (5×NMP 和 5×DCM)。然后将树脂用 30% 哌啶 -NMP 处理 2×10min, 最后用 5×NMP 和 5×DCM 洗涤。然后将肽加至含 0.125M HOAt (3 当量)、0.125M DIC (3 当量) 和 0.125M 二甲基吡啶 (3 当量) 的 0.25M 二十烷二酸 (6 当量) 溶液。将树脂在 rt 下振摇 2h。将树脂用 5×NMP 和 8×DCM 洗涤。使用 10% TFA-DCM 经 20min 使产物 (1) 从树脂中裂解。将树脂过滤, 然后再次用 10% TFA-DCM 经另外的 20min 处理树脂。收集合并的滤液并拿去干燥。

[0423] 步骤 (b) - 马来酰亚胺官能化的白蛋白结合物 (2) 的制备

[0424]



(2)

[0425] 在 DMF 中, 通过加入 TSTU 活化的 3-马来酰亚胺丙酸用马来酰亚胺处理来在游离氨基处进一步官能化白蛋白结合物。最后在 95% TFA-MilliQ 中脱保护和在乙腈中再结晶之后, 作为白色细粉末得到式 (2) 的化合物。

[0426] 步骤 (b) - 备选程序

[0427] 将来自上述步骤 (a) 的产物溶解在 DMF (6ml) 中, 然后加入 TSTU-活化的 3 马来酰亚胺丙酸 (通过使 TSTU 与 3 马来酰亚胺丙酸在 DMF (2ml) 中反应 45min 预制备) 和 DIPEA (200 μl)。将混合物在 rt 下搅拌 1h。然后将反应混合物拿去干燥。将残留物溶解于 95% TFA-MilliQ 水中并在 rt 下搅拌 20min。将混合物拿去干燥。向残留物中加入最小量的水以沉淀固体。将固体过滤并在乙腈中再结晶。收集晶体并用二乙醚充分洗涤。

[0428] 步骤 (c) - 马来酰亚胺官能化的白蛋白结合物 (2) 与 FVIIa 的缀合

[0429] 将 C407 因子 VIIa 用于缀合 : 将含 scFVIIaC407 的 50mM Hepes, 100mM NaCl, 10mM CaCl₂, pH 7.0 加至 (2) 的 50mM Hepes, 100mM NaCl, 10mM CaCl₂, pH 7.0 + 5% 2-羟乙基-β-环糊精溶液中并使之在 25℃ 下反应 1h。将样品浓缩并将缓冲液更换成新鲜 50mM Hepes, 100mM NaCl, 10mM CaCl₂, pH 7.0, 然后使脱辅基酶在 25℃ 过夜以自体活化。通过 SDS-PAGE (还原条件) 确认自体活化和选择性重链缀合。

[0430] 实施例 1

[0431] 1. 白蛋白结合物 (II) 的制备

[0432] 四唑 OEG 接头 (IIa) :

[0443] 将 Fmoc-OEG-OH 和 HOBT 称入烧瓶中,溶解于含溴酚蓝的 NMP (15mL, 0.5mM) 中。将该溶液加至所述排干的树脂,接着加入 DIC。将反应物在环境温度下振摇 23hr。将树脂排干并用 NMP (6×15mL) 洗涤。

[0444] Fmoc 基团的去除:将树脂与含 25%哌啶的 NMP (10mL) 一起振摇 10min。将树脂排干并用含 25%哌啶的 NMP (10mL) 处理 1 小时,接着排干并用 NMP (6×15mL) 洗涤。

[0445] 将 Fmoc-Glu-O-t-Bu 和 HOBT 称入烧瓶中,溶解于含溴酚蓝的 NMP (15mL, 0.5mM) 中。将该溶液加至所述排干的树脂,接着加入 DIC。将反应物在环境温度下振摇 18hr。将树脂排干并用 NMP (6×15mL) 洗涤。

[0446] Fmoc 基团的去除:将树脂与含 25%哌啶的 NMP (10mL) 一起振摇 10min。将树脂排干并用含 25%哌啶的 NMP (10mL) 处理 1 小时,接着排干并用 NMP (6×15mL) 洗涤。

[0447] 将 Fmoc-Glu-O-t-Bu 和 HOBT 称入烧瓶中,溶解于 15ml 含 0.5mM 溴酚蓝的 NMP 中。将该溶液加至所述排干的树脂,接着加入 DIC。将反应物在环境温度下振摇 18hr。将树脂排干并用 NMP (6×15mL) 洗涤。

[0448] Fmoc 基团的去除:将树脂与含 25%哌啶的 NMP (10mL) 一起振摇 10min。将树脂排干并用含 25%哌啶的 NMP (10mL) 处理 1 小时,接着排干并用 NMP (6×15mL) 洗涤。

[0449] 将 Fmoc-OEG-OH 和 HOBT 称入烧瓶中,溶解于含溴酚蓝的 NMP (15mL, 0.5mM) 中。将该溶液加至所述排干的树脂,接着加入 DIC。将反应物在环境温度下振摇。将树脂排干并用 NMP (6×15mL) 洗涤。

[0450] Fmoc 基团的去除:将树脂与含 25%哌啶的 NMP (10mL) 一起振摇 10min。将树脂排干并用含 25%哌啶的 NMP (10mL) 处理 1 小时,接着排干并用 NMP (6×15mL) 洗涤。

[0451] 将 4-(16-1H-四唑-5-基-十六烷酰氨磺酰基)-丁酸和 HOBT 称入烧瓶中,溶解于含溴酚蓝的 NMP (15mL, 0.5mM) 中。将该溶液加至所述排干的树脂,接着加入 DIC。将反应物在环境温度下振摇 21hr。将树脂排干并用 NMP (6×15mL NMP) 洗涤,接着排干并用 DCM (6×15mL) 洗涤。

[0452] 用含 95% TFA 的水 (10mL)+DCM (0.25mL) 与 TIPS (0.25mL) 的混合物使树脂裂解。将树脂在环境温度下振摇 2 小时。过滤到冰冷的二乙醚 (75mL) 中。将所得的沉淀通过离心分离,接着用二乙醚 (3×) 洗涤,然后真空干燥 48 小时,得到 300mg 粗标题化合物。

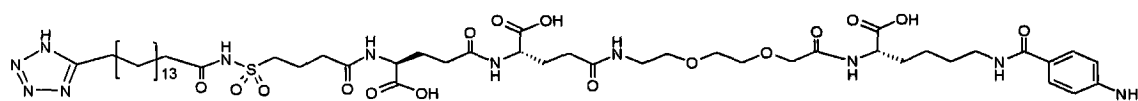
[0453] TOF-MS :Rt = 4.7min, 质量 1268.71

[0454] 将粗标题化合物在制备型 HPLC (GILSON) 上纯化。T2145-10 ;30- > 80% MeCN。将合并的流分在 rotavap 上蒸发干燥,然后将残留物溶解于 H₂O/MeCN 1 : 1 中并冷冻过夜干,得到 170mg 的标题化合物。

[0455] 实施例 2

[0456] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys (Mtt) -OH 和 Wang Resin 制备以下化合物。

[0457]

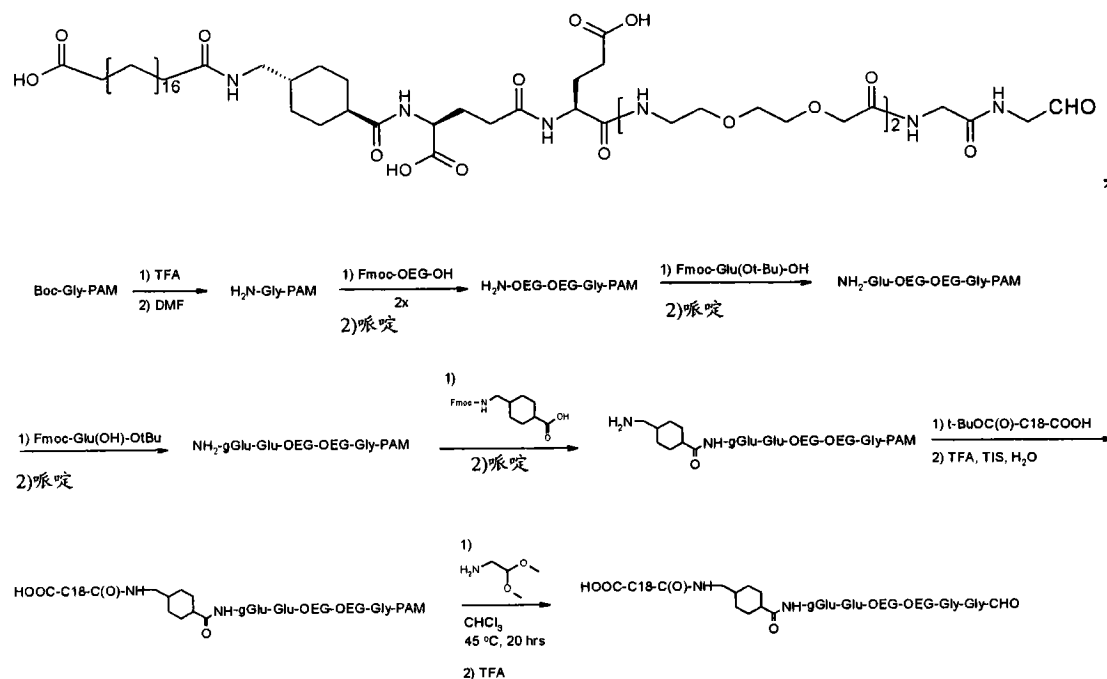


[0458] TOF-MS :质量 1124.33

[0459] 实施例 3

[0460] 以与上文实施例 1 所述类似的方式并如下所述,使用 Boc-Gly-PAM 树脂作为原料制备以下化合物。

[0461]

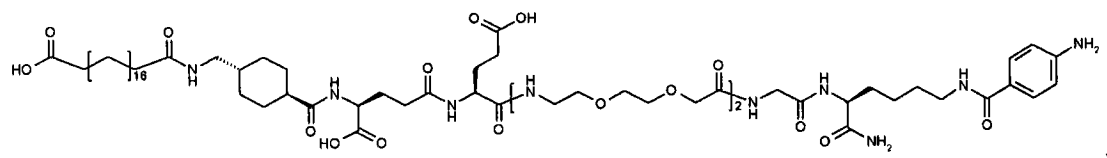


[0462] TOF-MS :质量 1128. 38

[0463] 实施例 4

[0464] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0465]

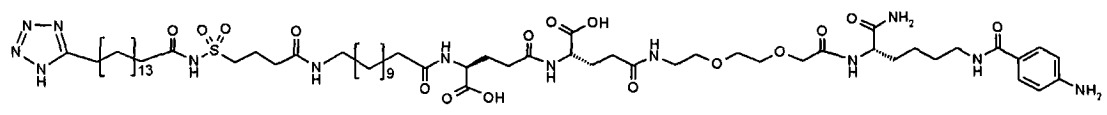


[0466] TOF-MS :质量 1333. 64

[0467] 实施例 5

[0468] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0469]

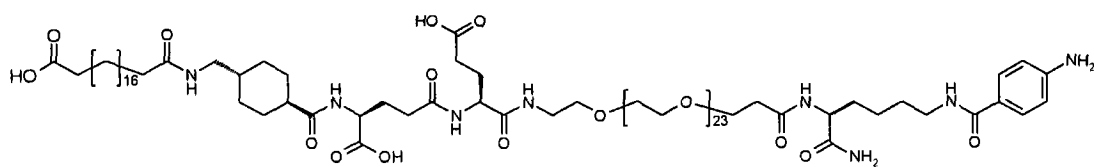


[0470] TOF-MS :质量 1320. 67

[0471] 实施例 6

[0472] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0473]

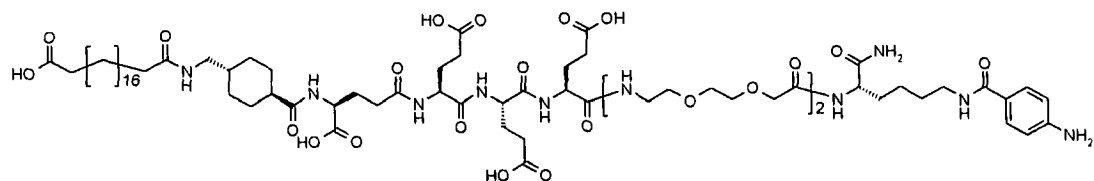


[0474] TOF-MS :质量 2114. 64

[0475] 实施例 7

[0476] 与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0477]

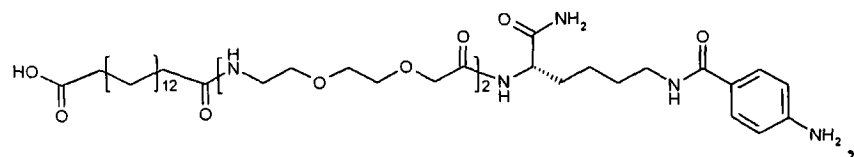


[0478] TOF-MS :质量 1534. 82

[0479] 实施例 8

[0480] 与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0481]

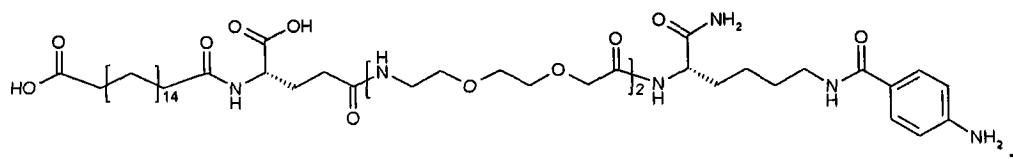


[0482] TOF-MS :质量 823. 05

[0483] 实施例 9

[0484] 与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Wang Resin 制备以下化合物。

[0485]

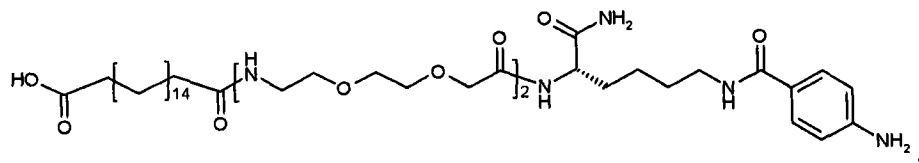


[0486] TOF-MS :质量 980. 22

[0487] 实施例 10

[0488] 与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 Fmoc-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0489]

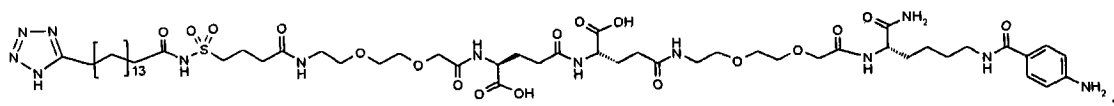


[0490] TOF-MS :质量 851. 10

[0491] 实施例 11

[0492] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0493]

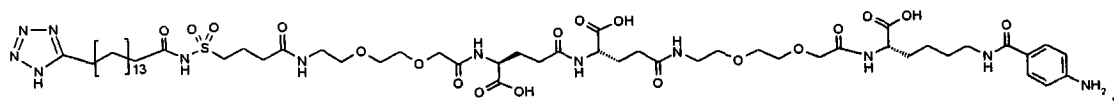


[0494] TOF-MS :质量 1258. 51

[0495] 实施例 12

[0496] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Wang Resin 制备以下化合物。

[0497]

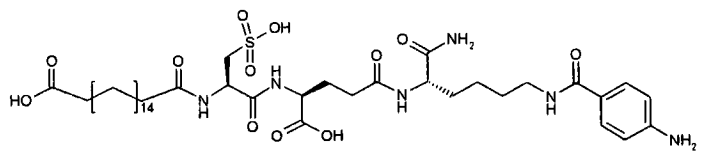


[0498] TOF-MS :质量 1269. 49

[0499] 实施例 13

[0500] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0501]

