

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-190871

(P2016-190871A)

(43) 公開日 平成28年11月10日(2016.11.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/61 (2006.01)	C O 7 K 14/61	Z N A 4 C O 7 6
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/27 (2006.01)	A 6 1 K 37/36	4 H O 4 5
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	

審査請求 有 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-153607 (P2016-153607)	(71) 出願人	511031755
(22) 出願日	平成28年8月4日 (2016.8.4)		ノヴォ・ノルディスク・ヘルス・ケア・ア ーゲー
(62) 分割の表示	特願2012-523348 (P2012-523348) の分割		スイス・CH-8050・チューリッヒ・ サーガウアーシュトラッセ・36/38
原出願日	平成22年8月6日 (2010.8.6)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	09167350.9		弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成21年8月6日 (2009.8.6)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 実広 信哉
(31) 優先権主張番号	61/232, 967	(74) 代理人	100133400
(32) 優先日	平成21年8月11日 (2009.8.11)		弁理士 阿部 達彦
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ニルス・ランゲラン・ヨハンセン
			デンマーク・DK-2880・ハウスベア ・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ ノルディスク・アー／エス

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 長期のインビボ有効性を有する成長ホルモン

(57) 【要約】

【課題】本発明は、アルブミンへの非共有結合を提供するリンカーを有する成長ホルモンコンジュゲートにより例示される、皮下投与に対して最適化されたポリペプチド化合物に関する。

【解決手段】本発明は、親水性スパーサーを介してアルブミン結合残基に連結した成長ホルモン化合物、ならびにこのような化合物を調製および使用する方法に関する。これらの化合物は、より長い作用プロファイルを有し、治療法において有用である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

親水性スパーサーを介してアルブミン結合残基に連結した成長ホルモン化合物(GH)を含む成長ホルモンコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物もしくはプロドラッグ。

【請求項 2】

成長ホルモンコンジュゲートが、式(1)：

A-W-B-GH(1)

(式中、

GHは、成長ホルモン化合物を表し、

10

Bは、親水性スパーサーを表し、

Wは、AとBを連結する化学基であり、

Aは、アルブミン結合残基を表す)

を有する、請求項1に記載のコンジュゲート、その薬学的に許容される塩、溶媒和物およびプロドラッグ。

【請求項 3】

GHが、hGH(配列番号1)である、請求項1または2に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

Bが、式

-X₁-X₂-X₃-X₄-

20

(式中、

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

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

X₃は、-[(CHR⁵)₁₅-W₆]_{m7}-であり、

X₄は、F-D1-(CH₂)₁₆-D2-であり、

11、12、13、14、15および16は、独立に、0~16から選択され、

m1、m3、m4、m6およびm7は、独立に、0~10から選択され、

m2およびm5は、独立に、0~25から選択され、

n1、n2、n3およびn4は、独立に、0~16から選択され、

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

30

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

D1、D2、E1およびE2は、独立に、-O-、-NR⁶-、-N(COR⁷)-または原子価結合から選択され、R⁶およびR⁷は、独立に、水素またはC₁~6-アルキルを表し、

W₁~W₆は、独立に、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され、s2は0または1である)

40

を有する、請求項2または3に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

Wが、式

-W₇-Y-

(式中、

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

17は、0~6であり、

W₇は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-

50

、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{s3}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ または原子価結合から選択され、
 $s3$ は、0または1であり、

W_8 は、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{s4}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、または原子価結合から選択され、 $s4$ は、0または1である)を有する、請求項2から4のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項6】

$l1$ 、 $l2$ 、 $l3$ 、 $l4$ 、 $l5$ および $l6$ が、独立に、0～6であり、
 $m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ および $m7$ が、独立に、0～6であり、
 $m2$ および $m5$ が、独立に、0～10であり、
 $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ および $n4$ が、独立に、0～10である、
 請求項4または5に記載のコンジュゲート。

10

【請求項7】

$D1$ および $D2$ が、独立に、 $-\text{O}-$ または $-\text{NR}^6-$ または原子価結合から選択される、請求項4から6のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項8】

$E1$ および $E2$ が、独立に、 $-\text{O}-$ または $-\text{NR}^6-$ または原子価結合から選択される、請求項4から7のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

20

【請求項9】

W_1 から W_8 が、独立に、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ または原子価結合からなる群から選択される、請求項4から8のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

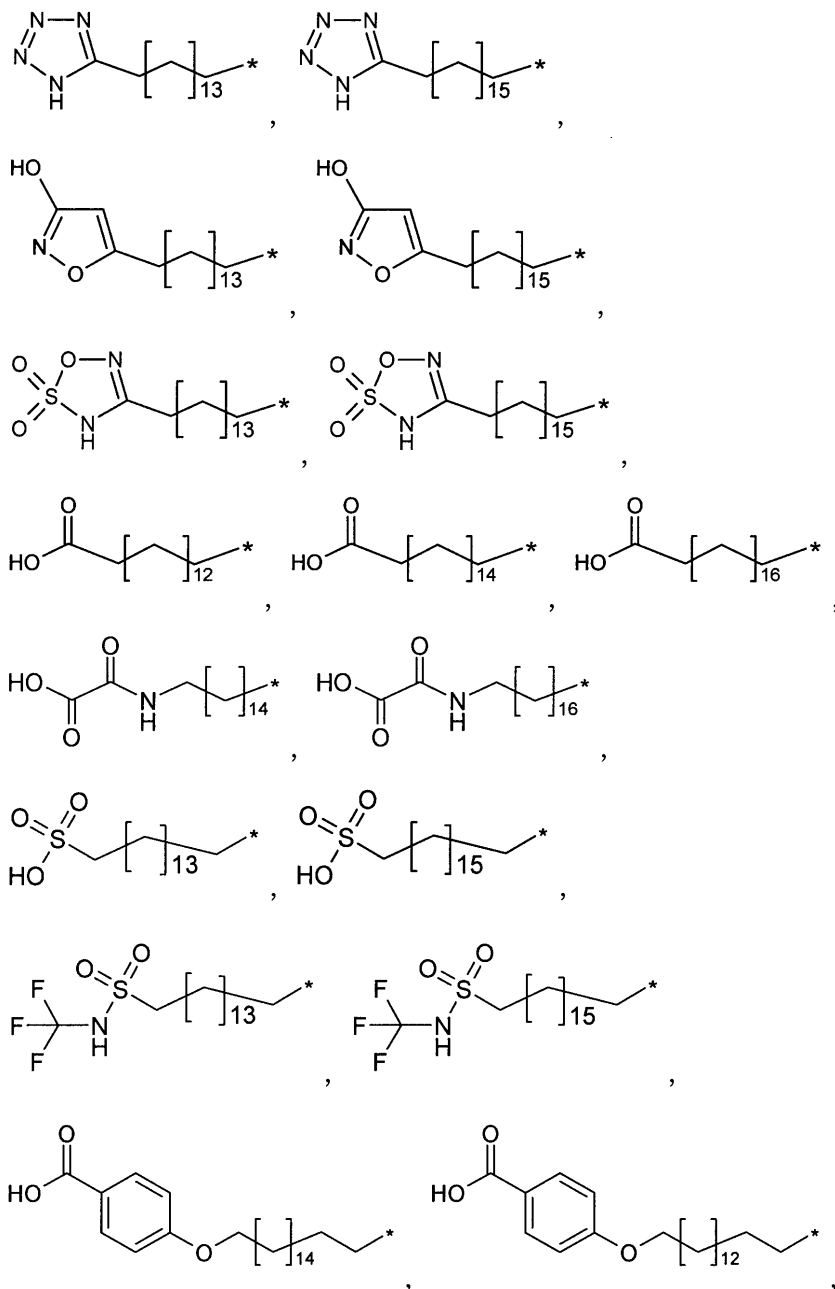
【請求項10】

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 が、独立に、水素、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ または C_{1-6} -アルキルから選択され、前記アルキル基が、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ で場合によって置換されている、請求項4から9のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項11】

Aが

【化 1】



10

20

30

(式中、*はWからBへの結合を示す)

から選択される、請求項2から10のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2】

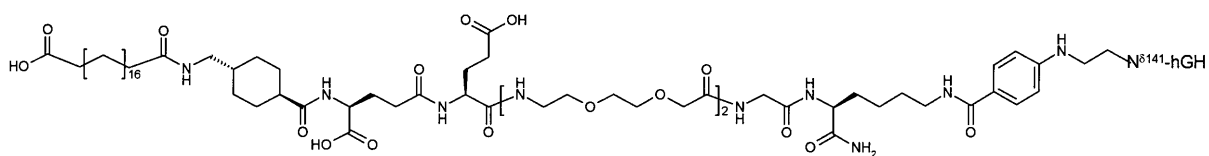
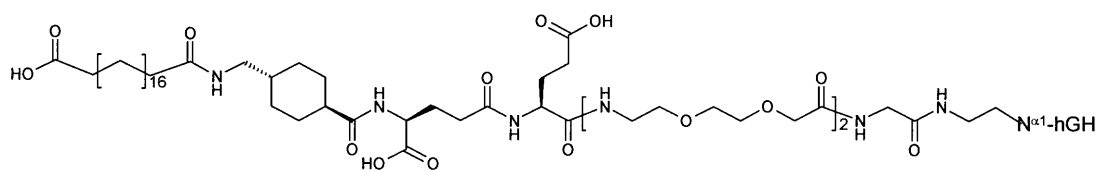
アルブミン結合残基が、親水性スパーを介して、成長ホルモン化合物の配列番号1の位置40に対応する位置でグルタミン残基に、または配列番号1の位置141に対応する位置でグルタミン残基に、またはN末端残基に結合している、請求項1から11のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

40

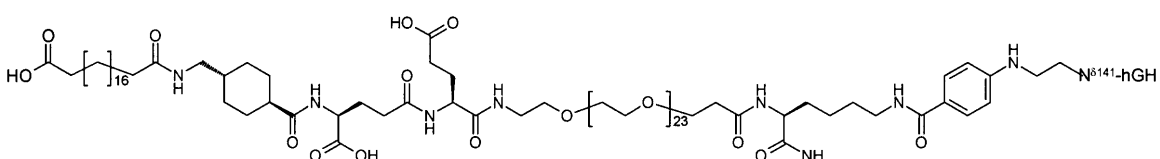
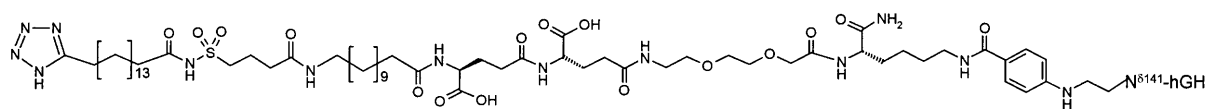
【請求項 1 3】

前記化合物が、

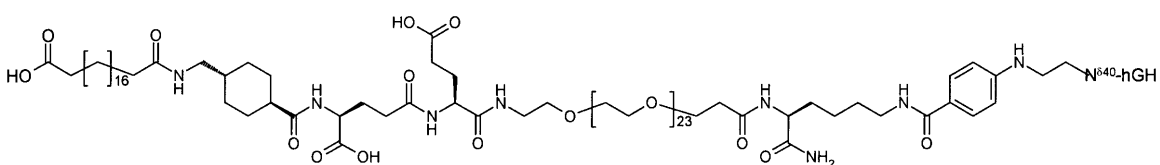
【化 2 - 1】



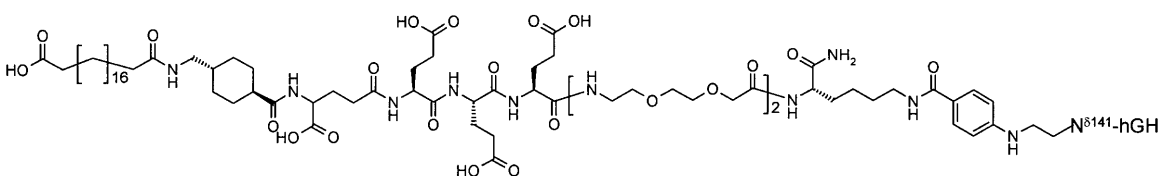
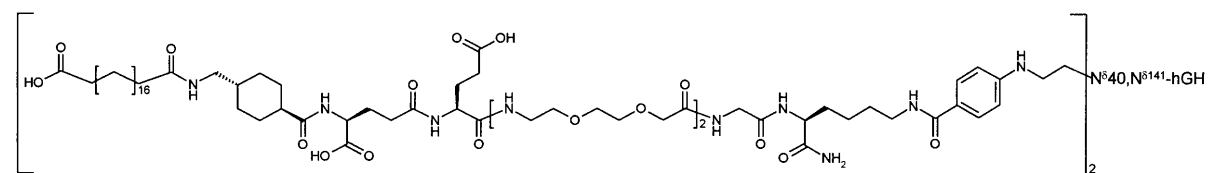
10



20

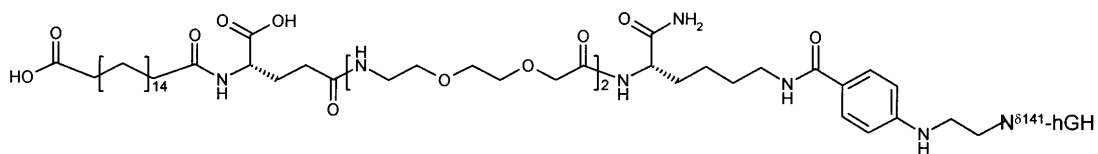
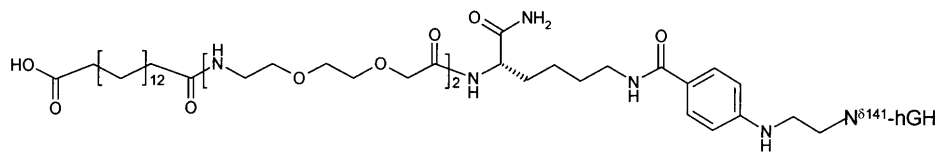


30

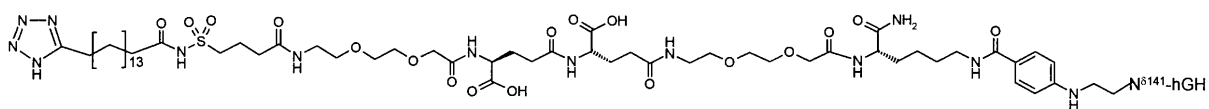
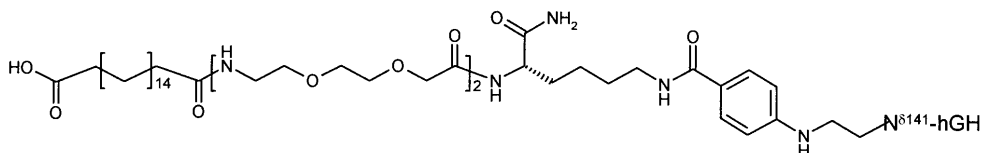


40

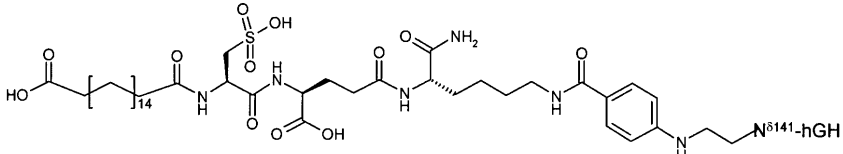
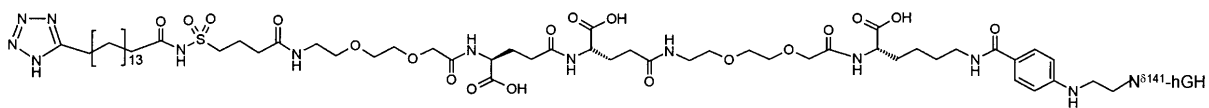
【化 2 - 2】



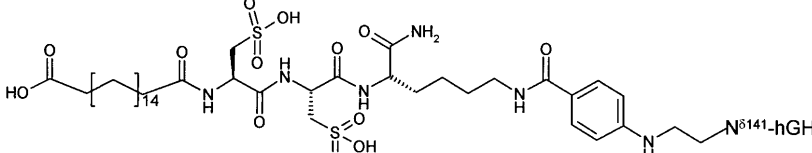
10



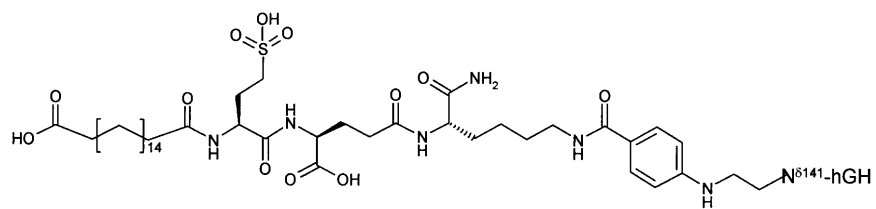
20



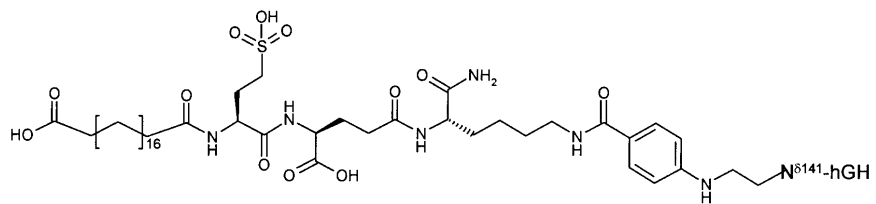
30



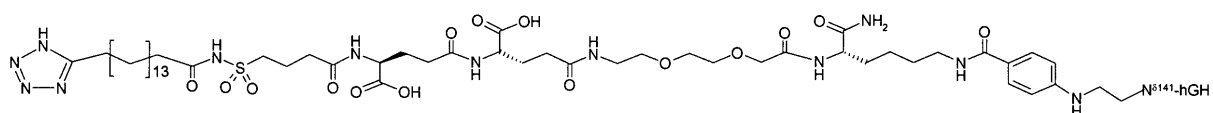
【化 2 - 3】



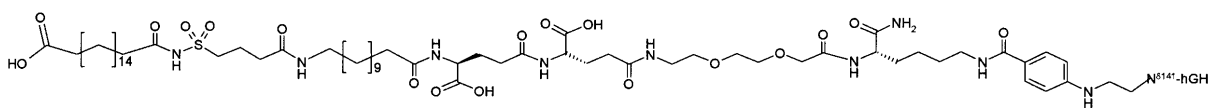
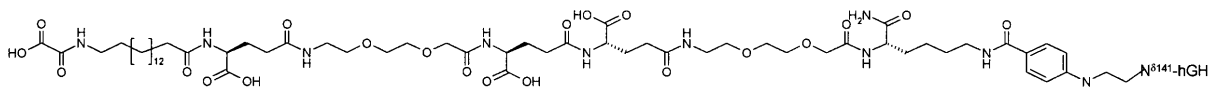
•



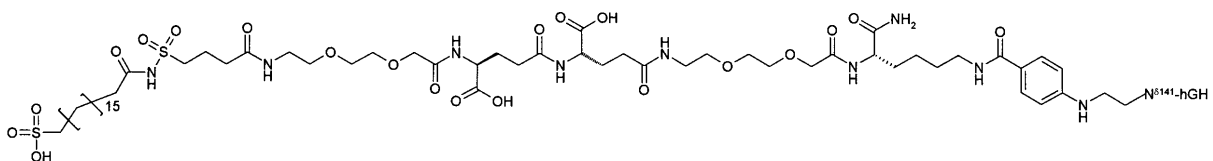
9



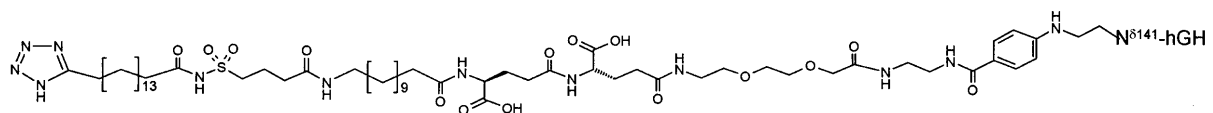
•



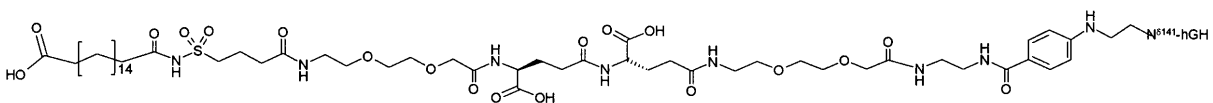
2



2



2



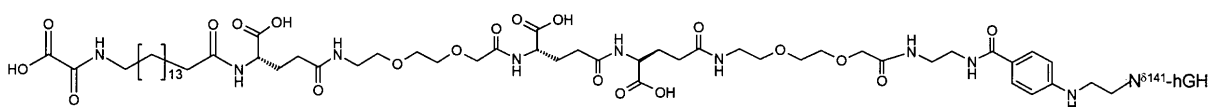
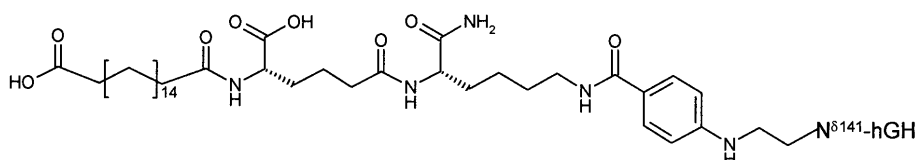
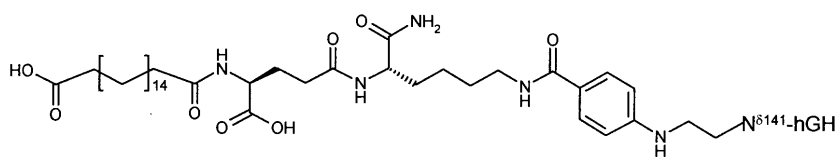
3

10

20

30

40

OC(=O)CC1CCCCCCCCCCCCCCC1C(=O)NC(C(=O)O)C[C@H](CCCCC(=O)NC(C(=O)N)C[C@H](CCCCNC(=O)c2ccc(cc2)NCCCN5[14I]hGH)C(=O)c2ccc(cc2)NCCCN5[14I]hGH)C(=O)N

【請求項 14】

【請求項 15】

ターナー症候群;ブラダーウィリ症候群(PWS);ヌーナン症候群;ダウン症候群;慢性腎疾患、若年性関節リウマチ;嚢胞性線維症、HAART治療を受けている小児のHIV-感染(HIV/HALS小児);短い在胎齢で産まれた背が低い小児(SGA);SGA以外で、非常に少ない出生時体重で産まれた小児の低身長(VLBW);骨格形成異常;低軟骨形成症;軟骨形成不全症;特発性低身長(ISS);成人のGHD;長骨、例えば脛骨、腓骨、大腿骨、上腕骨、橈骨、尺骨、鎖骨、中手、中足、および指などの骨折;スポンジ状骨、例えばスカル、手の底部、および足の底部などの骨折;例えば、手、膝、もしくは肩の腱または靱帯の手術後の患者;伸延骨形成を完了したかまたは行っている患者;股関節部もしくは円板の交換、半月板修復、脊椎固定または例えば膝、股関節部、肩、肘、手根もしくは顎などのプロテーゼ固定後の患者;骨接合材料、例えば釘、ネジおよびプレートなどを固定された患者;骨折の癒合不能または変形癒合の患者;例えば脛骨または母趾からの骨解剖後の患者;移植片移植後の患者;外傷または関節炎に起因する膝の関節軟骨の変性;ターナー症候群の患者の骨粗鬆症;男性の骨粗鬆症;慢性透析(APCD)の成人患者;APCDの栄養失調関連の循環器疾患;APCDのカヘキシーの逆転;APCDの癌;APCDの慢性抽象的肺疾患;APCDのHIV;APCDの高齢者;APCDの慢性肝疾患;APCDの疲労症候群;クローン病;肝機能不全;HIV感染の男性;短腸症候群;中心性肥満;HIV関連のリポジストロフィー症候群(HALS);男性不妊症;大きな待機手術、アルコール/薬物の解毒または神経外傷後の患者;老化;虚弱な高齢者;変形性関節症;外傷性損傷軟骨;勃起不全;線維筋痛;記憶障害;鬱病;外傷性脳損傷;クモ膜下出血;非常に少ない出生時体重;メタボリックシンドローム;グルココルチコイドミオパシー;または小児のグルココルチコイド治療による低身長の治療のための薬剤、筋肉組織、神経組織または外傷の治療の促進;損傷した組織への血流の促進もしくは改善;または損傷した組織の感染速度の低減のための薬剤の製造における、請求項1から13のいずれか一項に記載のコンジュゲートの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、親水性スパーサーを介してアルブミン結合残基に連結した成長ホルモン化合物、ならびにこのような化合物を調製および使用方法に関する。これらの化合物は、より長い作用プロファイルを有し、治療法において有用である。

【背景技術】

【0002】

ペプチドの特性を正しく変化させる基をこのペプチドとコンジュゲートさせることによって、このペプチドの特性および特徴を修正することは周知である。このようなコンジュゲーションは一般的に、ペプチド中のいくつかの官能基がコンジュゲート基の中の別の官能基と反応することを必要とする。通常、アミノ基、例えばN末端アミノ基またはリジン内の -アミノ基などが、例えば国際公開第2005/027978号のGLP-1に対して記載されているような適切なアシル化試薬と組み合わせて使用されてきた。別法として、ポリエチレングリコール(PEG)またはその誘導体をタンパク質に結合させてもよい。総説として、Exp. Opin. Ther. Patent、14、859～894頁、(2004年)を参照されたい。成長ホルモンに対するPEGの結合は、成長ホルモンの血漿半減期に正の効果を有しうることが示されている(国際公開第03/044056号)。

10

【0003】

ペプチドのC末端を修飾するためのカルボキシペプチダーゼの使用は以前に報告されている。国際公開第92/05271号では、C末端カルボキシ基をアミド化するためのカルボキシペプチダーゼおよび求核性化合物の使用を開示しており、国際公開第98/38285号では、この目的に特に適したカルボキシペプチダーゼYの変異体を開示している。

20

【0004】

欧州特許第243929号では、ポリペプチド、リポーター基または細胞毒性薬を、タンパク質またはポリペプチドのC末端に組み込むためのカルボキシペプチダーゼの使用を開示している。

【0005】

国際公開第2005/035553号は、ペプチドのC末端に官能基を酵素により組み込むことによるペプチドの選択的コンジュゲーション方法を記載している。

30

【0006】

トランスグルタミナーゼはこれまで、ペプチドの特性を改変するために使用されてきた。食品業界、特に乳産業では、例えばトランスグルタミナーゼを用いてペプチドを架橋結合させるための多くの技法が利用可能である。他の文献では、生理学的に活性のあるペプチドの特性を改変するためのトランスグルタミナーゼの使用を開示している。欧州特許第950665号、欧州特許第785276号およびSato、Adv. Drug Delivery Rev. 54、487～504頁(2002年)では、トランスグルタミナーゼの存在下、少なくとも一つのGlnを含むペプチドと、アミン官能化されたPEGまたは同様の配位子との間の直接反応を開示しており、Wada、Biotech. Lett. 23、1367～1372頁(2001年)では、トランスグルタミナーゼを用いた、 -ラクトグロブリンと脂肪酸との直接コンジュゲーションを開示している。国際公開第2005/070468号として公開された国際特許出願では、コンジュゲート基を結合することができるハンドルを組み込むためのトランスグルタミナーゼの使用を開示している。

40

【0007】

成長ホルモンは、体成長の制御だけでなく、タンパク質、炭水化物および脂質の代謝制御にも関与している重要なホルモンである。成長ホルモンの主な作用は、成長を促進させることである。ヒト成長ホルモンは、以下の配列を有する191アミノ酸残基タンパク質である：

FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRLISLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF(配列番号:1)。

50

【 0 0 0 8 】

ヒト成長ホルモンおよび密接に関連するその変異体の投与を使用して、様々な成長ホルモン欠乏に関連する疾患が治療される。成長ホルモンはペプチドであるため、非経口的に、すなわちニードルを用いて投与される。さらに、成長ホルモンは半減期が比較的短いことを特徴とし、したがって頻回の投与が必要となり、対応する痛みおよび患者の不便が伴う。したがって、例えば半減期がより長いなど、改善された薬理学的特性を有する成長ホルモン化合物の実現が依然として必要とされている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 9 】

10

【 特許文献 1 】 国際公開第2005/027978号

【 特許文献 2 】 国際公開第03/044056号

【 特許文献 3 】 国際公開第92/05271号

【 特許文献 4 】 国際公開第98/38285号

【 特許文献 5 】 欧州特許第243929号

【 特許文献 6 】 国際公開第2005/035553号

【 特許文献 7 】 欧州特許第950665号

【 特許文献 8 】 欧州特許第785276号

【 特許文献 9 】 国際公開第2005/070468号

20

【 特許文献 1 0 】 米国特許第5156956号

【 特許文献 1 1 】 米国特許第5252469号

【 特許文献 1 2 】 特開第2003/199569号

【 特許文献 1 3 】 米国特許第5731183号

【 特許文献 1 4 】 国際公開第96/06931号

【 特許文献 1 5 】 国際公開第96/22366号

【 特許文献 1 6 】 欧州特許第0555649号

【 特許文献 1 7 】 米国特許第5736356号

【 特許文献 1 8 】 国際公開第2007/020290号

【 特許文献 1 9 】 国際公開第2008/020075号

30

【 特許文献 2 0 】 国際公開第2006024953A2号

【 非特許文献 】

【 0 0 1 0 】

【 非特許文献 1 】 Exp. Opin. Ther. Patent、14、859～894頁、(2004年)

【 非特許文献 2 】 Sato、Adv. Drug Delivery Rev. 54、487～504頁(2002年)

【 非特許文献 3 】 Wada、Biotech. Lett. 23、1367～1372頁(2001年)

【 非特許文献 4 】 J. Biol. Chem. 277(38)、35035～35042、(2002)

【 非特許文献 5 】 Kaempfer、J. Gen. Microbiol. 137、1831～1892頁(1991年)

【 非特許文献 6 】 J. Pharm. Sci. 66、2、(1977)

【 非特許文献 7 】 J. Am. Chem. Soc. 86 (1964年)5175～5180頁「A New Substituent Constant, , Derived from Partition Coefficients」

40

【 非特許文献 8 】 C. A. Lipinskiら、Advanced Drug Delivery Reviews、23(1997年)3～25頁、「Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings」

【 非特許文献 9 】 I. Moriguchi、S. Hirono、I. Nakagome、H. Hirano、Chem. and Pharm. Bull.、42(1994年)976～978頁「Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods」

【 非特許文献 1 0 】 Computational Molecular Biology、Lesk、A. M.、ed.、Oxford University Press、New York、1988年

【 非特許文献 1 1 】 Biocomputing: Informatics and Genome Projects、Smith、D. W.、ed.、Academic Press、New York、1993年

50

- 【非特許文献 1 2】Computer Analysis of Sequence Data、Part 1、Griffin、A. M.、and Griffin、H. G.、eds.、Humana Press、New Jersey、1994年
- 【非特許文献 1 3】Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje、G.、Academic Press、1987年
- 【非特許文献 1 4】Sequence Analysis Primer、Gribskov、M. and Devereux、J.、eds.、M. Stockton Press、New York、1991年
- 【非特許文献 1 5】Carilloら、SIAM J. Applied Math.、48、1073頁、(1988年)
- 【非特許文献 1 6】Devereuxら、Nucl. Acid. Res.、12、387頁、(1984年);Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison、Wis.
- 【非特許文献 1 7】Altschulら、J. Mol. Biol.、215、403～410頁、(1990年) 10
- 【非特許文献 1 8】Dayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure、vol. 5、supp.3(1978年)
- 【非特許文献 1 9】Henikoffら、Proc. Natl. Acad. Sci USA、89、10915～10919頁(1992年)
- 【非特許文献 2 0】Needlemanら、J. Mol. Biol.、48、443～453頁(1970年)
- 【非特許文献 2 1】J. Biotech.、65、183頁(1998年)
- 【非特許文献 2 2】J. Med. Chem.、43、1986頁(2000年)
- 【非特許文献 2 3】N. Cheneら、Reprod. Nutr. Develop. 29、1～25頁(1989年)
- 【非特許文献 2 4】Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、2000
- 【非特許文献 2 5】WilliamsおよびPolli、J. Parenteral Sci. Technol.、38、48～59(1984) 20
- 【非特許文献 2 6】Spray-Drying Handbook中のMasters(1991)(第5版;Longman Scientific and Technical、Essez、U.K.)、491～676頁
- 【非特許文献 2 7】Broadheadら(1992)Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169～1206(1992)
- 【非特許文献 2 8】Mumenthalerら、Pharm. Res. 11、12～20(1994)
- 【非特許文献 2 9】CarpenterおよびCrowe、Cryobiology 25、459～470(1988)
- 【非特許文献 3 0】Roser、Biopharm. 4、47～53(1991)
- 【非特許文献 3 1】Handbook of Pharmaceutical Controlled Release(Wise、D.L.編、Marcel Dekker、New York、2000)
- 【非特許文献 3 2】Protein and the Pharmaceutical Sciences99巻:Protein Composition and Delivery(MacNally、E.J.編、Marcel Dekker、New York、2000) 30
- 【非特許文献 3 3】Stability of Protein Pharmaceuticals、Ahern. T.J. & Manning M. C.、Plenum Press、New York 1992
- 【非特許文献 3 4】M. M. Kurfurst in Anal. Biochem. 200(2)、244～248(1992)
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0011】
- したがって、本発明は、改善された薬理学的特性を有する新規の成長ホルモンコンジュゲート、ならびにその製造方法を提供する。
- 【課題を解決するための手段】 40
- 【0012】
- 皮下投与された医薬品化合物のバイオアベイラビリティは、吸収速度に関連する。化合物が皮下毛細血管の堅い接合部を通過する能力は、これらの物理的特性および化学的特性ならびに分子サイズまたは化合物の水力学的な量に部分的に関連する。タンパク質コンジュゲート、例えば40 kDa PEGでペグ化したhGH(PEG-hGH)などは、見かけの分子量150～250kDaを有する。共有結合したアルブミンを有するhGH分子の分子量は87kDaであるのに対し、非共有結合したアルブミンを有するhGH分子は、その時のアルブミン部分から分離するので、分子量は22kDaである。
- 【0013】
- 分離した状態で費やされる時間は、少なくとも部分的に、アルブミン結合部分の親和性 50