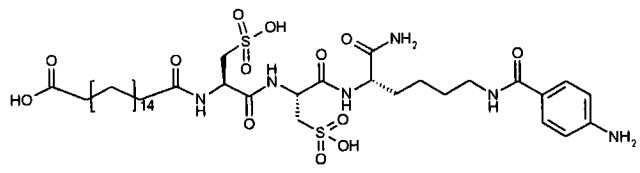


[0502] TOF-MS :质量 841. 04

[0503] 实施例 14

[0504] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0505]

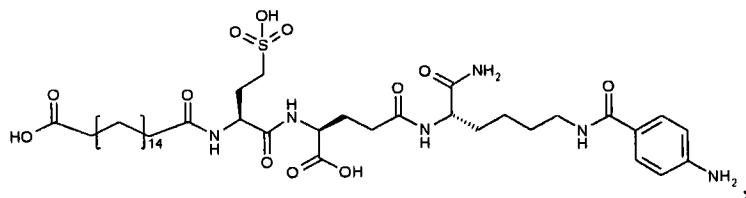


[0506] TOF-MS :质量 863. 07

[0507] 实施例 15

[0508] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0509]

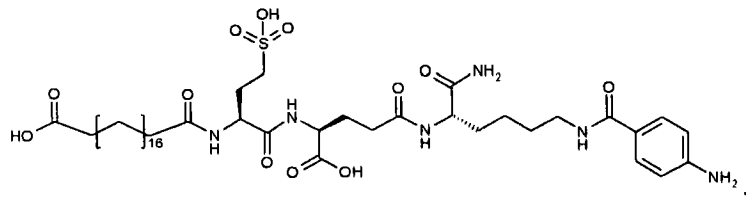


[0510] TOF-MS :质量 855. 07

[0511] 实施例 16

[0512] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys (Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0513]

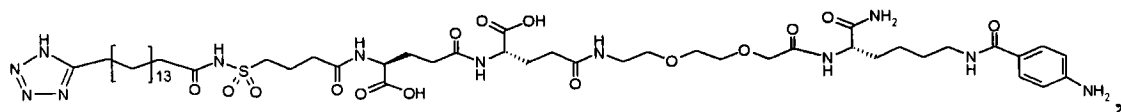


[0514] TOF-MS :质量 883. 12

[0515] 实施例 17

[0516] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys (Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0517]

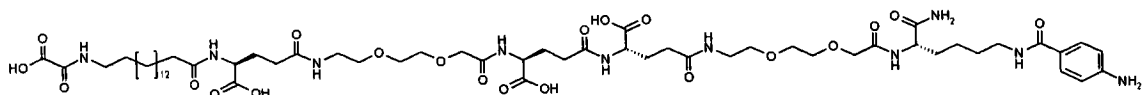


[0518] TOF-MS :质量 1123. 35

[0519] 实施例 18

[0520] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys (Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0521]

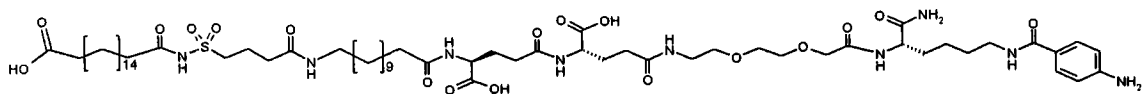


[0522] TOF-MS :Rt = 4. 7min, 质量 1267. 45

[0523] 实施例 19

[0524] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys (Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0525]

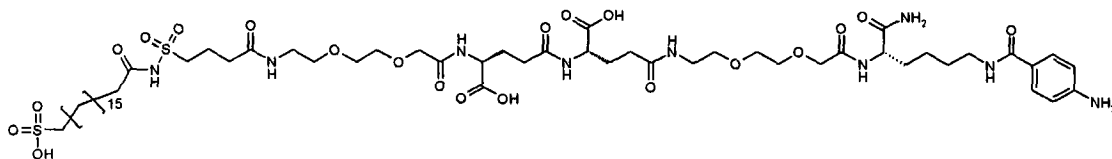


[0526] TOF-MS :质量 1310. 67

[0527] 实施例 20

[0528] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0529]

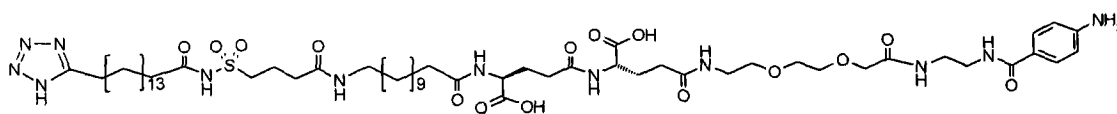


[0530] TOF-MS :质量 1308. 58

[0531] 实施例 21

[0532] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Glu(ODmab)-OH 和 2- 氯化三苯甲基氯树脂 (resine) 制备以下化合物。

[0533]

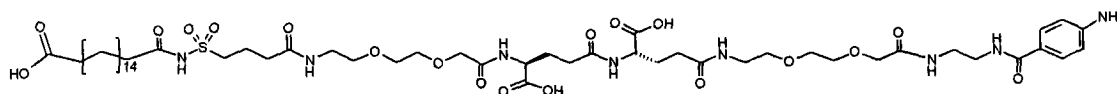


[0534] TOF-MS :质量 1235. 56

[0535] 实施例 22

[0536] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Glu(ODmab)-OH 和 2- 氯化三苯甲基氯树脂制备以下化合物。

[0537]

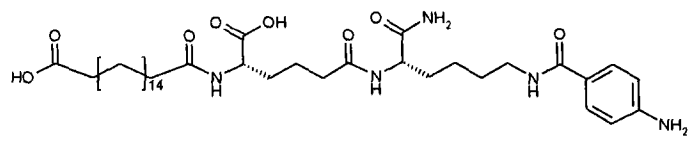


[0538] TOF-MS :质量 1173. 40

[0539] 实施例 23

[0540] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0541]

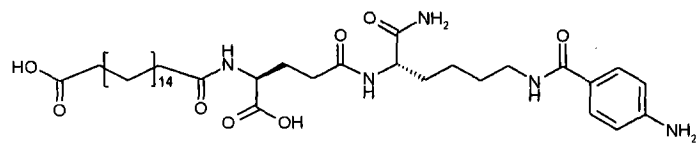


[0542] TOF-MS :质量 703. 93

[0543] 实施例 24

[0544] 以与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Rink amid resin 制备以下化合物。

[0545]

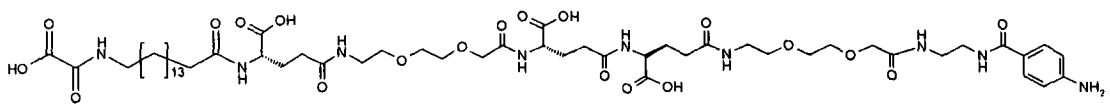


[0546] TOF-MS :质量 689. 90

[0547] 实施例 25

[0548] 与上文实施例 1 所述类似的方式,使用 Fmoc-Glu(ODmab)-OH 和 2- 氯化三苯甲基氯树脂制备以下化合物。

[0549]



[0550] TOF-MS :质量 1182.34

[0551] GH 白蛋白结合物化合物的制备 :

[0552] 实施例 26

[0553] 1. 经转氨基作用和氧化的 GH 化合物 (I) 与白蛋白结合物 (albumine binder) (II) 的偶联

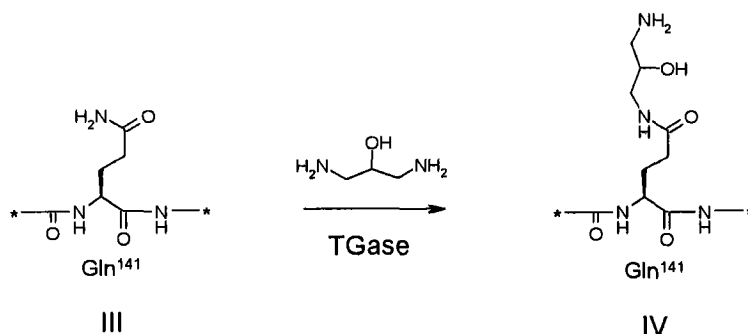
[0554] 制备以下溶液 :

[0555] 缓冲液 A :将三乙醇胺 (119mg, 0.8mmol) 溶解于水 (40mL) 中并将 pH 调至 8.5。

[0556] 缓冲液 B :20mM 三乙醇胺 ;0.2M NaCl。

[0557] (A) hGH(III) 与 1,3- 二氨基 -2- 丙醇的转氨基作用

[0558]



[0559] 制备以下溶液 :

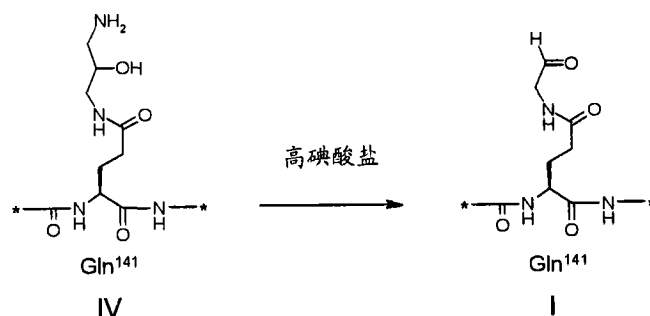
[0560] 将作为粉末的 hGH(8.64g) 搅拌溶解在缓冲液 A(500mL) 中。缓慢向该溶解加入含 DAP(8.1g) 的缓冲液 A(50mL) 混合物。通过加入 HCl 水溶液将所得混合物的 pH 调至 8.5。在混合时,加入 TGase(2.8mL, 1.3mg/mL)。将最终混合物在 RT 下搅拌过夜。

[0561] 将反应混合物用缓冲液 A(1.2L) 稀释,然后通过离子交换色谱法纯化产物 (IV)。100ml/min-200ml/ 流分。

[0562] 在 15CV = 225min 内,阶段缓冲液 B 40% - 梯度 40-100%缓冲液 B。

[0563] (B) 经转氨基作用的 hGH(IV) 的氧化

[0564]



[0565] 制备以下溶液：

[0566] 缓冲液 A：将三乙醇胺 (119mg, 0.8mmol) 溶解于水 (40mL) 中并将 pH 调至 8.5。

[0567] 缓冲液 B：将 3- 甲硫基 -1- 丙醇 (725mg, 7.1mmol) 溶解于缓冲液 A (10mL) 中。

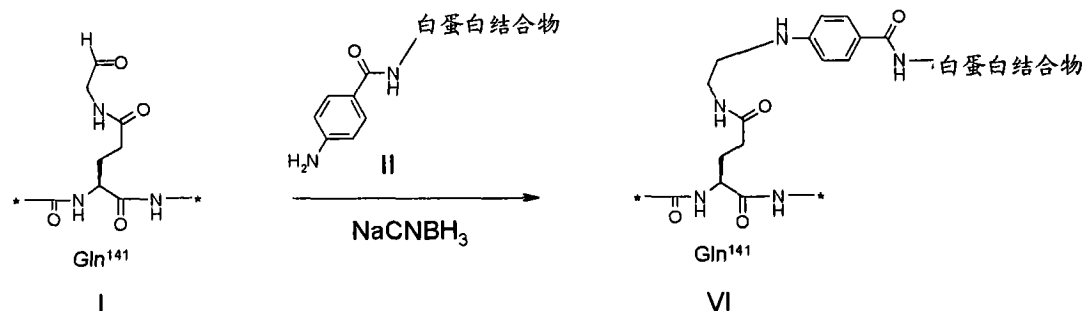
[0568] 缓冲液 C：将 HEPES (5.96g) 溶解于水 (1.0L) 中并将 pH 调至 7.0。

[0569] 高碘酸盐：将 NaIO_4 (48.1mg, 0.225mmol) 溶解于水 (1.0mL) 中。

[0570] 向 IV (10mg, 0.5 μmol) 的溶液加入缓冲液 B (0.2mL)，接着加入高碘酸盐溶液 (0.03mL)。在冷保温 20min 后，将混合物用缓冲液 C 透析 4 次。将残留物浓缩至 1mL。

[0571] (C) (I) 与白蛋白结合物 (II) 的还原氨化

[0572]



[0573] 如实施例 1 至 26 所述得到白蛋白结合物 (II)。

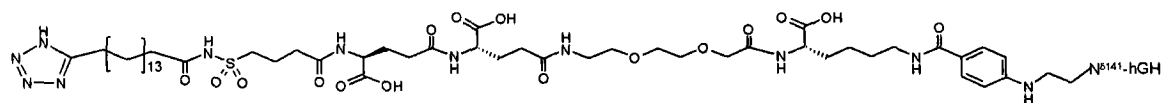
[0574] 使来自 (B) 的终溶液 (1mL, 10mg, 0.45 μmol (I)) 与白蛋白结合物 (II) 的 25mM pH 7.0HEPES 缓冲溶液 (2mL, 10mg, 0.3 μmol) 混合，然后将所得混合物在室温下缓慢旋转 1hr。在 1hr 后，将 NaCNBH₃ (100 μL NaCNBH₃ (20mg) 的水 (0.5mL) 溶液) 分部分 (portionwise) 加入。将混合物在室温下保持于暗处达 18-24 小时。

[0575] 将混合物用 1M tris 溶液稀释至终浓度 50mM pH 7.5，然后施加至离子交换柱。通过用 NaCl 梯度洗脱柱得到产物 (VI)。

[0576] 实施例 27

[0577] 以与上文实施例 26 所述类似的方式，使用来自实施例 2 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0578]

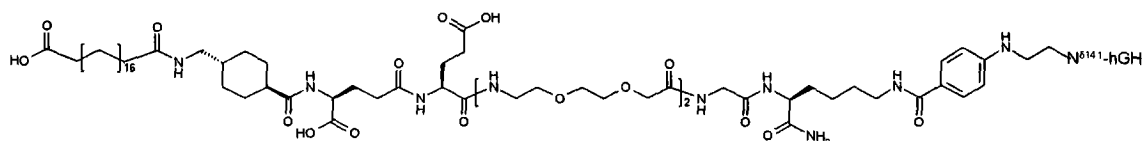


[0579] TOF-MS：质量 23.473, 81

[0580] 实施例 28

[0581] 以与上文实施例 26 所述类似的方式，使用来自实施例 4 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0582]

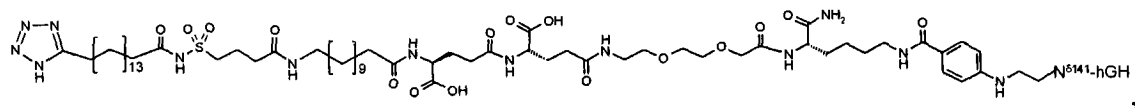


[0583] TOF-MS :质量 23. 428

[0584] 实施例 29

[0585] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 5 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0586]

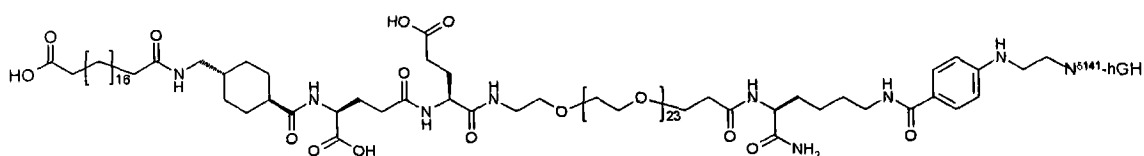


[0587] TOF-MS :质量 23. 472, 40

[0588] 实施例 30

[0589] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 6 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0590]

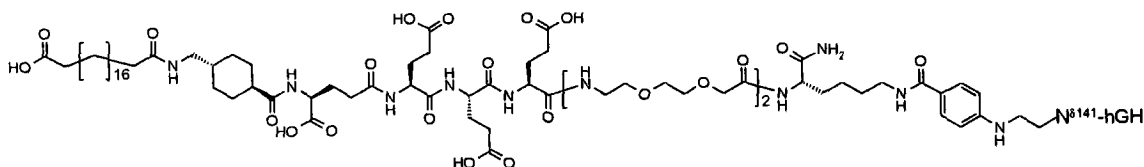


[0591] TOF-MS :质量 24. 265, 71

[0592] 实施例 31

[0593] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 7 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0594]

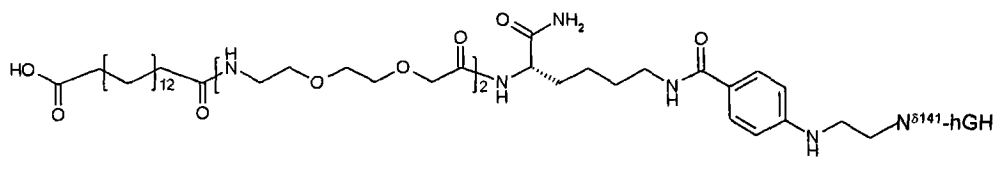


[0595] TOF-MS :质量 23. 686, 83

[0596] 实施例 32

[0597] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 8 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0598]

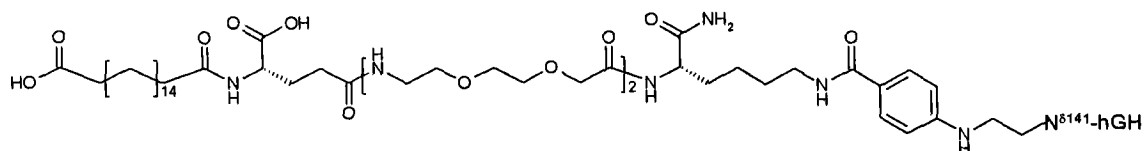


[0599] TOF-MS :质量 22. 974, 75

[0600] 实施例 33

[0601] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 9 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0602]

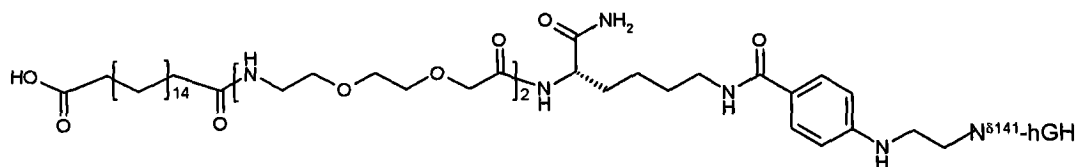


[0603] TOF-MS :质量 23. 131, 31

[0604] 实施例 34

[0605] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 10 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0606]

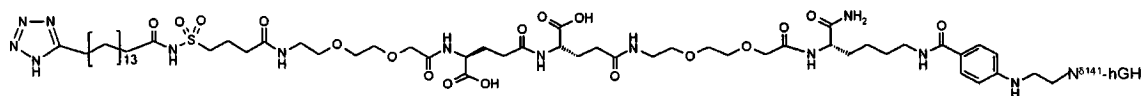


[0607] TOF-MS :质量 23. 002

[0608] 实施例 35

[0609] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 11 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0610]

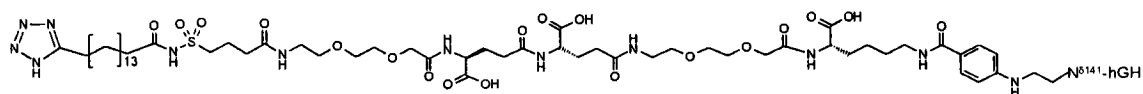


[0611] TOF-MS :质量 23. 419, 59

[0612] 实施例 36

[0613] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 12 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0614]

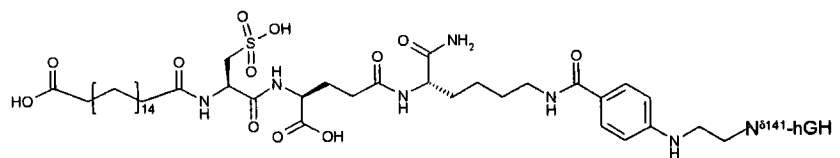


[0615] TOF-MS :质量 23. 420, 58

[0616] 实施例 37

[0617] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 13 白蛋白结合物制备以下化合物。

[0618]

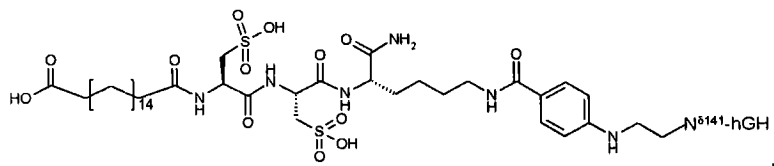


[0619] TOF-MS :质量 22. 992, 13

[0620] 实施例 38

[0621] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 14 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0622]

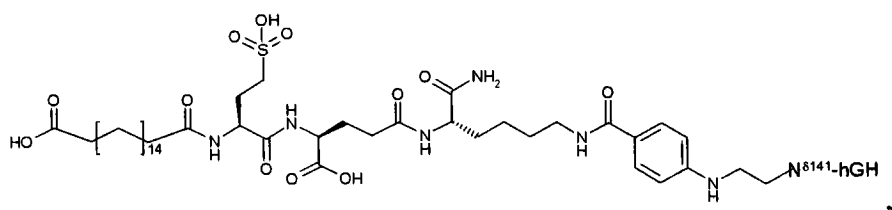


[0623] TOF-MS :质量 23. 015, 15

[0624] 实施例 39

[0625] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 15 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0626]

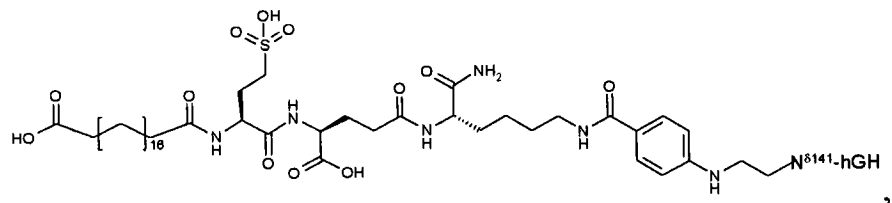


[0627] TOF-MS :质量 23. 006, 15

[0628] 实施例 40

[0629] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 16 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0630]

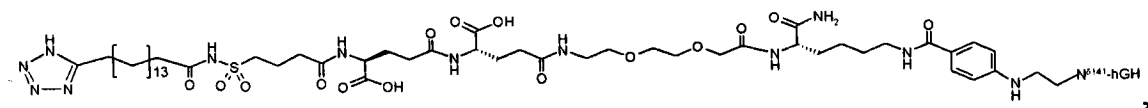


[0631] TOF-MS :质量 23. 034, 18

[0632] 实施例 41

[0633] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 17 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0634]

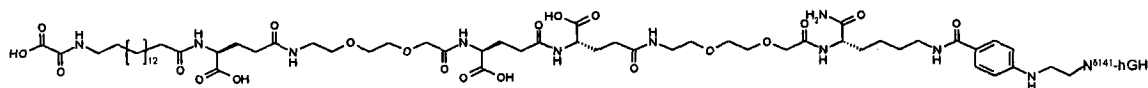


[0635] TOF-MS :质量 23. 273, 97

[0636] 实施例 42

[0637] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 18 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0638]

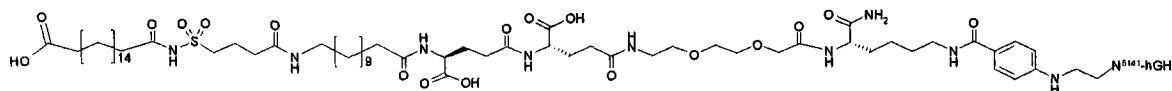


[0639] TOF-MS :质量 23. 333

[0640] 实施例 43

[0641] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 19 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0642]

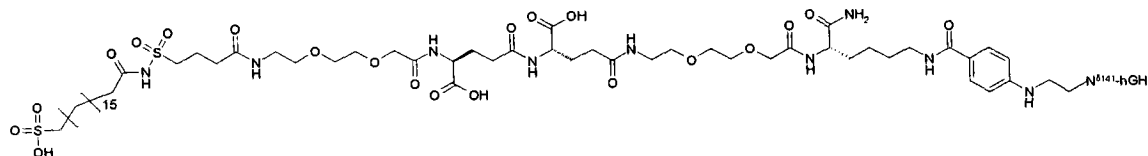


[0643] TOF-MS :质量 23. 461, 75

[0644] 实施例 44

[0645] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 20 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0646]

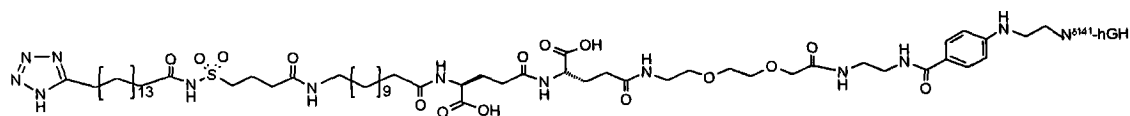


[0647] TOF-MS :质量 23. 459, 67

[0648] 实施例 45

[0649] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 21 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0650]

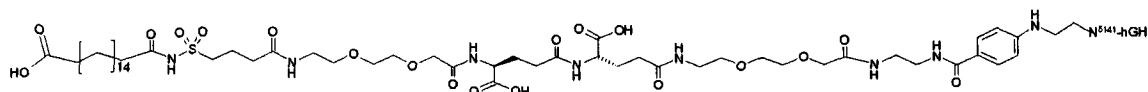


[0651] TOF-MS :质量 23. 386, 65

[0652] 实施例 46

[0653] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 22 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0654]

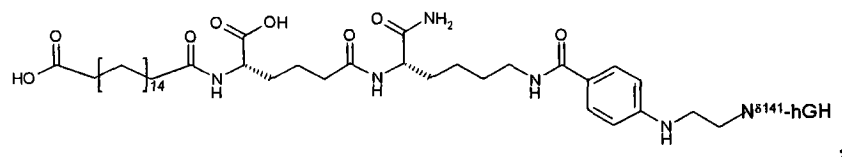


[0655] TOF-MS :质量 23. 324, 48

[0656] 实施例 47

[0657] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 23 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0658]

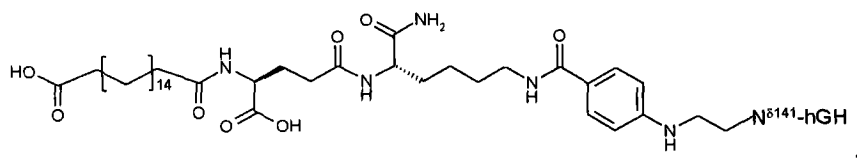


[0659] TOF-MS :质量 22. 841

[0660] 实施例 48

[0661] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 24 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0662]

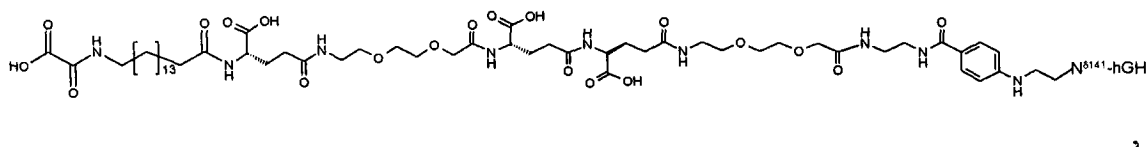


[0663] TOF-MS :质量 22. 826, 97

[0664] 实施例 49

[0665] 以与上文实施例 26 所述类似的方式,使用来自实施例 25 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0666]



[0667] TOF-MS :Rt = 4. 7min, 质量 1268. 7051

[0668] 实施例 50

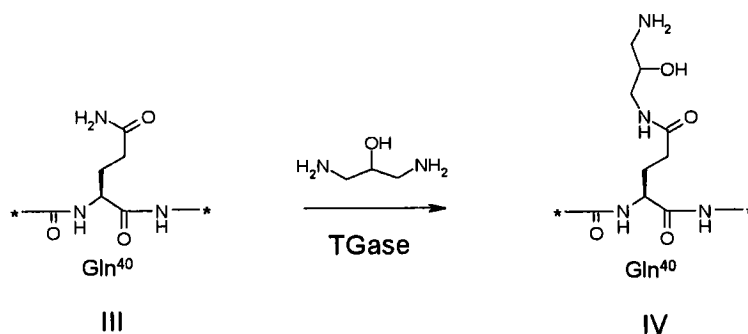
[0669] 1. 经转氨基作用和氧化的 GH 化合物 (I) 与白蛋白结合物 (II) 的偶联

[0670] 制备以下溶液 :

[0671] 缓冲液 A :将三乙醇胺 (119mg, 0. 8mmol) 溶解于水 (40mL) 中并将 pH 调至 8. 5。

[0672] (A)hGH(III) 与 1, 3- 二氨基 - 丙醇的转氨基作用

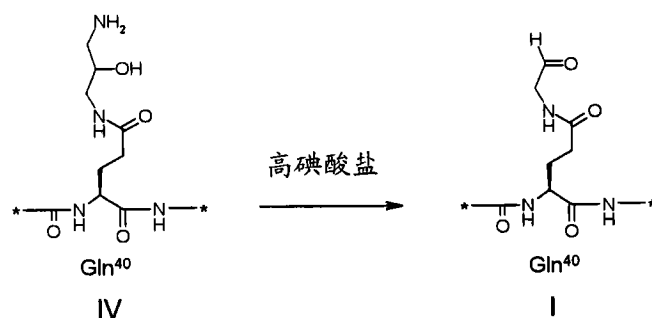
[0673]



[0674] 作为来自 CIE 色谱纯化的二元产物 (biprodukt) 根据实施例 26 得到经转氨基作用的 hGH Gln⁴⁰ (IV)。

[0675] (B) 如实施例 26 所述进行经转氨基作用的 hGH Gln⁴⁰(IV) 的氧化和还原氨化：

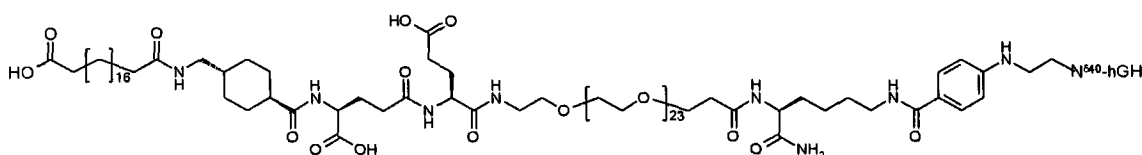
[0676]



[0677] 制备以下溶液：

[0678] 以与上文实施例 50 所述类似的方式，使用来自实施例 6 的白蛋白结合物制备以下化合物。

[0679]



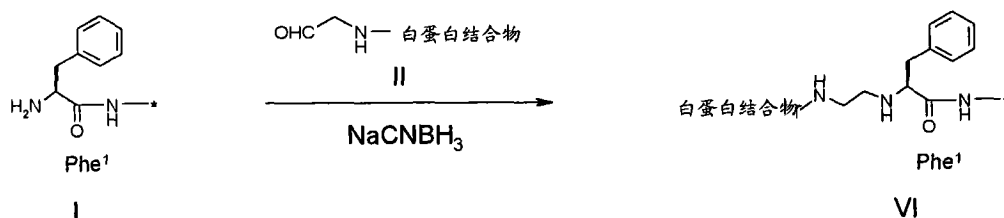
[0680] TOF-MS :Rt = 4.7min, 质量 23.473, 81