に依存するものと想定される。したがって、非共有結合のアルブミンを有するhGH分子の吸収速度は、PEG-hGHに対する吸収速度よりも速い可能性がある。アルブミンに対して低い親和性を有するアルブミン結合部分を用いた場合、より高い吸収速度が得られる。

【0014】

さらに、アルブミン結合部分をhGHへ結合させているリンカーおよび/またはスペーサーの物理的特性および化学的特性は、化合物の官能性に影響を与えることになる。

【0015】

本発明の発明者らは驚くことに、 $m\text{LogP}<0$ -または $c\text{LogP}<0.5$ を有する化学的部分によってGHとアルブミン結合残基とを分離する親水性スペーサーを介して、成長ホルモン化合物(GH)をアルブミン結合残基に選択的に連結させることによって、改善された薬理学的特性を有するGHコンジュゲートを得ることができることを発見した。

10

【0016】

さらに、本発明は、親水性スペーサーを介して、アルブミン結合残基をヒト成長ホルモン(hGH)に導入することを選択的に行うことができ、この場合大きい割合の生物活性が保持できるという観察に基づいている。親水性スペーサーを介してアルブミン結合残基が、配列番号1の配列を有するhGHのフェニルアラニン1、グルタミン40および/またはグルタミン141の位置に対応する位置に導入されることが好ましい。トランスグルタミナーゼ(TGase)、特にストレプトバクテリウムモバラエンス(*Streptovorticillium mobaraenae*)またはストレプトマイセスリディクス(*Streptomyces lydicus*)由来のTGaseの使用により、親水性スペーサーを介して、位置40および/または141でアルブミン結合残基を選択的に導入することが可能となり、残り11のグルタミン残基は、グルタミンが、トランスグルタミナーゼの基質であるという事実にもかかわらず、もとの状態のままである。

20

【0017】

したがって、本発明の一実施形態では、成長ホルモン化合物(GH)は、親水性スペーサーを介して1つのアルブミン結合残基に連結している。通常、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して、hGHのN末端、位置40または位置141に結合する。さらなる実施形態において、2つまたは3つのアルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して、hGHのN末端、位置40および/または位置141に結合する。

【0018】

本発明のさらなる実施形態において、親水性スペーサーは、式- $X_1-X_2-X_3-X_4$ - (式中、

30

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

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

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

X_4 は、 $-F-D1-(CH_2)_{l6}-D2$ -であり、

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

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

$m2$ および $m5$ は、独立に、0~25から選択され、

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

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

40

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

D1、D2、E1およびE2は、独立に、-O-、-NR⁶-、-N(COR⁷)-または原子価結合から選択され、 R^6 および R^7 は独立に水素またはC₁~₆アルキルを表し、

W_1 ~ W_6 は、独立に、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)

50

)-、 $-(\text{CH}_2)_{s1}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、または原子価結合から選択され、 $s1$ は、0または1である)

を有する。

【0019】

本発明のさらなる目的は、本発明の方法に従い前記タンパク質をコンジュゲートすることによって、GHの特性を改善するための方法を提供する。

【0020】

定義

本文脈では、本明細書で使用する場合、「成長ホルモン化合物」という用語は、哺乳動物由来の成長ホルモン、例えば、ヒト、ウシまたはブタの成長ホルモン、および組み換え型成長ホルモン、例えば、組み換え型のヒト、ウシまたはブタの成長ホルモン、ならびにこのような成長ホルモンの変異体を意味する。本明細書で使用する場合、「GH」および「成長ホルモン化合物」は、互換性がある。GHが、哺乳動物由来の成長ホルモンの変異体、例えば、hGHおよび組み換え型hGHである場合、前記変異体は、hGHなどの成長ホルモン配列中の1つもしくは複数のアミノ酸残基を別の天然アミノ酸もしくは非天然アミノ酸で置換することにより；かつ/または1つもしくは複数の天然アミノ酸もしくは非天然アミノ酸をhGHなどの成長ホルモン配列に加えることおよび/または1つもしくは複数のアミノ酸残基をhGHなどの成長ホルモン配列から欠失することにより得た化合物であって、これらのステップのいずれかの後で1つまたは複数のアミノ酸残基のさらなる誘導体化が場合により行われてもよい化合物であることが理解される。特に、このような置換基は、1つのアミノ酸残基が、同じ群からの別のアミノ酸残基で、すなわち、同様の特性を有する別のアミノ酸残基で置換されているという意味で保守的である。アミノ酸は、その特性に基づき以下の群に都合よく分類できる：塩基性アミノ酸(例えば、アルギニン、リシン、ヒスチジン)、酸性アミノ酸(例えば、グルタミン酸およびアスパラギン酸)、極性アミノ酸(例えば、グルタミン、システインおよびアスパラギン)、疎水性アミノ酸(例えば、ロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニンおよびバリン)、芳香族アミノ酸(例えば、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン)および小アミノ酸(例えば、グリシン、アラニン、セリンおよびスレオニン)。通常GHは、本明細書のアッセイIで決定したとき、少なくとも80%のhGHとの同一性を有し、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも20%を有する。

【0021】

本文脈では、本明細書で使用する場合、「アルブミン結合残基」という用語は、ヒト血清アルブミンに非共有結合する残基を意味する。成長ホルモン化合物(GH)に結合したアルブミン結合残基は、ヒト血清アルブミンに結合親和性を通常有し、それは約 $10\mu\text{M}$ 未満またはさらに約 $1\mu\text{M}$ 未満である。アルブミン結合残基の範囲は、12~40個の炭素原子を含有する直鎖および分岐の親油性部分、シクロペンタノフェナントレン骨格を有する化合物、ならびに/または10~45個のアミノ酸残基を有するペプチドなどの中で知られている。アルブミン結合特性は、J. Biol. Chem. 277(38)、35035~35042、(2002)に記載の表面プラズモン共鳴で測定できる。

【0022】

本明細書で使用する場合、「親水性スパーサー」という用語は、少なくとも5個の非水素原子を含み、その30~50%がNまたはOのいずれかである化学的部分によって、成長ホルモン化合物とアルブミン結合残基とを分離するスパーサーを意味する。

【0023】

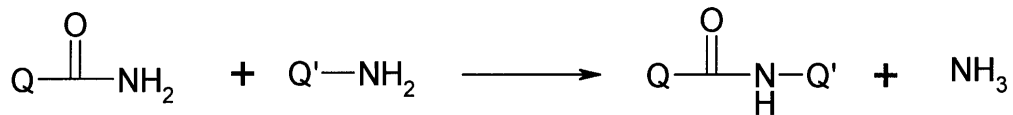
本文脈では、「アミノ基転移」という用語および関連する用語は、グルタミンの側鎖中のアミド窒素を、別の化合物からの窒素、特に求核試薬を含有する別の窒素からの窒素と交換する反応を示すことが意図される。

【0024】

トランスグルタミナーゼ(E.C.2.3.2.13)は、タンパク質-グルタミン- -グルタミルトランスフェラーゼとしても知られており、一般的反応を触媒する。

【0025】

【化 1】



【0026】

Q-C(O)-NH₂ (アミンアクセプター) は、グルタミン残基含有ペプチドまたはタンパク質を表すことができ、Q'-NH₂ (アミンドナー) は、アミン含有求核試薬を表す。あるいは、Q-C(O)-NH₂ および Q'-NH₂ は、それぞれアミンアクセプターおよびリジン含有ペプチドまたはタンパク質を表すことができる。しかし本発明において、Q-C(O)-NH₂ は、グルタミン残基含有成長ホルモンを表し、Q'-NH₂ は、上に示されているようにアミン含有求核試薬を表す。

10

【0027】

有用なトランスグルタミナーゼの例として、微生物トランスグルタミナーゼ、例えばストレプトマイセスモバラエンス (*Streptomyces mobaraense*)、ストレプトマイセスシナモネウム (*Streptomyces cinnamoneum*) およびストレプトマイセスグリセオカルネウム (*Streptomyces griseocarneum*) (すべてが、参照により本明細書に組み込まれている米国特許第5156956号に開示されている)、およびストレプトマイセスラベンデュラエ (*Streptomyces lavendulae*) (参照により本明細書に組み込まれている米国特許第5252469号に開示されている) およびストレプトマイセスラダカヌム (*Streptomyces ladakanum*) (本明細書に参照により組み込まれている特開2003/199569号) が挙げられる。以前の属ストレプトベルティシリウム (*Streptoverticillium*) のメンバーは、現在属ストレプトマイセス (*Streptomyces*) に含まれることを注意されたい (Kaempfer, J. Gen. Microbiol. 137, 1831 ~ 1892 頁 (1991 年))。他の有用な微生物トランスグルタミナーゼは、パチルスサブティリス (*Bacillus subtilis*) (参照により本明細書に組み込まれている米国特許第5731183号で開示) および様々なミコマイセタ (*Myxomycetes*) から単離されている。有用な微生物のトランスグルタミナーゼの他の例としては、国際公開第96/06931号 (例えばパチルスリディクス (*Bacillus lydicus*) 由来のトランスグルタミナーゼ) および国際公開第96/22366号に開示されているものがあり、いずれも参照により本明細書に組み込まれている。有用な非微生物トランスグルタミナーゼとしては、モルモット肝臓トランスグルタミナーゼ、ならびに (本明細書に参照により組み込まれている欧州特許第0555649号に開示されている) カレイ (*Pagrus major*) および (参照により本明細書に組み込まれている米国特許第5736356号に開示されている) 日本産真ガキ (*Crassostrea gigas*) などの様々な海洋源由来のトランスグルタミナーゼが挙げられる。

20

30

【0028】

本文脈では、「接近できない」という用語は、それに到達できないという意味で存在しないか、または事実上存在しないものを示すことが意図される。官能基にコンジュゲートすべきタンパク質中で接近できないことが示されている場合、前記官能基が、タンパク質中に存在しないか、または存在する場合、何らかの方法で反応への参加が妨げられていることを示すことが意図される。例証として、前記官能基は、反応への参加から保護されるようにタンパク質構造の深くに埋められている場合がある。反応条件に応じて官能基に接近できるかどうか認識される。例えば、変性剤の存在下でまたは高温で、タンパク質をアンフォールドして、他の方法では接近できない官能基を露出できることが想定できる。「接近できない」は、「関心のある特定の反応のために選択された反応条件で接近できない」ことを意味することが理解されよう。

40

【0029】

「アルカン」または「アルキル」という用語は、飽和、直鎖、分岐および/または環状の炭化水素を示すことが意図される。別の炭素原子数が指定されていない限り、該用語は、1~30個 (両端を含む)、例えば、1~20個 (両端を含む)、例えば、1~10個 (両端を含む)、例えば、1~5個 (両端を含む) の炭素原子を有する炭化水素を示すことが意図される。アルキルおよびアルキレンという用語は各々対応するラジカルおよびビラジカルを指す。

50

【0030】

「 $C_1 \sim 6$ アルキル」という用語は、1および6を含む1～6個の炭素原子を有する直鎖または分岐の飽和炭化水素を指す。このような基の例としては、それだけに限らないがメチル、2-プロピル、1-ブチル、2-ブチル、2-メチル-2-プロピル、2-メチル-1-ブチルおよびn-ヘキシルが挙げられる。

【0031】

「 $C_3 \sim 10$ シクロアルキル」という用語は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニルおよびシクロデカニルを通常指す。

【0032】

「アルケン」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含む、直鎖、分岐および/または環状の炭化水素を示すことが意図される。別の炭素原子数が指定されていない限り、該用語は、2～30個(両端を含む)、例えば、2～20個(両端を含む)、例えば、2～10個(両端を含む)、例えば、2～5個(両端を含む)の炭素原子を有する炭化水素を示すことが意図される。アルケニルおよびアルケニレンという用語は、各々対応するラジカルおよびビラジカルを指す。

10

【0033】

「アルキン」という用語は、少なくとも1つの炭素-炭素三重結合を含む、直鎖、分岐および/または環状の炭化水素を示すことが意図され、1つまたは複数の炭素-炭素二重結合を場合により含むことができる。別の炭素原子数が指定されていない限り、該用語は、2～30個(両端を含む)、例えば、2～20個(両端を含む)、例えば、2～10個(両端を含む)、例えば、2～5個(両端を含む)の炭素原子を有する炭化水素を示すことが意図される。アルキニルおよびアルキニレンという用語は、各々対応するラジカルおよびビラジカルを指す。

20

【0034】

「単素環式芳香族化合物」という用語は、芳香族炭化水素、例えば、ベンゼンおよびナフタレンを示すことが意図される。

【0035】

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

30

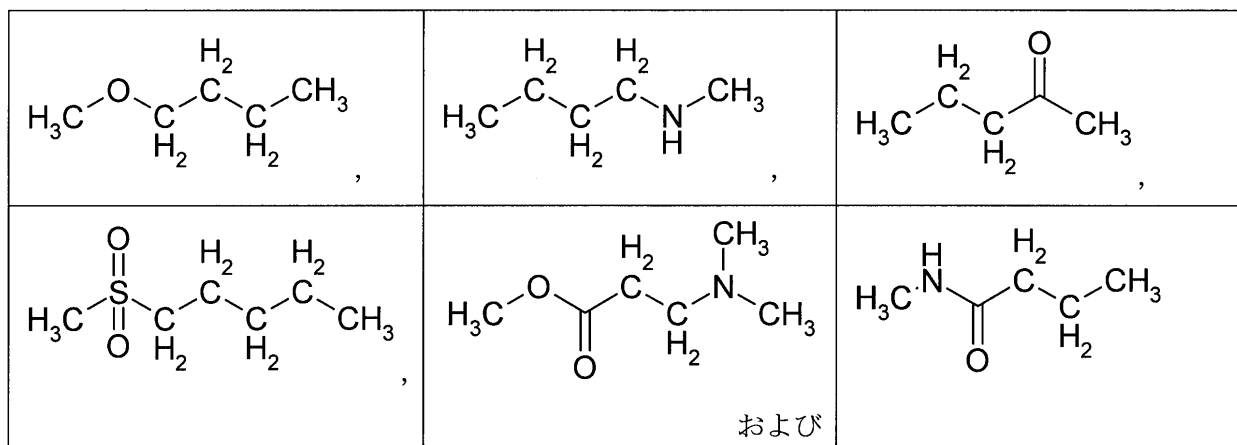
【0036】

「ヘテロアルカン」、「ヘテロアルケン」および「ヘテロアルキン」という用語は、1個または複数のヘテロ原子またはヘテロ基が、前記部分の構造に挿入されている、上記のアルカン、アルケンおよびアルキンを示すことが意図される。ヘテロ基およびヘテロ原子の例としては、-O-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-C(O)-、-C(S)-および-N(R*)-(式中、R*は、水素または $C_1 \sim C_6$ アルキルを示す)が挙げられる。ヘテロアルカンの例としては、

40

【0037】

【化 2】



10

【0038】

が挙げられる。

【0039】

「ラジカル」または「ビラジカル」という用語は、各々1つまたは2つの水素原子が除去された化合物を示すことが意図される。具体的に示されている場合、ラジカルは、より大きい原子群、例えば、ヒドロキシルを化合物からホルマール除去することにより形成される部分も示すことができる。

20

【0040】

「ハロゲン」という用語は、周期律表第7族の構成要素、例えば、F、Cl、BrおよびIを示すことが意図される。

【0041】

本文脈では、「アリアル」という用語は、環の少なくとも1つが芳香族である、炭素環式芳香族環ラジカルまたは縮合芳香族環系ラジカルを示すことが意図される。通常のアリアル基としては、フェニル、ピフェニル、ナフチルなどが挙げられる。

【0042】

本明細書で使用する場合、「ヘテロアリアル」または「ヘタリール」という用語は、単独でまたは組み合わせて、例えば、5~7員の原子を有する芳香族環ラジカル、例えば、7~18員の原子を有する縮合芳香族環系ラジカルであって、少なくとも1つの環は芳香族であり、窒素、酸素または硫黄のヘテロ原子から選択される環原子として1個または複数のヘテロ原子を含有し、N-オキシド、ならびに硫黄モノオキシドおよび硫黄ジオキシドが、許容されるヘテロ芳香族置換基である芳香族環ラジカルを指す。例としては、フラニル、チエニル、チオフェニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、イソチアゾリル、ピリジニル、ピリダジニル、ピラジニル、ピリミジニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェニル、インドリルおよびインダゾリルなどが挙げられる。

30

40

【0043】

名詞としての「コンジュゲート」という用語は、変性タンパク質、すなわち前記タンパク質の特性を変更するためにそこに結合した部分を有するタンパク質を示すことが意図される。動詞としての該用語は、前記タンパク質の特性を変更するためにタンパク質にある部分を結合させるプロセスを示すことが意図される。

【0044】

本明細書で使用する場合、「プロドラッグ」という用語は、生加水分解性アミドおよび生加水分解性エステルを示し、a)このようなプロドラッグの生加水分解性官能基が、本発明による化合物に包含される化合物、およびb)所与の官能基において生物学的に酸化されるか、または還元され、本発明による薬物物質を生成することができる化合物も包含する

50

。これらの官能基の例としては、1,4-ジヒドロピリジン、N-アルキルカルボニル-1,4-ジヒドロピリジン、1,4-シクロヘキサジエン、tert-ブチルなどが挙げられる。

【0045】

本明細書で使用する場合、「生加水分解性エステル」という用語は、a)親物質の生物学的活性を妨害しないが、該物質に、例えば、作用持続、作用開始などインビボでの有利な特性を与えるか、またはb)生物学的に不活性であるが、対象により生物学的に有効な成分にインビボで容易に変換される、(本発明による化合物の場合)薬物物質のエステルである。利点は、例えば、溶解性の増加、または生加水分解性エステルが、腸から経口吸収され、血漿中で本発明による化合物に変換されることである。これらの多くの例は、当技術分野で知られており、例証として、低級アルキルエステル(例えば、C₁~C₄)、低級アシルオキシアルキルエステル、低級アルコキシアシルオキシアルキルエステル、アルコキシアシルオキシエステル、アルキルアシルアミノアルキルエステルおよびコリンエステルが挙げられる。

10

【0046】

本明細書で使用する場合、「生加水分解性アミド」という用語は、a)親物質の生物学的活性を妨害しないが、該物質に、例えば、作用持続、作用開始などインビボでの有利な特性を与えるか、またはb)生物学的に不活性であるが、対象により生物学的に有効な成分にインビボで容易に変換される、(本発明による化合物の場合)薬物物質のアミドである。利点は、例えば、溶解性の増加、または生加水分解性アミドが、腸から経口吸収され、血漿中で本発明による化合物に変換されることである。これらの多くの例は、当技術分野で知られており、例証として、低級アルキルアミド、アミノ酸アミド、アルコキシアシルアミドおよびアルキルアミノアルキルカルボニルアミドが挙げられる。

20

【0047】

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

30

40

【0048】

本明細書で使用する化合物の「治療有効量」とは、所与の疾患およびその合併症の臨床症状を治癒するか、緩和するか、または部分的に抑えるのに十分な量を意味する。これを実現するのに適した量が、「治療有効量」と定義される。各目的のための有効量は、疾患または損傷の重症度、ならびに対象の体重および全体的状態に依存するであろう。適切な用量の決定は、値の行列を構成し、その行列の異なる点を試験することにより、常套的実験を用いて実現できることが理解されるであろう。これは、すべて訓練を受けた医師または獣医師の通常の技術範囲内である。

50

【0049】

本明細書で使用する場合、「治療」および「治療する」という用語は、状態、例えば、疾患または障害に対抗する目的のための患者の管理およびケアを意味する。該用語は、患者が患っている所与の状態の治療の完全なスペクトル、例えば、症状もしくは合併症を軽減するため、疾患、障害もしくは状態の進行を遅らせるため、症状および合併症を緩和するか、または軽減するため、および/または疾患、障害もしくは状態を治癒するか、もしくは排除するため、ならびに状態を予防するための活性化合物の投与を含むことが意図され、そこで予防は、疾患、状態または障害に対抗する目的のための患者の管理およびケアとして理解されるべきであり、症状または合併症の発症を予防するための活性化合物の投与を含む。治療されるべき患者は、哺乳動物、特にヒトであることが好ましいが、動物、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジおよびブタも含むことができる。

10

【発明を実施するための形態】

【0050】

そのもっとも広範な態様において、本発明は、親水性スパーサーを介してアルブミン結合残基に選択的に連結した成長ホルモン化合物(GH)を含む成長ホルモンコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物またはプロドラッグに関する。

【0051】

本発明の一実施形態では、親水性スパーサーは、 $m\text{LogP} < 0$ を有する。

【0052】

親水性スパーサーの溶解性は、そのログP値で示すことができる。分配係数としても知られるログPは、平衡状態で2つの非混和性溶媒の混合物の2相における化合物の濃度比の対数である。通常、溶媒の1つは水であり、二つ目は、オクタン-1-オール、クロロホルム、シクロヘキサンおよびプロピレングリコールジペラルゴネート(PGDP)から選択される。これらの異なる溶媒中で測定されたログP値は、主として水素結合作用により違いを示す。オクタノールは、水素結合を与え、受け入れることができるが、シクロヘキサンは不活性である。クロロホルムは、水素結合を与えることができるが、PGDPは、それらを受け入れることしかできない。

20

【0053】

本発明の別の実施形態において、親水性スパーサーは、オクタン-1-オール、クロロホルム、シクロヘキサンおよびプロピレングリコールジペラルゴネート(PGDP)のいずれかにおいて -0.5 以下のLogPを有する。

30

【0054】

さらなる実施形態において、親水性スパーサーは、オクタン-1-オール、クロロホルム、シクロヘキサンおよびプロピレングリコールジペラルゴネート(PGDP)のいずれかにおいて -1 以下のLogPを有する。

【0055】

あるいは、LogP値は、公開されたアルゴリズムを用いて、アルブミン結合剤部分または親水性スパーサー部分に対して $m\text{LogP}$ および/または $c\text{LogP}$ として計算することができる(J. Am. Chem. Soc.、86 (1964年)5175~5180頁「A New Substituent Constant, , Derived from Partition Coefficients」、C. A. Lipinskiら、Advanced Drug Delivery Reviews、23(1997年)3~25頁、「Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings」およびI. Moriguchi、S. Hirano、I. Nakagome、H. Hirano、Chem. and Pharm. Bull.、42(1994年)976~978頁「Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods」。本発明の一実施形態では親水性スパーサーは、 $c\text{LogP} < 0.5$ を有する。

40

【0056】

さらなる実施形態において、成長ホルモン化合物(GH)は、親水性スパーサーを介して1つのアルブミン結合残基に連結している。

【0057】

別の実施形態において、成長ホルモン化合物(GH)は、1つまたは2つの親水性スパーサー

50

を介して、2つのアルブミン結合残基に連結している。したがって、1つの例では、1つのアルブミン結合残基は、1つの親水性スペーサーを介して位置40でグルタミンに連結しており、他のアルブミン結合残基は、1つの親水性スペーサーを介して、位置141でグルタミンに連結しているか、または代わりに2つのアルブミン結合残基が、一つの親水性スペーサーを介して、位置40もしくは141またはN末端においてグルタミンに連結している。また他の実施形態において、成長ホルモン化合物(GH)は、一つまたは複数の親水性スペーサーを介して、3つのアルブミン結合残基に連結している。

【0058】

一実施形態において、親水性スペーサーは、少なくとも一つのOEGモチーフ、8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸の基、すなわち-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-を含む。さらなる特定された実施形態において、親水性スペーサーは、少なくとも2つのOEGモチーフを含む。このようなOEGモチーフの定位は、-C(O)-が成長ホルモン化合物に一番近接しているが、成長ホルモン化合物とアルブミン結合剤リンカーを結合せず、-NH-がアルブミン結合残基に最も近接しているような一実施形態である。2つのOEGモチーフを含むさらなる実施形態において、これら2つのモチーフは、同一の定位または異なる定位を有する。一実施形態において、2つのこのようなOEGモチーフは、互いに隣接して位置する一方、代替の実施形態において、このようなOEGモチーフは、共有結合により連結した1つまたは複数の原子により分離されている。

10

【0059】

一実施形態において、親水性スペーサーは、少なくとも一つのグルタミン酸残基を含む。アミノ酸グルタミン酸は、2つのカルボン酸基を含む。その -カルボキシ基を使用して、リジンの -アミノ基と共に、または存在する場合OEG分子のアミノ基と共に、または存在する場合別のGlu残基のアミノ基と共に、アミド結合を形成することができる。代わりに -カルボキシ基を使用して、リジンの -アミノ基と共に、または存在する場合OEG分子のアミノ基と共に、または存在する場合別のGlu残基のアミノ基と共に、同様のアミド結合を形成することもできる。Gluのアミノ基は次に、アルブミン結合残基のカルボキシ基と共に、または存在する場合OEGモチーフのカルボキシ基と共に、または存在する場合別のGluの -カルボキシ基またはカルボキシ基と共に、アミド結合を形成することもできる。一つのGluのアミノ基が、第2のGluのカルボキシ基に連結することを「-Glu」モチーフと呼ぶことができる。

20

30

【0060】

一実施形態において、親水性スペーサーは、少なくとも一つの組み合わせたOEG-Gluモチーフ(-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)NH-CH(C(O)OH)-(CH₂)₂-C(O)-)または少なくとも一つの組み合わせたGlu-OEGモチーフ(-NH-CH(C(O)OH)-(CH₂)₂-C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-)またはこれらの組合せを含み、このようなGlu-OEGおよびOEG-Gluモチーフは、一つもしくは複数の共有結合により連結した原子で分離されているか、またはGluが -Gluを形成するアミド結合で互いに直接結合していてもよい。

【0061】

成長ホルモンコンジュゲートのさらなる実施形態では、親水性スペーサーは、式 -X₁-X₂-X₃-X₄-

40

(式中、

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

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

X₃は、-[(CHR⁵)₁₅-W₆]_{m7}-であり、

X₄は、-F-D1-(CH₂)₁₆-D2-であり、

11、12、13、14、15および16は、独立に、0~16から選択され、

m1、m3、m4、m6およびm7は、独立に、0~10から選択され、

m2およびm5は、独立に、0~25から選択され、

n1、n2、n3およびn4は、独立に、0~16から選択され、

Fは、アリール、ヘタリール、ピロリジン-2,5-ジオンまたは原子価結合であり、アリール

50

基およびヘタリール基は、ハロゲン、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ または $\text{C}_1 \sim 6$ -アルキルで場合によって置換されており、

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

$\text{D}1$ 、 $\text{D}2$ 、 $\text{E}1$ および $\text{E}2$ は、独立に、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^6-$ 、 $-\text{N}(\text{COR}^7)-$ または原子価結合から選択され、 R^6 および R^7 は、独立に、水素または $\text{C}_1 \sim 6$ -アルキルを表し、

$\text{W}_1 \sim \text{W}_6$ は、独立に、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{s1}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、または原子価結合から選択され、 $s1$ は、0または1である)

10

を有する。

【0062】

一実施形態において、 $\text{D}1$ は、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^6-$ 、 $-\text{N}(\text{COR}^7)-$ または原子価結合から選択され、 $\text{D}2$ は、 $-\text{NR}^6-$ であり、 $\text{E}1$ および $\text{E}2$ は、独立に、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^6-$ 、 $-\text{N}(\text{COR}^7)-$ または原子価結合から選択され、 R^6 および R^7 は、独立に、水素または $\text{C}_1 \sim 6$ -アルキルを表す。

【0063】

さらなる態様において本発明は、式(1)の成長ホルモンコンジュゲート：

A-W-B-GH (1)

20

(式中、

GH は、成長ホルモン化合物を表し、

B は、親水性スペーサーを表し、

W は、 A と B とを連結する化学基であり、

A は、アルブミン結合残基を表す)、

ならびにその薬学的に許容される塩、溶媒和物およびプロドラッグに関する。

【0064】

上述のように、成長ホルモン化合物(GH)は、親水性スペーサーを介して2つのアルブミン結合残基に連結していてもよく、したがって、さらなる態様において、本発明は、式(1)の成長ホルモンコンジュゲート：

30

A-W-B-GH-B'-W'-A' (11)

(式中、

GH は、成長ホルモン化合物を表し、

W は、 A と B を連結する化学基を表し、

W' は、 A' と B' を連結する化学基を表し、

A および A' は、独立に、アルブミン結合残基を表し、

B および B' は、独立に、親水性スペーサーである)、

ならびにその薬学的に許容される塩、溶媒和物およびプロドラッグに関する。

【0065】

式(11)のコンジュゲートにおいて、 W' は、 W と同じ群から選択され、 A' は、 A と同じ群から選択され、 B' は、 B と同じ群から選択され、 W と W' 、 A と A' 、ならびに B と B' は、独立に、本明細書中のこれより以下で定義されたそれぞれの群の任意の一つから選択されることを理解されたい。したがって、本明細書中のこれより以下の W 、 A 、および B の任意の実施形態は、 W 、 A' 、および B' の実施形態でもある。さらに、本明細書中に記載されている実施形態の任意の一つは、独立に、式(1)および(11)のコンジュゲートの両方ならびに適切な場合にはその広範な態様および実施形態を指す。

40

【0066】

一実施形態が本発明のある種の態様または態様に関するということが特定されていない限り、上記実施形態ならびに本明細書中のこれより以下に記載される実施形態は、本明細書中に記載されている態様の任意の一つならびに本明細書中に記載されている実施形態の

50

任意の一つを指すとみなされるべきである。

【0067】

一実施形態において、GHは、hGHの変異体であり、変異体は、hGH配列の一つまたは複数のアミノ酸残基を、別の天然アミノ酸もしくは非天然アミノ酸で置換することによって、および/またはhGH配列へ一つもしくは複数の天然アミノ酸もしくは非天然アミノ酸を添加することによって、および/またはhGH配列から一つもしくは複数のアミノ酸残基を欠失することによって得られる化合物であると理解されるべきであり、これらのステップのいずれかの後には、一つまたは複数のアミノ酸残基のさらなる誘導体化が場合によって続いてもよい。特に、このような置換は、一つのアミノ酸残基が同じ基の別のアミノ酸残基、すなわち同様の特性を有する別のアミノ酸残基で置換されるという意味では保存性がある。アミノ酸は、これらの特性に基づき以下の群に都合よく分けることができる：塩基性アミノ酸（例えばアルギニン、リジン、ヒスチジンなど）、酸性アミノ酸（例えばグルタミン酸およびアスパラギン酸など）、極性アミノ酸（例えばグルタミン、システインおよびアスパラギンなど）、疎水性アミノ酸（例えばロイシン、イソロイシン、プロリン、メチオニンおよびバリンなど）、芳香族アミノ酸（例えばフェニルアラニン、トリプトファン、チロシンなど）および小アミノ酸（例えばグリシン、アラニン、セリンおよびトレオニンなど）。

10

【0068】

さらなる実施形態において、GHは、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す。さらなる実施形態において、GHは、hGHと少なくとも80%、例えば少なくとも85%、例えば少なくとも95%の同一性を有する。さらなる実施形態では、hGHとの前記同一性を、本発明のアッセイで測定した場合の、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも20%、例えば少なくとも40%、例えば少なくとも60%、例えば少なくとも80%と合わせる。配列同一性の実施形態の任意の一つは、活性実施形態の任意の一つと組み合わせてもよく、例えばhGHと少なくとも80%の同一性を有するGHを、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも60%と合わせてもよいし、hGHと少なくとも90%の同一性を有するGHを、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも40%と合わせてもよいし、hGHと少なくとも95%の同一性を有するGHを、hGHの成長ホルモン活性の少なくとも80%と合わせてもよい。

20

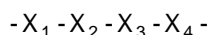
【0069】

またさらなる実施形態において、GHはhGHである(配列番号1)。

30

【0070】

式(I)または(II)のコンジュゲートのさらなる実施形態において、親水性スパーサーBは、次式



[式中、

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

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

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

X_4 は $F-D1-(CH_2)_{16}-D2$ -であり、

11、12、13、14、15および16は独立に0~16から選択され、

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

$m2$ および $m5$ は独立に0~25から選択され、

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

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

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

40

50

D1、D2、E1およびE2は独立に-O-、-NR⁶-、-N(COR⁷)-または原子価結合から選択され、R⁶およびR⁷は独立に水素またはC₁ - ₆アルキルを表し、

W₁ ~ W₆は独立に-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-または原子価結合から選択され、s2は0または1である]

を有する。

【 0 0 7 1 】

さらなる実施形態において、W₁は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合から選択される。通常、W₁は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-から選択される。

10

【 0 0 7 2 】

さらなる実施形態において、W₂は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合から選択される。通常、W₂は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-から選択される。

【 0 0 7 3 】

さらなる実施形態において、W₃は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合から選択される。通常、W₃は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-から選択される。

【 0 0 7 4 】

さらなる実施形態において、W₄は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合から選択される。通常、W₄は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-から選択される。

20

【 0 0 7 5 】

さらなる実施形態において、W₅は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合から選択される。通常、W₅は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-から選択される。

【 0 0 7 6 】

さらなる実施形態において、W₆は-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合から選択される。通常、W₆は、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-から選択される。

30

【 0 0 7 7 】

さらなる実施形態において、R¹は水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁ - ₆アルキルから選択され、そこでアルキル基は、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHで場合により置換されている。通常、R¹は-C(O)OH、-C(O)NH₂またはC₁ - ₆アルキルから選択され、アルキル基は、-C(O)OH、-C(O)NH₂または-S(O)₂OHで場合により置換されている。

【 0 0 7 8 】

さらなる実施形態において、R²は水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁ - ₆アルキルから選択され、アルキル基は、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHで場合により置換されている。通常、R²は-C(O)OH、-C(O)NH₂またはC₁ - ₆アルキルから選択され、アルキル基は、-C(O)OH、-C(O)NH₂または-S(O)₂OHで場合により置換されている。

40

【 0 0 7 9 】

さらなる実施形態において、R³は水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁ - ₆アルキルから選択され、アルキル基は、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHで場合により置換されている。通常、R³は-C(O)OH、-C(O)NH₂またはC₁ - ₆アルキルから選択され、アルキル基は、-C(O)OH、-C(O)NH₂または-S(O)₂OHで場合により置換されている。

【 0 0 8 0 】

さらなる実施形態において、R⁴は水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁ - ₆アルキルから選択され、アルキル基は、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHで場合により置換されている。通常、R⁴は-C(O)OH、-C(O)NH₂またはC₁ - ₆アルキルから選択され、アルキル基は

50

、-C(O)OH、-C(O)NH₂または-S(O)₂OHで場合により置換されている。

【0081】

さらなる実施形態において、R⁵は水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHまたはC₁~₆アルキルから選択され、アルキル基は、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OHで場合により置換されている。通常、R⁵は-C(O)OH、-C(O)NH₂またはC₁~₆アルキルから選択され、アルキル基は、-C(O)OH、-C(O)NH₂または-S(O)₂OHで場合により置換されている。

【0082】

さらなる実施形態において、E1およびE2は、独立に、-O-、-NR⁶-、-N-(COR⁷)-または原子価結合から選択される。R⁶およびR⁷は、独立に、水素またはC₁~₆-アルキルを表す。

【0083】

さらなる実施形態において、E1は-O-もしくは-NR⁶-または原子価結合から選択される。通常、E1は-O-から選択される。

【0084】

さらなる実施形態において、E2は-O-もしくは-NR⁶-または原子価結合から選択される。通常、E2は-O-から選択される。

【0085】

さらなる実施形態において、E1およびE2はいずれも-O-である。

【0086】

さらなる実施形態において、E1およびE2はいずれも-NR⁶-である。

【0087】

さらなる実施形態において、Fはフェニル、ピロリジン-2,5-ジオンまたは原子価結合である。

【0088】

さらなる実施形態において、D1は-O-、-NR⁶-、-N(COR⁷)-または原子価結合から選択される。

【0089】

さらなる実施形態において、D1は-O-もしくは-NR⁶-または原子価結合から選択される。通常、D1は-NR⁶-から選択される。

【0090】

さらなる実施形態において、D2は-O-、-NR⁶-、-N(COR⁷)-または原子価結合から選択される。

【0091】

さらなる実施形態において、D2は-O-もしくは-NR⁶-または原子価結合から選択される。通常、D2は-NR⁶-から選択される。

【0092】

R⁶およびR⁷は独立に水素またはC₁~₆アルキルを表す。

【0093】

さらなる実施形態において、I1は0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【0094】

さらなる実施形態において、I2は0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【0095】

さらなる実施形態において、I3は0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【0096】

さらなる実施形態において、I4は0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【0097】

さらなる実施形態において、I5は0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【0098】

さらなる実施形態において、I6は0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【0099】

さらなる実施形態において、m1は0~6、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 0 】

さらなる実施形態において、m2は0～10、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である。

【 0 1 0 1 】

さらなる実施形態において、m3は0～5、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【 0 1 0 2 】

さらなる実施形態において、m4は0～5、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【 0 1 0 3 】

さらなる実施形態において、m5は0～10、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である。

10

【 0 1 0 4 】

さらなる実施形態において、m6は0～5、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【 0 1 0 5 】

さらなる実施形態において、m7は0～5、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【 0 1 0 6 】

さらなる実施形態において、n1は0～10、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【 0 1 0 7 】

さらなる実施形態において、n2は0～10、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【 0 1 0 8 】

さらなる実施形態において、n3は0～10、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

20

【 0 1 0 9 】

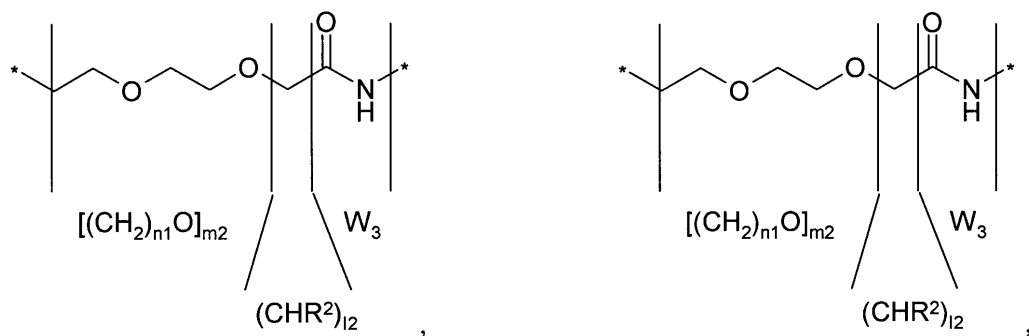
さらなる実施形態において、n4は0～10、例えば、0、1、2、3、4、5または6である。

【 0 1 1 0 】

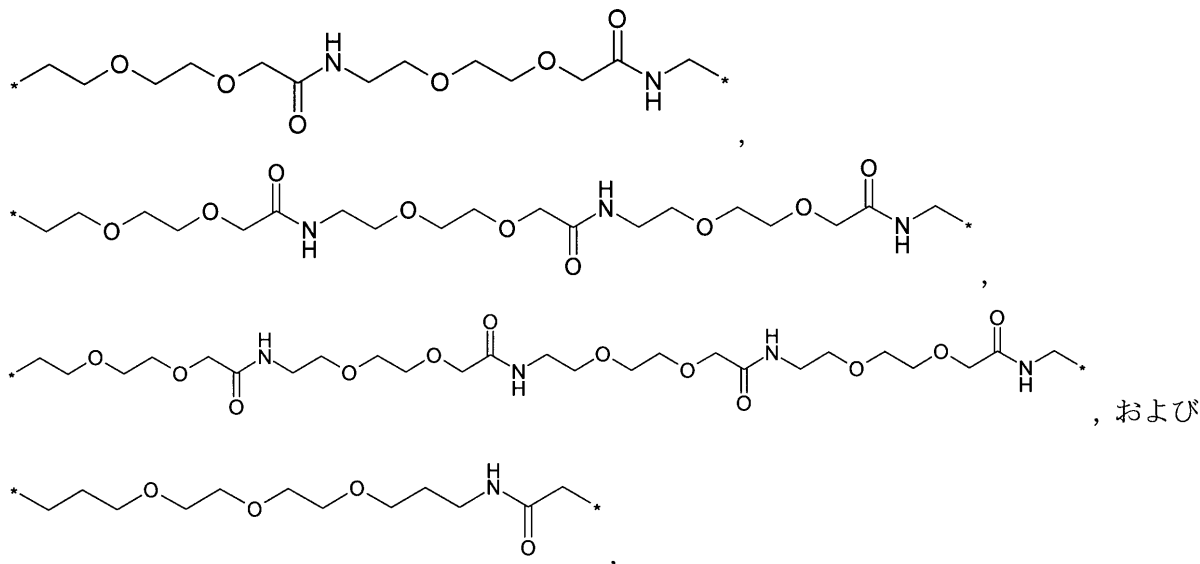
さらなる実施形態において、 X_1 は $-W_1 - [(CHR^1)_{11} - W_2]_{m1} - \{[(CH_2)_{n1}O]_{m2} - [(CHR^2)_{12} - W_3]_{m3}\}_{n2}$ -および X_2 は $-[(CHR^3)_{13} - W_4]_{m4} - \{[(CH_2)_{n3}O]_{m5} - [(CHR^4)_{14} - W_5]_{m6}\}_{n4}$ -であり、 $- \{[(CH_2)_{n1}O]_{m2} - [(CHR^2)_{12} - W_3]_{m3}\}_{n2}$ -および $- \{[(CH_2)_{n3}O]_{m5} - [(CHR^4)_{14} - W_5]_{m6}\}_{n4}$ -は、

【 0 1 1 1 】

【化 3】



10



20

【 0 1 1 2 】

(式中、*は、結合点、すなわち空いている結合を意味することを意図する)から選択される。

30

【 0 1 1 3 】

さらなる実施形態において、前記親水性スペーサーの分子量は、80ダルトン(D)~1500Dの範囲または500D~1100Dの範囲である。

【 0 1 1 4 】

さらにさらなる実施形態において、Wは、次式
-W₇-Y-

【式中、

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

17は0~6であり、

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

40

【 0 1 1 5 】

Wの実施形態において、Yは、-(CH₂)₁₇-シクロヘキシル-W₈-である。

【 0 1 1 6 】

さらなる実施形態において、Yは原子価結合である。

50

【 0 1 1 7 】

－実施形態において、 W_7 は、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ または原子価結合から選択される。通常、 W_7 は、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2$ から選択される。

【 0 1 1 8 】

さらなる実施形態において、 W_8 は、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ または原子価結合から選択される。通常、 W_8 は、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2$ から選択される。

【 0 1 1 9 】

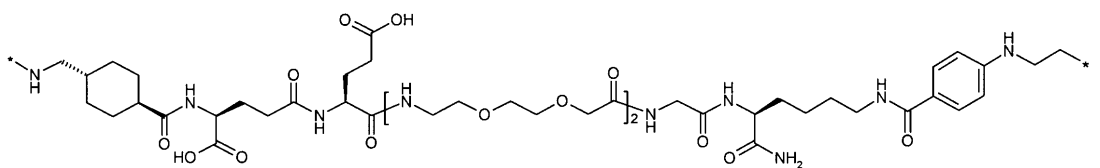
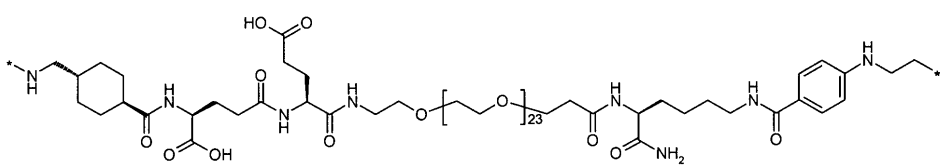
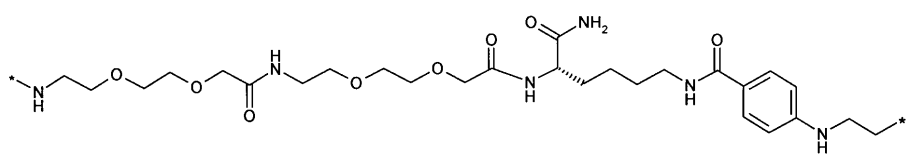
さらなる実施形態において、 I_7 は0または1である。

10

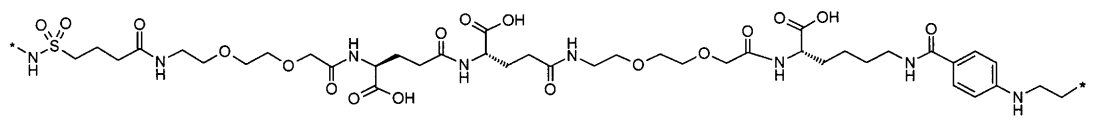
【 0 1 2 0 】

さらなる実施形態において、本発明の親水性スペーサーBは、

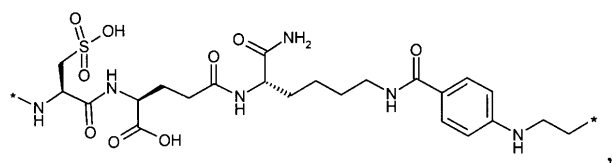
【 0 1 2 1 】

N[C@H]1CCCC[C@@H]1C(=O)NC(C(=O)O)CC(=O)NC(C(=O)O)CC(=O)NCCOCCOCC(=O)NCC(=O)NCC*NS(=O)(=O)CCCC(=O)NCC([CH2]9)CC(=O)NC(=O)[C@H](O)CC(=O)N[C@@H](O)CC(=O)NCCOCCOCC(=O)N[C@H](O)CCCCNC(=O)c1ccc(NCC)cc1*[illegible]*NC(=O)[C@H](O)CC(=O)NCCOCCOC(=O)C1NCC[C@H](C1)CCNC(=O)c2ccc(NCC)cc2*S(=O)(=O)CCCC(=O)NCCOCCOCC(=O)NC(=O)C(O)CC(=O)N[C@@H](C(=O)O)CC(=O)NCCOCCOCC(=O)NC(=O)C(N)C[C@H](CCCCNC(=O)c1ccc(NCC)cc1)C(=O)NCC*

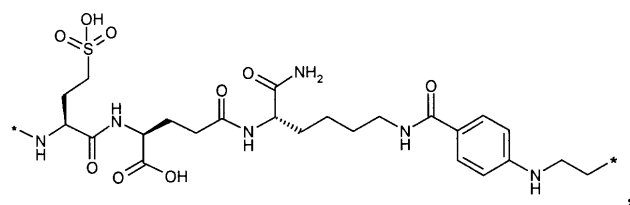
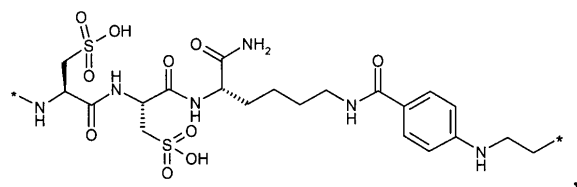
【化 4 - 2】



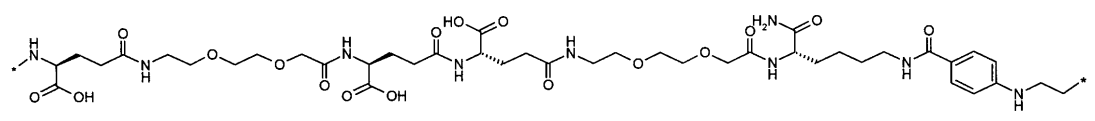
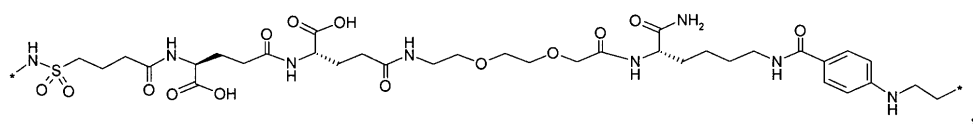
10



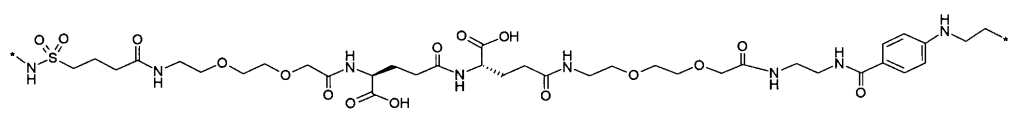
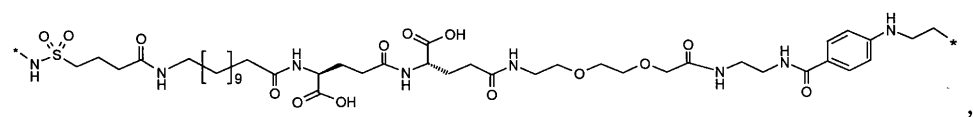
20



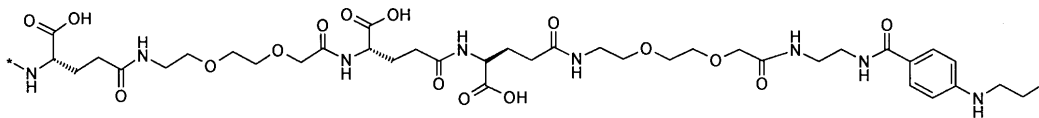
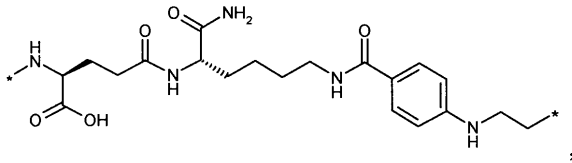
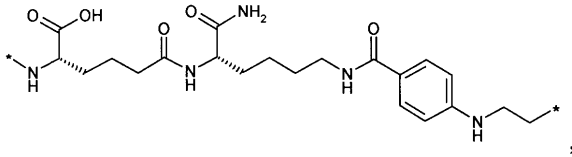
30



40



【化 4 - 3】



10

【 0 1 2 2】

(式中、*は、結合点、すなわち空いている結合を意味することを意図する)から選択される。

【 0 1 2 3】

20

本発明の成長ホルモン化合物に結合したアルブミン結合残基(上記式(I)または(II)の置換基A)は、アルブミンに非共有結合する親油性残基である。通常、アルブミン結合残基は、生理的pHで負に帯電し、約10 μ M未満またはさらに約1 μ M未満であるヒト血清アルブミンに対して結合親和性を有する。

【 0 1 2 4】

本発明の成長ホルモン化合物のさらなる実施形態において、アルブミン結合残基は、直鎖アルキル基、分岐アルキル基、カルボン酸基またはカルボン酸イソスターを有する基から選択される。通常、アルブミン結合残基は、6~40個の炭素原子を有する。さらなる実施形態において、アルブミン結合残基は、8~26個の炭素原子を有する。さらなる実施形態において、アルブミン結合残基は、8~20個の炭素原子を有する。

30

【 0 1 2 5】

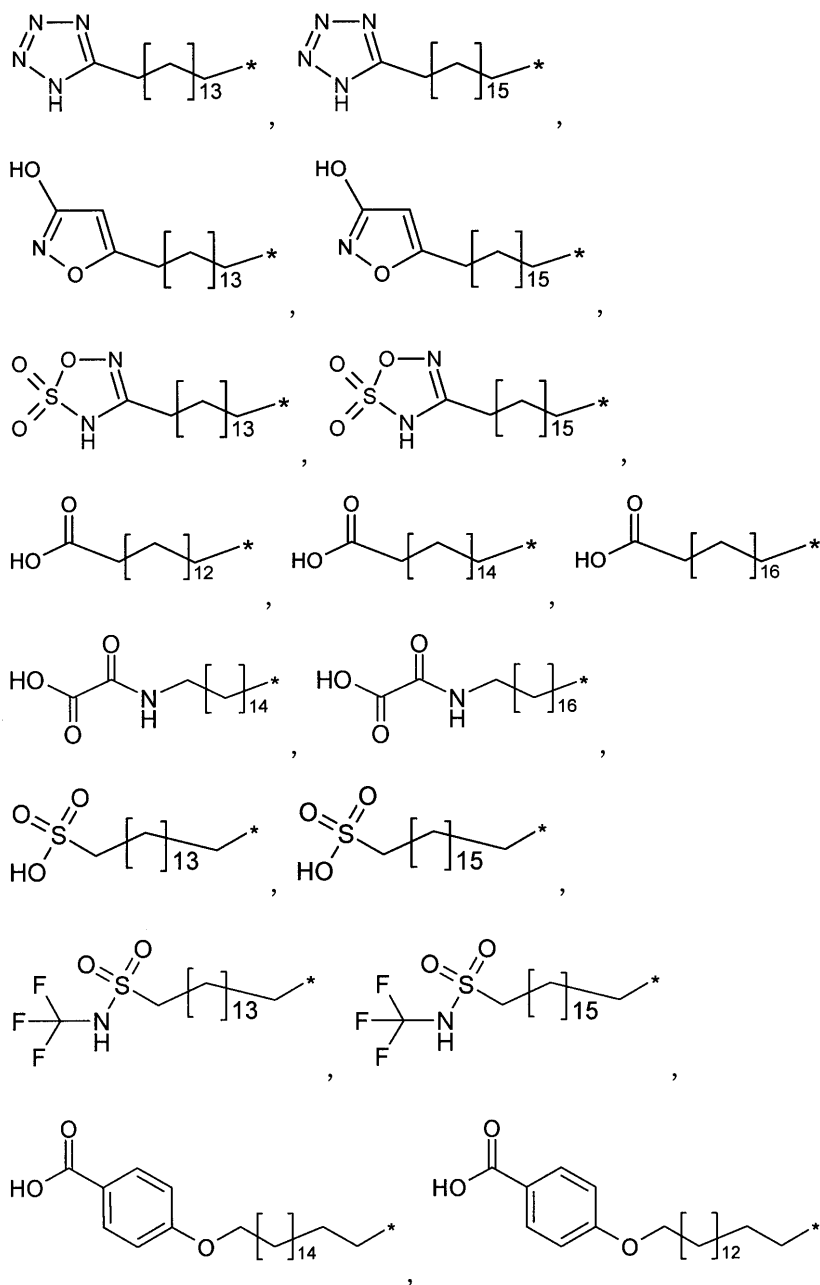
さらなる実施形態において、Aは14~26個の炭素原子を有し、カルボン酸基を含む。さらなる実施形態において、Aは14~26個の炭素原子を有し、カルボン酸イソスター、例えば、テトラゾールを含む。

【 0 1 2 6】

さらなる実施形態において、Aは、以下のもの

【 0 1 2 7】

【化5】



10

20

30

【0128】

(式中、*はWからBへの結合を示す)
から選択される。

【0129】

親水性スパーサー(B)は、1つ、2つ、または3つのアルブミン結合残基(A)が、成長ホルモン化合物に組み込まれるべきか制御できるように、選択的な方式により成長ホルモン化合物(GH)の位置へ導入するのが好ましい。親水性スパーサー(B)は、GH化合物のアミノ酸側鎖に結合してもよい。このようなアミノ酸側鎖は、GH化合物の化学的に修飾されたアミノ酸側鎖であってよい。別のこのようなアミノ酸側鎖は、GH化合物の酵素により修飾されたアミノ酸側鎖であってよい。トランスグルタミナーゼを使用して、配列番号1の位置40または141に対応する位置のグルタミン残基に親水性スパーサーを導入するのが好ましい。親水性スパーサーを選択的に導入する別の手段は、成長ホルモン化合物、例えばhGH(配列番号1)などのN末端残基である。

【0130】

40

50

式(1)の成長ホルモンコンジュゲートにおいて、フラグメントA-W-Bは、直鎖または分枝であってよい。一実施形態においてA-W-Bは、直鎖ペプチドではない。

【0131】

さらなる実施形態において、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して、配列番号1の位置40に対応する位置でグルタミン残基に結合する。

【0132】

さらなる実施形態において、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して、配列番号1の位置141に対応する位置でグルタミン残基に結合する。

【0133】

さらなる実施形態において、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して、成長ホルモン化合物、例えばhGH(配列番号1)などのN末端残基に結合する。

10

【0134】

さらなる実施形態において、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して、配列番号1の位置40に対応する位置でグルタミン残基に、および位置141に対応する位置でグルタミン残基に結合する。

【0135】

さらなる実施形態において、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して、hGH(配列番号1)などの成長ホルモン化合物の位置40に対応する位置でグルタミン残基に結合し、N末端残基に結合する。

【0136】

20

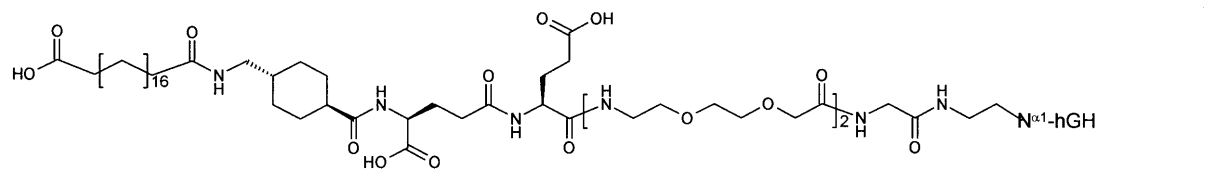
さらなる実施形態において、アルブミン結合残基は、親水性スペーサーを介して、hGH(配列番号1)などの成長ホルモン化合物の位置141に対応する位置でグルタミン残基に結合し、N末端残基に結合する。

【0137】

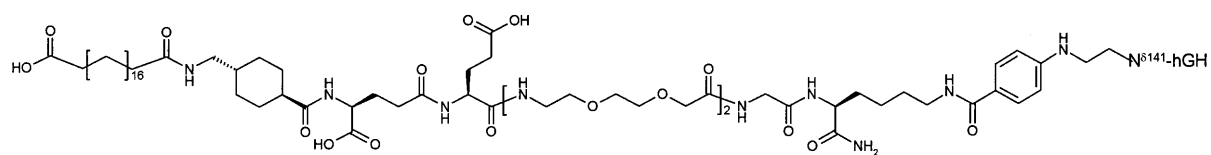
本発明の成長ホルモンコンジュゲートは、

【0138】

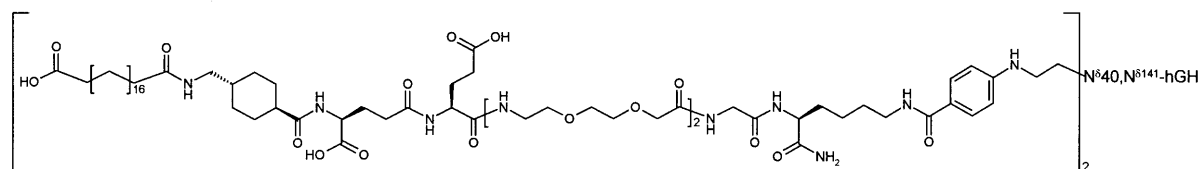
【化 6 - 1】



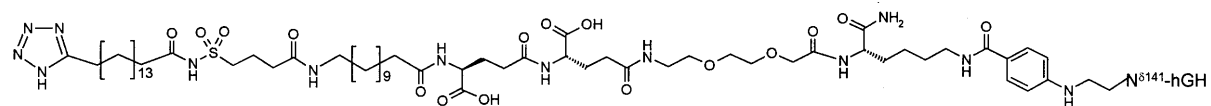
10



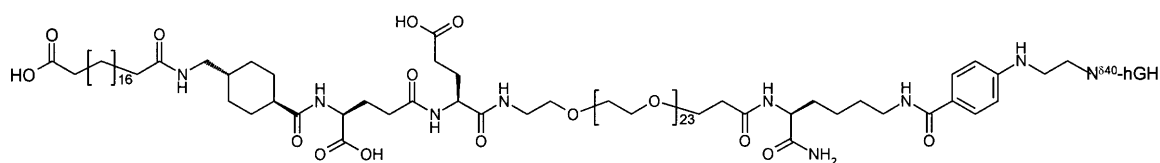
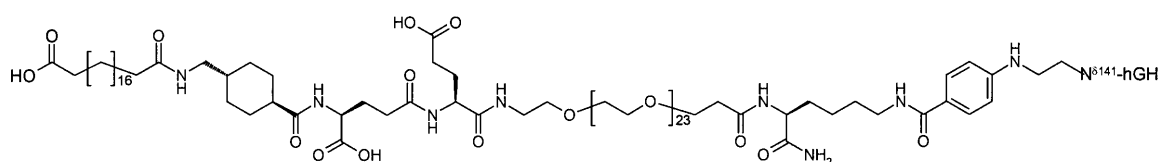
20



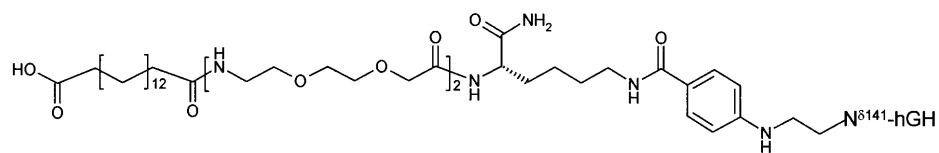
30



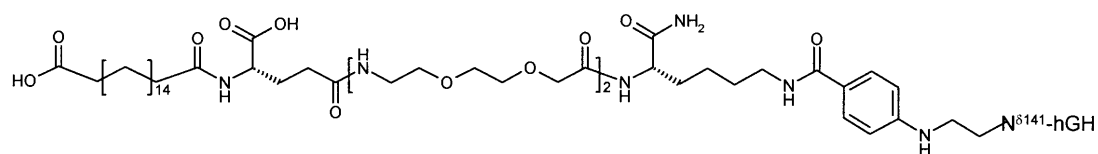
40



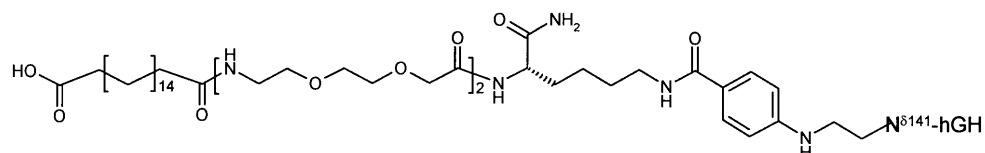
【化 6 - 2】



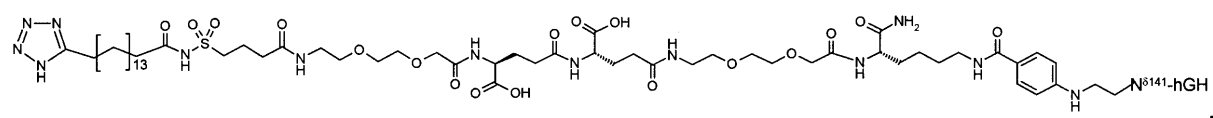
10



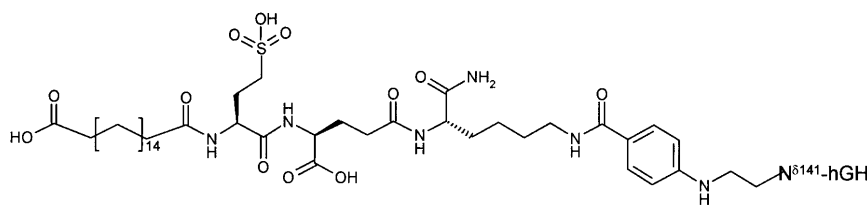
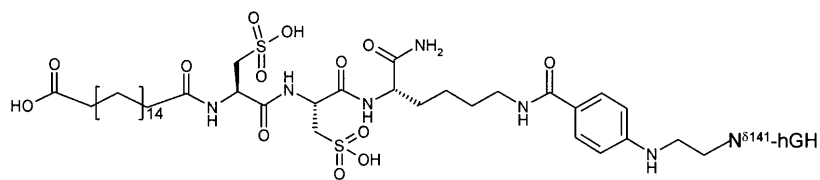
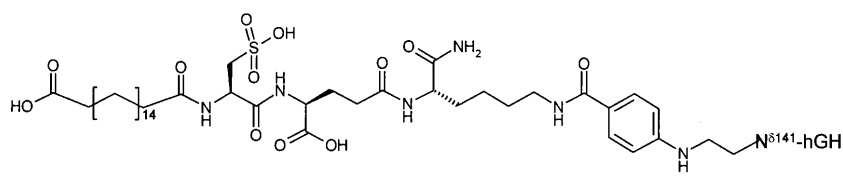
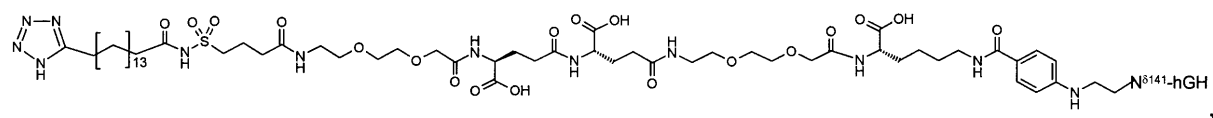
20