[0681] 实施例 51

[0682] 1. GH 化合物 (I) N-端与白蛋白结合物 (II) 的偶联

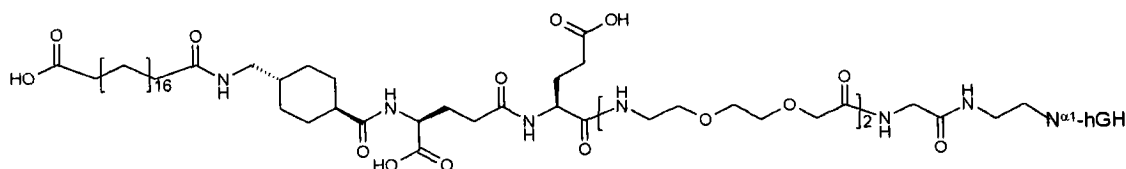
[0683] (A) (I) 与白蛋白结合物的醛 (II) 的还原烷基化

[0684]



[0685] 如实施例 3 所述得到白蛋白结合物 (II)。

[0686]



[0687] 2-(C₂₀ 二酸 -Trx-γ Glu-Glu-OEG-OEG-Gly- 甘氨酸酰胺 (Glycin amid))- 乙基 -N^{α1}-hGH

[0688] 将 hGH(23mg) 溶解于 Hepes 缓冲液 (2.3mL 0.25mM pH 7.0) 中。

[0689] 将 C₂₀ 二酸 -Trx-γ Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly- 二甲基缩醛 (2mg, 参见上文实施例 3) 用 TFA (50 μL) 处理 6min, 然后真空蒸发至干燥。将残留物用 EtOH (200 μL) 反萃取, 然后真空蒸发至干燥。将残留物溶解于 DMF (100 μL) 中并加至 hGH 溶液中。形成沉淀并通过加入 DMF (1mL) 再溶解。在 1hr 之后, 将 NaCNBH₃ (20mg, 在 0.5mL MeCN (230 μL) 中) 溶液

分部加入并搁置 20hr。通过加入 AcOH(2mL) 淬灭反应,并用水稀释至总体积 20ml,然后在制备型 HPLC、C18 柱中用 MeCN/0,1% TFA 从 40-80% (相对于含 0,1% TFA 的水) 的梯度进行纯化。收集最后的洗脱峰,并用水将 70% MeCN 稀释至 10%,然后冻干,得到 4.51mg 标题化合物。

[0690] TOF-MS :质量 23. 237, 6

[0691] 药理学方法

[0692] 测定法 (I) :测定生长激素活性的 BAF-3GHR 测定

[0693] BAF-3 细胞 (来源于骨髓的鼠前 -B 淋巴样细胞系) 的生长和存活最初依赖于 IL-3。IL-3 活化 JAK-2 和 STAT,其为同样的介体。GH 在刺激时活化。在转染人生长激素受体后,该细胞系变成生长激素依赖性细胞系。该克隆可用于评估不同生长激素样品对 BAF-3GHR 存活的影响。

[0694] 使 BAF-3GHR 细胞在饥饿培养基 (无生长激素的培养基) 中于 37°C、5% CO₂ 下生长 24 小时。

[0695] 将细胞洗涤并重悬于饥饿培养基中,然后接种至板中。将 10 μl 不同浓度的生长激素化合物或人生长激素或者对照加至细胞中,然后将板在 37°C、5% CO₂ 下孵育 68 小时。

[0696] 将 AlamarBlue® 加至各个孔中,然后将细胞再孵育 4 小时。AlamarBlue® 为氧化还原指示剂,并且被细胞代谢的固有反应所还原,从而提供对存活细胞数的间接测量。

[0697] 最后,在荧光板读数器中测量细胞的代谢活性。样品的吸光度以不被生长激素化合物或对照刺激的细胞的 % 表示,并且可根据浓度 - 响应曲线,计算活性 (刺激 50% 细胞的化合物的量)。

[0698] 实施方案列表

[0699] 实施方案 1. 一种用于制备缀合蛋白或缀合糖蛋白的方法,其包括以下步骤:在任选取代的环糊精分子存在下,使蛋白或糖蛋白与水不溶性的白蛋白结合物反应。

[0700] 实施方案 2. 实施方案 1 限定的方法,其中所述环糊精分子包括任选取代的 β-环糊精。

[0701] 实施方案 3. 实施方案 1 或实施方案 2 限定的方法,其中所述任选取代的环糊精包括任选被一个或多个 C₁₋₆ 烷基 (例如甲基、乙基或丙基) 取代的环糊精,每个所述 C₁₋₆ 烷基可任选被一个或多个羟基取代 (例如羟乙基-环糊精或羟丙基-环糊精)。

[0702] 实施方案 4. 实施方案 3 限定的方法,其中所述任选取代的环糊精包括 2-羟乙基-β-环糊精。

[0703] 实施方案 5. 任何前述实施方案限定的方法,其中所述任选取代的环糊精分子以 1% 与 10% 之间 (例如 5%) 的浓度加入。

[0704] 实施方案 6. 任何前述实施方案限定的方法,其包括在含水缓冲溶液例如 Hepes 缓冲液 (例如 50mM Hepes, 100mM NaCl 和 10mM CaCl₂) 中反应。

[0705] 实施方案 7. 任何前述实施方案限定的方法,其包括在恒定 pH (例如 pH 7.0) 和恒定温度 (例如 25°C) 下反应。

[0706] 实施方案 8. 任何前述实施方案限定的方法,其中所述蛋白缀合物为下式 (I) 的蛋白缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药:

[0707] (A-W-B)_y-P (I)

- [0708] 其中
- [0709] P 表示蛋白或糖蛋白；
- [0710] B 表示亲水间隔物；
- [0711] W 为连接 A 和 B 的化学基团；
- [0712] A 表示白蛋白结合残基；以及
- [0713] Y 表示选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 的整数；使得所述 A-W-B- 部分包含水不溶性部分。
- [0714] 实施方案 9. 实施方案 8 限定的方法，其中所述蛋白具有高于 20,000Da 的分子量。
- [0715] 实施方案 10. 实施方案 8 或实施方案 9 限定的方法，其中所述蛋白表示凝血因子，例如 FVII、FX、FII、FV、蛋白 C、蛋白 S、tPA、PAI-1、组织因子、FXI、FXII 和 FXIII 以及其序列 FVIII、FIX 变体。
- [0716] 实施方案 11. 实施方案 10 限定的方法，其中所述凝血因子为 FVII，例如 FVIIa。
- [0717] 实施方案 12. 实施方案 8 或实施方案 9 限定的方法，其中所述蛋白表示生长激素 (GH)。
- [0718] 实施方案 13. 实施方案 8-12 中任一项限定的方法，其中 y 表示选自 1、2 或 3 的整数。
- [0719] 实施方案 14. 实施方案 8-13 中任一项限定的方法，其中 y 表示选自 2、3、4、5 或 6 的整数。
- [0720] 实施方案 15. 实施方案 14 限定的方法，其中 y 表示 2。
- [0721] 实施方案 16. 实施方案 8-12 中任一项限定的方法，其中 y 表示 1。
- [0722] 实施方案 17. 实施方案 8-16 中任一项限定的方法，其中所述亲水间隔物具有 $cLogP < 0$ 。
- [0723] 实施方案 18. 实施方案 8-17 中任一项限定的方法，其中所述亲水间隔物具有下式：
- [0724] $-X_1-X_2-X_3-X_4-$
- [0725] 其中
- [0726] X_1 为 $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ，
- [0727] X_2 为 $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ，
- [0728] X_3 为 $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$ ，
- [0729] X_4 为 $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$ ，
- [0730] $I1、I2、I3、I4、I5$ 和 $I6$ 独立选自 0-16，
- [0731] $m1、m3、m4、m6$ 和 $m7$ 独立选自 0-10，
- [0732] $m2$ 和 $m5$ 独立选自 0-25，
- [0733] $n1、n2、n3$ 和 $n4$ 独立选自 0-16，
- [0734] F 为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮 c，其中所述芳基和杂芳基任选用卤素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆-烷基取代，
- [0735] R¹、R²、R³、R⁴ 和 R⁵ 独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆-烷基、芳基或杂芳基；其中所述烷基、芳基和杂芳基任选用卤素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH 取代，

[0736] D1、D2、E1 和 E2 独立选自 $-O-$ 、 $-NR^6-$ 、 $-N(COR^7)-$ 或价键；其中 R^6 和 R^7 独立表示氢或 C_{1-6} -烷基，

[0737] W_1 至 W_6 独立选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或价键；其中 $s2$ 为 0 或 1。

[0738] 实施方案 19. 实施方案 8-18 中任一项限定的方法，其中 W 具有下式：

[0739] $-W_7-Y-$ ，

[0740] 其中

[0741] Y 为 $-(CH_2)_{I7}-C_{3-10}$ -环烷基 $-W_8-$ 或价键，

[0742] $I7$ 为 0-6，

[0743] W_7 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s3}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或价键；其中 $s3$ 为 0 或 1，

[0744] W_8 选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s4}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或价键；其中 $s4$ 为 0 或 1。

[0745] 实施方案 20. 实施方案 18 或实施方案 19 限定的方法，其中 $I1$ 、 $I2$ 、 $I3$ 、 $I4$ 、 $I5$ 和 $I6$ 独立表示 0-6。

[0746] 实施方案 21. 实施方案 18-20 中任一项限定的方法，其中 $m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 和 $m7$ 独立表示 0-6。

[0747] 实施方案 22. 实施方案 18-21 中任一项限定的方法，其中 $m2$ 和 $m5$ 独立表示 0-10。

[0748] 实施方案 23. 实施方案 18-22 中任一项限定的方法，其中 $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 和 $n4$ 独立表示 0-10，例如 0-6。

[0749] 实施方案 24. 实施方案 18-23 中任一项限定的方法，其中 $D1$ 和 $D2$ 独立选自 $-O-$ 或 $-NR^6-$ 或价键。

[0750] 实施方案 25. 实施方案 18-24 中任一项限定的方法，其中 $D1$ 和 $D2$ 都为 $-O-$ 。

[0751] 实施方案 26. 实施方案 18-25 中任一项限定的方法，其中 $D1$ 和 $D2$ 都为 $-NR^6-$ 。

[0752] 实施方案 27. 实施方案 18-26 中任一项限定的方法，其中 $E1$ 和 $E2$ 独立选自 $-O-$ 或 $-NR^6-$ 或价键。

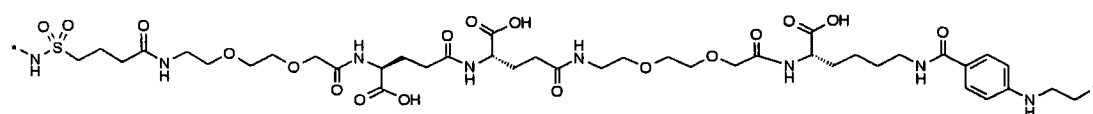
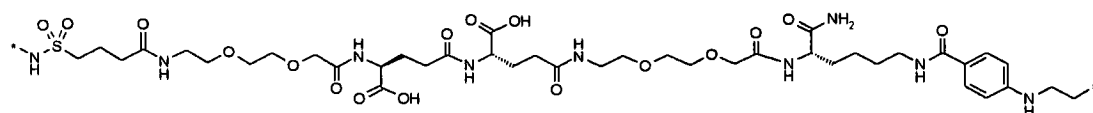
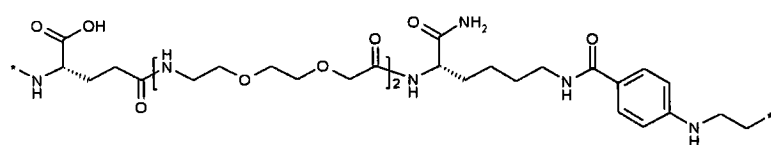
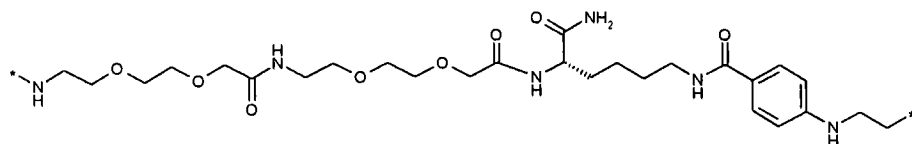
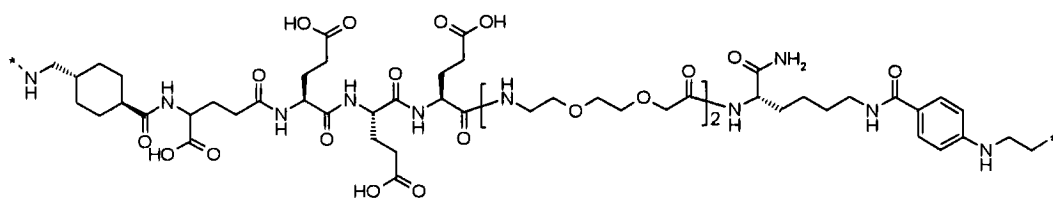
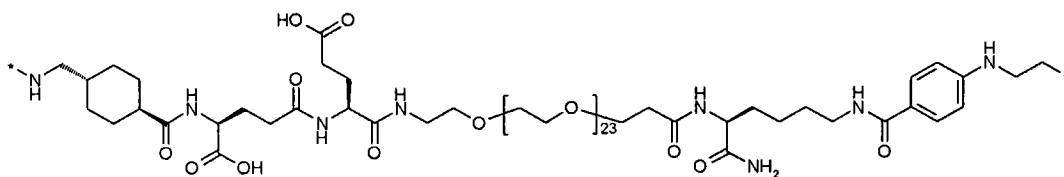
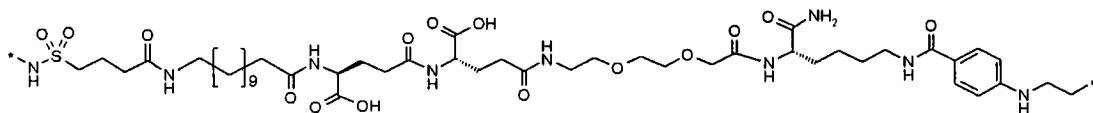
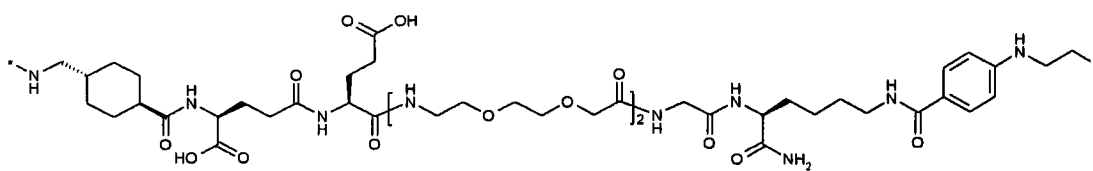
[0753] 实施方案 28. 实施方案 18-27 中任一项限定的方法，其中 $E1$ 和 $E2$ 都为 $-O-$ 。