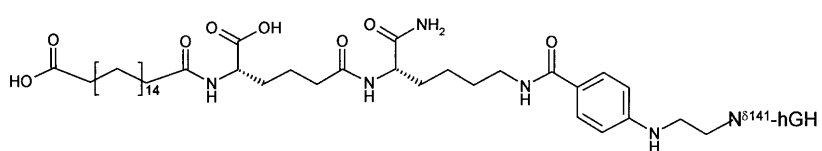
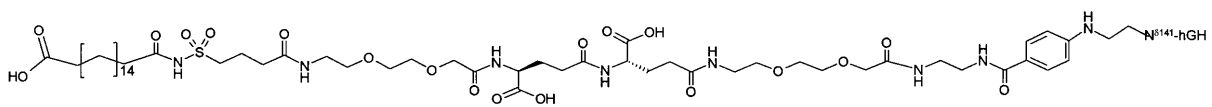
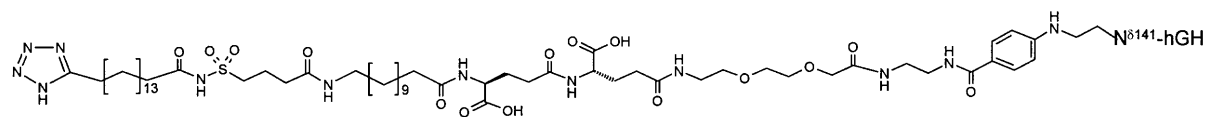
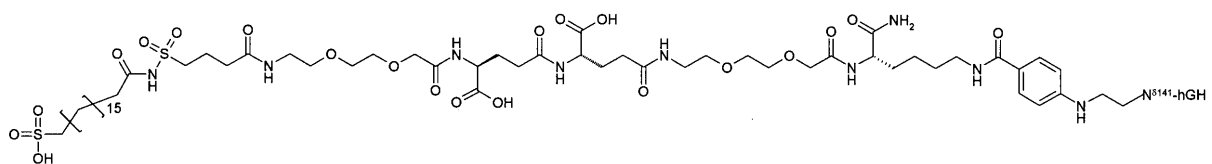
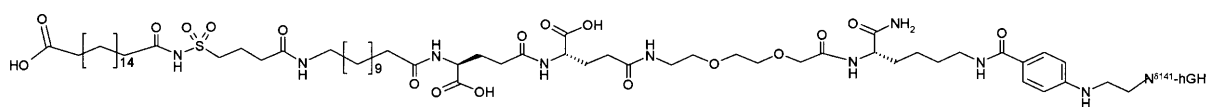
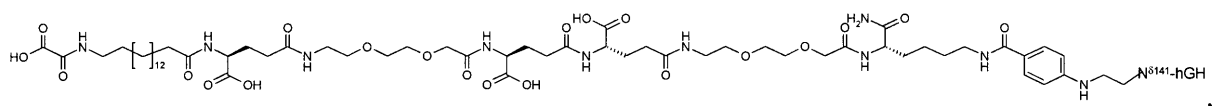
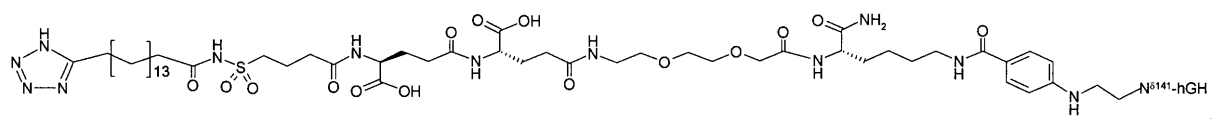
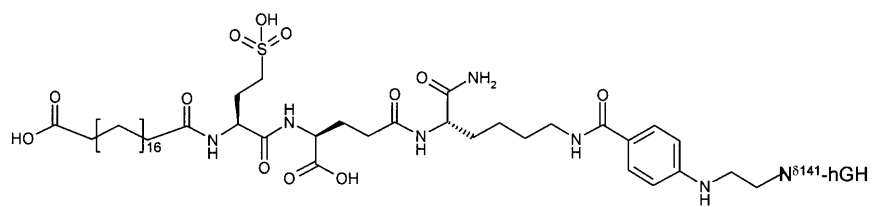
30



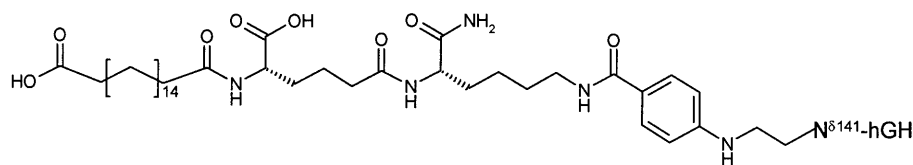
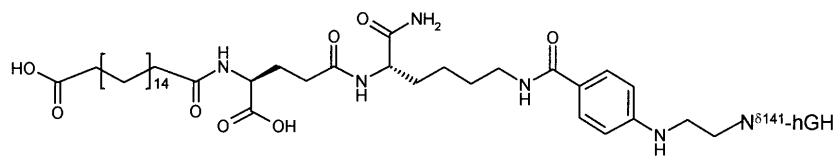
40



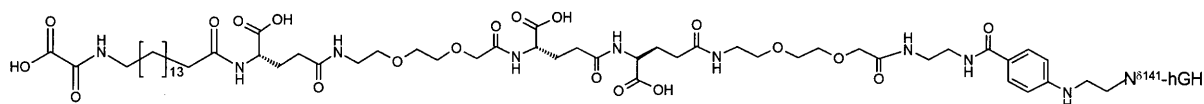
【化 6 - 3】



【化 6 - 4】



10



【 0 1 3 9】

から選択される。

【 0 1 4 0】

20

さらなる態様において、本発明は、治療法において使用するための、親水性スパーサーを介してアルブミン結合残基に連結した成長ホルモン化合物(GH)を含む成長ホルモンコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物もしくはプロドラッグに関する。さらに、本発明の成長ホルモンコンジュゲートGHにおいて、アルブミン結合残基および親水性スパーサーは、上記実施形態の任意の一つから選択され、特に成長ホルモンコンジュゲートは、式(I)または(II)を有する。

【 0 1 4 1】

さらなる態様において、本発明は、親水性スパーサーを介してアルブミン結合残基に連結した成長ホルモン化合物(GH)を含む成長ホルモンコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物もしくはプロドラッグを、薬学的に許容可能な添加剤と場合によって組み合わせて含む医薬組成物に関する。

30

【 0 1 4 2】

当技術分野で公知の「同一性」という用語は、配列を比較することにより決定される2つ以上のタンパク質の配列間での関係を指す。当技術分野において、「同一性」とは、2つ以上のアミノ酸残基のストリング間の適合数により決定される、タンパク質間の配列関連性の程度も意味する。「同一性」は、特定の数学的モデルまたはコンピュータプログラム(すなわち、「アルゴリズム」)によって対処されるギャップアラインメント(存在する場合)を用いて、2つ以上の配列のより小さな方の配列の同一適合性パーセントを測定する。関連タンパク質の同一性は、公知の方法で容易に算出できる。このような方法として、これらに限らないが、Computational Molecular Biology、Lesk、A. M.、ed.、Oxford University Press、New York、1988年；Biocomputing: Informatics and Genome Projects、Smith、D. W.、ed.、Academic Press、New York、1993年；Computer Analysis of Sequence Data、Part 1、Griffin、A. M.、and Griffin、H. G.、eds.、Humana Press、New Jersey、1994年；Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje、G.、Academic Press、1987年；Sequence Analysis Primer、Gribskov、M. and Devereux、J.、eds.、M. Stockton Press、New York、1991年；およびCarilloら、SIAM J. Applied Math.、48、1073頁、(1988年)に記載されているものなどが挙げられる。

40

【 0 1 4 3】

同一性を測定するための好ましい方法は、試験される配列間で最大の適合性を得るように設計される。同一性を決定する方法は、公的に入手可能なコンピュータプログラムに記

50

載されている。2つの配列間の同一性を決定する好ましいコンピュータプログラム方法として、GAP(Devereuxら、Nucl. Acid. Res.、12、387頁、(1984年);Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison、Wis.)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA(Altschulら、J. Mol. Biol.、215、403~410頁、(1990年))を含めたGCGプログラムパッケージが挙げられる。BLASTXプログラムは、全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI)および他の供給元(BLAST Manual、Altschulら、NCB/NLM/NIH Bethesda、Md. 20894;Altschulら、上記)から公的に入手可能である。周知のスミスウォーターマンアルゴリズムもまた、同一性を測定するために使用することができる。

【0144】

例えばコンピュータアルゴリズムギャップ(Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison、Wis.)を用いて、配列同一性パーセントの測定対象となる2つのタンパク質を、それぞれのアミノ酸が最適に適合するよう整列させる(アルゴリズムにより決定される「適合スパン」)。ギャップ開始ペナルティ(これは、平均対角の3倍として算出される。「平均対角」とは、使用する比較マトリックスの対角の平均であり、「対角」とは、特定の比較マトリックスによる、それぞれの完全なアミノ酸適合に割り当てられるスコアまたは数である)およびギャップ伸長ペナルティ(これは、通常ギャップ開始ペナルティの{分率(1/10)倍}である)、ならびに比較マトリックス、例えばPAM 250またはBLOSUM 62などがこのアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較マトリックス(PAM250比較マトリックスについては、Dayhoffら、Atlas of Protein Sequence and Structure、vol. 5、supp.3(1978年)を参照、BLOSUM62比較マトリックスについては、Henikoffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89、10915~10919頁(1992年)を参照)もまたアルゴリズムにより使用される。

【0145】

タンパク質配列の比較に好ましいパラメータとして、以下が挙げられる:アルゴリズム: Needlemanら、J. Mol. Biol.、48、443~453頁(1970年);比較マトリックス: BLOSUM 62、Henikoffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89、10915~10919頁(1992年)から;ギャップペナルティ:12、ギャップ長ペナルティ:4、類似性の閾値:0。

【0146】

GAPプログラムは、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、GAPアルゴリズムを用いたタンパク質比較(末端ギャップについてペナルティなし)についての初期設定パラメータである。

【0147】

本発明の化合物は、親化合物とも呼ばれる、対応する非コンジュゲート成長ホルモンと比較して、改善された薬理学的特性を有する。このような薬理学的特性の例として、機能的インビボ半減期、免疫原性、腎臓の濾過、プロテアーゼ保護およびアルブミン結合が挙げられる。

【0148】

「機能的インビボ半減期」という用語は、その通常の意味において使用される。すなわち、GHまたはGHコンジュゲートの生物活性の50%が、体内/標的器官内に依然として存在する時間、またはGHまたはGHコンジュゲートの活性が、その初期値の50%である時間である。機能的インビボ半減期を決定する代替法として、「インビボ血漿半減期」、すなわちGHまたはGHコンジュゲートの50%が、除去される前に血漿または血流中を循環する時間を測定してもよい。血漿半減期の測定は、機能的半減期を測定するよりもシンプルな場合が多く、血漿半減期の大きさは通常、機能的インビボ半減期の大きさの優れた指標である。血漿半減期の代替の用語として、血清半減期、循環半減期、循環性半減期、血清クリアランス、血漿クリアランス、およびクリアランス半減期が挙げられる。

【0149】

機能的インビボ半減期または血漿半減期に関連して使用される「増加した」という用語は、GHコンジュゲートの関連する半減期は、同等の条件下で測定した親GHの半減期と比較して統計的に有意に増加していることを示すために使用される。例えば関連する半

減期は、少なくとも約25%、例えば少なくとも約50%、例えば少なくとも約100%、150%、200%、250%、または500%だけ増加しうる。一実施形態において、本発明の化合物は、親GHの半減期と比較して、少なくとも約5時間、好ましくは少なくとも約24時間、より好ましくは少なくとも約72時間、および最も好ましくは少なくとも約7日の半減期の増加を示す。

【0150】

インビボ血漿半減期の測定は、文献に記載された、いくつかの方式で行うことができる。インビボ血漿半減期の増加は、クリアランス(CL)の低下としてまたは平均滞留時間(MRT)の増加として定量化することができる。適切なアッセイで測定した、親GHのCLの70%未満、例えば50%未満、例えば20%未満、例えば10%未満にCLが低下している本発明のコンジュゲートGHは、増加したインビボ血漿半減期を有するといわれる。適切なアッセイにおいて、MRTが、親GHのMRTよりも130%超、例えば150%超、例えば200%超、例えば500%超まで増加している本発明のコンジュゲートGHは、増加したインビボ血漿半減期を有するといわれる。クリアランスおよび平均滞留時間は、適切な試験動物を用いた標準的な薬物動態学的研究において評価することができる。所与のタンパク質に対して適切な試験動物を選ぶことは当業者の能力の範囲内である。もちろん、ヒトの試験は、最終的な試験を意味する。適切な試験動物として、正常なSprague-Dawleyオスのラット、マウスおよびカニクイザルが挙げられる。通常マウスおよびラットには、単回の皮下ボーラス注射をする一方で、サルには、単回の皮下ボーラスまたは単回のiv用量を注射してもよい。注射する量は、試験動物に依存する。続いて、CLおよびMRTの評価にそれぞれ応じて1~5日の期間に渡り血液試料を採取する。血液試料は、ELISA技法で分析するのが便利である。

【0151】

化合物の「免疫原性」という用語は、ヒトに投与した場合、体液細胞、または両方において有害な免疫応答を誘発する化合物の能力を指す。任意のヒトの部分母集団において、特定の投与されたタンパク質に対して感受性を示す個人が存在しうる。免疫原性は、当技術分野で公知の従来の方法を用いて、敏感な個人において成長ホルモン抗体および/または成長ホルモン反応性T-細胞の存在を定量化することによって測定することができる。一実施形態において、本発明のコンジュゲートしたGHは、敏感な個人において、その個人の親GHに対する免疫原性に比べて、少なくとも約10%、好ましくは少なくとも約25%、より好ましくは少なくとも約40%および最も好ましくは少なくとも約50%の免疫原性の低下を示す。

【0152】

「プロテアーゼ保護」または「プロテアーゼ保護された」という用語は、本明細書で使用する場合、本発明のコンジュゲートGHは、親GHよりも血漿ペプチダーゼまたはプロテアーゼに対して耐性があることを示すことを意図する。血漿中に存在するプロテアーゼおよびペプチダーゼ酵素は、循環タンパク質、例えば循環ペプチドホルモン、例えば成長ホルモンなどの分解に関与していることが知られている。

【0153】

成長ホルモンは、例えばトロンピン、プラスミン、スプチリシン、およびキモトリプシン様セリンプロテアーゼなどにより分解されやすいことがある。これらプロテアーゼの分解を測定するためのアッセイは、J. Biotech., 65, 183頁(1998年)に記載されている。一実施形態において、GHコンジュゲートの加水分解の速度は、親GHの速度の70%未満、例えば40%未満、例えば10%未満などである。

【0154】

哺乳動物種属の循環する血液にもっとも豊富に存在するタンパク質成分は、血清アルブミンであり、この血清アルブミンは、普通全血100ミリリットル当たり約3~4.5グラムの濃度で存在する。血清アルブミンは、約70000ダルトンの血液タンパク質であり、循環系の中でいくつかの重要な機能を有する。血清アルブミンは、血液に含まれる様々な有機分子のトランスポーターとして、血液の中の様々な代謝物、例えば脂肪酸およびビリルビンなどの主なトランスポーターとして、さらにその豊富さから、循環している血液の浸透圧レギュレーターとして機能する。血清アルブミンは、1週間を超える半減期を有する

ので、タンパク質の血漿半減期を増加させる一つの手法は、血清アルブミンに結合するタンパク質の群にコンジュゲートすることである。アルブミン結合特性は、本明細書に参照により組み込まれている、J. Med. Chem.、43、1986頁(2000年)に記載されているように決定することができる。

【0155】

式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートは、成長ホルモン活性を発揮し、よって、循環する成長ホルモンの量の増加によって恩恵を受けることとなる疾患または状態の治療に使用することができる。特に、本発明は、それを必要とする患者に、式(I)または(II)による成長ホルモンコンジュゲートの治療有効量を投与するステップを含む、成長ホルモン欠損症(GHD);ターナー症候群;プラダーウィリ症候群(PWS);ヌーナン症候群;ダウン症候群;慢性腎疾患、若年性関節リウマチ;嚢胞性線維症、HAART治療を受けている小児のHIV-感染(HIV/HALS小児);短い在胎齢で産まれた背が低い小児(SGA);SGA以外で、非常に少ない出生時体重で産まれた小児の低身長(VLBW);骨格形成異常;低軟骨形成症;軟骨形成不全症;特発性低身長(ISS);成人のGHD;長骨、例えば脛骨、腓骨、大腿骨、上腕骨、橈骨、尺骨、鎖骨、中手(metacarpus)、中足(matatarsus)および指などの骨折;スポンジ状骨、例えばスカル(skull)、手の底部、および足の底部などの骨折;例えば手、膝、もしくは肩の腱または靭帯の手術後の患者;伸延骨形成を完了したかまたは行っている患者;股関節部もしくは円板の交換、半月板の修復、脊椎固定または例えば膝、股関節部、肩、肘、手根もしくは顎などのプロテーゼ固定後の患者;骨接合材料、例えば釘、ネジおよびプレートなどを固定された患者;骨折の癒合不能または変形癒合の患者;例えば脛骨または母趾からの骨解剖(osteotomy)後の患者;移植片移植後の患者;外傷または関節炎に起因する膝の関節軟骨の変性;ターナー症候群の患者の骨粗鬆症;男性の骨粗鬆症;慢性透析の成人患者(APCD);APCDの栄養失調関連の循環器疾患;APCDのカヘキシーの逆転;APCDの癌;APCDの慢性抽象的肺疾患;APCDのHIV;APCDの高齢者;APCDの慢性肝疾患;APCDの疲労症候群;クローン病;肝機能不全;HIV感染の男性;短腸症候群;中心性肥満;HIV関連のリポジストロフィー症候群(HALS);男性不妊症;大きな待機手術、アルコール/薬物の解毒または神経外傷後の患者;老化;虚弱な高齢者;変形性関節症;外傷性損傷軟骨;勃起不全;線維筋痛;記憶障害;鬱病;外傷性脳損傷;クモ膜下出血;非常に少ない出生時体重;メタボリックシンドローム;グルココルチコイドミオパシー;または小児のグルココルチコイド治療による低身長の治療のための方法を提供する。

【0156】

さらなる態様において、本発明は、それを必要とする患者に、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートの治療有効量の有効量を投与するステップを含む、筋肉組織、神経組織または外傷の治療の促進;損傷した組織への血流の促進もしくは改善;または損傷した組織の感染速度の低減のための方法を提供する。

【0157】

さらなる実施形態において、本発明は、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートの、成長ホルモン血漿レベルの増加から恩恵を受ける疾患、例えば上述された疾患などにおける使用に関する。

【0158】

典型的な経口用量は、投与1回につき 10^{-9} mg/kg~約100mg/kg(体重)の範囲である。典型的な投与の用量は、投与1回につき約0.0000001~約10mg/kg(体重)である。正確な用量は、例えば適応症、薬剤、回数および投与方法、治療する対象の性別、年齢および全身症状、治療する疾患または状態の性質および重症度、所望の治療効果ならびに当業者には明らかな他の要因に依存することになる。

【0159】

典型的な投薬頻度は、毎日2回、毎日1回、1日おき、週に2回、週に1回またはさらに長い投薬間隔である。本発明の融合タンパク質の半減期はより長いので、長い投薬間隔、例えば週に2回、週に1回またはさらに長い投薬間隔を有する投薬体制は、本発明のある特定の実施形態である。

【0160】

2つ以上の薬剤を治療に用いて、同時投与するか、または順次投与するかのいずれかによって、多くの疾患が治療されている。したがって、上述の疾患のうちの一つを治療するための治療による方法において、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを、前記疾患の治療において標準的に使用される一つまたは複数の他の治療的活性化合物と組み合わせて使用することは本発明の範囲内である。類推によって、前記疾患のための薬剤の製造において、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを、上述の疾患のうちの一つの治療に標準的に使用される他の治療上活性のある化合物と組み合わせて使用することもまた、本発明の範囲内である。

【0161】

一般的な調製方法

酵素コンジュゲーション:

本発明の成長ホルモンコンジュゲートの調製において、通常、式(I)のA-W-B-GHコンジュゲートの調製において築かれた共有結合の少なくとも一つを、以下の実施例で例示されている酵素を使用することによって調製する。このような酵素は、例えばトランスグルタミナーゼ、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼからなる群から選択することができる。通常、前記酵素は、トランスグルタミナーゼである。このようなトランスグルタミナーゼは、例えば微生物トランスグルタミナーゼ、組織トランスグルタミナーゼならびに因子XIIIおよびその変異体からなる群から選択することができる。別の実施形態では、前記酵素は、システインプロテアーゼである。このようなシステインプロテアーゼは、例えばパパイン、ソルターゼAならびにソルターゼBからなる群から選択することができる。さらなる実施形態において、前記酵素は、セリンプロテアーゼである。このようなセリンプロテアーゼは、例えばカルボキシペプチダーゼY(CPY)(国際公開第2005/035553号は、CPYを用いたタンパク質修飾の一般的な開示を含有する)、トリプシンおよびキモトリプシンからなる群から選択することができる。

【0162】

本発明の成長ホルモンコンジュゲートは、多くの異なる方法から調製することができ、非限定的な例を以下に示す。

【0163】

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

【0164】

トランスグルタミナーゼ

上で述べられているように、本発明のA-W-B-GHコンジュゲートの調製で築かれる少なくとも一つの共有結合は、トランスグルタミナーゼの使用により調製することができる。トランスグルタミナーゼは、微生物トランスグルタミナーゼ、例えばストレプトマイセス(*Streptomyces*)種属; *S. モバラエンス*、*S. シナモネウム*、*S. グリセオカルネウム*(本明細書に参照により組み込まれている米国特許第5156956号)、*S. ラベンデュラエ*(本明細書に参照により組み込まれている米国特許第5252469号)およびストレプトマイセスラダカムム(本明細書に参照により組み込まれている特開2003/199569号)などから単離したものを挙げる。他の有用な微生物トランスグルタミナーゼは、パチルスサブティリス(本明細書に参照により組み込まれている米国特許第5731183号に開示されている)および様々なミコマイセタから単離されている。有用な微生物トランスグルタミナーゼの他の例は、国際公開第96/06931号(例えばパチルスリディクス由来のトランスグルタミナーゼ)および国際公開第96/22366号に開示されているものがあり、いずれも本明細書に参照により組み込まれている。有用な非微生物トランスグルタミナーゼとしては、モルモット肝臓トランスグルタミナーゼ、ならびに(本明細書に参照により組み込まれている欧州特許第0555649号に開示されている)カレイ、および(参照により本明細書に組み込まれている米国特許第5736356号に開示されている)日本産真ガキなどの様々な海洋源由来のトランスグルタミナーゼが挙げられる。その機能的類似物および誘導体もまた有用となりうる。

【0165】

通常、本発明の方法で使用されるTGaseは、微生物トランスグルタミナーゼである。一実施形態において、TGaseは、S.モバラエンスまたはその変異体由来のもの、例えば国際公開第2007/020290号および国際公開第2008/020075号に記載されたものなどである。別の実施形態では、TGaseは、S.ラダカヌムまたはその変異体由来のもの、例えば国際公開第2008/020075号に記載されたものなどである。

【0166】

本発明によるA-W-BへのhGHのコンジュゲーションが、TGase媒介性修飾により達成されることにより、使用する基質に応じて、GH化合物の配列内の特定のリジン(Lys)またはグルタミン(Gln)位置で選択性変化が生じうる。基質としてのアミンの使用により、グルタミンの修飾が生じる一方で、第一級アミドの使用によりリジンの修飾が生じることになる。hGH(配列番号1)は、位置38、41、70、115、140、145、158、168および172で9リジン残基を有し、位置22、29、40、46、49、68、69、84、91、122、137、141および181で13グルタミン残基を有する。これらのすべてが、修飾に容易に利用できるわけでもないし、修飾に適しているわけでもない。なぜなら、成長ホルモン結合タンパク質への結合能を減弱させ、したがって生物活性の低下へとつながるからである。hGHとその結合タンパク質(pdb: 3HHR)との間のエックス線のタンパク質結晶構造から、少なくとも4つのリジン(38、41、168および172)が、結合タンパク質および潜在的に一つのみのグルタミン(Gln46)への結合に参加していることが明らかである。これは、グルタミンをよりアルブミン結合剤リンカーの選択的導入の標的としてより魅力のあるものにしている。これらの構造的考慮は、N. Cheneら、Reprod. Nutr. Develop. 29、1~25頁(1989年)において要約されている研究結果でさらに支持され、そこでは、リジンに影響を与える化学変性は、インビボの生物活性およびGHの肝臓受容体への結合能に負の効果があることが判明したと結論づけている。

【0167】

化学反応I

一態様において、本発明は、GH化合物を、特性修飾基由来のアルデヒドまたはケトンで処理することによって、アミン、イミンまたはヘミアミナールを生成する、式(VI)の成長ホルモンコンジュゲートの調製に関する。

【0168】

さらなる態様において、本発明は、GH化合物由来のアルデヒドまたはケトン、特性修飾基由来のアニリンまたはヘテロアリールアミンで処理することによって、アミン、イミンまたはヘミアミナールを生成するステップを含む、式(VI)の成長ホルモンコンジュゲートの調製に関する。

【0169】

一実施形態において、GH化合物(IV)由来のアルデヒドを、特性修飾基由来のアニリンまたはヘテロアリールアミン(V)で処理する。

【0170】

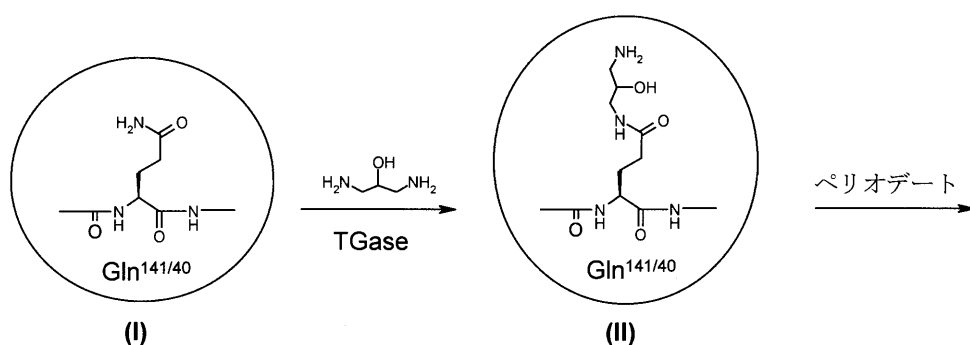
「GH化合物由来のアルデヒド(またはケトン)」または「GH化合物由来のアルデヒドまたはケトン」という用語は、アルデヒド官能基もしくはケトン官能基がそこに共有結合で結合しているGH化合物、またはアルデヒドもしくはケトン官能基がその上に生成されたGH化合物を示すことを意図する。GH化合物由来のアルデヒド、例えば以下に例示されている化合物(IV)の調製は、当業者には周知であり、これら既知の手順のいずれかを使用することによって、本明細書中に開示されている本発明の実現のために必要なGH化合物由来のアルデヒド(IV)を調製することができる。

【0171】

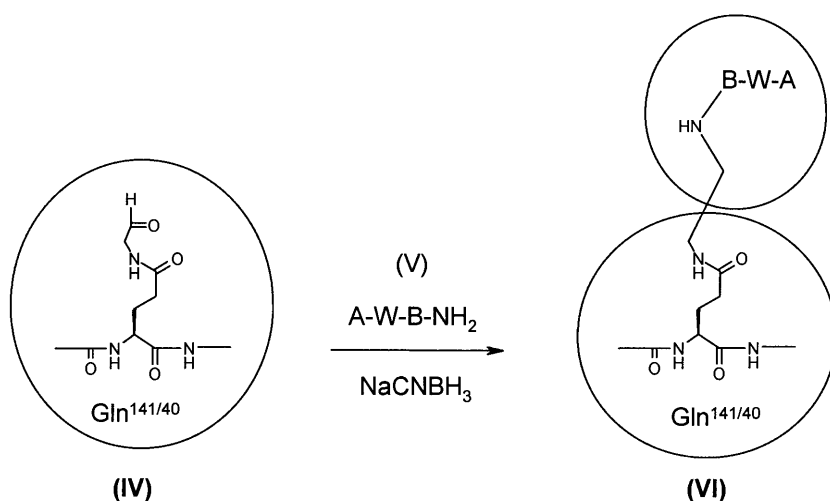
一実施形態においてコンジュゲートA-W-B-hGH(VI)は、以下に例示されているように調製される：

【0172】

【化7】



10



20

【0173】

GH(I)とのTGase-媒介性酵素反応は、位置141および/または40で、Glnの修飾を生じ、GH(II)を産出する。ペリオデート酸化したGH(II)とA-W-B-NH₂(V)とのコンジュゲーションは、還元性のアルキル化を介して起こる。還元性のアルキル化は、本明細書中で例示されており、当技術分野ではよく認識されており、位置Gln(141)および/または40において修飾されたGH化合物(VI)が生じる結果となる。

30

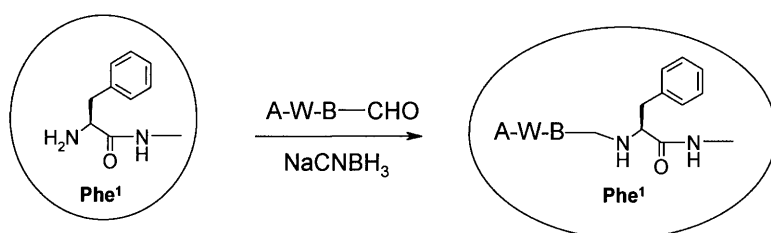
【0174】

化学反応II

一実施形態において、コンジュゲートA-W-B-hGHは、以下に例示されているように調製される：

【0175】

【化8】



40

【0176】

上に示した誘導体化の方法は、位置Phe(1)においてhGH化合物に結合したアルブミン結合リンカーをもたらす。

【0177】

天然ペプチドとの密接な関係は、これが例えば任意の望ましくない抗体の生成などのリ

50

スクを最小限に抑えることから、一般的にこの天然ペプチドの変異体または類似体の投与を含む治療上の介入の利点としてみなされる。

【0178】

本発明の方法に従いペプチドに組み込むことができる多くの求核性化合物が、知られており、 α -アミノ酸は、このような種類の求核性化合物の一つである。しかし本発明の目的のためには、形成される、アシル基転移された化合物それ自体が、適用される酵素の基質とならないように求核性化合物を選ぶのが好ましい。言い換えると、酵素のいかなるさらなる反応をも効果的に遮断する求核性化合物を適用することが好ましい。このような化合物の一つの例が、 α -アミノ酸のアミドであるが、これはカルボキシアミド化したペプチドが、カルボキシペプチダーゼの基質ではないからである。

10

【0179】

化合物が所与の酵素の基質であるかどうかは、原則として条件、例えば反応が起こる時間枠などに依存することが認識されている。実際に、多くの化合物は、普通の条件下ではそうとはみなされないが、十分な時間が与えられた場合、酵素の基質となる。アシル基転移された化合物それ自体が、酵素の基質となるべきではないと上で述べられている場合、これは、本発明の方法における以下の反応が妨げられてしまう程、アシル基転移された化合物それ自体が、酵素の基質となることはないことを示すことを意図している。アシル基転移された化合物が実際に酵素の基質である場合、アシル基転移反応の後で、この酵素を、取り除くか、または例えば酵素阻害剤などで不活化させてもよい。

20

【0180】

医薬組成物

別の目的は、 10^{-15} mg/mL ~ 200mg/mL、例えば 10^{-10} mg/mL ~ 5mg/mLなどの濃度で存在する、本発明の成長ホルモンコンジュゲート、例えば式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを含む、pH2.0 ~ 10.0を有する医薬組成物を提供することである。この組成物は、薬学的添加剤、例えば緩衝液系、保存剤、等張化剤、キレート剤、安定化剤および界面活性剤などをさらに含むことができる。本発明の一実施形態において、医薬組成物は、水性組成物、すなわち水を含む。このような組成物は通常、溶液剤または懸濁剤である。本発明のさらなる実施形態において、医薬組成物は水溶液である。「水性組成物」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む組成物として定義される。同様に、「水溶液」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む溶液として定義され、「水性懸濁液」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む懸濁液として定義される。

30

【0181】

別の実施形態において、医薬組成物は、凍結乾燥された組成物であり、使用前に医師または患者が、これに溶媒および/または希釈剤を添加する。

【0182】

別の実施形態において、医薬組成物は、いかなる事前溶解なしですぐに使用できる乾燥組成物(例えば凍結乾燥またはスプレー乾燥)である。

【0183】

さらなる態様において、本発明は、成長ホルモンコンジュゲート、例えば式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートなどの水溶液、および緩衝液を含む、前記GHコンジュゲートが、0.1 ~ 100mg/mLまたはこれ以上の濃度で存在し、pH約2.0 ~ 約10.0を有する医薬組成物に関する。

40

【0184】

本発明の別の実施形態において、組成物のpHは、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9および10.0からなるリストから選択される。

50

【0185】

本発明のさらなる実施形態において、緩衝液は、ナトリウムアセテート、ナトリウムカーボネート、シトレート、グリシルグリシン、ヒスチジン、グリシン、リシン、アルギニン、ナトリウムジヒドロゲンホスフェート、ジナトリウムヒドロゲンホスフェート、ナトリウムホスフェートおよびトリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、ピシン、トリシン、リンゴ酸、スクシネート、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、アスパラギン酸またはそれらの混合物からなる群から選択される。これらの特定の緩衝液の各々1つは、本発明の代替実施形態を構成する。

【0186】

本発明のさらなる実施形態において、組成物は、薬学的に許容される保存料をさらに含む。本発明のさらなる実施形態において、保存料は、フェノール、o-クレゾール、m-クレゾール、p-クレゾール、メチルp-ヒドロキシベンゾエート、プロピルp-ヒドロキシベンゾエート、2-フェノキシエタノール、ブチルp-ヒドロキシベンゾエート、2-フェニルエタノール、ベンジルアルコール、クロロブタノールおよびチオメロザール、プロノポール、安息香酸、イミドウレア、クロルヘキシジン、ナトリウムデヒドロアセテート、クロルクレゾール、エチルp-ヒドロキシベンゾエート、ベンゼトニウムクロリド、クロルフェネシン(3p-クロロフェノキシプロパン-1,2-ジオール)またはその混合物からなる群から選択される。本発明のさらなる実施形態において、保存料は、0.1mg/mL ~ 20mg/mLの濃度で存在する。本発明のさらなる実施形態において、保存料は、0.1mg/mL ~ 5mg/mLの濃度で存在する。本発明のさらなる実施形態において、保存料は、5mg/mL ~ 10mg/mLの濃度で存在する。本発明のさらなる実施形態において、保存料は、10mg/mL ~ 20mg/mLの濃度で存在する。これらの特定の保存料の各々1つは、本発明の代替実施形態を構成する。医薬組成物における保存料の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、2000が参照される。