[0754] 实施方案 29. 实施方案 18-27 中任一项限定的方法，其中 $E1$ 和 $E2$ 都为 $-NR^6-$ 。

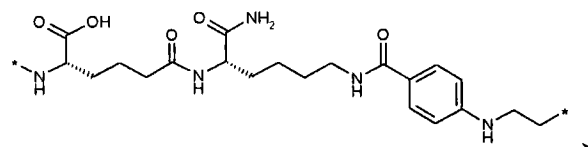
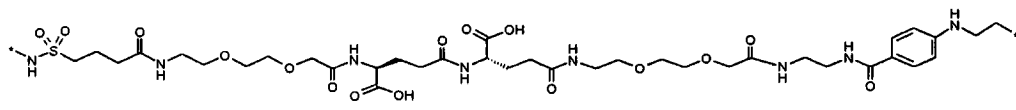
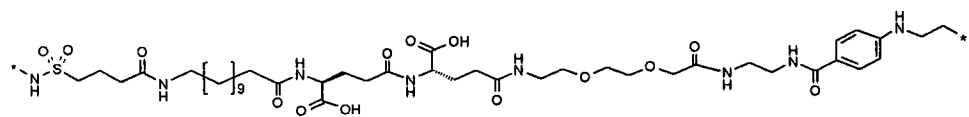
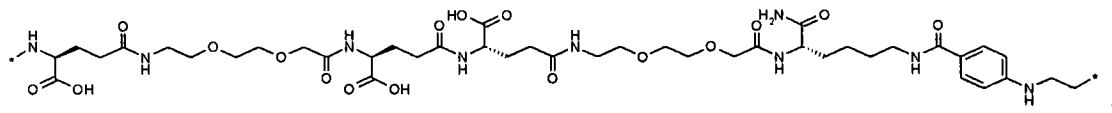
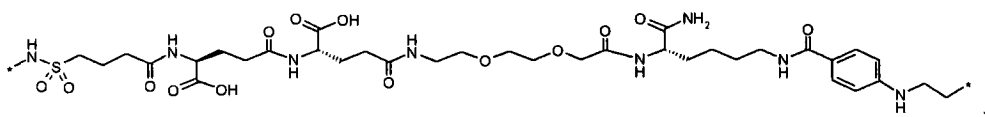
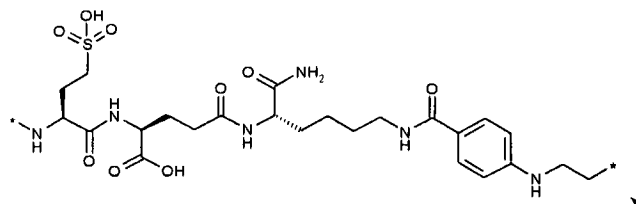
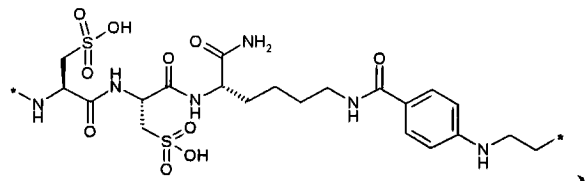
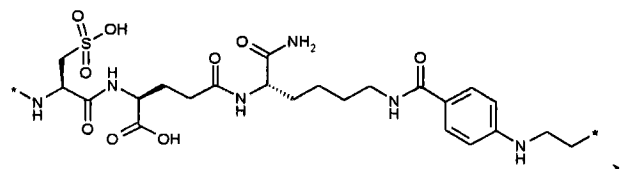
[0755] 实施方案 30. 实施方案 18-29 中任一项限定的方法，其中 W_1 至 W_8 独立选自 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 或价键。

[0756] 实施方案 31. 实施方案 18-30 中任一项限定的方法，其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 独立选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} -烷基；其中所述烷基任选用 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 取代。

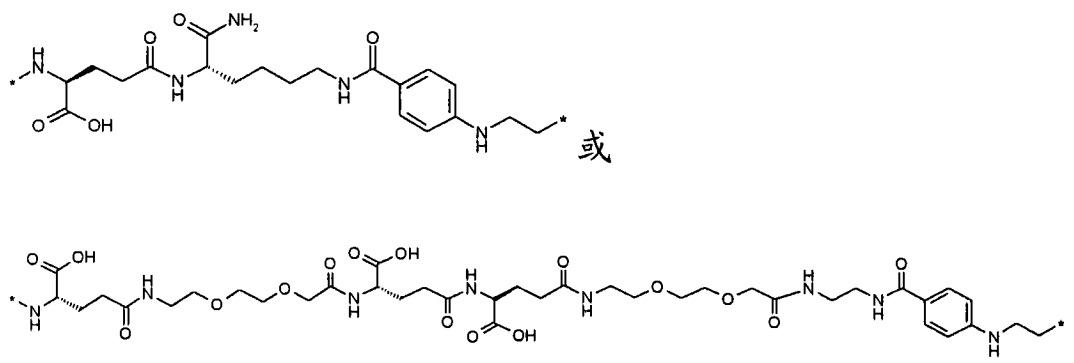
[0757] 实施方案 32. 实施方案 18-31 中任一项限定的方法，其中 X_1 为 $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ，而 X_2 为 $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ，其中 $-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ 和 $-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ 选自：



[0762]



[0763]



[0764] 实施方案 34. 实施方案 8-33 中任一项限定的方法, 其中所述亲水间隔物的摩尔量介于 80D-1500D 之间或者介于 500D-1100D 之间。

[0765] 实施方案 35. 任何前述实施方案限定的方法, 其中所述白蛋白结合残基为亲脂残基。

[0766] 实施方案 36. 任何前述实施方案限定的方法, 其中所述白蛋白结合残基非共价地结合至白蛋白。

[0767] 实施方案 37. 任何前述实施方案限定的方法, 其中所述白蛋白结合残基在生理 pH 下带负电荷。

[0768] 实施方案 38. 任何前述实施方案限定的方法, 其中所述白蛋白结合残基具有低于约 $10 \mu\text{M}$ 或低于约 $1 \mu\text{M}$ 的对人血清白蛋白的结合亲和力。

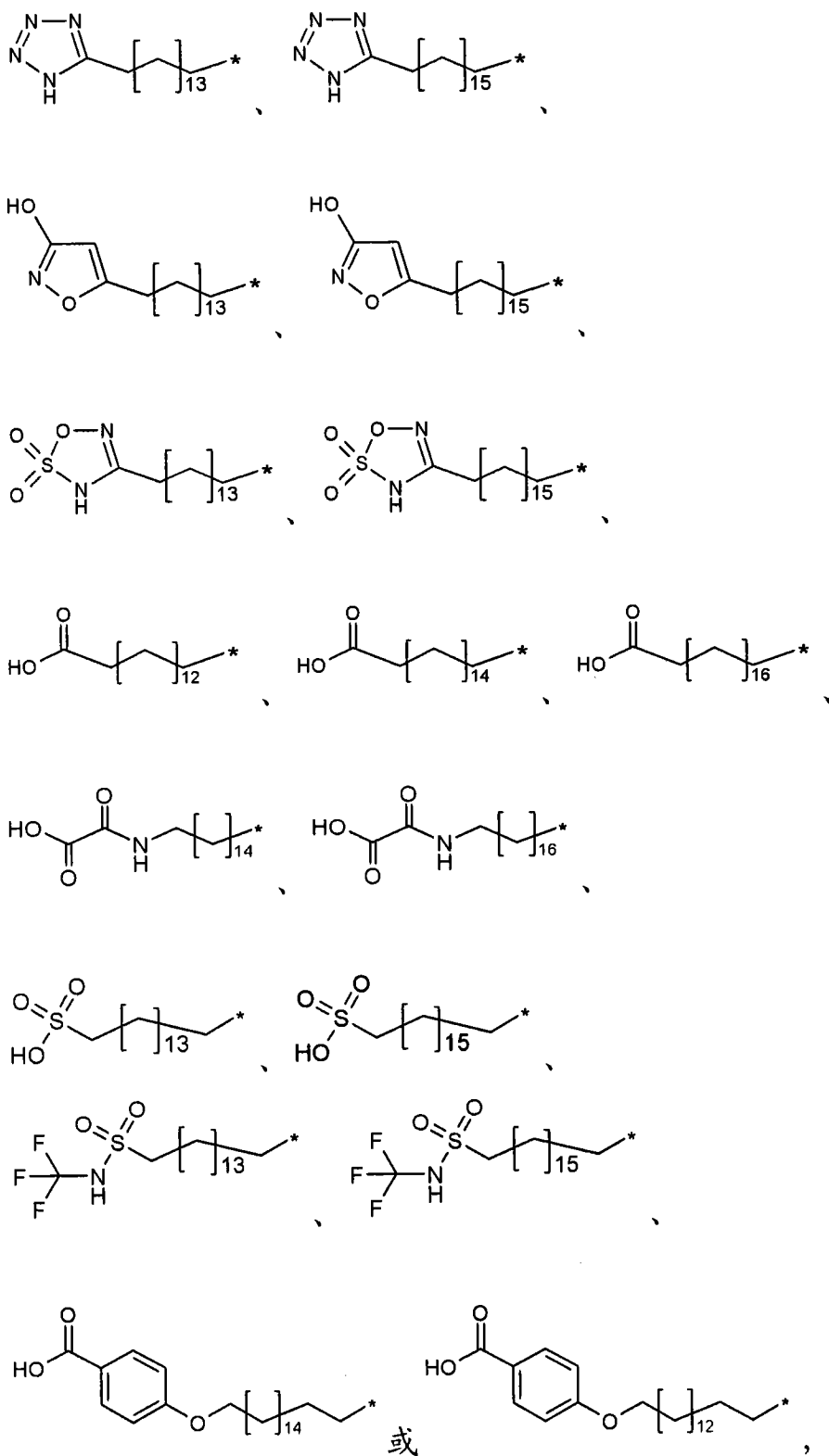
[0769] 实施方案 39. 任何前述实施方案限定的方法, 其中所述白蛋白结合残基选自直链烷基、支链烷基、具有 ω -羧酸基或 ω -羧酸等排体的基团。

[0770] 实施方案 40. 任何前述实施方案限定的方法, 其中所述白蛋白结合残基具有 6-40 个碳原子、8-26 个碳原子或 8-20 个碳原子。

[0771] 实施方案 41. 任何前述实施方案限定的方法, 其中所述白蛋白结合残基为肽, 例如包含少于 40 个氨基酸残基的肽。

[0772] 实施方案 42. 任何前述实施方案限定的方法, 其中所述白蛋白结合物选自:

[0773]



[0774] 其中*表示通过W连接至B。

[0775] 实施方案43. 实施方案8-42中任一项限定的方法,其中所述白蛋白结合残基A通过亲水间隔物B连接至蛋白P的谷氨酰胺残基。

[0776] 实施方案44. 实施方案8-42中任一项限定的方法,其中所述白蛋白结合残基A通过亲水间隔物B连接至蛋白P的半胱氨酸残基。

[0777] 实施方案45. 实施方案8-42中任一项限定的方法,其中所述白蛋白结合残基A通

过亲水间隔物 B 连接至蛋白 P 的 N 端残基。

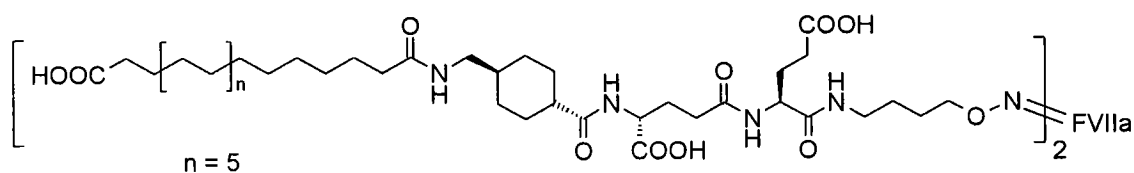
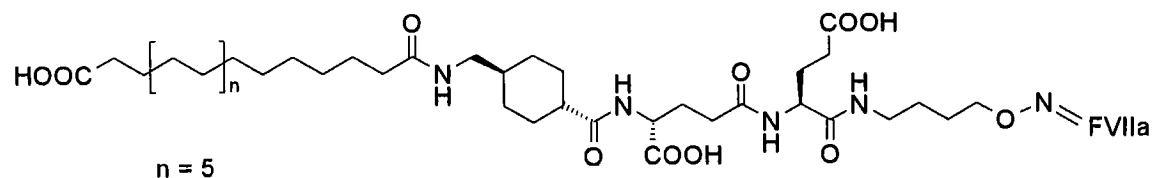
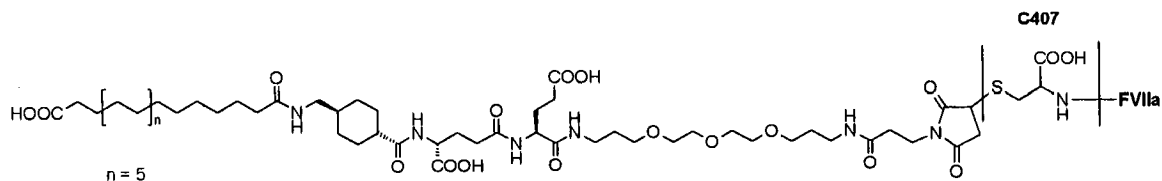
[0778] 实施方案 46. 实施方案 8-42 中任一项限定的方法, 其中所述白蛋白结合残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至蛋白 P 的 C 端残基。

[0779] 实施方案 47. 实施方案 8-42 中任一项限定的方法, 其中所述白蛋白结合残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至蛋白 P 的赖氨酸残基。

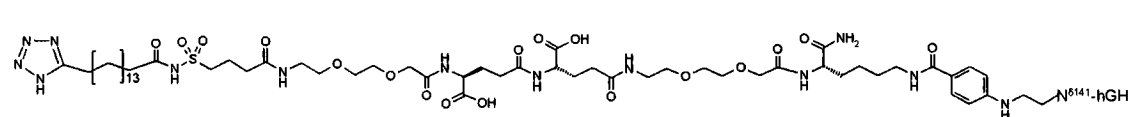
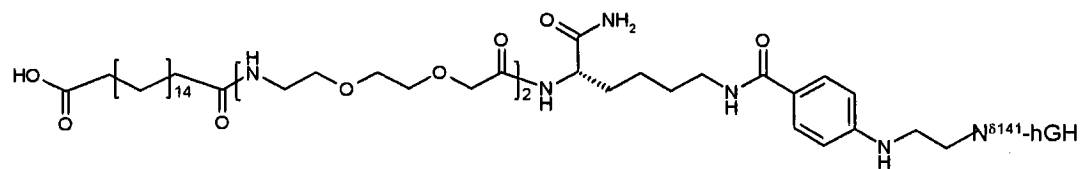
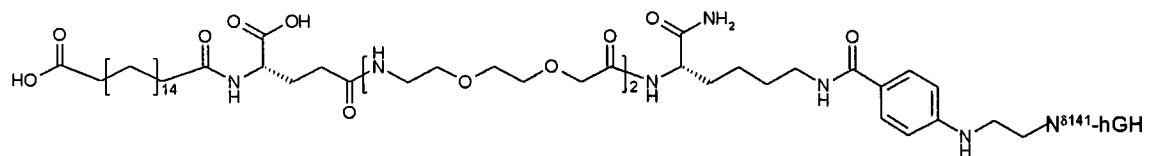
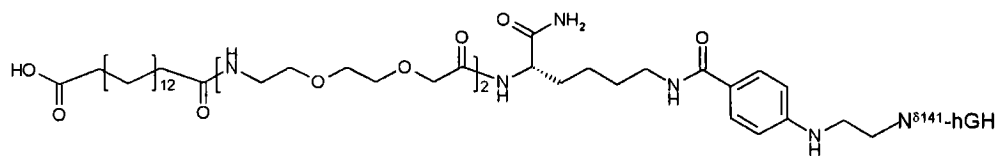
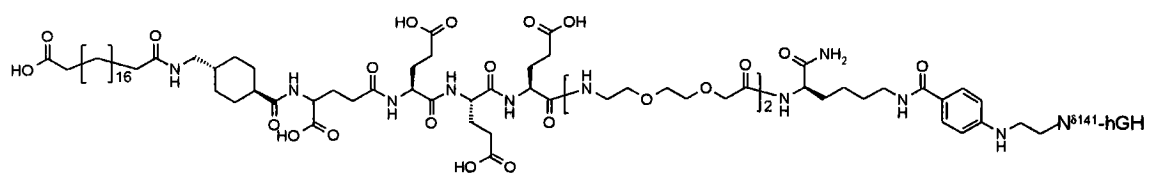
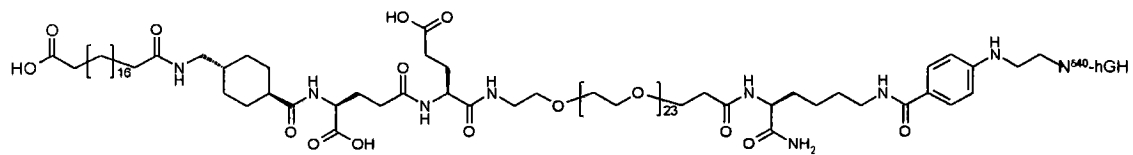
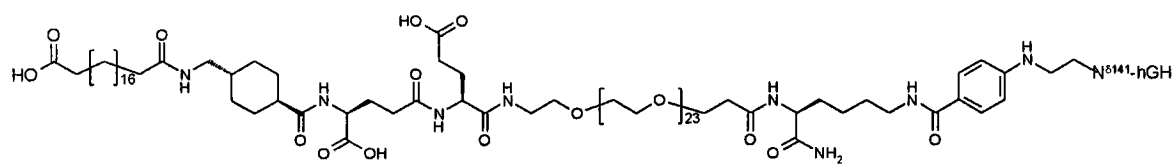
[0780] 实施方案 48. 实施方案 8-42 中任一项限定的方法, 其中所述白蛋白结合残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至糖蛋白 P 的氧化聚糖残基。