【0187】

本発明のさらなる実施形態において、組成物は、等張剤をさらに含む。本発明のさらなる実施形態において、等張剤は、塩(例えば、ナトリウムクロリド)、糖または糖アルコール、アミノ酸(例えば、L-グリシン、L-ヒスチジン、アルギニン、リシン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、スレオニン)、アルジトール(例えば、グリセロール(グリセリン)、1,2-プロパンジオール(プロピレングリコール)、1,3-プロパンジオール、1,3-ブタンジオール)ポリエチレングリコール(例えば、PEG400)またはそれらの混合物からなる群から選択される。任意の糖、例えば、単糖、二糖もしくは多糖、または例えば、フルクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、デキストラン、プルラン、デキストリン、シクロデキストリン、水溶性デンプン、ヒドロキシエチルデンプンおよびカルボキシメチルセルロースNaを含む、水溶性グルカンを使用できる。一実施形態において、糖添加物はスクロースである。糖アルコールは、少なくとも1つの-OH基を有するC4 ~ C8炭化水素として定義され、例えば、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、ガラクトール、ダルシトール、キシリトールおよびアラビトールが挙げられる。一実施形態において、糖アルコール添加物はマンニトールである。上に言及した糖または糖アルコールは、単独でまたは組み合わせて使用できる。糖または糖アルコールが液状調製物に可溶性であり、本発明の方法を用いて得られる安定化効果に悪影響を与えない限りは、使用量に決まった制限はない。一実施形態において、糖または糖アルコールの濃度は、約1mg/mL ~ 約150mg/mLの間である。本発明のさらなる実施形態において、等張剤は1mg/mL ~ 50mg/mLの濃度で存在する。本発明のさらなる実施形態において、等張剤は1mg/mL ~ 7mg/mLの濃度で存在する。本発明のさらなる実施形態において、等張剤は8mg/mL ~ 24mg/mLの濃度で存在する。本発明のさらなる実施形態において、等張剤は25mg/mL ~ 50mg/mLの濃度で存在する。これらの特定の等張剤の各々1つは、本発明の代替実施形態を構成する。医薬組成物での等張剤の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、2000が参照される。

10

20

30

40

50

【0188】

本発明のさらなる実施形態において、組成物は、キレート化剤をさらに含む。本発明のさらなる実施形態において、キレート化剤は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、クエン酸およびアスパラギン酸、ならびにそれらの混合物から選択される。本発明のさらなる実施形態において、キレート化剤は、0.1mg/mL ~ 5mg/mLの濃度で存在する。本発明のさらなる実施形態において、キレート化剤は、0.1mg/mL ~ 2mg/mLの濃度で存在する。本発明のさらなる実施形態において、キレート化剤は、2mg/mL ~ 5mg/mLの濃度で存在する。これらの特定のキレート化剤の各々1つは、本発明の代替的实施形態を構成する。医薬組成物中でのキレート化剤の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、2000が参照される。

10

【0189】

本発明のさらなる実施形態において、組成物は安定剤をさらに含む。医薬組成物における安定剤の使用は、当業者に周知である。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、2000が参照される。

【0190】

より特に、本発明の組成物は、治療有効成分が、液体医薬組成物中で貯蔵中に凝集形成を示す可能性のあるタンパク質を含む、安定化液体医薬組成物である。「凝集形成」とは、可溶性のまま残り得るオリゴマー、または溶液から沈殿する大きな可視的凝集物の形成に至るタンパク質分子間の物理的相互作用を意味する。「貯蔵中」とは、一度調製した液体医薬組成物または組成物が、対象に直ぐに投与されないことを意味する。正しくは、液体医薬組成物または組成物は、調製後、貯蔵のために、液体形態、凍結状態、または対象に投与するのに適した液体形態または他の形態に後で再構成するための乾燥形態のいずれかで包装される。「乾燥形態」とは、液体医薬組成物または組成物が、凍結乾燥(すなわち、凍結乾燥;WilliamsおよびPolli、J. Parenteral Sci. Technol.、38、48 ~ 59(1984)参照)、噴霧乾燥(Spray-Drying Handbook中のMasters(1991)(第5版;Longman Scientific and Technical、Essez、U.K.)、491 ~ 676頁;Broadheadら(1992)Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169 ~ 1206(1992);Mumenthalerら、Pharm. Res. 11、12 ~ 20(1994)参照))、または空気乾燥(CarpenterおよびCrowe、Cryobiology 25、459 ~ 470(1988);Roser、Biopharm. 4、47 ~ 53(1991))のいずれかにより乾燥させることを意味する。液体医薬組成物の貯蔵中のタンパク質による凝集形成は、当該タンパク質の生物学的活性に悪影響を及ぼし、医薬組成物の治療効果を低下させる可能性がある。さらに、タンパク質含有医薬組成物が、注入システムを用いて投与される場合、凝集形成は、管、膜またはポンプの閉塞などの他の問題を引き起こす可能性がある。

20

30

【0191】

本発明の医薬組成物は、組成物の貯蔵中に、タンパク質による凝集形成を低下させるのに十分な量のアミノ酸塩基をさらに含むことができる。「アミノ酸塩基」とは、任意の所与のアミノ酸がその遊離塩基形態またはその塩形態のいずれかで存在する、アミノ酸、またはアミノ酸の組合せを意味する。アミノ酸の組合せを使用する場合、すべてのアミノ酸が遊離塩基形態で存在してもよく、すべてがそれらの塩形態で存在してもよく、またはいくつかはそれらの遊離塩基形態で存在してもよいの対して他がそれらの塩形態で存在する。一実施形態において、本発明の組成物を調製する際に使用するアミノ酸は、帯電した側鎖を有するもの、例えば、アルギニン、リシン、アスパラギン酸およびグルタミン酸である。特定アミノ酸(メチオニン、ヒスチジン、アルギニン、リシン、イソロイシン、アスパラギン酸、トリプトファン、スレオニンおよびそれらの混合物)または有機塩基がその遊離塩基形態またはその塩形態で存在している限り、特定アミノ酸の任意の立体異性体(すなわち、LまたはD異性体またはそれらの混合物)またはこれらの立体異性体の組合せまたはグリシンまたは、これに限らないがイミダゾールなどの有機塩基が、本発明の医薬組成物中に存在してもよい。一実施形態において、アミノ酸のL立体異性体を使用する。一実施形態において、L立体異性体を使用する。本発明の組成物は、これらアミノ酸の類似体を用いて製剤化してもよい。「アミノ酸類似体」とは、本発明の液体医薬組成物の貯蔵

40

50

中に、タンパク質による凝集形成を低下させる望ましい効果をもたらす天然に存在するアミノ酸の誘導体を意味する。適切なアルギニン類似体としては、例えば、アミノグアニジン、オルニチンおよびN-モノエチル-L-アルギニンが挙げられ、適切なメチオニン類似体としては、エチオニンおよびブチオニンが挙げられ、適切なシステイン類似体としては、S-メチル-L-システインが挙げられる。他のアミノ酸と同様に、アミノ酸類似体は、それらの遊離塩基形態またはそれらの塩形態のいずれかで組成物中に取り込まれる。本発明のさらなる実施形態において、アミノ酸またはアミノ酸類似体は、タンパク質の凝集を防止または遅延させるのに十分な濃度で使用される。

【0192】

本発明のさらなる実施形態において、治療薬として作用するタンパク質が、メチオニン残基のメチオニンスルホキシドへの酸化を受けやすい少なくとも1つのメチオニン残基を含むタンパク質である場合、メチオニン(または、他の硫黄含有アミノ酸またはアミノ酸類似体)を、このような酸化を抑制するために加えることができる。「抑制する」とは、経時的にメチオニン酸化種の蓄積を最小限にすることを意味する。メチオニン酸化を抑制することにより、その適正な分子形態でタンパク質がより多く保持される。メチオニンのいずれかの立体異性体(LまたはD異性体)またはその任意の組合せを使用できる。添加されるべき量は、メチオニンスルホキシドの量が規制当局に許容されるように、メチオニン残基の酸化を抑制するのに十分な量でなければならない。通常、これは、組成物が、約10%~約30%以下のメチオニンスルホキシドを含有することを意味する。一般に、これは、添加するメチオニンとメチオニン残基との比が約1:1~約1000:1、例えば、約10:1~約100:1の範囲となるように、メチオニンを加えることによって得られる。

【0193】

本発明のさらなる実施形態において、組成物は、高分子量ポリマーまたは低分子量化合物からなる群から選択される安定剤をさらに含む。本発明のさらなる実施形態において、安定剤は、ポリエチレングリコール(例えば、PEG3350)、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルピロリドン、カルボキシ/ヒドロキシセルロースまたはその誘導体(例えば、HPC、HPC-SL、HPC-LおよびHPMC)、シクロデキストリン、硫黄含有物質、例えば、モノチオグリセロール、チオグリコール酸および2-メチルチオエタノール、ならびに各種の塩(例えば、ナトリウムクロリド)から選択される。これらの特定の安定剤の各々1つは、本発明の代替的实施形態を構成する。

【0194】

医薬組成物は、治療有効タンパク質の安定性をさらに高める追加の安定化剤も含むことができる。本発明で特に関心のある安定化剤としては、それだけに限らないが、タンパク質をメチオニン酸化から保護するメチオニンおよびEDTA、ならびにタンパク質を凍結融解または機械的剪断に関連する凝集から保護する非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0195】

本発明のさらなる実施形態において、組成物は、界面活性剤をさらに含む。本発明のさらなる実施形態において、界面活性剤は、洗浄剤、エトキシ化ヒマシ油、ポリグリセロール化グリセリド、アセチル化モノグリセリド、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロックポリマー(例えば、Pluronic(登録商標)F68、ポリキサマー188および407、トリトンX-100などのポリキサマー)、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンおよびポリエチレン誘導体、例えば、アルキル化誘導体およびアルコキシ化誘導体(Tween、例えば、Tween-20、Tween-40、Tween-80およびBrij-35)、モノグリセリドもしくはそのエトキシ化誘導体、ジグリセリドもしくはそのポリオキシエチレン誘導体、アルコール、グリセロール、レクチンおよびリン脂質(例えば、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジイルノシトール、ジホスファチジルグリセロールおよびスフィンゴミエリン)、リン脂質誘導体(例えば、ジパルミトイルホスファチジン酸)およびリゾリン脂質誘導体(例えば、パルミトイルリゾホスファチジル-L-セリンおよびエタノールアミン、コリン、セリンもしくはスレオニンの1-アシル-sn-グリセロ-3-ホスフェートエステル)、リ

ゾホスファチジルおよびホスファチジルコリンのアルキル、アルコキシ(アルキルエステル)、アルコキシ(アルキルエーテル)誘導体、例えば、リゾホスファチジルコリンのラウロイル誘導体およびミリストイル誘導体、ジパルミトイルホスファチジルコリン、コリン、エタノールアミン、ホスファチジン酸、セリン、スレオニン、グリセロール、イノシトールである極性頭基の修飾物、正帯電したDODAC、DOTMA、DCP、BISHOP、リゾホスファチジルセリンおよびリゾホスファチジルスレオニン、グリセロリン脂質(例えば、セファリン)、グリセロ糖脂質(例えば、ガラクトピラノシド)、スフィンゴ糖脂質(例えば、セラミド、ガングリオシド)、ドデシルホスホコリン、ニワトリ卵リソレシチン、フシジン酸誘導体(例えば、ナトリウムタウロ-ジヒドロフシデートなど)、長鎖脂肪酸およびその塩C6~C12(例えば、オレイン酸およびカプリル酸)、アシ

10

ルカルニチンおよび誘導体、リシン、アルギニンもしくはヒスチジンのN-アシル化誘導体、リシンもしくはアルギニンの側鎖アシル化誘導体、リシン、アルギニンもしくはヒスチジンと中性もしくは酸性アミノ酸との任意の組合せを含むジペプチドのN-アシル化誘導体、中性アミノ酸と2つの帯電アミノ酸との任意の組合せを含むトリペプチドのN-アシル化誘導体、DSS(ドクサートナトリウムCAS登録番号[577-11-7])、ドクサートカルシウムCAS登録番号[128-49-4]、ドクサートカリウムCAS登録番号[7491-09-0])、SDS(ナトリウムドデシルスルフェートもしくはナトリウムラウリルスルフェート)、ナトリウムカプリレート、コール酸もしくはその誘導体、胆汁酸およびその塩、ならびにグリシンもしくはタウリンコンジュゲート、ウルソデオキシコール酸、ナトリウムコレート、ナトリウムデオキシコレート、ナトリウムタウロコレート、ナトリウムグリコレート、N-ヘキサデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、アニオン性(アルキル-アリール-スルホネート)一価界面活性剤、双イオン性界面活性剤(例えば、N-アルキル-N,N-ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホネート、3-コールアミド-1-プロピルジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホネート)、カチオン性界面活性剤(第4級アンモニウム塩基)(例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、セチルピリジニウムクロリド)、非イオン性界面活性剤(例えば、ドデシル-D-グルコピラノシド)、プロピレンオキシドおよびエチレンオキシドをエチレンジアミンに順次加えることにより誘導される四官能性ブロックコポリマーであるポロキサミン(例えば、Tetronic's)から選択されるか、または界面活性剤は、イミダゾリン誘導体およびその混合物からなる群から選択できる。これらの特定の界面活性剤の各々1つは、本発明の代替的实施形態を構成する。

20

30

【0196】

医薬組成物中での界面活性剤の使用は当業者に周知である。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、2000が参照される。

【0197】

他の成分が、本発明の医薬組成物に存在し得る可能性がある。このような追加成分としては、湿潤剤、乳化剤、抗酸化剤、増量剤、等張性修飾剤、キレート化剤、金属イオン、油性ビヒクル、タンパク質(例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチンまたはタンパク質)および両性イオン種(例えば、ベタイン、タウリン、アルギニン、グリシン、リシンおよびヒスチジンなどのアミノ酸)を挙げることができる。当然ながら、このような追加の成分は、本発明の医薬組成物の全体的な安定性に悪影響を与えてはならない。

40

【0198】

本発明の成長ホルモンコンジュゲートを含有する医薬組成物は、このような治療を必要とする患者に、例えば、皮膚および粘膜部位などの局所部位、動脈内、静脈内、心臓内での投与など吸収をバイパスする部位、および皮内、皮下、筋肉内または腹部内での投与など吸収に関与する部位に投与できる。

【0199】

本発明の医薬組成物の投与は、このような治療を必要とする患者に、舌、舌下、パッカル、口内、経口、胃および腸内、鼻、例えば、細気管支および肺胞またはその組合せを通して肺、表皮、真皮、経皮、経腔、直腸、例えば、結膜を介して眼、尿管および非経口など、複数の投与経路を介するものであってよい。

50

【0200】

本発明の組成物は、いくつかの剤形で、例えば、溶液、懸濁液、エマルジョン、マイクロエマルジョン、複合エマルジョン、フォーム、膏薬、ペースト、硬膏、軟膏、錠剤、被覆錠剤、リンス、カプセル、例えば、硬ゼラチンカプセルおよび軟ゼラチンカプセル、坐薬、直腸カプセル、ドロップ、ゲル、スプレー、粉末、エアロゾル、吸入剤、点眼剤、眼軟膏、眼リンス、膣ペッサリー、膣リング、膣軟膏、注射液、in situ形質転換溶液、例えば、in situゲル化、in situ硬化、in situ沈殿、in situ結晶化、注入溶液およびインプラントとして投与できる。

【0201】

さらに、本発明の組成物は、成長ホルモンコンジュゲートの安定性をさらに高めるため、バイオアベイラビリティを増加させるため、溶解度を増加させるため、副作用を低減するため、当業者に周知の時間療法を実現するため、患者のコンプライアンスを高めるため、またはそれらの任意の組合せのために、例えば、共有、疎水性および静電的相互作用を介して、薬物担体、薬物送達系および高度薬物送達系に混合してもよく、または結合させてもよい。担体、薬物送達系および高度薬物送達系の例としては、それだけに限らないがポリマー、例えば、セルロースおよび誘導体、多糖、例えば、デキストランおよび誘導体、デンプンおよび誘導体、ポリ(ビニルアルコール)、アクリレートおよびメタクリレートポリマー、ポリ乳酸およびポリグリコール酸、ならびにそれらのブロックコポリマー、ポリエチレングリコール、キャリアタンパク質、例えば、アルブミン、ゲル、例えば、当業者に周知のブロックコポリマー系などの熱ゲル化系、ミセル、リボソーム、ミクロスフェア、ナノ粒子、液晶およびその分散液、脂質-水系における相挙動の当業者に周知のL2相およびその分散液、ポリマーミセル、複合エマルジョン、自己乳化、自己マイクロ乳化、シクロデキストリンおよびその誘導体、ならびにデンドリマーが挙げられる。

【0202】

本発明の組成物は、すべて当業者に周知のデバイスである、例えば、計量吸入器、乾燥粉末吸入器およびネブライザーを用いて成長ホルモンコンジュゲートを肺投与するために、固体、半固体、粉末および溶液の組成物において有用である。

【0203】

本発明の組成物は、制御放出、持続放出、延長放出、遅延放出および徐放出の薬物送達系組成物において特に有用である。より特に、それだけに限らないが、組成物は、当業者に周知の非経口制御放出系および非経口持続放出系(いずれの系も、投与回数を何分の1かに低減する)の組成物において有用である。皮下投与のための制御放出系および持続放出系がさらにより好ましい。本発明の範囲を限定するものではないが、有用な制御放出系および組成物の例としては、ヒドロゲル、油性ゲル、液晶、ポリマーミセル、ミクロスフェア、ナノ粒子がある。

【0204】

本発明の組成物に有用な制御放出系を製造する方法としては、それだけに限らないが結晶化、凝縮、共結晶化、沈殿、共沈殿、乳化、分散、高圧均質化、カプセル化、噴霧乾燥、マイクロカプセル化、コアセルベーション、相分離、ミクロスフェアを製造するための溶媒蒸発、押出および超臨界流体処理が挙げられる。一般には、Handbook of Pharmaceutical Controlled Release(Wise, D.L. 編、Marcel Dekker、New York、2000)およびDrug and the Pharmaceutical Sciences99巻:Protein Composition and Delivery(MacNally, E. J. 編、Marcel Dekker、New York、2000)を参照されたい。

【0205】

非経口投与は、注射器、場合によりペン様注射器を用いて皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与または静脈内投与により実行できる。あるいは、非経口投与は注入ポンプを用いて実行できる。さらなる任意選択は、鼻スプレーまたは肺スプレーの形態で成長ホルモンコンジュゲートを投与するための溶液または懸濁液であってよい組成物である。さらにさらなる任意選択として、本発明の成長ホルモンコンジュゲートを含有する医薬組成物は、無針注射によるか、もしくはパッチ、場合によりイオン泳動パッチからなどの経皮投与、ま

たはバッカル投与などの経粘膜投与に適合させてもよい。

【0206】

「安定化組成物」という用語は、高い物理的安定性、高い化学的安定性または高い物理的および化学的安定性を有する組成物を指す。

【0207】

本明細書で使用するタンパク質組成物の「物理的安定性」という用語は、タンパク質を、熱-機械的ストレス、ならびに/または不安定化させる界面および表面、例えば、疎水性の表面および界面との相互作用に曝した結果として、タンパク質の生物学的に不活性および/または不溶性の凝集物を形成するタンパク質の傾向を指す。水性タンパク質組成物の物理的安定性は、適当な容器(例えば、カートリッジまたはバイアル)に充填した組成物を、異なる温度で異なる時間で、機械的/物理的ストレス(例えば、攪拌)に曝した後、目視検査および/または濁度の測定により評価される。組成物の目視検査は、暗背景で鋭く集光した光によって行われる。組成物の濁度は、濁度を例えば、0~3のスケールでランク付ける視覚スコアにより特徴付けられる(濁りを示さない組成物は、視覚スコア0に相当し、昼光で視覚的濁りを示す組成物は、視覚スコア3に相当する)。組成物が昼光で視覚的濁りを示す場合、タンパク質凝集に対して物理的に不安定と分類される。あるいは、組成物の濁度は、当業者に周知の簡単な濁度測定により評価できる。水性タンパク質組成物の物理的安定性は、タンパク質の立体配座状態の分光学的薬剤またはプローブを用いて評価することもできる。プローブは、タンパク質の非天然コンフォーマーに優先的に結合する小分子であることが好ましい。タンパク質構造の小分子分光プローブの一例としては、チオフラビンTがある。チオフラビンTは、アミロイドフィブリルの検出のために広く使用されている蛍光染料である。フィブリル、およびおそらくさらに他のタンパク質構造の存在下において、チオフラビンTは約450nmで新たな最大励起を生じ、フィブリルタンパク質形態に結合すると、約482nmで増大した発光を生ずる。非結合型のチオフラビンTは、波長で本質的に非蛍光性である。

10

20

【0208】

他の小分子を、天然状態から非天然状態へのタンパク質構造における変化のプローブとして使用できる。例えば、「疎水性パッチ」プローブは、タンパク質の露出疎水性パッチに優先的に結合する。疎水性パッチは、その天然状態のタンパク質の3次構造内に通常埋まっているが、タンパク質がアンフォールドまたは変性し始めると露出されるようになる。これらの小分子分光プローブの例としては、芳香族疎水性染料、例えば、アントラセン、アクリジン、フェナントロリンなどがある。他の分光プローブは、金属-アミノ酸錯体、例えば、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンおよびバリンなどの疎水性アミノ酸のコバルト金属錯体がある。

30

【0209】

本明細書で使用する場合、タンパク質組成物の「化学的安定性」という用語は、天然のタンパク質構造と比較して潜在的に低い生物学的効力および/または潜在的に高い免疫原性を有する化学的分解生成物の形成に至る、タンパク質構造における化学的共有結合の変化を指す。天然のタンパク質の種類および性質、ならびにタンパク質が曝される環境に応じて、様々な化学的分解生成物が形成され得る。化学的分解の排除は、ほぼ確実に完全には回避できず、化学分解生成物の量の増大は、当業者に周知のように、タンパク質組成物の貯蔵中および使用中にしばしば見られる。大部分のタンパク質は、グルタミン残基またはアスパラギン残基中の側鎖アミド基が加水分解されて遊離カルボン酸を形成するプロセスである、脱アミド化しやすい。他の分解経路は、高分子量の形質転換生成物の形成を伴い、そこで2つ以上のタンパク質分子がアミド基転移および/またはジスルフィド相互作用により互いに共有結合して、共有結合したダイマー、オリゴマーおよびポリマーの分解生成物の形成に至る(Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern, T.J. & Manning M.C., Plenum Press, New York 1992参照)。化学分解の別の変形形態として、(例えば、メチオニン残基の)酸化を挙げることができる。タンパク質組成物の化学安定性は、異なる環境条件に曝した後の様々な時点での化学分解生成物の量を測定することによって評価でき

40

50

る(分解生成物の形成は、例えば、温度を上昇させることによりしばしば加速できる)。各個々の分解生成物の量は、様々なクロマトグラフィー技術(例えば、SEC-HPLCおよび/またはRP-HPLC)を使用して、分子サイズおよび/または電荷に応じて分解生成物を分離することによりしばしば決定される。

【0210】

したがって、上に概説したように、「安定化組成物」とは、増大した物理的安定性、増大した化学的安定性、または増大した物理的および化学的安定性を有する組成物を指す。一般に、組成物は有効期限に達するまで、(推奨される使用および貯蔵条件に従って)使用中および貯蔵中安定でなければならない。

【0211】

本発明の一実施形態において、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを含む医薬組成物は、6週間超の使用および3年超の貯蔵に対して安定である。

【0212】

本発明の別の実施形態において、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを含む医薬組成物は、4週間超の使用および3年超の貯蔵に対して安定である。

【0213】

本発明のさらなる実施形態において、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを含む医薬組成物は、4週間超の使用および2年超の貯蔵に対して安定である。

【0214】

本発明のさらにさらなる実施形態において、式(I)または(II)の成長ホルモンコンジュゲートを含む医薬組成物は、2週間超の使用および2年超の貯蔵に対して安定である。

【0215】

本明細書中に引用された、出版物、特許出願および特許を含めたすべての参考文献は、あたかもそれぞれの参照が、参照により組み込まれると個々におよび具体的に示され、その全体が本明細書中に記載されているのと同程度に参照により本明細書に組み込まれている。

【0216】

すべての表題およびサブ表題は、本明細書中で便宜のためのみに使用されるもので、本発明を限定すると決して解釈してはならない。

【0217】

上に記載の要素の任意の組合せは、そのすべての可能なバリエーションにおいて、本明細書中で他に指摘されていない限り、または文脈が明らかに矛盾しない限り、本発明に包含される。

【0218】

「a」および「an」および「the」という用語ならびに同様の指示対象は、本発明を記載する文脈において使用された場合、本明細書中で他に指摘されていない限り、または文脈が明らかに矛盾しない限り、単数および複数の両方を包含すると解釈されるものとする。

【0219】

本明細書中の列挙の値の範囲は、本明細書中で他に指摘されていない限り、範囲内に含まれるそれぞれ別々の値を個々に指す簡単な方法としての役目を果たすことを単に意図するだけであり、あたかもそれぞれ別々の値が本明細書中で個々に列挙されたかの如く、明細書中に組み込まれている。他に述べられていない限り、本明細書中に提供されているすべて正確な値は、対応する概算値を代表するものである(例えば、ある特定の要素または測定に関して提供されたすべての正確な代表的な値は、適切な場合、「約」で修飾された対応する概算の測定値を提供しているとも考えることができる)。

【0220】

本明細書中で他に指摘されていない限り、または文脈が明らかに矛盾しない限り、本明細書中に記載されているすべて方法は、任意の適切な順序で実施することができる。

【0221】

本明細書中に提供されている任意およびすべての例または代表的言語(例えば「例えば

10

20

30

40

50

」など)の使用は、他に指摘されていない限り、単に本発明をより明確にすることのみを意図し、本発明の範囲に制限を設けるものではない。本明細書におけるいかなる言語も、それだけ明確に述べられていない限り、任意の要素が本発明の実施に必要不可欠であることを示していると解釈されてはならない。

【0222】

本明細書中に特許文献を引用および組み込むことは、便宜のためだけに行われ、このような特許文献の有効性、特許性および/または執行可能性に対する任意の視野を反映するものではない。

【0223】

本発明は、これらだけに限らないが、これより以下に列挙する実施形態によりさらに説明される。

【0224】

1. 親水性スパーサーを介してアルブミン結合残基に連結した成長ホルモン化合物(GH)を含む成長ホルモンコンジュゲート、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物もしくはプロドラッグ。

【0225】

2. 親水性スパーサーが、 $m\text{LogP} < 0$ または $c\text{LogP} < 0.5$ を有する、実施形態1に記載のコンジュゲート。

【0226】

3. 成長ホルモン化合物(GH)が、親水性スパーサーを介して1つのアルブミン結合残基に連結している、実施形態1または2に記載のコンジュゲート。

【0227】

4. 成長ホルモン化合物(GH)が、親水性スパーサーを介して2または3つのアルブミン結合残基に連結している、実施形態1または2に記載のコンジュゲート。

【0228】

5. 親水性スパーサーが、式

$-X_1-X_2-X_3-X_4-$ (式中、

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

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

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

X_4 は、 $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ であり、

11、12、13、14、15および16は、独立に、0~16から選択され、

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

$m2$ および $m5$ は、独立に、0~25から選択され、

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

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

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

D1、D2、E1およびE2は、独立に、-O-、-NR⁶-、-N(COR⁷)-または原子価結合から選択され、R⁶およびR⁷は、独立に、水素またはC₁~6-アルキルを表し、

W₁~W₆は、独立に、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s1}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、または原子価結合から選択され、s1は0または1である)

を有する、実施形態1から4のいずれか一つに記載のコンジュゲートまたはその薬学的に許容される塩、溶媒和物もしくはプロドラッグ。

10

20

30

40

50

【 0 2 2 9 】

6. 式(1)の成長ホルモンコンジュゲート:

A-W-B-GH(1)

(式中、

GHは、成長ホルモン化合物を表し、

Bは、親水性スパーサーを表し、

Wは、AとBを連結する化学基であり、

Aは、アルブミン結合残基を表す)、

その薬学的に許容される塩、溶媒和物およびプロドラッグ。

【 0 2 3 0 】

10

7. GHが、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す、実施形態6に記載のコンジュゲート。

【 0 2 3 1 】

8. GHがhGH(配列番号1)である、実施形態6または7に記載のコンジュゲート。

【 0 2 3 2 】

9. Bが、次式

$-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[式中、

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

20

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

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

X_4 は $F-D1-(CH_2)_{16}-D2-$ であり、

11、12、13、14、15および16は独立に0~16から選択され、

m1、m3、m4、m6およびm7は独立に0~10から選択され、

m2およびm5は独立に0~25から選択され、

n1、n2、n3およびn4は独立に0~16から選択され、

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

30

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

D1、D2、E1およびE2は独立に-O-、-NR⁶-、-N(COR⁷)-または原子価結合から選択され、R⁶およびR⁷は独立に水素またはC₁~₆アルキルを表し、

W₁~W₆は独立に-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、OC(O)-または原子価結合から選択され、s2は0または1である]

40

を有する、実施形態6~8のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 3 3 】

10. Wが、次式

$-W_7-Y-$

[式中、

Yは $-(CH_2)_{17}-C_3\sim_{10}$ -シクロアルキル-W₈-または原子価結合であり、

17は0~6であり、

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

50

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

を有する、実施形態6～9のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0234】

11.l1、12、13、14、15および16が独立に0～6である、実施形態6～10のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0235】

12.m1、m3、m4、m6およびm7が独立に0～6である、実施形態6～11のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

10

【0236】

13.m2およびm5が独立に0～10である、実施形態6～12のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0237】

14.n1、n2、n3およびn4が独立に0～10、例えば、0～6である、実施形態6～13のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0238】

15.D1およびD2が独立に-O-もしくは-NR⁶-または原子価結合から選択される、実施形態6～14のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

20

【0239】

16.D1が-NR⁶-である、実施形態6～15のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0240】

17.D2が-NR⁶-である、実施形態6～16のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0241】

18.D1およびD2がいずれも-O-である、実施形態6～17のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0242】

19.D1およびD2がいずれも-NR⁶-である、実施形態6～18のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

30

【0243】

20.E1およびE2が独立に-O-もしくは-NR⁶-または原子価結合から選択される、実施形態6～19のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0244】

21.E1が-NR⁶-である、実施形態6～20のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0245】

22.E2が-NR⁶-である、実施形態6～21のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0246】

23.E1およびE2がいずれも-O-である、実施形態6～22のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

40

【0247】

24.E1およびE2がいずれも-NR⁶-である、実施形態6～23のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0248】

25.W₁～W₈は独立に-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、
-S(O)₂NHC(O)-または原子価結合からなる群から選択される、実施形態6～24のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【0249】

26.R¹、R²、R³、R⁴およびR⁵が独立に水素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH、またはC₁～
6アルキルから選択され、アルキル基が、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH、で場合により置

50

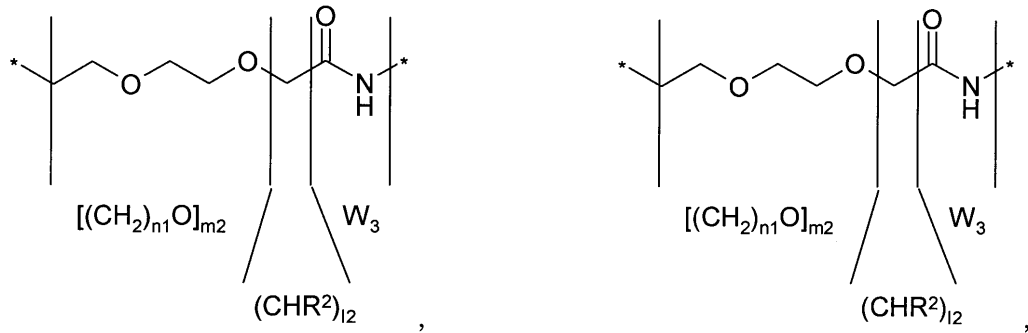
換されている、実施形態6～25のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 5 0 】

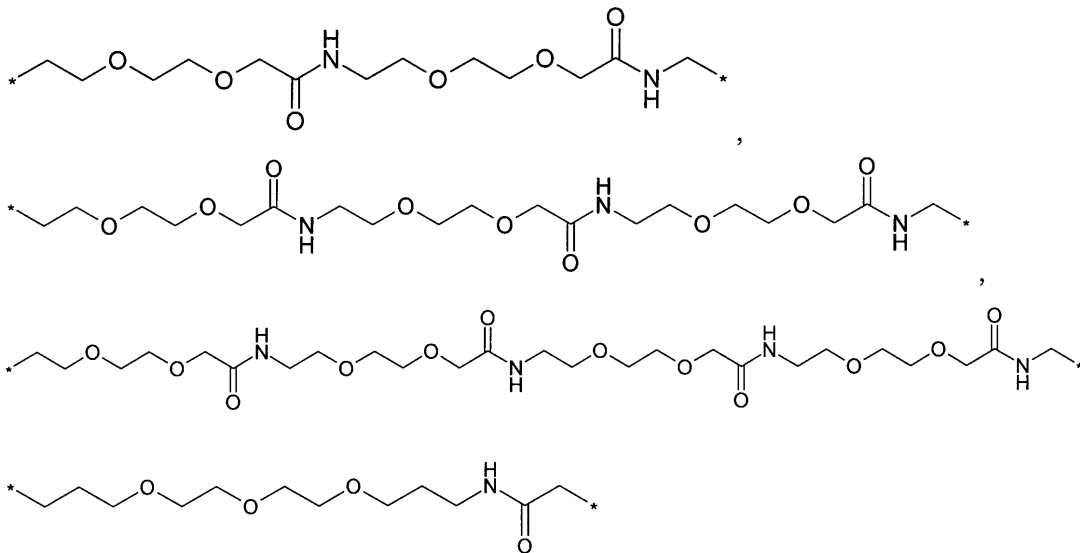
27. $- \{ [(CH_2)_{n1}E1]_{m2} - [(CHR^2)_{12} - W_3]_{m3} \}_{n2}$ - であり、
 $- \{ [(CH_2)_{n3}E2]_{m5} - [(CHR^4)_{14} - W_5]_{m6} \}_{n4}$ - であり、E1およびE2が0であり、