[0781] 实施方案 49. 任何前述实施方案限定的方法, 其中所述缀合物选自:

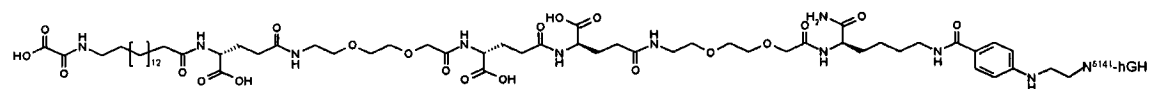
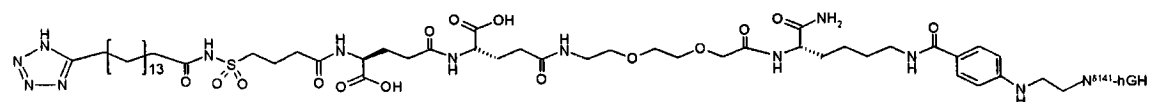
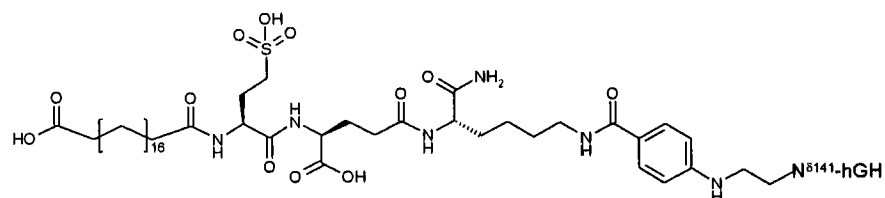
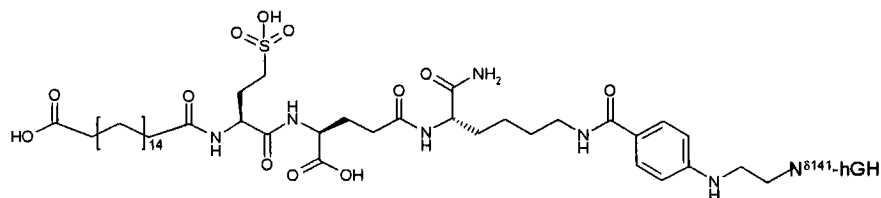
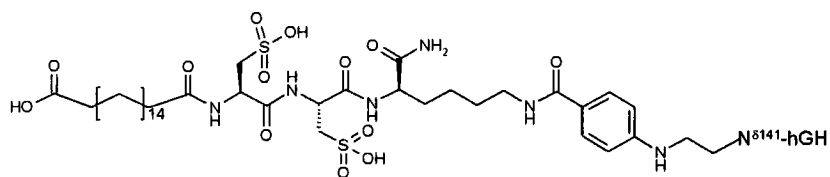
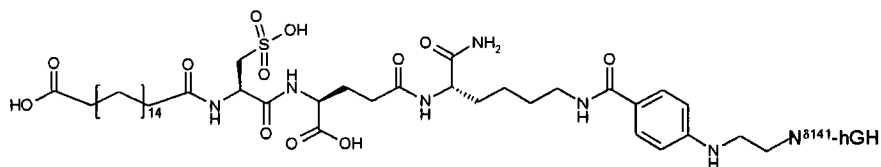
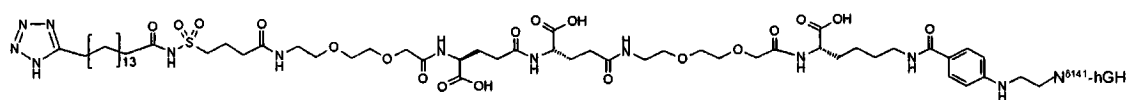
[0782]



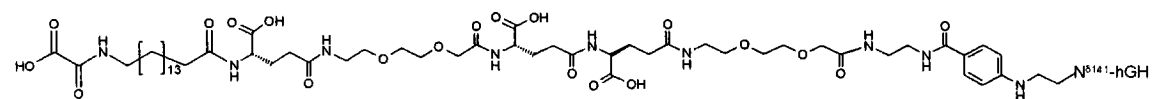
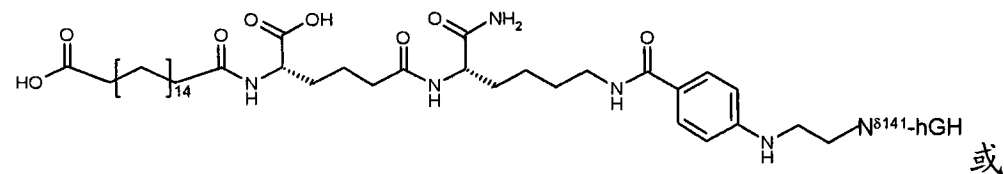
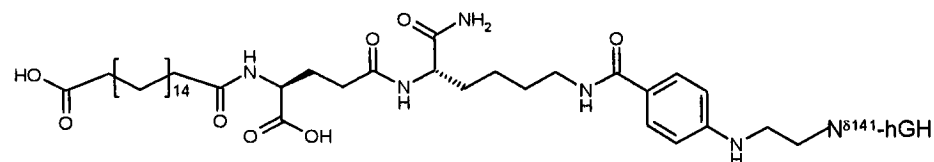
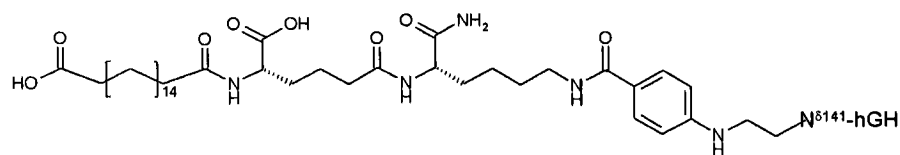
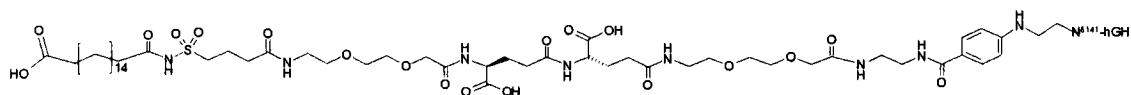
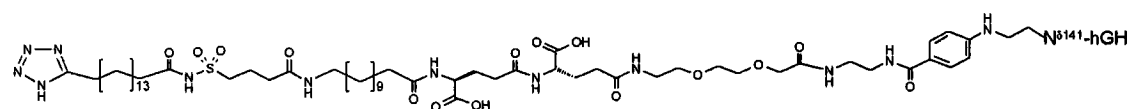
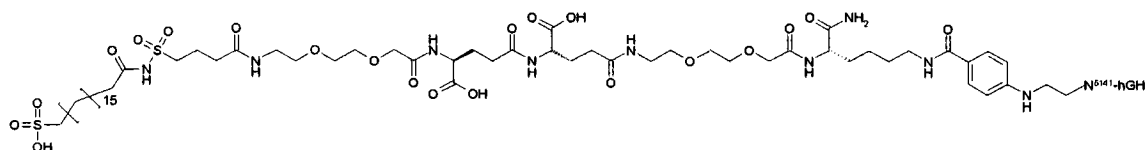
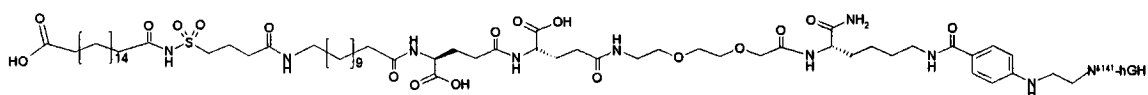
[0783]



[0785]



[0786]



[0787] 实施方案 50. 一种通过任何前述实施方案所限定的方法得到的缀合蛋白。

[0788] 实施方案 51. 一种蛋白缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,所述蛋

白缀合物包含通过亲水间隔物连接至白蛋白结合残基的蛋白或糖蛋白。

[0789] 实施方案 52. 下式 (I) 的蛋白缀合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药：

[0790] $(A-W-B)_y-P$ (I)

[0791] 其中

[0792] P 表示蛋白或糖蛋白；

[0793] B 表示亲水间隔物；

[0794] W 为连接 A 和 B 的化学基团；

[0795] A 表示白蛋白结合残基；以及

[0796] Y 表示选自 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 的整数。

[0797] 实施方案 53. 实施方案 51 或实施方案 52 限定的蛋白缀合物，其中所述蛋白具有高于 20,000Da 的分子量。

[0798] 实施方案 54. 实施方案 51-53 限定的蛋白缀合物，其中所述蛋白表示凝血因子，例如 FVII、FX、FII、FV、蛋白 C、蛋白 S、tPA、PAI-1、组织因子、FXI、FXII 和 FXIII 以及其序列 FVIII、FIX 变体。

[0799] 实施方案 55. 实施方案 54 限定的蛋白缀合物，其中所述凝血因子为 FVII，例如 FVIIa。

[0800] 实施方案 56. 实施方案 52 或实施方案 53 限定的蛋白缀合物，其中所述蛋白表示生长激素 (GH)。

[0801] 实施方案 57. 实施方案 52-56 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 y 表示选自 1、2 或 3 的整数。

[0802] 实施方案 58. 实施方案 52-57 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 y 表示选自 2、3、4、5 或 6 的整数。

[0803] 实施方案 59. 实施方案 58 限定的蛋白缀合物，其中 y 表示 2。

[0804] 实施方案 60. 实施方案 52-57 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 y 表示 1。

[0805] 实施方案 61. 实施方案 52-60 中任一项限定的蛋白缀合物，其中所述亲水间隔物具有 $cLogP < 0$ 。

[0806] 实施方案 62. 实施方案 52-61 中任一项限定的蛋白缀合物，其中所述亲水间隔物具有下式：

[0807] $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0808] 其中

[0809] X_1 为 $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ，

[0810] X_2 为 $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ，

[0811] X_3 为 $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$ ，

[0812] X_4 为 $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$ ，

[0813] $I1$ 、 $I2$ 、 $I3$ 、 $I4$ 、 $I5$ 和 $I6$ 独立选自 0-16，

[0814] $m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 和 $m7$ 独立选自 0-10，

[0815] $m2$ 和 $m5$ 独立选自 0-25，

[0816] $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 和 $n4$ 独立选自 0-16，

[0817] F 为芳基、杂芳基、吡咯烷 -2,5- 二酮 c，其中所述芳基和杂芳基任选用卤

素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆-烷基取代，

[0818] R¹、R²、R³、R⁴ 和 R⁵ 独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆-烷基、芳基或杂芳基；其中所述烷基、芳基和杂芳基任选用卤素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH 取代，

[0819] D1、D2、E1 和 E2 独立选自 -O-、-NR⁶-、-N(COR⁷)- 或价键；其中 R⁶ 和 R⁷ 独立表示氢或 C₁₋₆-烷基，

[0820] W1 至 W6 独立选自 -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)- 或价键；其中 s2 为 0 或 1。

[0821] 实施方案 63. 实施方案 52-62 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 W 具有下式：

[0822] -W₇-Y-

[0823] 其中

[0824] Y 为 -(CH₂)_{I7}-C₃₋₁₀-环烷基 -W₈- 或价键，

[0825] I7 为 0-6，

[0826] W₇ 选自 -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)- 或价键；其中 s3 为 0 或 1，

[0827] W₈ 选自 -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)- 或价键；其中 s4 为 0 或 1。

[0828] 实施方案 64. 实施方案 62 或实施方案 63 限定的蛋白缀合物，其中 I1、I2、I3、I4、I5 和 I6 独立表示 0-6。

[0829] 实施方案 65. 实施方案 62-64 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 m1、m3、m4、m6 和 m7 独立表示 0-6。

[0830] 实施方案 66. 实施方案 62-65 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 m2 和 m5 独立表示 0-10。

[0831] 实施方案 67. 实施方案 62-66 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 n1、n2、n3 和 n4 独立表示 0-10，例如 0-6。

[0832] 实施方案 68. 实施方案 62-67 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 D1 和 D2 独立选自 -O- 或 -NR⁶- 或价键。

[0833] 实施方案 69. 实施方案 62-68 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 D1 和 D2 都为 -O-。

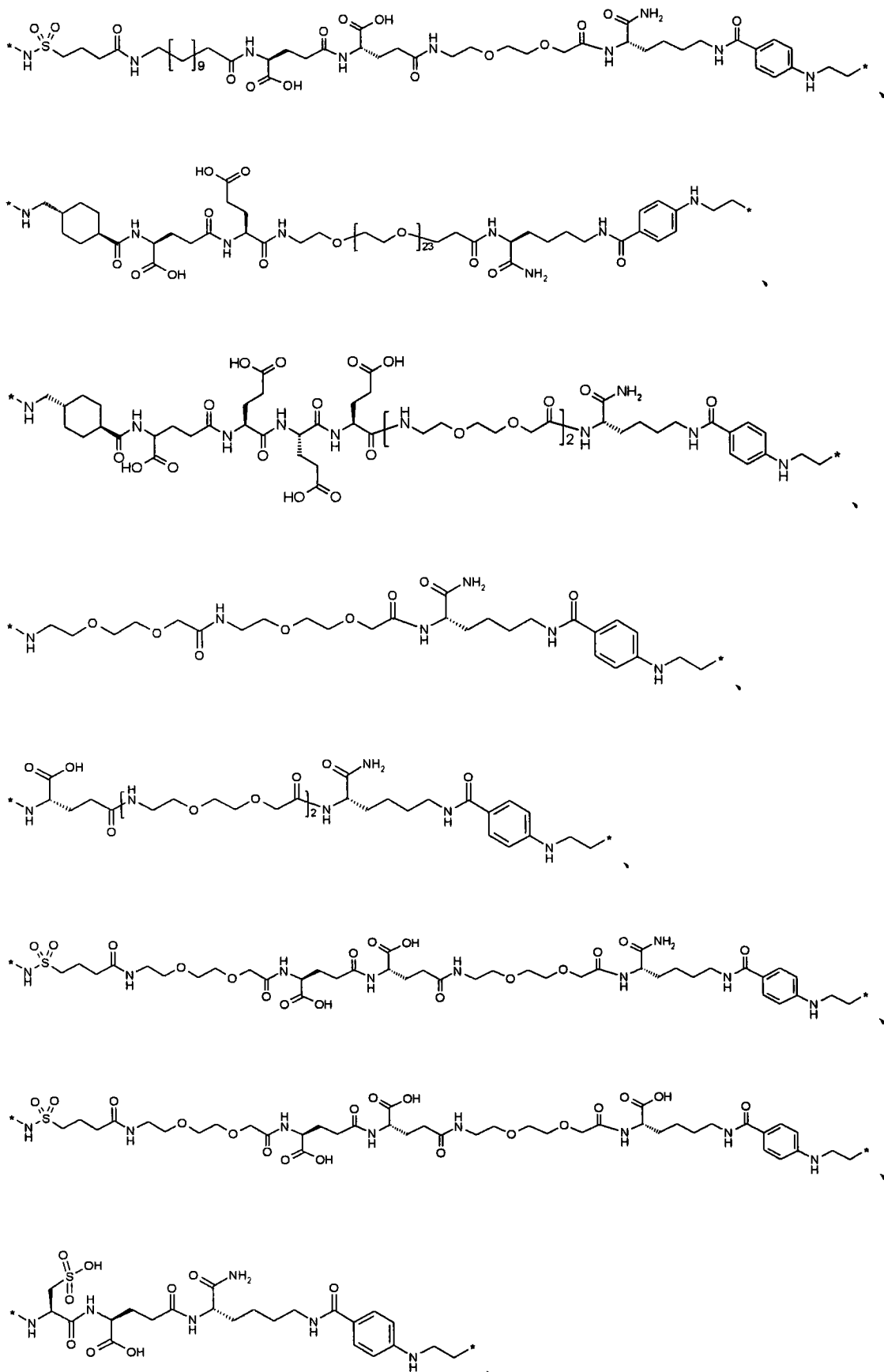
[0834] 实施方案 70. 实施方案 62-68 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 D1 和 D2 都为 -NR⁶-。