【 0 2 5 1 】

【 化 9 】



10



20

, および

30

【 0 2 5 2 】

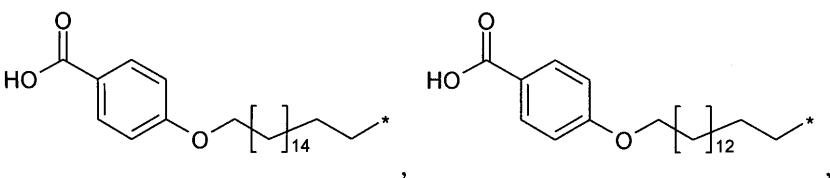
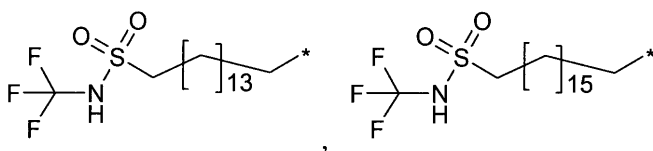
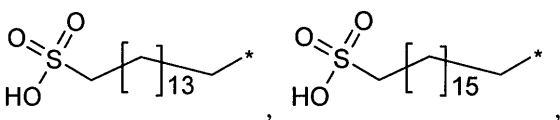
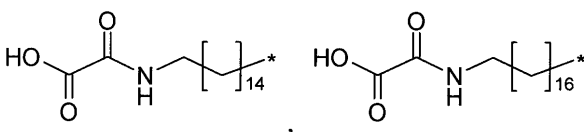
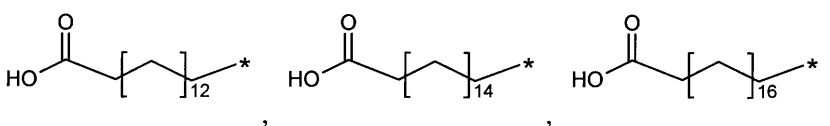
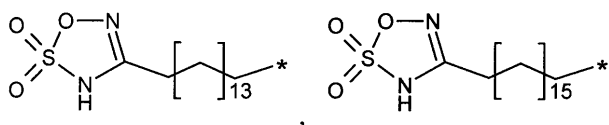
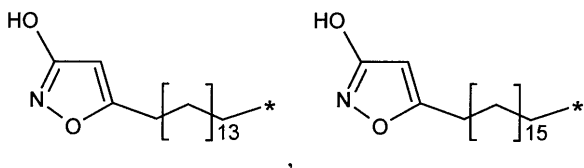
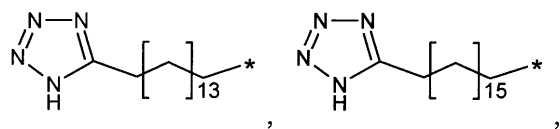
(式中、*は、結合点、すなわち空いている結合を意味することを意図する)
 から選択される、実施形態6～26のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 5 3 】

28. Aが、

【 0 2 5 4 】

【化 1 0】



10

20

30

【 0 2 5 5】

(式中、*はWからBへの結合を示す)

から選択される、実施形態6~27のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 5 6】

29. アルブミン結合残基が、親水性スパーサーを介して、配列番号1の位置40に対応する位置でグルタミン残基に結合する、実施形態1から28のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

40

【 0 2 5 7】

30. アルブミン結合残基が、親水性スパーサーを介して、配列番号1の位置141に対応する位置でグルタミン残基に結合する、実施形態1から29のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 5 8】

31. アルブミン結合残基が、親水性スパーサーを介して、成長ホルモン化合物、例えばhGH(配列番号1)などのN末端残基に結合する、実施形態1から30のいずれか一つに記載の

50

ンジュゲート。

【 0 2 5 9 】

32. 式(II)の成長ホルモンコンジュゲート:

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

(式中、

GHは、成長ホルモン化合物を表し、

Wは、AとBを連結する化学基であり、

W'は、A'とB'を連結する化学基であり、

AおよびA'は、独立に、アルブミン結合残基を表し、

BおよびB'は、独立に、親水性スペーサーである)、

その薬学的に許容される塩、溶媒和物およびプロドラッグ。

【 0 2 6 0 】

33. GHが、ヒト成長ホルモン(hGH)(配列番号1)のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む成長ホルモン化合物を表す、実施形態32に記載のコンジュゲート。

【 0 2 6 1 】

34. GHがhGH(配列番号1)である、実施形態33に記載のコンジュゲート。

【 0 2 6 2 】

35. W'がWから選択され、A'がAから選択され、B'がBから選択される、実施形態32から34のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 6 3 】

36. WとW'、AとA'、ならびにBとB'が、独立に、実施形態6から31のいずれか一つのこれらのそれぞれの定義から選択される、実施形態32から35のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 6 4 】

37. 前記親水性スペーサーの分子量が、80D~1500Dの範囲または500D~1100Dの範囲である、前記実施形態のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 6 5 】

38. 前記アルブミン結合残基が親油性残基である、前記実施形態のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 6 6 】

39. 前記アルブミン結合残基が、アルブミンに非共有結合で結合する、前記実施形態のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 6 7 】

40. 前記アルブミン結合残基が、生理的pHで負に帯電している、前記実施形態のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 6 8 】

41. 前記アルブミン結合残基が、約10 μM以下または約1 μM以下であるヒト血清アルブミンに対して結合親和性を有する、前記実施形態のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 6 9 】

42. 前記アルブミン結合残基が、直鎖アルキル基、分枝アルキル基、-カルボン酸基または-カルボン酸等価体を有する基から選択される、前記実施形態のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 7 0 】

43. 前記アルブミン結合残基が、6~40個の炭素原子、8~26個の炭素原子または8~20個の炭素原子を有する、前記実施形態のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 7 1 】

44. 前記アルブミン結合残基が、ペプチド、例えば40未満のアミノ酸残基を含むペプチドである、前記実施形態のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 7 2 】

10

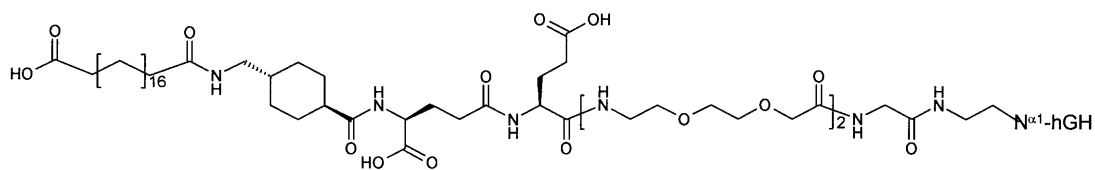
20

30

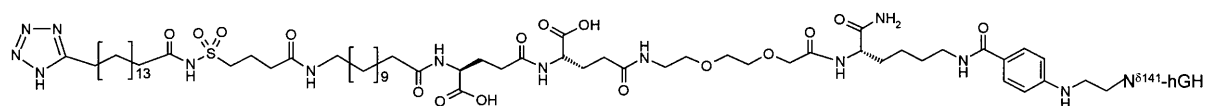
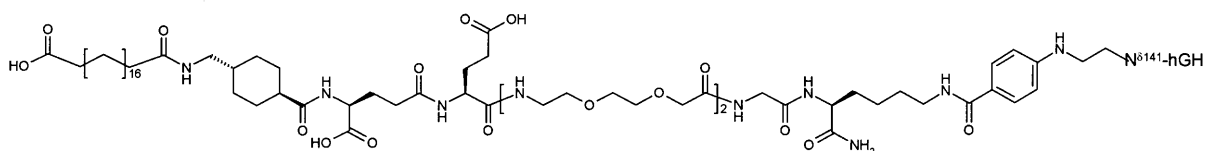
40

50

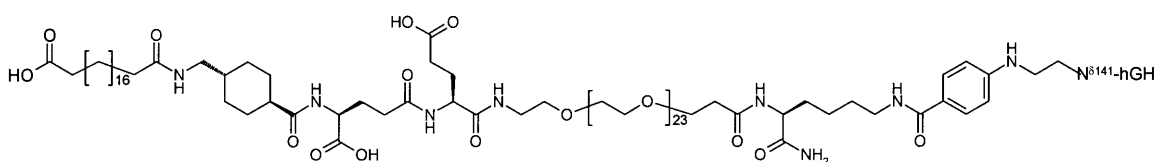
45. 前記化合物が、
 【 0 2 7 3 】
 【 化 1 1 - 1 】



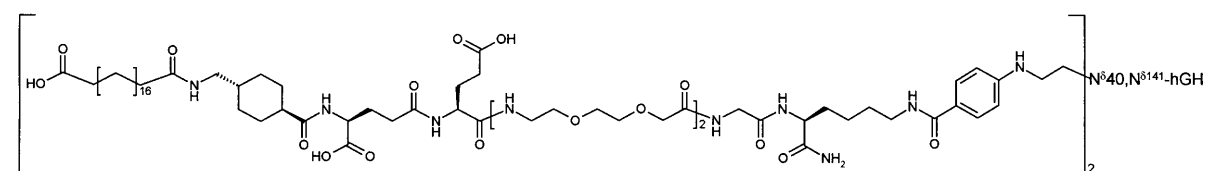
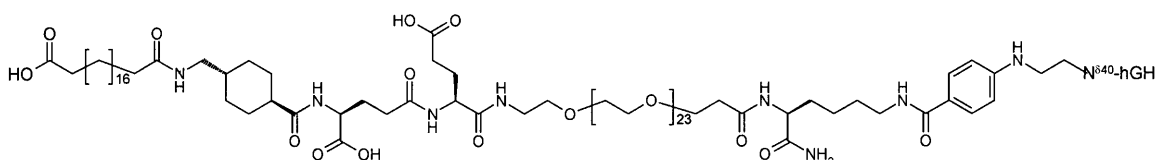
10



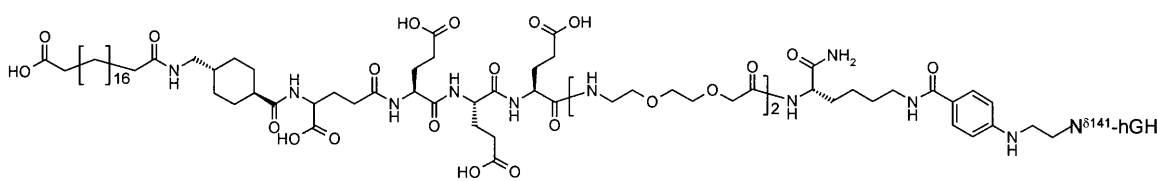
20



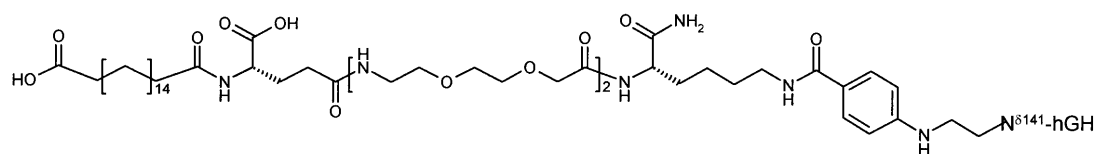
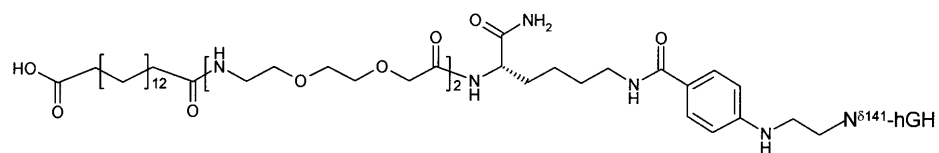
30



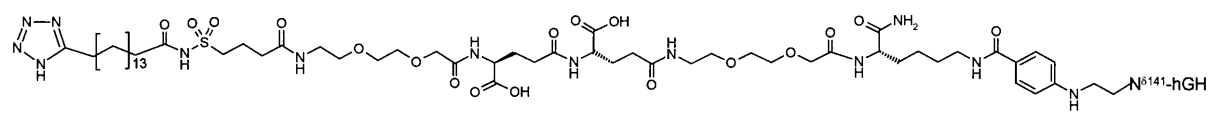
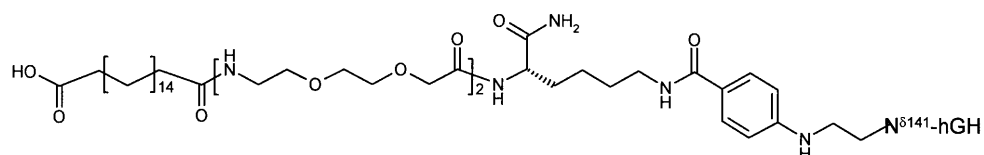
40



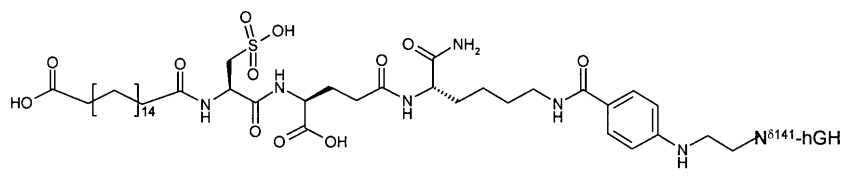
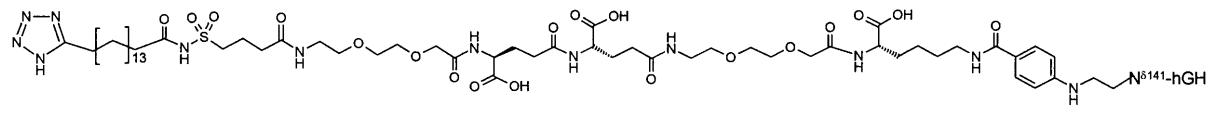
【化 1 1 - 2】



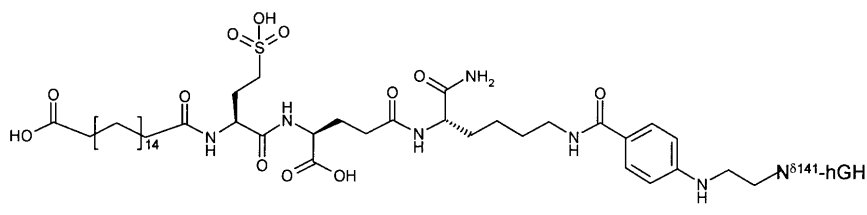
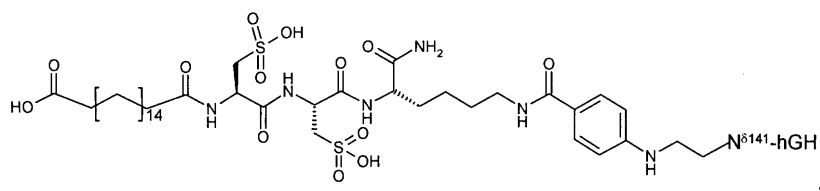
10



20

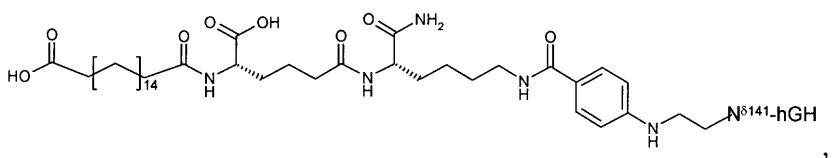
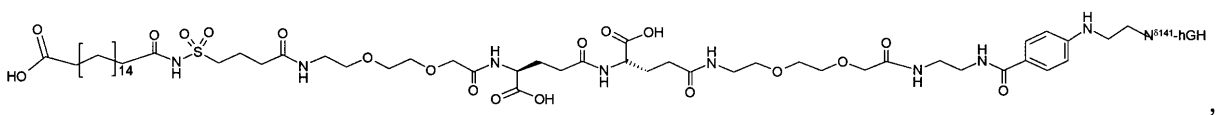
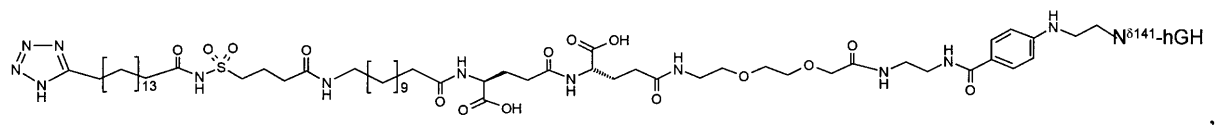
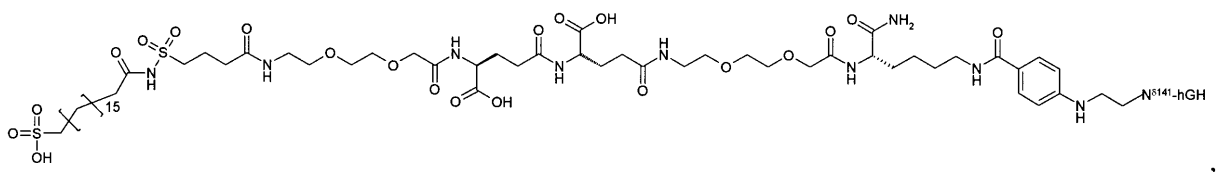
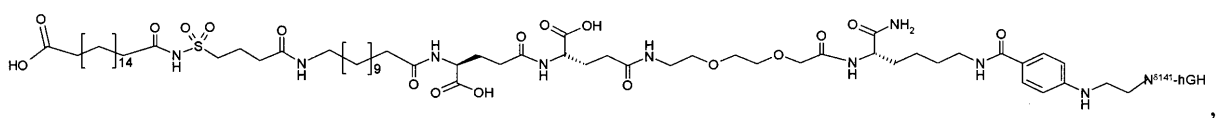
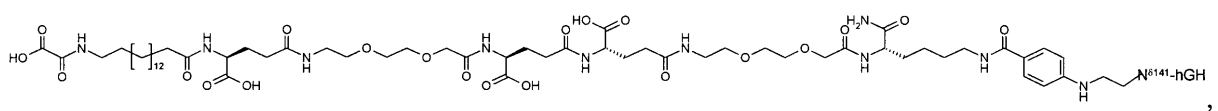
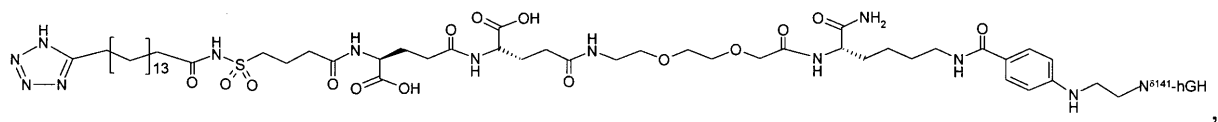
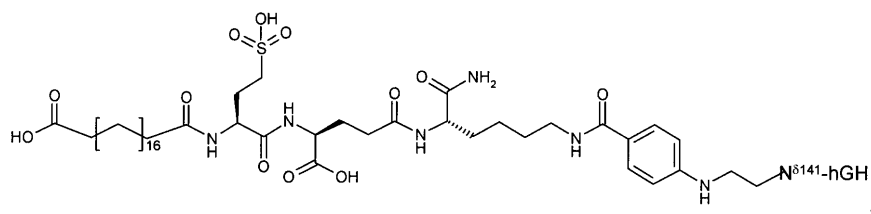


30

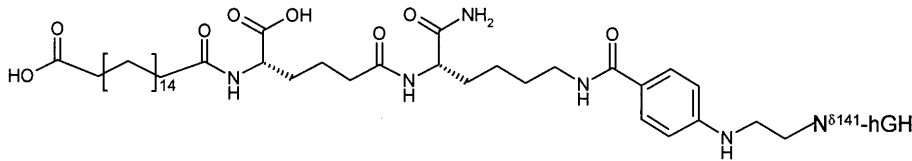
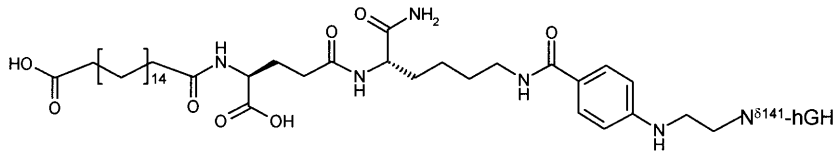


40

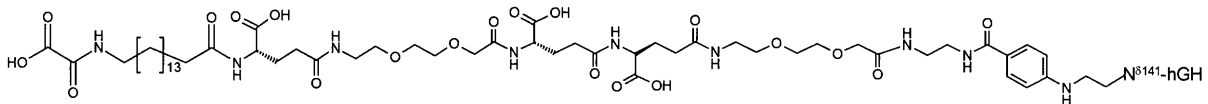
【化 1 1 - 3】



【化 1 1 - 4】



および



【 0 2 7 4 】

から選択される、前記実施形態のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 7 5 】

46. 治療法における使用のための、実施形態1から45のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 7 6 】

47. ターナー症候群; プラダーウィリ症候群 (PWS); ヌーナン症候群; ダウン症候群; 慢性腎疾患、若年性関節リウマチ; 嚢胞性線維症、HAART治療を受けている小児のHIV-感染 (HIV/HALS小児); 短い在胎齢で生まれた背が低い小児 (SGA); SGA以外で、非常に少ない出生時体重で生まれた小児の低身長 (VLBW); 骨格形成異常; 低軟骨形成症; 軟骨形成不全症; 特発性低身長 (ISS); 成人のGHD; 長骨、例えば脛骨、腓骨、大腿骨、上腕骨、橈骨、尺骨、鎖骨、中手、中足、および指などの骨折; スポンジ状骨、例えばスカル、手の底部、および足の底部などの骨折; 例えば手、膝、もしくは肩の腱または靱帯の手術後の患者; 伸延骨形成を完了したかまたは行っている患者; 股関節部もしくは円板の交換、半月板の修復、脊椎固定または例えば膝、股関節部、肩、肘、手根もしくは顎などのプロテーゼ固定後の患者; 骨接合材料、例えば釘、ネジおよびプレートなどを固定された患者; 骨折の癒合不能または変形癒合の患者; 例えば脛骨または母趾からの骨解剖後の患者; 移植片移植後の患者; 外傷または関節炎に起因する膝の関節軟骨の変性; ターナー症候群の患者の骨粗鬆症; 男性の骨粗鬆症; 慢性透析 (APCD) の成人患者; APCDの栄養失調関連の循環器疾患; APCDのカヘキシーの逆転; APCDの癌; APCDの慢性抽象的肺疾患; APCDのHIV; APCDの高齢者; APCDの慢性肝疾患; APCDの疲労症候群; クロウン病; 肝機能不全; HIV感染の男性; 短腸症候群; 中心性肥満; HIV関連のリポジストロフィー症候群 (HALS); 男性不妊症; 大きな待機手術、アルコール/薬物解毒または神経外傷後の患者; 老化; 虚弱な高齢者; 変形性関節症; 外傷性損傷軟骨; 勃起不全; 線維筋痛; 記憶障害; 鬱病; 外傷性脳損傷; クモ膜下出血; 非常に低い出生時体重; メタボリックシンドローム; グルココルチコイドミオパシー; 小児のグルココルチコイド治療による低身長の治療の方法、筋肉組織、神経組織または外傷の治療の促進; 損傷した組織への血流の促進もしくは改善; または損傷した組織の感染速度の低減の方法における使用のための実施形態1から45のいずれか一つに記載のコンジュゲート。

【 0 2 7 7 】

48. 実施形態1から45のいずれか一つに記載のコンジュゲートを、薬学的許容可能な添加剤と場合によって組み合わせる含む、医薬組成物。

【 0 2 7 8 】

49. TGase方法を介して、組換え型で生成された成長ホルモンまたは成長ホルモン類似体

10

20

30

40

50

にアルブミン結合剤リンカーを導入するステップを含む、実施形態1から45のいずれか一つに記載のコンジュゲートの調製の方法。

【0279】

50. 実施形態1から45のいずれか一つに記載のコンジュゲートの治療有効量の有効量を、それを必要とする患者に投与するステップを含む、成長ホルモン欠損症(GHD)を治療する方法。

【0280】

51. 実施形態1から45のいずれか一つに記載のコンジュゲートの治療有効量の有効量を、それを必要とする患者に投与するステップを含む、ターナー症候群; プラダーウィリ症候群(PWS); ヌーナン症候群; ダウン症候群; 慢性腎疾患、若年性関節リウマチ; 嚢胞性線維症、HAART治療を受けている小児のHIV-感染(HIV/HALS小児); 短い在胎齢で生まれた背が低い小児(SGA); SGA以外で、非常に少ない出生時体重で生まれた小児の低身長(VLBW); 骨格形成異常; 低軟骨形成症; 軟骨形成不全症; 特発性低身長(ISS); 成人のGHD; 長骨、例えば脛骨、腓骨、大腿骨、上腕骨、橈骨、尺骨、鎖骨、中手、中足、および指などの骨折; スポンジ状骨、例えばスカル、手の底部および足の底部などの骨折; 例えば手、膝、もしくは肩の腱または靱帯の手術後の患者; 伸延骨形成を完了したかまたは行っている患者; 股関節部もしくは円板の交換、半月板の修復、脊椎固定または例えば膝、股関節部、肩、肘、手根もしくは顎などのプロテーゼ固定後の患者; 骨接合材料、例えば釘、ネジおよびプレートなどを固定された患者; 骨折の癒合不能または変形癒合の患者; 例えば脛骨または母趾からの骨解剖後の患者; 移植片移植後の患者; 外傷または関節炎に起因する膝の関節軟骨の変性; ターナー症候群の患者の骨粗鬆症; 男性の骨粗鬆症; 慢性透析(APCD)の成人患者; APCDの栄養失調関連の循環器疾患; APCDのカヘキシーの逆転; APCDの癌; APCDの慢性抽象的肺疾患; APCDのHIV; APCDの高齢者; APCDの慢性肝疾患; APCDの疲労症候群; クロウン病; 肝機能不全; HIV感染の男性; 短腸症候群; 中心性肥満; HIV関連のリボジストロフィー症候群(HALS); 男性不妊症; 大きな待機手術、アルコール/薬物解毒または神経外傷後の患者; 老化; 虚弱な高齢者; 変形性関節症; 外傷性損傷軟骨; 勃起不全; 線維筋痛; 記憶障害; 鬱病; 外傷性脳損傷; クモ膜下出血; 非常に少ない出生時体重; メタボリックシンドローム; グルココルチコイドミオパシー; 小児のグルココルチコイド治療による低身長の治療の方法、筋肉組織、神経組織または外傷の治療の促進; 損傷した組織への血流の促進もしくは改善; または損傷した組織の感染速度の低減の方法。

【0281】

52. 成長ホルモン欠損症(GHD)の治療のための薬剤の製造における、実施形態1から45のいずれか一つに記載のコンジュゲートの使用。

【0282】

53. ターナー症候群; プラダーウィリ症候群(PWS); ヌーナン症候群; ダウン症候群; 慢性腎疾患、若年性関節リウマチ; 嚢胞性線維症、HAART治療を受けている小児のHIV-感染(HIV/HALS小児); 短い在胎齢で生まれた背が低い小児(SGA); 非常に少ない出生時体重で生まれた小児の低身長(VLBW) プタSGA; 骨格形成異常; 低軟骨形成症; 軟骨形成不全症; 特発性低身長(ISS); 成人のGHD; 長骨、例えば脛骨、腓骨、大腿骨、上腕骨、橈骨、尺骨、鎖骨、中手、中足、および指などの骨折; スポンジ状骨、例えばスカル、手の底部および足の底部などの骨折; 例えば、手、膝、もしくは肩の腱または靱帯の手術後の患者; 伸延骨形成を完了したかまたは行っている患者; 股関節部もしくは円板の交換、半月板の修復、脊椎固定または例えば膝、股関節部、肩、肘、手根もしくは顎などのプロテーゼ固定後の患者; 骨接合材料、例えば釘、ネジおよびプレートなどを固定された患者; 骨折の癒合不能または変形癒合の患者; 例えば脛骨または母趾からの骨解剖後の患者; 移植片移植後の患者; 外傷または関節炎に起因する膝の関節軟骨の変性; ターナー症候群の患者の骨粗鬆症; 男性の骨粗鬆症; 慢性透析(APCD)の成人患者; APCDの栄養失調関連の循環器疾患; APCDのカヘキシーの逆転; APCDの癌; APCDの慢性抽象的肺疾患; APCDのHIV; APCDの高齢者; APCDの慢性肝疾患; APCDの疲労症候群; クロウン病; 肝機能不全; HIV感染の男性; 短腸症候群; 中心性肥満; HIV関連のリボジストロフィー症候群(HALS); 男性不妊症; 大きな待機手術、アルコール/薬物解毒または

神経外傷後の患者;老化;虚弱な高齢者;変形性関節症;外傷性損傷軟骨;勃起不全;線維筋痛;
記憶障害;鬱病;外傷性脳損傷;クモ膜下出血;非常に少ない出生時体重;メタボリックシン
ドローム;グルココルチコイドミオパシー;小児のグルココルチコイド治療による低身長
の治療のための薬剤、筋肉組織、神経組織もしくは外傷の治療の促進;損傷した組織への血
流の促進もしくは改善;または損傷した組織の感染速度の低減のための薬剤の製造におけ
る、実施形態1から45のいずれか一つに記載のコンジュゲートの使用。

【0283】

要素について、例えば「含む」、「有する」、「含めた」または「含有する」などの用
語を用いた、本発明の任意の態様または実施形態の本明細書中の記述は、他に述べられて
いない限り、または文脈が明らかに矛盾しない限り、特定要素「からなる」、「基本的
にからなる」、または「を実質的に含む」本発明の同様の態様または実施形態への支持を提
供することを意図する(例えば、ある特定の要素を含む本明細書中に記載されている組成
物は、他に述べられていない限り、または文脈が明らかに矛盾しない限り、その要素から
なる組成物も記述していると理解されるべきである)。

10

【0284】

本発明は、適切な法で許容される最大の範囲まで、本明細書中に提示された態様または
特許請求の範囲で列挙された対象事項のすべての変更および同等物を含む。

【0285】

本発明は、以下の実施例でさらに例示されるが、これら実施例は保護範囲を制限するも
のと解釈されてはならない。前の記述および以下の実施例で開示された特徴は、別々およ
びこれらの任意の組合せの両方において、その多様な形態で、本発明を実現するための材
料であってよい。

20

【0286】

(実施例)

略語

amu=原子質量単位

hr(s)=時間

Hz=ヘルツ

L=リットル

M=モル

mbar=ミリバール

mg=ミリグラム

min=分

mL=ミリリットル

mM=ミリモル

mm=ミリメートル

mmol=ミリモル

nmol=ナノモル

mol=モル

N=正常

nm=ナノメートル

sec=秒

ppm=100万分の一

ESI=エレクトロスプレーイオン化

i.v.=静脈内

m/z=質量対電荷比

MS=質量分析

HPLC=高圧液体クロマトグラフィー

RP=逆相

HPLC-MS=高圧液体クロマトグラフィー-質量分析

30

40

50

NMR=核磁気共鳴分光法

p.o.=経口による

rtまたはRT=室温

s.c.=皮下

tr=保持時間

Boc=tert-ブチルオキシカルボニル

OtBu=tert-ブチルエステル

tBu=tert-ブチル

Boc-4-ABZ-OH=4-tert-ブトキシカルボニルアミノ安息香酸

DCM=ジクロロメタン、 CH_2Cl_2 、メチレンクロリド

DIC=ジイソプロピルカルボジイミド

DIPEA=N,N-ジイソプロピルエチルアミン

DMF=N,N-ジメチルホルムアミド

DMSO=ジメチルスルホキシド

DTT=ジチオトレイトール

EDAC=1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド

Et_2O =ジエチルエーテル

EtOAc=エチルアセテート

Fmoc=9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニル

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

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

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

H_2O =水

HOBt=1-ヒドロキシベンゾトリアゾール

MeCN=アセトニトリル

MeOH=メタノール

NaCl=ナトリウムクロリド

NaOH=ナトリウムヒドロキシド

NMP=N-メチルピロリジン-2-オン

OEG=(2[2-(アミノ)エトキシ]エトキシ)酢酸

TFA=トリフルオロ酢酸

THF=テトラヒドロフラン

TIS=トリイソプロピルシラン

CDCl_3 =重水素化クロロホルム

CD_3OD =テトラ重水素化メタノール

$\text{DMSO}-d_6$ =ヘキサ重水素化ジメチルスルホキシド

【0287】

実施例は、以下の一般的方法も使用する。

【0288】

hGH化合物を調製するための一般的な方法

成長ホルモン化合物のための遺伝子コーディングをプラスミドベクターへ組み換え技術によって挿入した。続いてこのプラスミドベクターを用いて、適切なE.coli菌株を変換した。hGHまたはGH変異体は、N末端メチオニンと共に、またはMEAE配列が続いてそこから切断されるMEAE癒合として発現しうる。