[0835] 实施方案 71. 实施方案 62-70 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 E1 和 E2 独立选自 -O- 或 -NR⁶- 或价键。

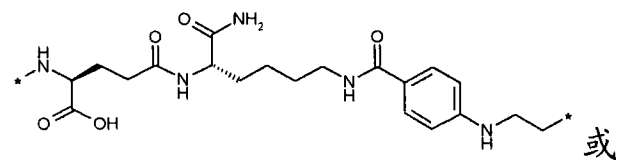
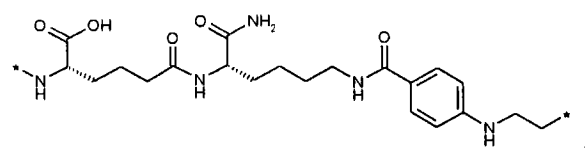
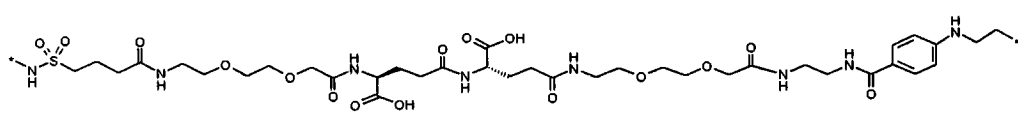
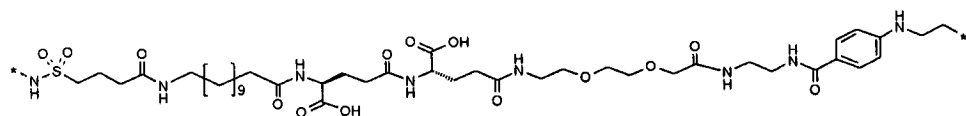
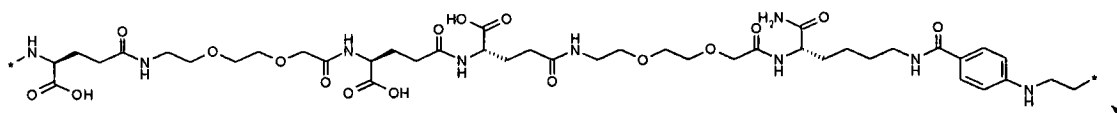
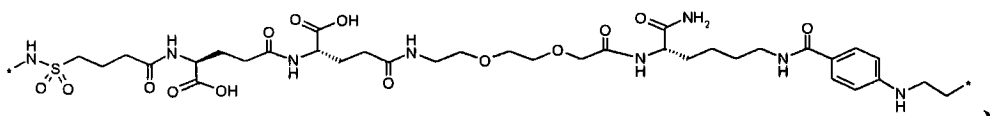
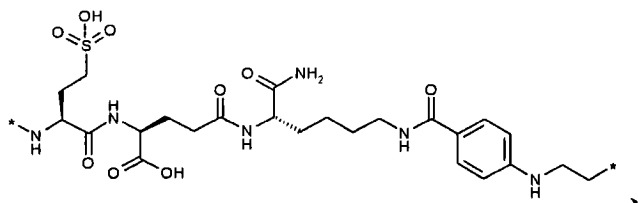
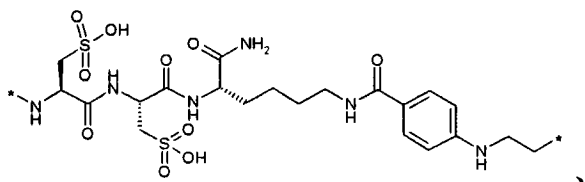
[0836] 实施方案 72. 实施方案 62-71 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 E1 和 E2 都为 -O-。

[0837] 实施方案 73. 实施方案 62-71 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 E1 和 E2 都为 -NR⁶-。

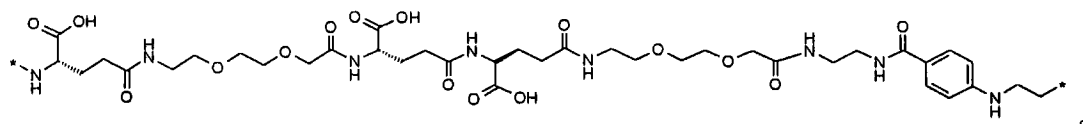
[0838] 实施方案 74. 实施方案 62-73 中任一项限定的蛋白缀合物，其中 W₁ 至 W₈ 独立选



[0845]



[0846]



[0847] 实施方案 78. 实施方案 51-77 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述亲水间隔物的摩尔量介于 80D-1500D 之间或介于 500D-1100D 之间。

[0848] 实施方案 79. 实施方案 51-78 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合残基为亲脂残基。

[0849] 实施方案 80. 实施方案 51-79 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合残基非共价地结合至白蛋白。

[0850] 实施方案 81. 实施方案 51-80 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合残基在生理 pH 下带负电荷。

[0851] 实施方案 82. 实施方案 51-81 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合残基具有低于约 $10\ \mu\text{M}$ 或低于约 $1\ \mu\text{M}$ 的对人血清白蛋白的结合亲和力。

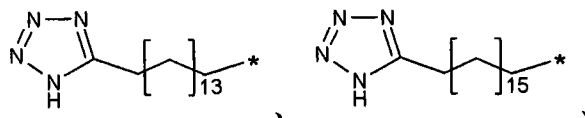
[0852] 实施方案 83. 实施方案 51-82 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合残基选自直链烷基、支链烷基、具有 ω -羧基或 ω -羧酸等排体的基团。

[0853] 实施方案 84. 实施方案 51-83 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合残基具有 6-40 个碳原子、8-26 个碳原子或 8-20 个碳原子。

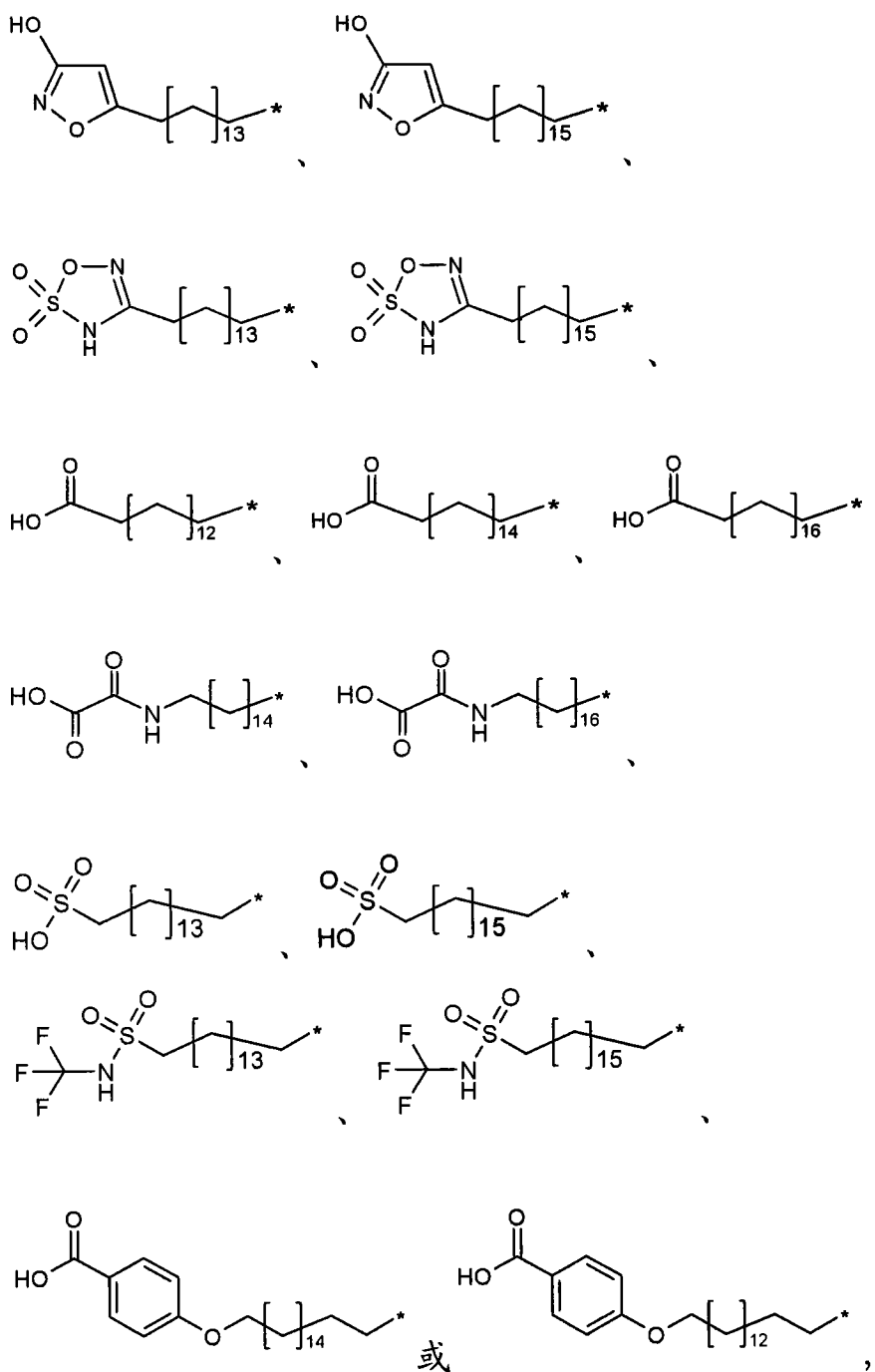
[0854] 实施方案 85. 实施方案 51-84 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合残基为肽, 例如含少于 40 个氨基酸残基的肽。

[0855] 实施方案 86. 实施方案 51-85 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合物选自:

[0856]



[0857]



[0858] 其中*表示通过W连接至B。

[0859] 实施方案 87. 实施方案 51-86 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至蛋白 P 的谷氨酰胺残基。

[0860] 实施方案 88. 实施方案 51-86 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至蛋白 P 的半胱氨酸残基。

[0861] 实施方案 89. 实施方案 51-86 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至蛋白 P 的 N 端残基。

[0862] 实施方案 90. 实施方案 51-86 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至蛋白 P 的 C 端残基。

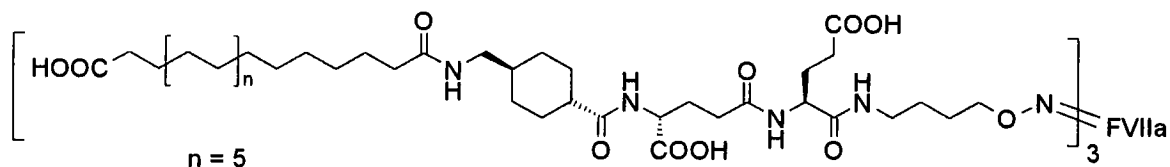
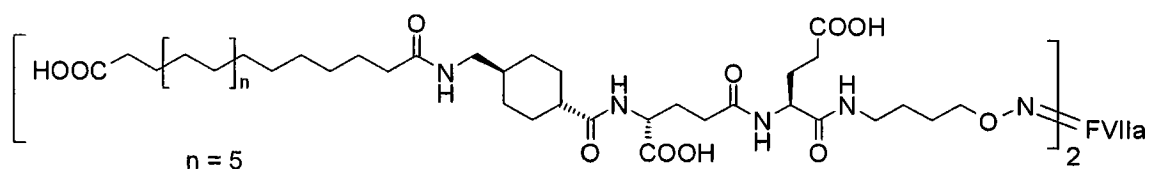
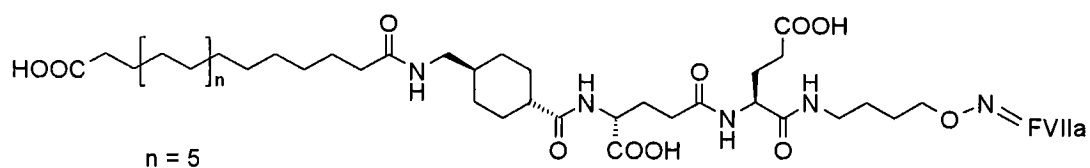
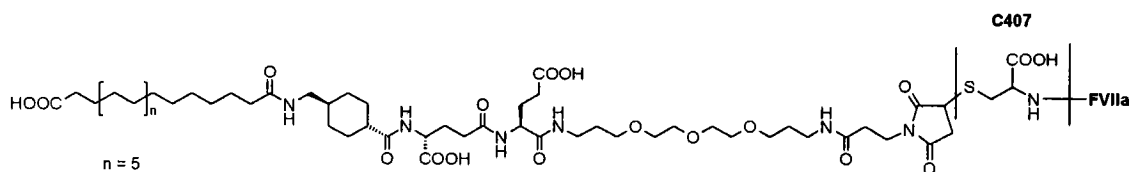
[0863] 实施方案 91. 实施方案 51-86 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述白蛋白结合