【0289】

細胞ストックを、25%グリセロール中に調製し、-80 で保存した。グリセロールストック菌株を、LBプレートに接種し、続いて37 で一晩インキュベートした。各プレートの内容物をLB培養液で洗浄し、発現のため500mLLB培養液で希釈した。培養物を220rpmで振盪させながら、37 でインキュベートし、 OD_{600} 0.6に到達するまでこれを続けた。これに続

10

20

30

40

50

いて、0.2mM IPTGを用いて、25℃で6時間誘導を実施し、細胞を最後に遠心分離で収穫した。

【0290】

続いて細胞を0.05% Tween20、2.5mM EDTA、10mMシステアミンおよび4Mウレアを含有する、10mMトリス-HCl、pH=9.0中に懸濁させ、細胞破壊器を用いて30kPSIで破壊した。上清を遠心分離で収集し、続いてクロマトグラフィーの精製を施した。

【0291】

精製は、イオン-交換クロマトグラフィーおよび疎水性相互作用を用いて実施し、続いてCHO細胞から発現するヒトジペプチジルペプチダーゼI(hDPPI)を用いてペプチドタグを取り除いた。最終の精製を、アイドプレシピテーションおよびイオン交換クロマトグラフィーにより達成した。精製はまた、これだけに限らないが、当業者には公知のイオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよび膜ベースの分離技法を用いて達成できる。

10

【0292】

精製された成長ホルモン化合物のタンパク質化学的特徴

MALDI-MSを用いて、無処置の精製されたタンパク質を分析した。観測した質量は、アミノ酸配列から推定した理論的質量に相当した。

【0293】

予想された連結ジスルフィド結合は、トリプシンおよびAspN消化を用いたペプチドマッピング、これに続く、DTTを用いたジスルフィド結合の還元前後の消化物のMALDI-MS分析により実証することができる。

20

【0294】

キャピラリー電気泳動法

キャピラリー電気泳動法を、Agilent Technologies 3DCEシステム(Agilent Technologies)を用いて行った。データ収集および信号処理は、Agilent Technologies 3DCE ChemStationを用いて行った。キャピラリーは、64.5cm(有効な長さ56.0cm)、50μm内径のAgilent製の「Extended Light Path Capillary」であった。UV検出は、200nm(16nmBw、基準380nmおよび50nmBw)で行った。ランニング電解質は、50mMホスフェート緩衝液pH7であった(方法A)。キャピラリーは、0.1M NaOHにて3分間、次いでミリQ水にて2分間、電解質にて3分間調整した。各動作後、キャピラリーを、ミリQ水にて2分間、次いでリン酸にて2分間、ミリQ水にて2分間洗い流した。水力学的注入を、50mbarで4.0秒間行った。電圧は+25kVであった。キャピラリーの温度は30℃であり、動作時間は10.5分であった。

30

【0295】

Maldi-Tof質量分析法

分子量を、Autoflex Maldi-Tof装置(Bruker)を用いて決定した。試料を、マトリックスとして -シアノ-4-ヒドロキシ-桂皮酸を用いて調製した。

【0296】

RP-HPLC

RP-HPLC分析は、Vydac218TP54 4.6mm×250mm 5μm C-18シリカカラム(The Separations Group、Hesperia)を用いてAgilent 1100システム上で行った。検出は、214nm、254nm、280nmおよび301nmでUVにより行った。カラムを、0.1%トリフルオロ酢酸/H₂Oで平衡化し、試料を、0.1%トリフルオロ酢酸/H₂Oに対して0~90%アセトニトリルの適切な勾配により溶出した。

40

【0297】

LC-MS

LC-MS分析は、Perkin Elmer Series 200マイクロポンプ2台、Perkin Elmer Series 200オートサンプラー1台、Applied Biosystems 785A UV検出器1台およびSedex 75蒸発光散乱検出器1台を備えたPE-Sciex API 100または150質量分析計で行った。Waters Xterra 3.0mm×50mm 5μm C-18シリカカラムを、1.5ml/分で室温にて溶出した。それを5%MeCH/0.1%TFA/H₂Oで平衡化し、5%MeCH/0.1%TFA/H₂Oで1分間溶出し、次いで、90%MeCH/0.1%TFA/H₂Oまで

50

の直線勾配で7分にわたって溶出した。検出は、214nmでのUV検出および蒸発光散乱により行った。カラム溶出液のフラクションを、PE-Sciex API 100質量分析計のイオンスプレー界面に導入した。300~2000amuの質量範囲を、動作中2秒ごとに走査した。

【0298】

タンパク質の定量

タンパク質濃度は、NanoDrop ND-1000 UV-分光光度計を用いて280nmでの吸光度を測定することにより推定した。

【0299】

誘導体化部位の決定のための酵素ペプチドマッピング

ペプチドマッピングを、還元およびアルキル化タンパク質のAsp-N消化を用いて行った。最初に、タンパク質を、標準的な手順に従ってDTTおよびヨードアセトアミドで処理した。アルキル化した生成物を、HPLCを用いて精製した。次いで、アルキル化し、精製した生成物を、1:100の酵素:基質の比でエンドプロテアーゼAsp-N(Boehringer)で終夜消化させた。消化物を、C-18カラムおよび標準TFA/MeCN緩衝系を用いてHPLC分離した。得られたペプチドマップを、非誘導体化hGHのものと比較し、保持時間の異なるフラクションを収集して、Maldi-tof質量分析を用いてさらに分析した。

10

【0300】

SDS page

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を、NuPAGE4%~12%Bis-Trisゲル(Invitrogen NP03 21BOX)を用いて行った。ゲルを、銀染色(Invitrogen LC6100)またはクマシー染色(Invitrogen LC6065)し、適切な場合、M. M. Kurfurst in Anal. Biochem. 200(2)、244~248(1992)に記載されているように、PEGについてもヨウ化バリウムで染色した。

20

【0301】

タンパク質クロマトグラフィー

タンパク質クロマトグラフィーを、Akta ExplorerクロマトグラフィーシステムおよびGE Health Care製カラムで行った。アニオン交換を、Q-Sepharose HP26/10カラムを用いて行った。出発緩衝液は、20mMトリエタノールアミン緩衝液pH8.5であり、溶出緩衝液は、出発緩衝液+0.2M NaClであった。化合物を、15カラム量にわたって0~75%溶出緩衝液の勾配で通常溶出した。脱塩および緩衝液交換は、HiPrep 26/10カラムを用いて行った。

30

【0302】

実施例で使用したTGaseは、米国第5156956号によるストレプトバーティシリウムモバラエンス由来の、微生物トランスグルタミナーゼである。

【0303】

LogPの計算

LogP値は、公開アルゴリズムを用いて、アルブミン結合剤部分および/または親水性スパーサー部分に対するmLogPおよび/またはcLogPとして計算することができる(J. Am. Chem. Soc. 86(1964年)5175~5180頁「A New Substituent Constant, , Derived from Partition Coefficients」、C. A. Lipin-skiら、Advanced Drug Delivery Reviews、23 (1997年)3~25頁「Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings」およびI. Moriguchi、S. Hirono、I. Nakagome、H. Hirano、Chem. and Pharm. Bull.、42(1994年) 976~978頁「Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods」。本明細書中では、clogP-Pomona College logP(オクタノール/水分配係数)を、Tripos(<http://www.tripos.com>)のSybyl7.0、clogPアルゴリズムバージョン4.2およびBioByte Corp(<http://www.biobyte.com/>)により提供されているその関連フラグメントデータベースバージョン22を用いて計算している。

40

【0304】

アッセイ(I)成長ホルモン活性を測定するBAF-3GHRアッセイ

BAF-3細胞(骨髄由来のマウスpro-Bリンパ系細胞株)は、成長および生存に対してもともとIL-3依存性であった。IL-3は、刺激によってGHが活性化する同じ伝達物質であるJAK-2

50

およびSTATを活性化する。ヒト成長ホルモン受容体のトランスフェクション後、細胞株は、成長ホルモン依存性細胞株に変わった。このクローンを使用して、BAF-3GHRの生存に対する異なる成長ホルモン試料の効果を評価することができる。

【0305】

BAF-3GHR細胞を、37℃、5%CO₂で24時間、飢餓培地(成長ホルモンなしの培地)内で成長させる。

【0306】

細胞を洗浄し、飢餓培地内に再懸濁させ、プレートに播種する。異なる濃度の10μlの成長ホルモン化合物もしくはヒト成長ホルモンまたは対照を細胞に添加し、37℃、5%CO₂で68時間プレートをインキュベートする。

10

【0307】

AlamarBlue(登録商標)を各ウェルに添加し、次いで細胞をもう4時間インキュベートする。このAlamarBlue(登録商標)は、レドックス指示薬であり、細胞代謝に本来伴う反応により還元され、これによって、生存細胞数の間接的な測定が得られる。

【0308】

最後に、細胞の代謝性活性を、蛍光プレートリーダーで測定する。試料内の光吸収を、成長ホルモン化合物または対照により刺激されなかった細胞の%で表現し、濃度反応曲線から、活性(細胞を50%刺激する化合物の量)を算出することができる。

【0309】

GHおよびhGH化合物コンジュゲートのプロテアーゼ分解速度の測定のためのアッセイ

20

目的の化合物を、37℃で24時間までの間、適切な緩衝液(例えばPBSまたは重炭酸アンモニウム)中の関連プロテアーゼ(トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、エラスターゼ、Factor Vila、Factor Xa、プロテアーゼK、カルボキシペプチダーゼ、DPPIV、中性のエンドペプチダーゼ、グランザイムB、プロリン-エンドペプチダーゼ、ブドウ球菌ペプチダーゼI、サーモリシン、トロニン、Arg-Cプロテアーゼ、Asp-Nエンドペプチダーゼ、カスパーゼ1-10、クロストリパイン、エンテロキナーゼ、グルタミルエンドペプチダーゼ、グランザイムB、LysC、LysN、プロリン-エンドペプチダーゼおよびブドウ球菌ペプチダーゼIまたは組織抽出物)により消化する。タンパク質分解の分解をHPLCアッセイで評価する。

【0310】

タンパク質分解の消化:

30

重炭酸アンモニウム緩衝液中の試験化合物溶液(1mg/ml)100μlを37℃で24時間までの間、酵素で分解する。副試料を、様々な時間点において採取し、1%TFAへの10回の希釈で試料を酸化することにより、タンパク質分解反応を中止する。これらの希釈された試料を逆相HPLCで分析することによって、タンパク質分解消化の程度を推定する。

【0311】

HPLC方法:

逆相VydacC42×150mmカラムに10μLの上記溶液を注入し、流速0.2ml/分で30分間に渡り、水中の0.1%TFAから0.1%TFAを含有する100%アセトニトリルへの直線勾配で溶出する。ピーク検出を214nmUV吸収で実施する。時間点t=Tにおいて無処置の化合物のパーセンテージ(%)を、時間点t=T(A_T)およびピーク領域t=0(A₀)でのピーク領域から(A_T/A₀)×100%として計算する。無処置の化合物のパーセンテージ(%)を、GraphPad Primsソフトウェアver.5.01を用いて、時間に対してプロットする。同様にGraphPadプリズムソフトウェアにより、半減期(Ty₂)を一つの相崩壊として計算する。使用しうる酵素の例として、エラスターゼ(Sigma、ブタ膵臓)およびキモトリプシン(Roche、シーケンシンググレード)が挙げられる。緩衝液の例は、50mM重炭酸アンモニウム、pH=8.5である。

40

【0312】

薬動学

静脈内の(i.v.)および/または皮下への(s.c.)単一用量投与後のオスのSprague Dawleyラットにおいて、実施例の化合物の薬物動態を調査する。

【0313】

50

試験化合物を、グリシン20mg/ml、マンニトール2mg/mL、NaHCO₃ 2.5 mg/mlからなり、pHを8.2に調整した希釈緩衝液中で1mg/mlの最終濃度に希釈する。

【0314】

体重250gのオスのSprague Dawleyラット内で試験化合物を試験する。尾静脈にi.v.で、または首にs.c.で、単回投与60nmol/kg(体重)の用量で、25Gニードルを用いて、試験化合物を投与する。

【0315】

Table 1(表1)に提示した以下のスケジュールに従い、各試験化合物の血液サンプリングを行う。

【0316】

【表1】

Table1. 各試験化合物に対する血液採取スケジュール

動物 番号	RoA	サンプリング時間 (h)												
		予防 投与	0.08	0.25	0.5	1	2	4	6	8	18	24	48	72
1	s.c.							×	×	×		×	×	×
2								×	×	×		×	×	×
3				×	×	×	×							
4				×	×	×	×							
5			×								×			
6			×								×			
7	i.v.				×	×			×	×		×	×	×
8					×	×			×	×		×	×	×
9		×	×								×			
10		×	×								×			

【0317】

各サンプリング時間に、25Gニードルを用いて尾静脈から、0.25mlの血液を採取する。この血液をEDTAコーティングされた試験チューブに試料として取り、氷上で保存し、4で10分間、1200×Gで遠心分離する。血漿をMicronicチューブに移し、分析まで-20で保存する。

【0318】

キャッチャーとしてモルモット抗-hGHポリクローナル抗体を用いて、ディテクターとしてビオチン化したhGH結合タンパク質(ヒトGH受容体の可溶性の部分)を用いて、サンドイッチELISAで試験化合物濃度を測定する。アッセイの検出の限界は0.2nMであった。

【0319】

WinNonlin Professional(Pharsight Inc., Mountain View, CA, USA)を用いて、各試験化合物の平均濃度-時間プロファイルについて、非コンパートメントの薬物動態学的分析を実施する。最終的半減期(t_{1/2})および平均滞留時間(MRT)の薬物動態学的パラメータの推定を算出する。

【0320】

脳下垂体摘出されたSprague Dawleyラットにおけるインビボの用量反応の実験

インビボの用量反応の関係を、脳下垂体摘出されたオスのSprague Dawleyラットで試験する。脳下垂体摘出されたラットは、周知であり、公認の成長ホルモン欠損症の動物モデルであり、下垂体の外科的な除去後、このラットでは成長ホルモンが生成されない。これはまた、ヒトにおける成長ホルモン欠損症の別の重要な臨床上的特徴である、インスリン様成長因子-1(IGF-1)の低い循環レベルももたらす。

【0321】

下垂体摘出術を、体重90～100gの週齢4週のオスのラットに実施する。動物は、手術後の3～4週間で実験に加わり、体重は100～110gである。体重手術後3～4週間の間に10%を超える体重増加があった動物は、実験に加えることができない。

【0322】

用量反応実験は通常、試験化合物の1～150nmol/ラットの5つの用量レベルを用いて実施する。

【0323】

消失

消失速度は、ブタで、通常、異種交配したLYDのメスブタ、少なくとも5匹で測定することができる。ブタを秤量し、絶食させ、カウンターおよび送信機を担持するための特別な「ブタのコート」を与え、実験開始前に単独のおりの中に配置する。すべてブタは、実験前の18時間の間絶食させる。

10

【0324】

動物には、黒いニードルストッパーが固定された、Novopen3(登録商標)およびNovoFine(登録商標)28Gニードルをそれぞれ用いて、首の左側および右側に皮下投与(60nmol)する。注射の深さは、5mmである。グリシン20mg/mL、マンニトール12mg/mL、NaHCO₃2.4mg/mLからなり、pH8.2に調整した緩衝液で試験溶液(化合物を含む)を希釈する。

【0325】

¹²⁵Iでのヨウ素化を、Chemistry & Isotope Lab. Novo Nordisk A/Sで実施する。最終の放射性配合物は、特定の放射性活性3μCi/mLを有し、3mLのPenfills中に提供される。使用時まで溶液は2～8℃で保存した。

20

【0326】

約24～48時間、携帯用機器で放射性の持続性薬剤の消失を測定する。

【0327】

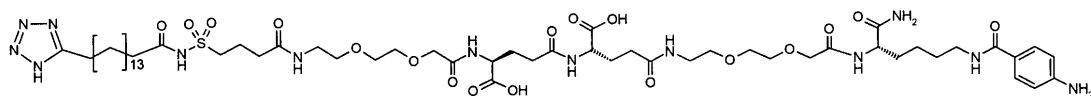
アルブミン結合剤の調製

(実施例1)

テトラゾールOEGリンカー(I)

【0328】

【化12】



30

(I)

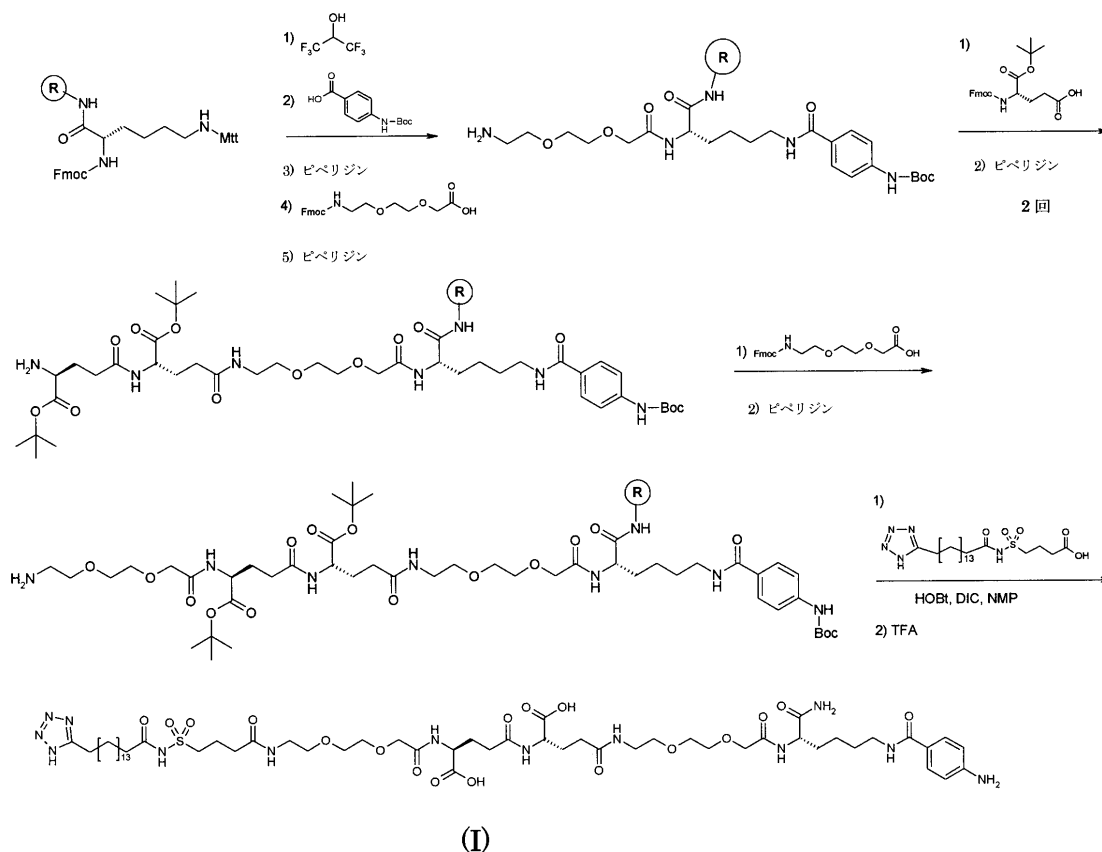
【0329】

テトラゾールOEGリンカー(I)を、スキーム1に従って合成した。

【0330】

【化 1 3】

スキーム 1.



10

20

30

40

50

【0 3 3 1】

リンクアミド樹脂 (2g、0.6mmol/g) 2g をフラスコに秤量した。樹脂を、NMP (3 × 30ml) で2時間膨張させた。

【0 3 3 2】

Fmoc基の除去：樹脂をNMP (30ml) 中の25%ピペリジンと共に10分間振とうした。樹脂をドレインし、NMP (30ml) 中の25%ピペリジンで1時間処理し、次いでドレインし、NMP (6 × 30ml) で洗浄した。

【0 3 3 3】

Fmoc-Lys(Mtt)-OHおよびHOBTをフラスコに秤量し、NMP (30ml、0.5mM) 中のプロモフェノールブルーに溶解させた。この溶液を、上記のドレインした樹脂に加え、次いでDICを加えた。反応物を、大気温度で21時間振とうした。樹脂をドレインし、NMP (6 × 30 ml) で洗浄し、次いでDCM (3 × 30ml) で洗浄した。

【0 3 3 4】

樹脂を、ヘキサフルオロイソプロパノール (20ml) で10分間処理した。10分間振とうした。樹脂をドレインし、DCM (3 × 30ml) で洗浄した。再び、樹脂をヘキサフルオロイソプロパノール (20ml) で10分間処理し、10分間振とうした。樹脂をドレインし、DCM (3 × 30ml) で洗浄し、次いでドレインし、NMP (3 × 30ml) で洗浄した。

【0 3 3 5】

Boc-4-ABZ-OHおよびHOBTをフラスコに秤量し、NMP (30ml、0.5mM) 中のプロモフェノールブルーに溶解させた。この溶液を、上記のドレインした樹脂に加え、次いでDICを加えた。反応物を、大気温度で振とうした。樹脂をドレインし、NMP (6 × 30ml) で洗浄した。

【0 3 3 6】

Fmoc基の除去：樹脂をNMP (10ml) 中25%ピペリジンと共に10分間振とうした。樹脂をドレインし、NMP (10ml) 中の25%ピペリジンで1時間処理し、次いでドレインし、NMP (6 × 15ml) で洗浄した。

【0337】

Fmoc-OEG-OHおよびHOBTをフラスコに秤量し、NMP(15ml、0.5mM)中のプロモフェノールブルーに溶解させた。この溶液を、ドレインした樹脂に加え、次いでDICを加えた。反応物を、大気温度で23時間振とうした。樹脂をドレインし、NMP(6×15ml)で洗浄した。

【0338】

Fmoc基の除去:樹脂をNMP(10ml)中の25%ピペリジンと共に10分間振とうした。樹脂をドレインし、NMP(10ml)中の25%ピペリジンで1時間処理し、次いでドレインし、NMP(6×15ml)で洗浄した。

【0339】

Fmoc-Glu-O-t-BuおよびHOBTをフラスコに秤量し、NMP(15ml、0.5mM)中のプロモフェノールブルーに溶解させた。この溶液を、ドレインした樹脂に加え、次いでDICを加えた。反応物を、大気温度で18時間振とうした。樹脂をドレインし、NMP(6×15ml)で洗浄した。

10

【0340】

Fmoc基の除去:樹脂をNMP(10ml)中の25%ピペリジンと共に10分間振とうした。樹脂をドレインし、NMP(10ml)中の25%ピペリジンで1時間処理し、次いでドレインし、NMP(6×15ml)で洗浄した。

【0341】

Fmoc-Glu-O-t-BuおよびHOBTをフラスコに秤量し、NMP中の0.5mMプロモフェノールブルー15mlに溶解させた。この溶液を、ドレインした樹脂に加え、次いでDICを加えた。反応物を、大気温度で18時間振とうした。樹脂をドレインし、NMP(6×15ml)で洗浄した。

20

【0342】

Fmoc基の除去:樹脂をNMP(10ml)中の25%ピペリジンと共に10分間振とうした。樹脂をドレインし、NMP(10ml)中の25%ピペリジンで1時間処理し、次いでドレインし、NMP(6×15ml)で洗浄した。

【0343】

Fmoc-OEG-OHおよびHOBTをフラスコに秤量し、NMP(15ml、0.5mM)中のプロモフェノールブルーに溶解させた。この溶液を、ドレインした樹脂に加え、次いでDICを加えた。反応物を、大気温度で振とうした。樹脂をドレインし、NMP(6×15ml)で洗浄した。

【0344】

Fmoc基の除去:樹脂をNMP(10ml)中の25%ピペリジンと共に10分間振とうした。樹脂をドレインし、NMP(10ml)中の25%ピペリジンで1時間処理し、次いでドレインし、NMP(6×15ml)で洗浄した。

30

【0345】

4-(16-1H-テトラゾール-5-イル-ヘキサデカノイルスルファモイル)酪酸およびHOBTをフラスコに秤量し、NMP(15ml、0.5mM)中のプロモフェノールブルーに溶解させた。この溶液を、ドレインした樹脂に加え、次いでDICを加えた。反応物を、大気温度で21時間振とうした。樹脂をドレインし、NMP(6×15ml)で洗浄し、次いでドレインし、DCM(6×15ml)で洗浄した。

【0346】

樹脂を水(10ml)+DCM(0.25ml)およびTIPS(0.25ml)中の95%TFAの混合物で切断した。樹脂を大気温度で2時間浸透し、冷ジエチルエーテル(75ml)に濾過浸透させた。得られた沈殿物を、遠心分離により単離し、次いでジエチルエーテルで洗浄し(3×)、48時間真空乾燥させ、化合物の粗製物300mgを得た。

40

TOF-MS: 反応時間=4.7分、質量1268.71

【0347】

粗製化合物をprep-HPLC(GILSON)で精製した。T2145-10;30 80%MeCN。プールしたフラクションを、ロータリーエバポレーターで蒸発乾燥させ、残基を、H₂O/MeCN1:1に溶解させ、終夜凍結乾燥させ、化合物170mgを得た。

【0348】

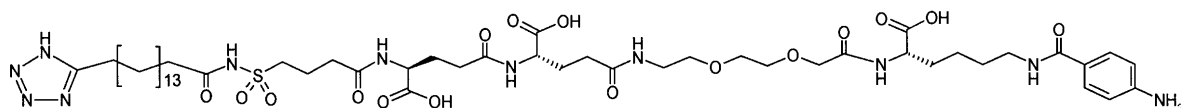
(実施例2)

50

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang樹脂を用いて調製してもよい。

【0349】

【化14】



【0350】

計算質量1124.33

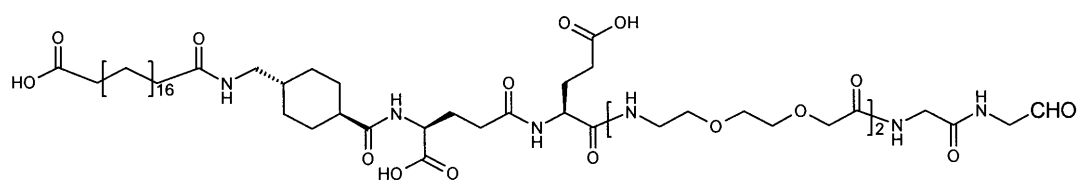
【0351】

(実施例3)

上記の実施例1に記載されており、かつ以下に示されているのと同様の方法で、以下の化合物を、出発物質としてBoc-Gly-PAM樹脂を用いて調製した。

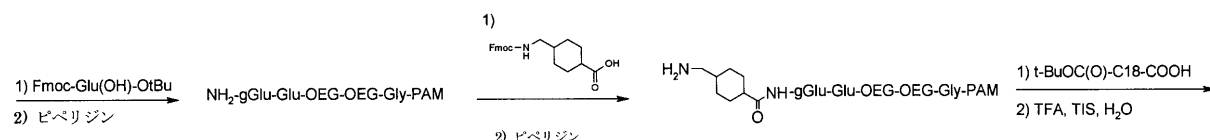
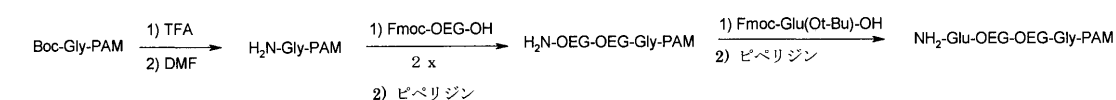
【0352】

【化15】

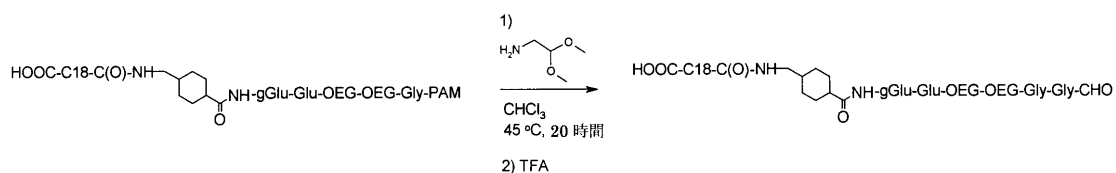


10

20



30



【0353】

TOF-MS: 質量1128.38

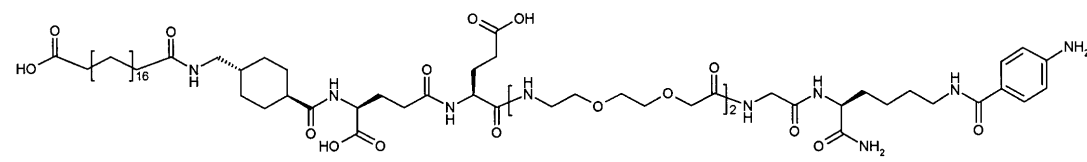
【0354】

(実施例4)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【0355】

【化16】



50

【 0 3 5 6 】

TOF-MS: 質量1333.64

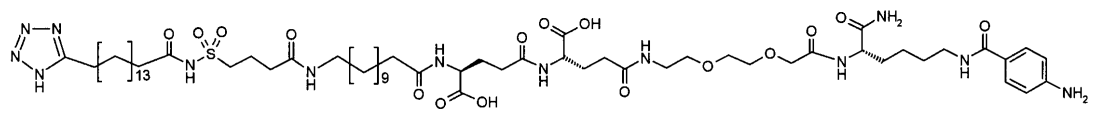
【 0 3 5 7 】

(実施例5)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【 0 3 5 8 】

【 化 1 7 】



10

【 0 3 5 9 】

TOF-MS: 質量1320.67

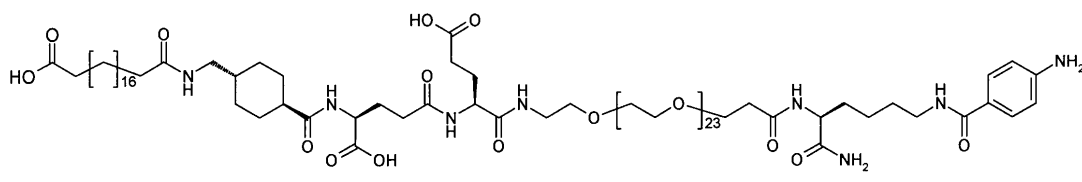
【 0 3 6 0 】

(実施例6)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【 0 3 6 1 】

【 化 1 8 】



20

【 0 3 6 2 】

TOF-MS: 質量2114.64

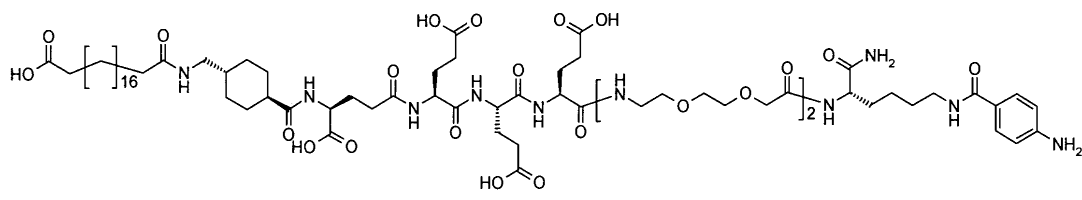
【 0 3 6 3 】

(実施例7)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【 0 3 6 4 】

【 化 1 9 】



30

【 0 3 6 5 】

TOF-MS: 質量1534.82

【 0 3 6 6 】

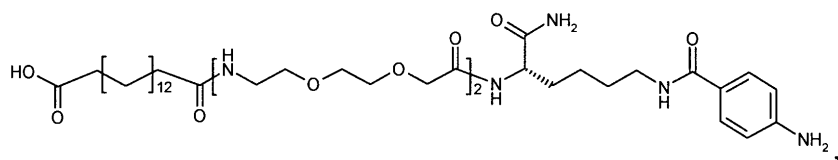
(実施例8)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【 0 3 6 7 】