残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至蛋白 P 的赖氨酸残基。

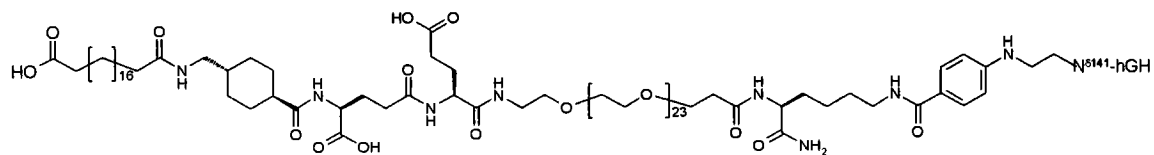
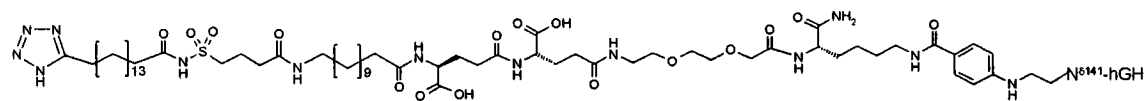
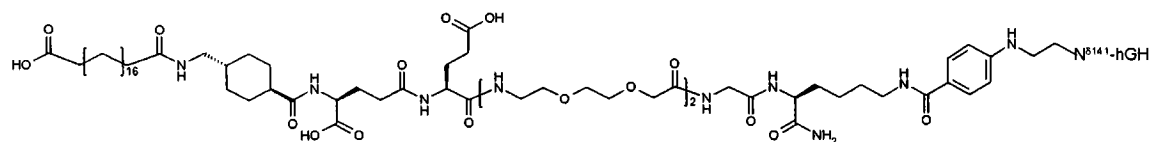
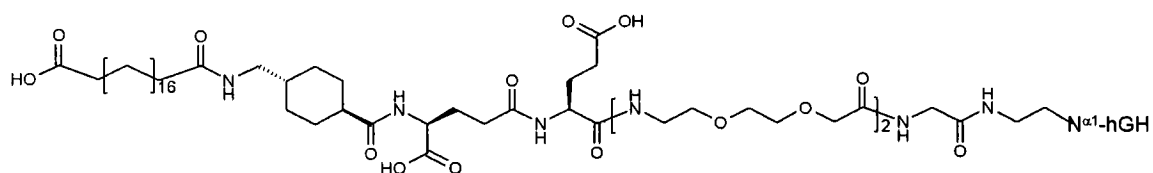
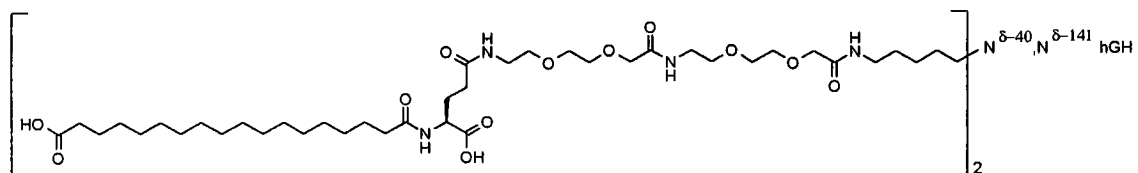
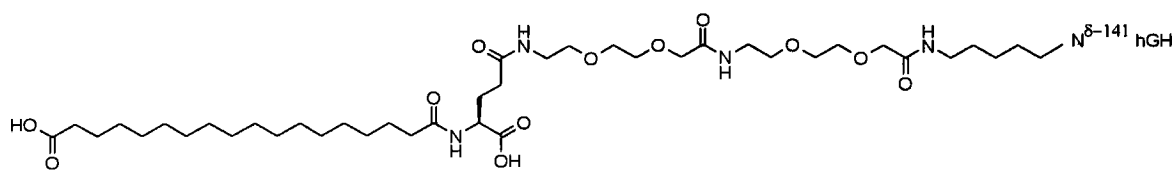
[0864] 实施方案 92. 实施方案 51-86 中任一项限定的蛋白缀合物,其中所述白蛋白结合残基 A 通过亲水间隔物 B 连接至糖蛋白 P 的氧化聚糖残基。

[0865] 实施方案 93. 实施方案 51-92 中任一项限定的蛋白缀合物, 其中所述缀合物选自:

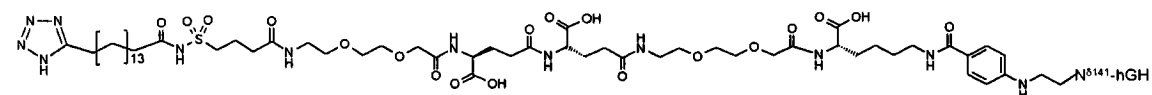
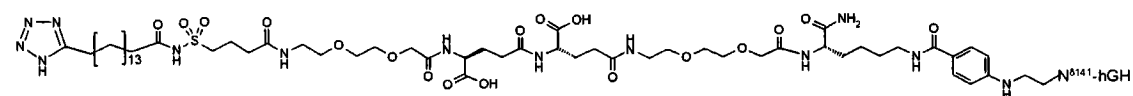
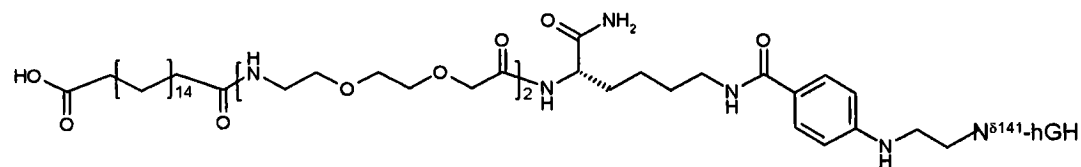
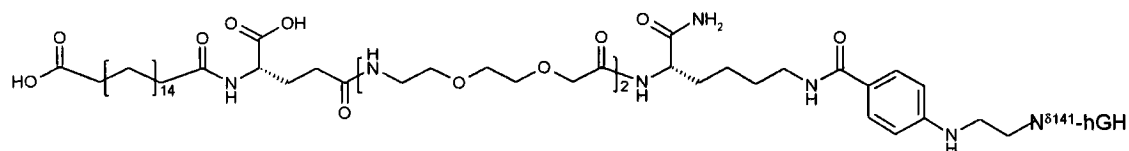
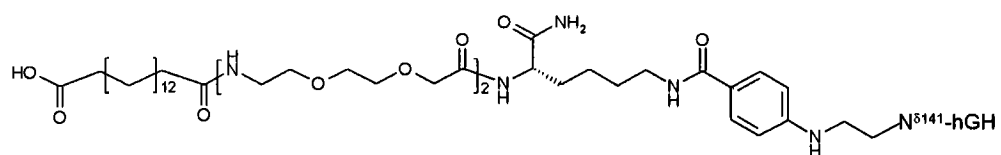
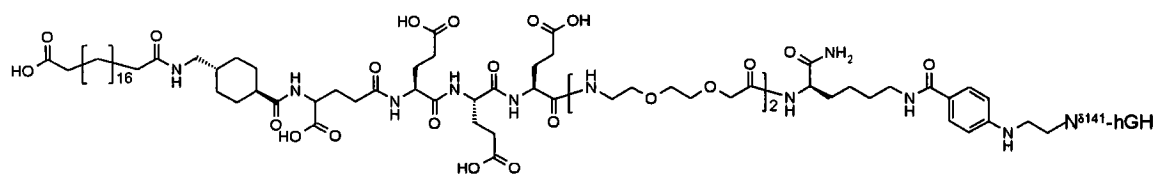
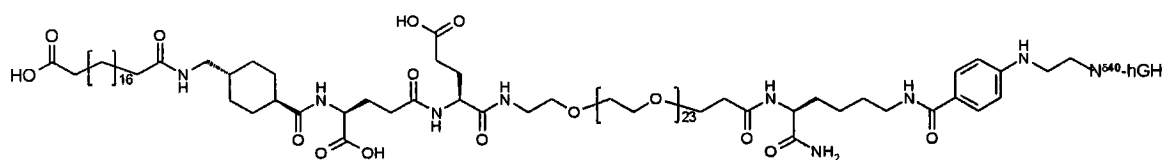
[0866]



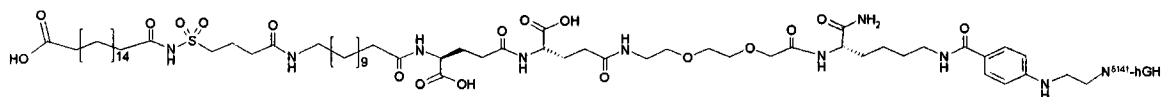
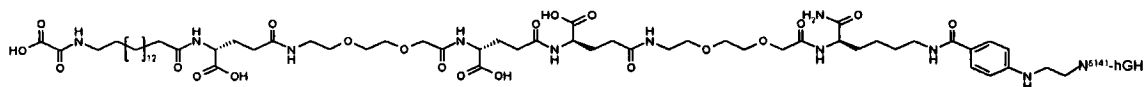
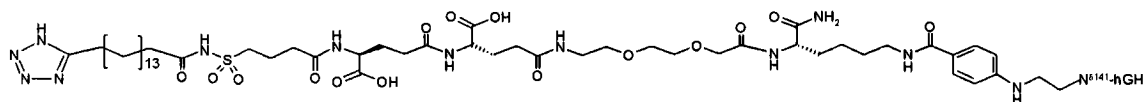
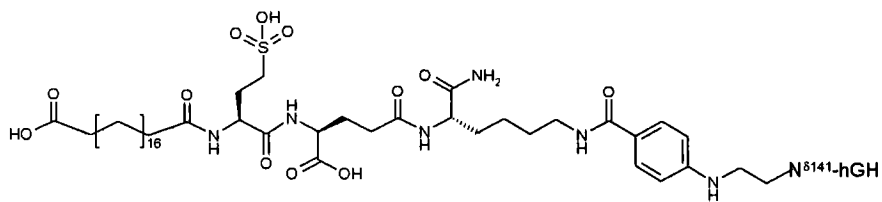
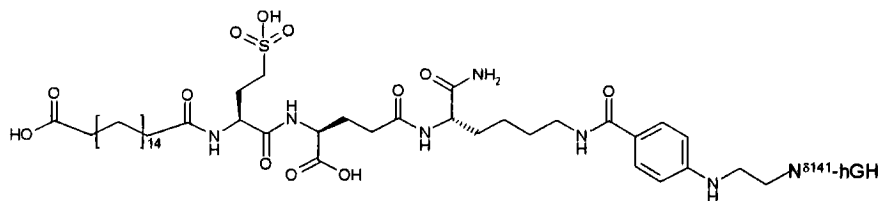
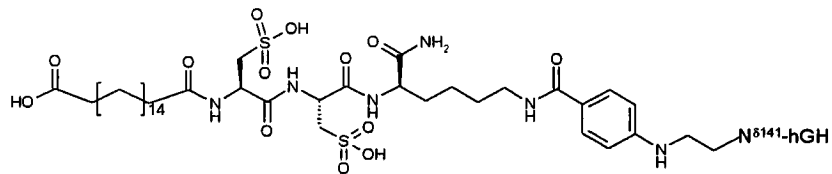
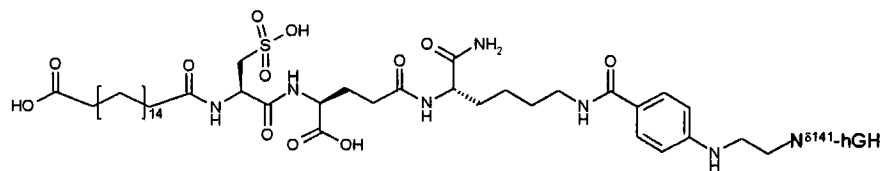
[0867]



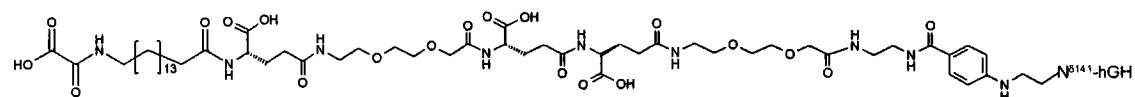
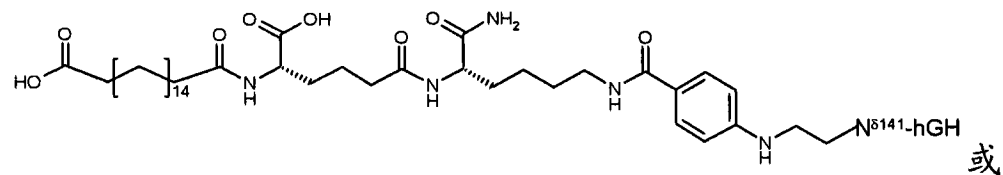
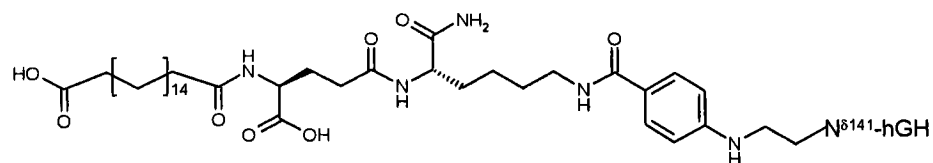
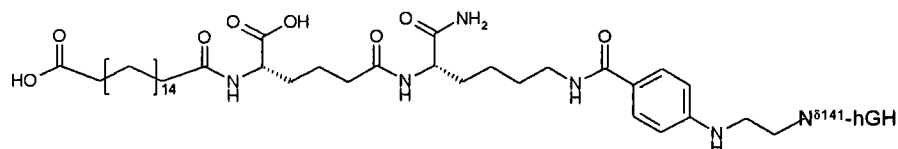
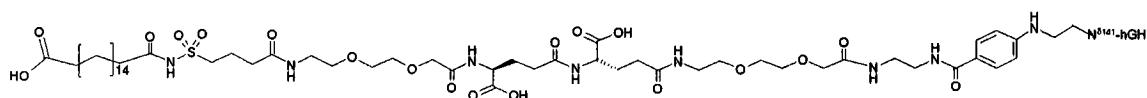
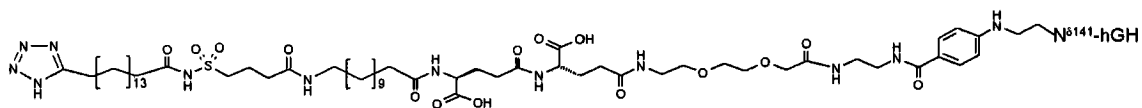
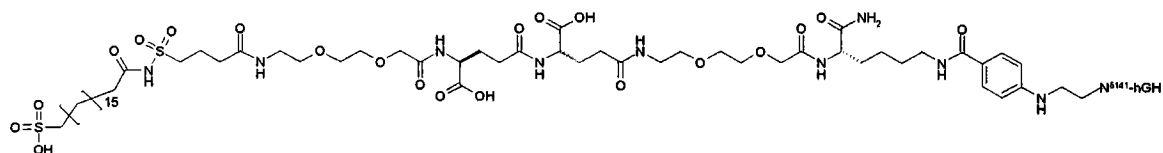
[0868]



[0869]



[0870]



[0871] 实施方案 94. 用于治疗实施方案 50-93 中任一项限定的蛋白缀合物。

[0872] 实施方案 95. 一种药物组合物, 其包含任选与药学上可接受的赋形剂联合的实施方案 50-93 中任一项限定的蛋白缀合物。

[0873] 实施方案 96. 一种血友病的预防性治疗方法, 其包括给予患者治疗有效量的实施

方案 11 限定的缀合凝血因子。

[0874] 实施方案 97. 一种用于血友病的预防性治疗的实施方案 11 限定的缀合凝血因子。

[0875] 实施方案 98. 实施方案 11 限定的缀合凝血因子在制备用于预防性治疗血友病的药物中的用途。

[0876] 实施方案 99. 一种药物组合物,其包含用于预防性治疗血友病的实施方案 11 限定的缀合凝血因子。

[0877] 实施方案 100. 一种药物制剂,其包含实施方案 11 限定的缀合凝血因子。

[0878] 本文所引用的所有参考文献包括出版物、专利申请和专利都通过参考以其整体结合至本文中,并且在程度上如同各种参考文献被独立且具体地指明通过参考结合和以其整体阐述于本文中一样(法律所允许的最大程度上),与任何单独提供的在本文其它地方对特定文献所作的结合无关。

[0879] 除非本文另外说明或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中对不定冠词和术语“所述”以及类似的指示物的使用应理解为涵盖了单数和复数。例如,除非另外说明,短语“所述化合物”应理解为指本发明或特定描述方面的各种“化合物”。

[0880] 除非另外说明,否则本文提供的所有准确值代表了相应的近似值(例如关于特定要素或测量值所提供的所有确切的例示值可理解为还提供了相应的近似测量值,适当时通过“约”来修饰)。

[0881] 除非另外说明或与上下文明显矛盾,使用关于一个或多个要素的术语(例如“包含”、“具有”、“包括”或“含有”)的本发明任何方面的本文描述,旨在为“由”或“基本上由”具体一个或多个要素“组成”或者“基本包含”所述要素的本发明类似方面或方面提供支持(例如除非另外说明或与上下文明显矛盾,否则在本文描述为包含特定要素的组合物应理解为还描述了由该要素组成的组合物)。