40

【化 2 0】



【 0 3 6 8 】

TOF-MS: 質量823.05

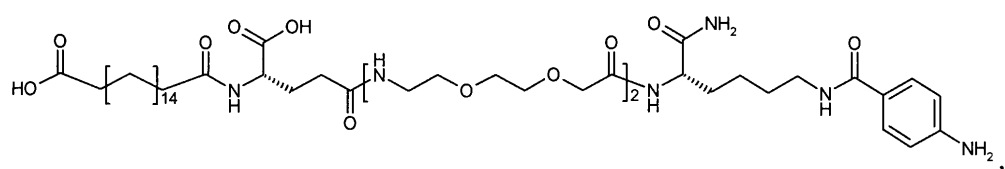
【 0 3 6 9 】

(実施例9)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang樹脂を用いて調製した。

【 0 3 7 0 】

【化 2 1】



【 0 3 7 1 】

TOF-MS: 質量980.22

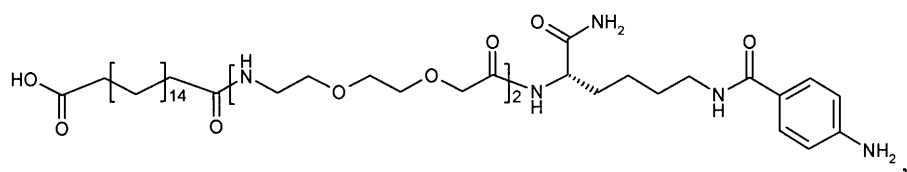
【 0 3 7 2 】

(実施例10)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【 0 3 7 3 】

【化 2 2】



【 0 3 7 4 】

TOF-MS: 質量851.10

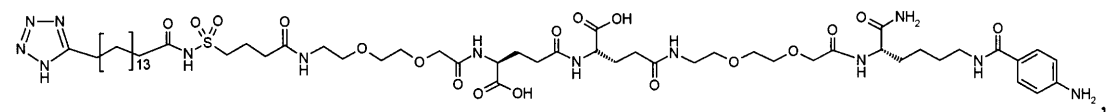
【 0 3 7 5 】

(実施例11)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【 0 3 7 6 】

【化 2 3】



【 0 3 7 7 】

TOF-MS: 質量1258.51

【 0 3 7 8 】

(実施例12)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびWang樹脂を用いて調製した。

10

20

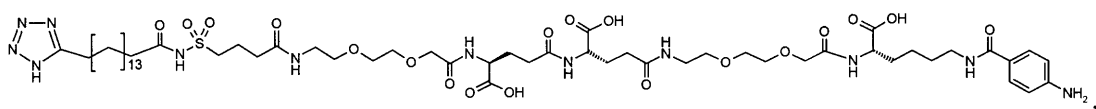
30

40

50

【 0 3 7 9 】

【 化 2 4 】



【 0 3 8 0 】

TOF-MS: 質量1269.49

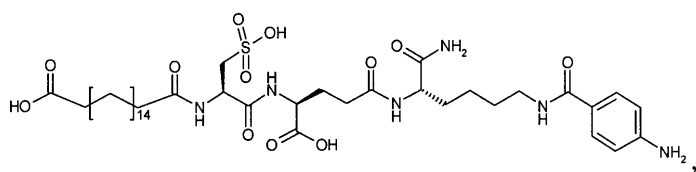
【 0 3 8 1 】

(実施例13)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【 0 3 8 2 】

【 化 2 5 】



【 0 3 8 3 】

TOF-MS: 質量841.04

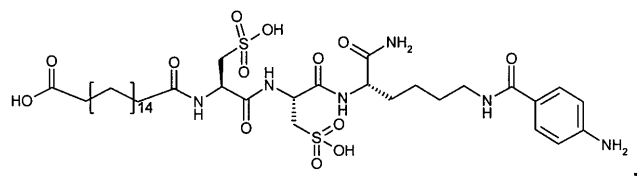
【 0 3 8 4 】

(実施例14)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製してもよい。

【 0 3 8 5 】

【 化 2 6 】



【 0 3 8 6 】

計算質量863.07

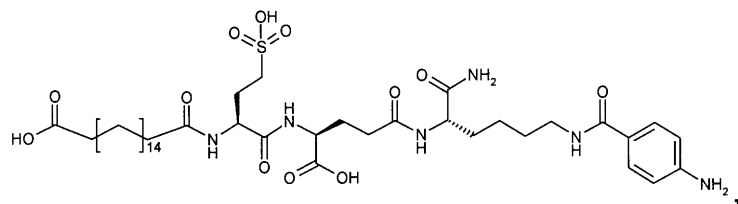
【 0 3 8 7 】

(実施例15)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製してもよい。

【 0 3 8 8 】

【 化 2 7 】



【 0 3 8 9 】

計算質量855.07

【 0 3 9 0 】

10

20

30

40

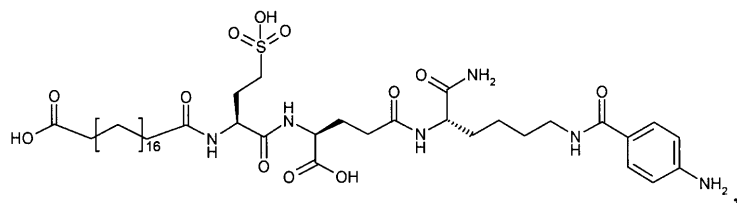
50

(実施例16)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製してもよい。

【0391】

【化28】



10

【0392】

計算質量883.12

【0393】

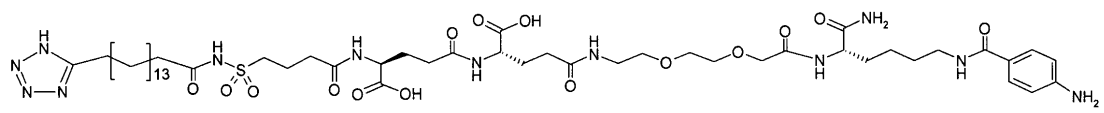
(実施例17)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【0394】

【化29】

20



【0395】

TOF-MS: 質量1123.35

【0396】

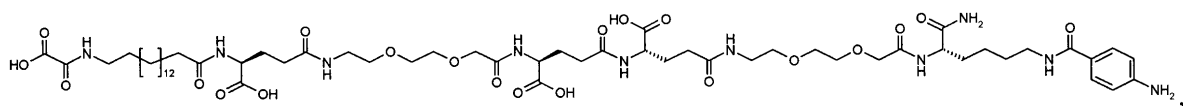
(実施例18)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【0397】

【化30】

30



【0398】

TOF-MS: 反応時間=4.7分、質量1267.45

【0399】

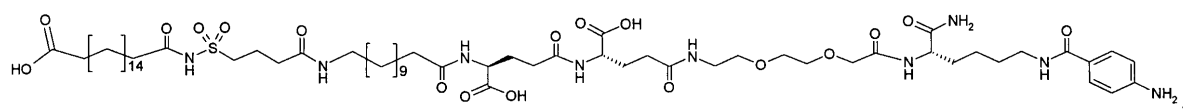
(実施例19)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【0400】

【化31】

40



【0401】

TOF-MS: 質量1310.67

【0402】

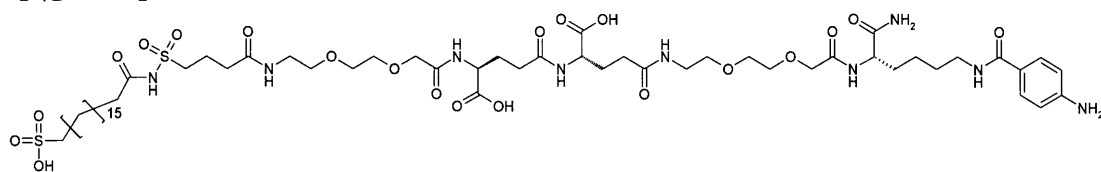
50

(実施例20)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製してもよい。

【0403】

【化32】



10

【0404】

計算質量1308.58

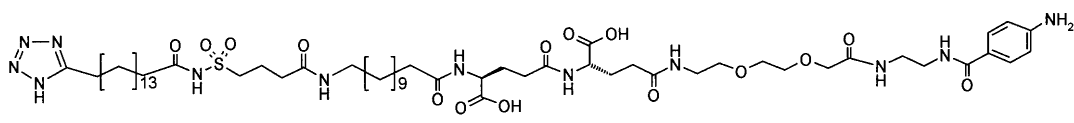
【0405】

(実施例21)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Glu(ODmab)-OHおよび2-クロロトリチルクロリド樹脂を用いて調製してもよい。

【0406】

【化33】



20

【0407】

計算質量1235.56

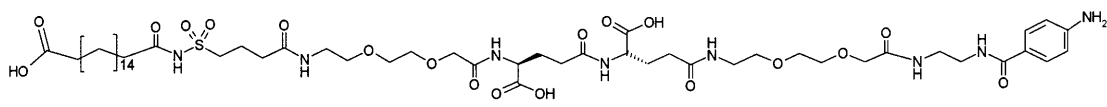
【0408】

(実施例22)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Glu(ODmab)-OHおよび2-クロロトリチルクロリド樹脂を用いて調製してもよい。

【0409】

【化34】



30

【0410】

計算質量1173.40

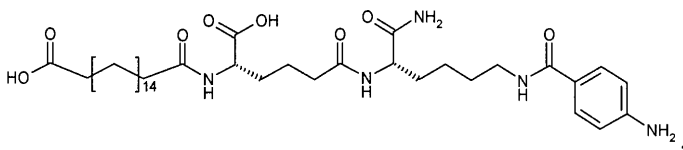
【0411】

(実施例23)

上記の実施例1に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製した。

【0412】

【化35】



40

【0413】

TOF-MS: 質量703.93

【0414】

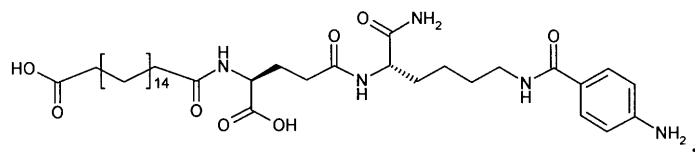
(実施例24)

50

上記の実施例1に記載されていると同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Lys(Mtt)-OHおよびリンクアミド樹脂を用いて調製してもよい。

【0415】

【化36】



【0416】

計算質量689.90

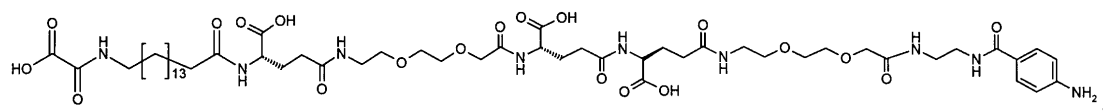
【0417】

(実施例25)

上記の実施例1に記載されていると同様の方法で、以下の化合物をFmoc-Glu(ODmab)-OHおよび2-クロロトリチルクロリド樹脂を用いて調製してもよい。

【0418】

【化37】



【0419】

計算質量1182.34

【0420】

GHアルブミン結合剤化合物の調製

(実施例26)

1. 一般式A-W-B1-NH2のアルブミン結合剤と、アミノ基転移したおよび酸化したGH化合物(I)とのカップリング

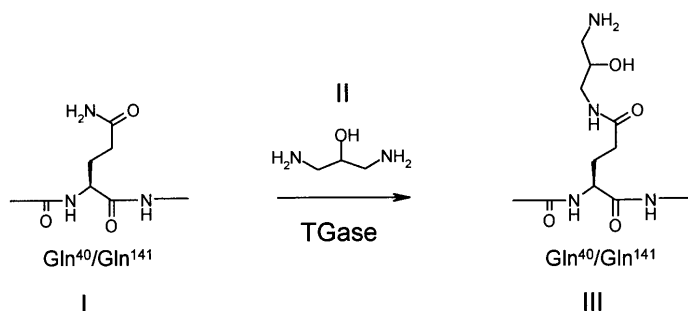
アルデヒドハンドルと、グルタミン残基上のGHを結合させるためのトランスグルタミナーゼの使用は、国際公開第2005/070468号でこれまで記載されてきた。式A-W-B1-NH2のアルブミン結合剤ベースのリンカーの結合のため、本発明による方法を使用することができる。使用するTGaseは、米国第5156956号による、ストレプトバクテリウムモバラエンス由来の微生物トランスグルタミナーゼである。

【0421】

この反応は、以下の通り実施することができる：国際公開第2005/070468号に記載の通り、1,3-ジアミノ-2-プロパノール(II)を用いて、GH(I)を最初にアミノ基転移する：

【0422】

【化38】



【0423】

次のステップで、アミノ基転移したGH(III)にペリオデートを添加する。通常、酸化は、低温、例えば4~10 で、30分間に渡り、場合によって暗所で行う。ペリオデートは、GH内のメチオニン残基を、これらの対応するメチオニンスルホキシド残基へと酸化するこ

10

20

30

40

50

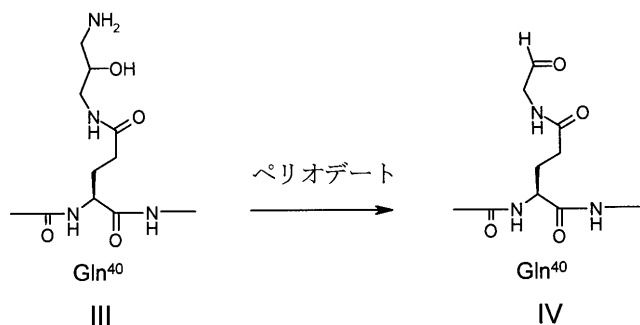
とができる。この酸化リスクを最小限に抑えるため、小分子有機チオエーテルをペリオデート酸化中に添加してもよい。適切な有機チオエーテルは、3-メチルチオプロパン-1-オールであるが、当業者であれば他を提案することができるであろう。

【0424】

アミノ基転移したGH化合物(III)の酸化：

【0425】

【化39】



10

【0426】

緩衝変化(buffer change)を実施することによって、効率的なナトリウムシアノボロハイドライド還元に必要な酸性溶液を得ることができる。通常、過剰なA-W-B1-NH₂アミンを使用し、時間の経過と共により少ない分量のシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加することができる。

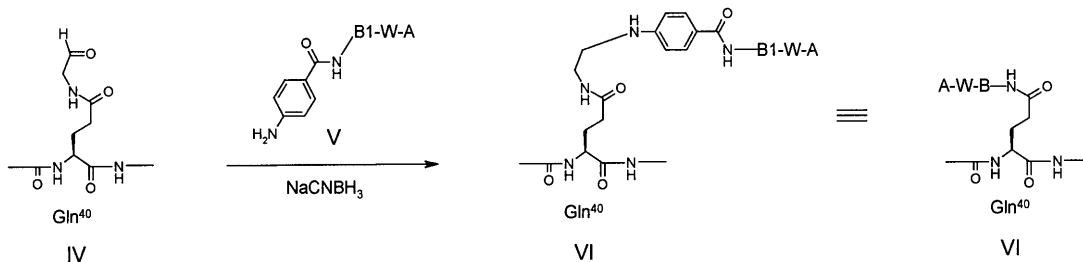
20

【0427】

アルブミン結合剤リンカー(V)を用いた(IV)の還元的アミノ化：

【0428】

【化40】



30

【0429】

後半の反応を以下の通り実施することができる：

酸化したアミノ基転移したGH(IV)の溶液を、pH6.00の、アルブミン結合剤リンカー(V)のAcOH(1.5ml)と50mM MES(0.5ml)の混合物中溶液に添加する。生成した反応混合物を室温で30分間穏やかに振盪させ、30分後の時点でNaCNBH₃溶液(15 μL、(500 μLのMilli-Q water+AcOH(15 μL)中に溶解した22mgのNaCNBH₃))を添加する。試料をスズ箔で覆い、室温で一晩撹拌する。

40

【0430】

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

3×8分間の4000rpm/分での遠心分離により、Amicon Ultra15装置(Ultracel 10Kチューブ)を用いて、純水(3×)で緩衝変化により酢酸を取り除く。次いでこの混合物を、Amicon Filter装置を用いて、20mM TEA、pH:8.50へと緩衝変化させ、20mM TEAを用いて最終量50mlまで希釈し、HiLoad Q Sepharose、26/10カラムに充填する。最初にカラムを20mM TEA、pH8.50(緩衝液A)で洗浄し、次いで20mM TEA、500mM NaCl、pH8.50(緩衝液B)を用いて、20CV上での0~100%(B)勾配で、流速2ml/分で溶出させる。プールした留分にAmicon Ultra15装置(Ultracel 10Kチューブ)を用いて、3×8分の間、4000rpm/分で遠心分離することによ

50

り、純水中の10mM炭酸水素アンモニウム緩衝液へと5回緩衝変化を行った。

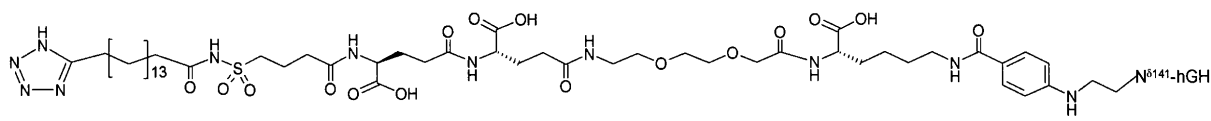
【0431】

(実施例27)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例2からのアルブミン結合剤を用いて調製してもよい。

【0432】

【化41】



10

【0433】

計算質量23.473,81

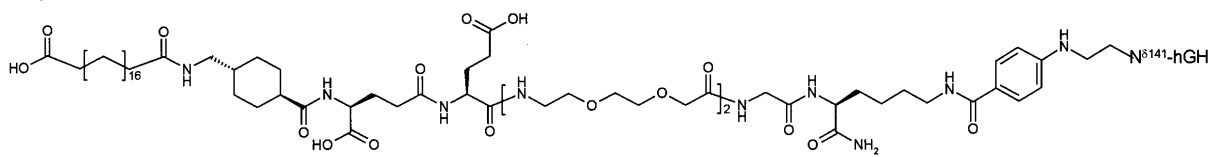
【0434】

(実施例28)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例4からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【0435】

【化42】



20

【0436】

TOF-MS: 質量23.428

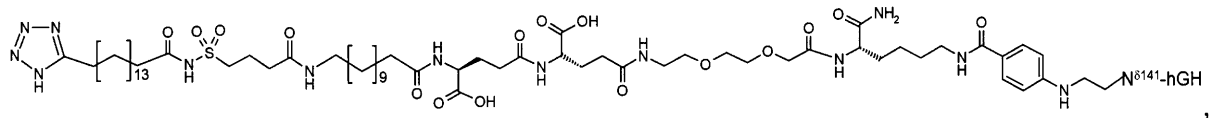
【0437】

(実施例29)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例5からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【0438】

【化43】



30

【0439】

TOF-MS: 質量23.472,40

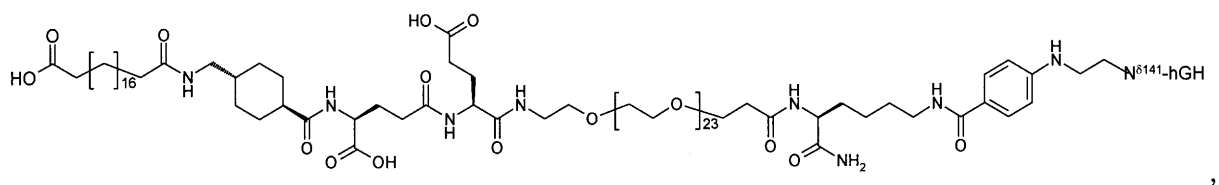
【0440】

(実施例30)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例6からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【0441】

【化44】



40

【0442】

50

TOF-MS: 質量24.265,71

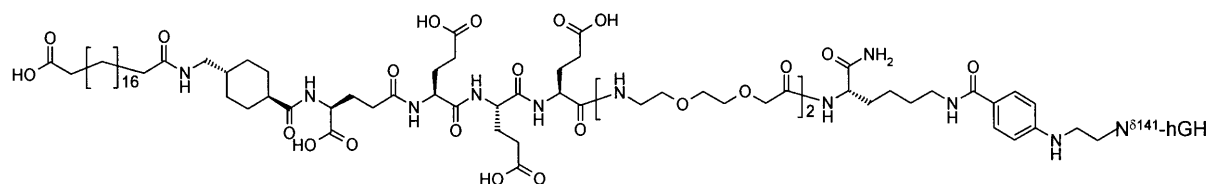
【0443】

(実施例31)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例7からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【0444】

【化45】



10

【0445】

TOF-MS: 質量23.686,83

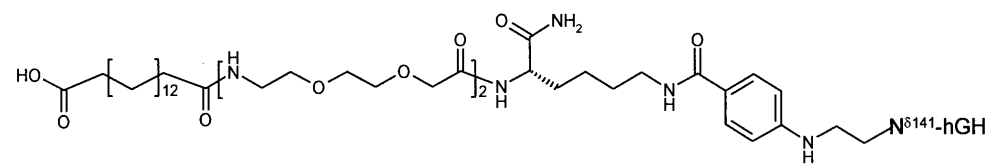
【0446】

(実施例32)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例8からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【0447】

【化46】



20

【0448】

TOF-MS: 質量22.974,75

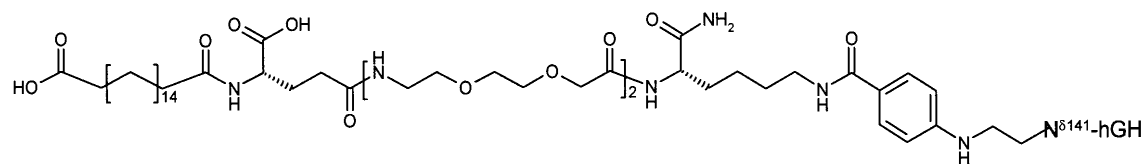
【0449】

(実施例33)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例9からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【0450】

【化47】



30

【0451】

TOF-MS: 質量23.131,31

【0452】

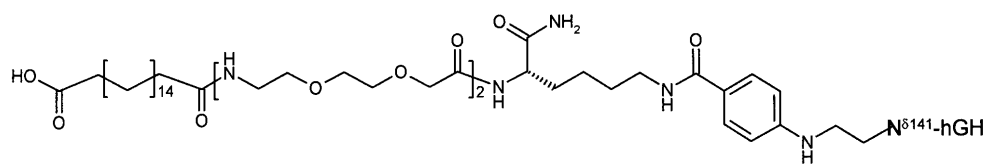
(実施例34)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例10からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【0453】

40

【化 4 8】



【 0 4 5 4】

TOF-MS: 質量23.002

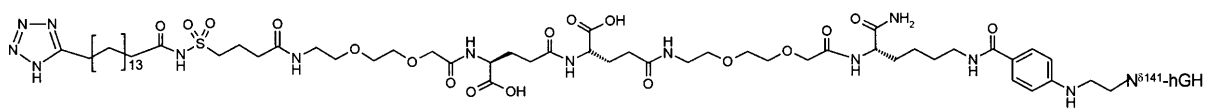
【 0 4 5 5】

(実施例35)

上記の実施例26に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物を実施例11からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【 0 4 5 6】

【化 4 9】



【 0 4 5 7】

TOF-MS: 質量23.419,59

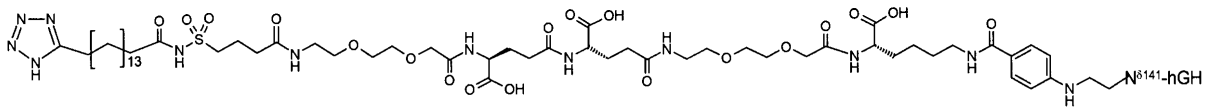
【 0 4 5 8】

(実施例36)

上記の実施例26に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物を実施例12からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【 0 4 5 9】

【化 5 0】



【 0 4 6 0】

TOF-MS: 質量23.420,58

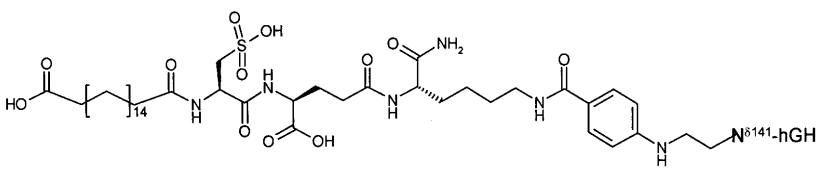
【 0 4 6 1】

(実施例37)

上記の実施例26に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物を実施例13からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【 0 4 6 2】

【化 5 1】



【 0 4 6 3】

TOF-MS: 質量22.992,13

【 0 4 6 4】

(実施例38)

上記の実施例26に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物を実施例14からのアルブミン結合剤を用いて調製してもよい。

【 0 4 6 5】

10

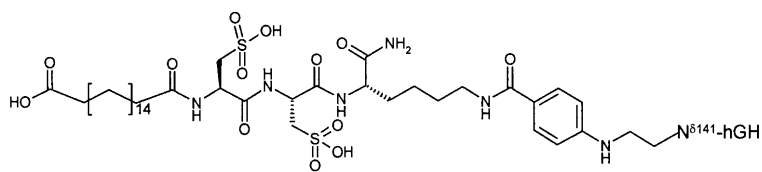
20

30

40

50

【化 5 2】



【 0 4 6 6 】

計算質量23.015,15

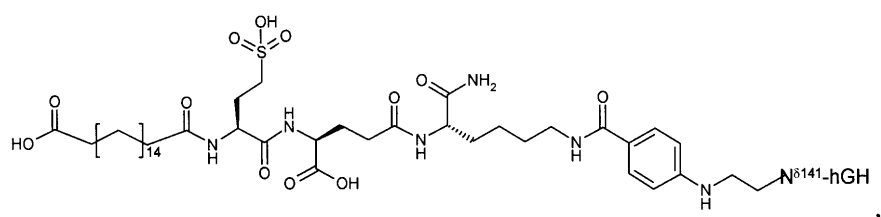
【 0 4 6 7 】

(実施例39)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例15からのアルブミン結合剤を用いて調製してもよい。

【 0 4 6 8 】

【化 5 3】



【 0 4 6 9 】

計算質量23.006,15

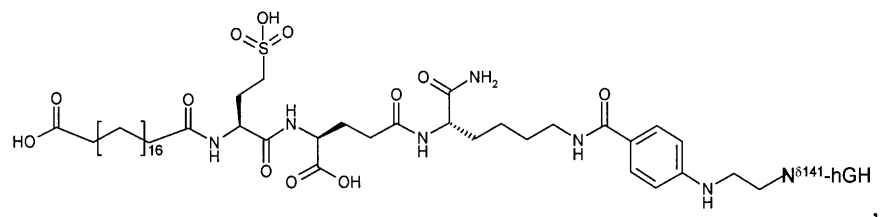
【 0 4 7 0 】

(実施例40)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例16からのアルブミン結合剤を用いて調製してもよい。

【 0 4 7 1 】

【化 5 4】



【 0 4 7 2 】

計算質量23.034,18

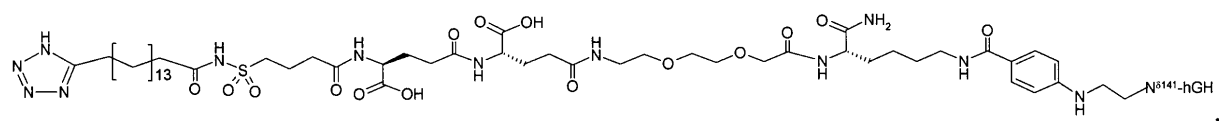
【 0 4 7 3 】

(実施例41)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例17からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【 0 4 7 4 】

【化 5 5】



【 0 4 7 5 】

TOF-MS: 質量23.273,97

【 0 4 7 6 】

(実施例42)

10

20

30

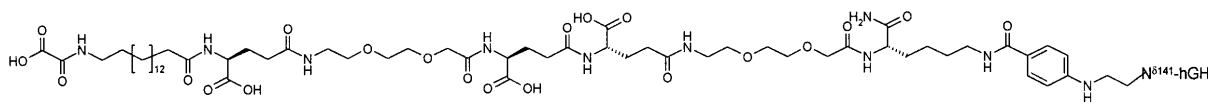
40

50

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例18からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【0477】

【化56】



【0478】

TOF-MS: 質量23.333

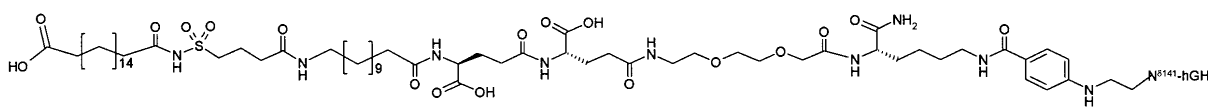
【0479】

(実施例43)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例19からのアルブミン結合剤を用いて調製してもよい。

【0480】

【化57】



【0481】

計算質量23.461,75

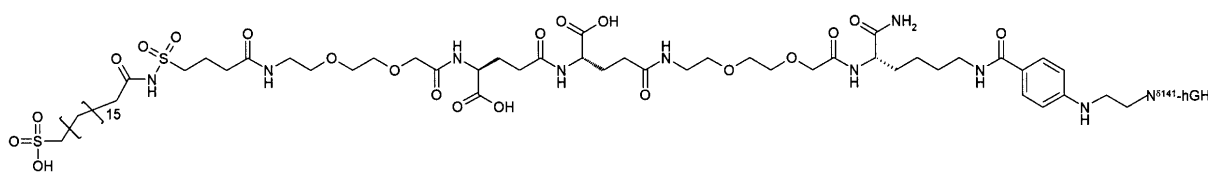
【0482】

(実施例44)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例20からのアルブミン結合剤を用いて調製してもよい。

【0483】

【化58】



【0484】

計算質量23.459,67

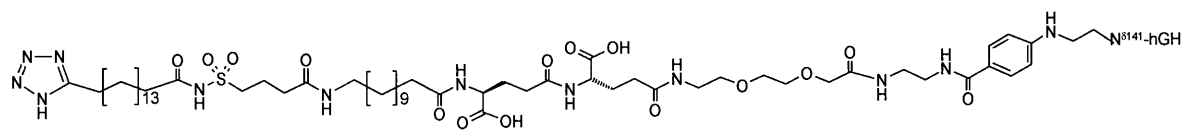
【0485】

(実施例45)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例21からのアルブミン結合剤を用いて調製してもよい。

【0486】

【化59】



【0487】

計算質量23.386,65

【0488】

(実施例46)

上記の実施例26に記載されていると同様の方法で、以下の化合物を実施例22からのアルブミン結合剤を用いて調製してもよい。

10

20

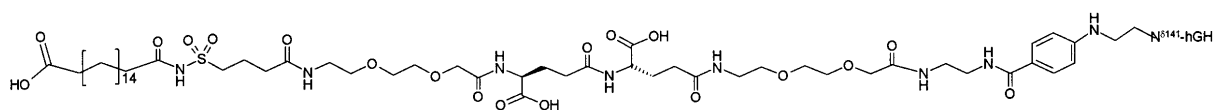
30

40

50

【 0 4 8 9 】

【 化 6 0 】



【 0 4 9 0 】

計算質量23.324,48

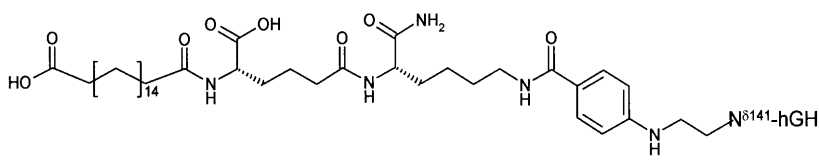
【 0 4 9 1 】

(実施例47)

上記の実施例26に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物を実施例23からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【 0 4 9 2 】

【 化 6 1 】



【 0 4 9 3 】

TOF-MS: 質量22.841

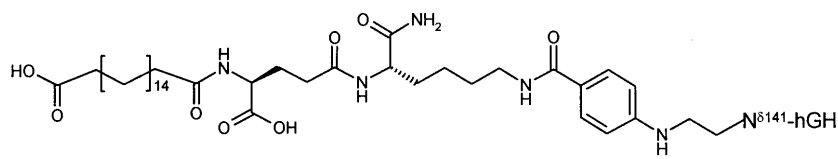
【 0 4 9 4 】

(実施例48)

上記の実施例26に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物を実施例24からのアルブミン結合剤を用いて調製してもよい。

【 0 4 9 5 】

【 化 6 2 】



【 0 4 9 6 】

計算質量22.826.97

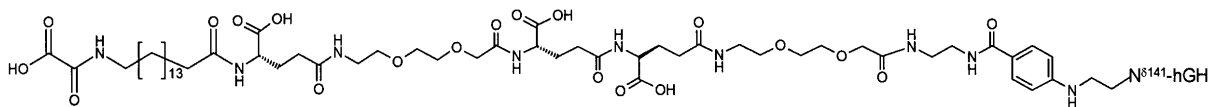
【 0 4 9 7 】

(実施例49)

上記の実施例26に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物を実施例25からのアルブミン結合剤を用いて調製してもよい。

【 0 4 9 8 】

【 化 6 3 】



【 0 4 9 9 】

(実施例50)

一般式A-W-BI-NH₂のアルブミン結合剤リンカーと、アミノ基転移し、および酸化したGH化合物(I)のカップリング

アルデヒドハンドルを、グルタミン残基上のGHに結合させるためのトランスグルタミナーゼの使用は、これまで国際公開第2005/070468号に記載されてきた。式A-W-BI-NH₂のア

10

20

30

40

50

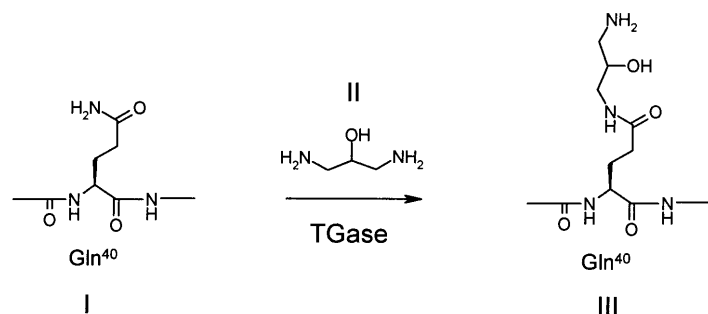
ルブミン結合剤ベースのリンカーの結合のため、本発明による方法を使用することができる。使用するTGaseは、米国第5156956号による、ストレプトバーティシリウムモバラエンス由来の微生物トランスグルタミナーゼである。

【0500】

この反応は、以下の通り実施することができる：国際公開第2005/070468号に記載の通り、1,3-ジアミノ-2-プロパノール(II)を用いて、GH(I)を最初にアミノ基転移する：アミノ基転移したhGH Gln⁴⁰(III)は、CIEクロマトグラフィー精製からの副産物として、実施例26から得た。

【0501】

【化64】



10

【0502】

次のステップで、アミノ基転移したGH(III)にペリオデートを添加する。通常、酸化は、低温、例えば4~10℃で、30分間に渡り、場合によって暗所で行う。ペリオデートは、GH内のメチオニン残基を、これらの対応するメチオニンスルホキシド残基へと酸化することができる。この酸化リスクを最小限に抑えるため、小分子有機チオエーテルをペリオデート酸化中に添加してもよい。適切な有機チオエーテルは、3-メチルチオプロパン-1-オールブタであるが、当業者であれば他を提案することができるであろう。

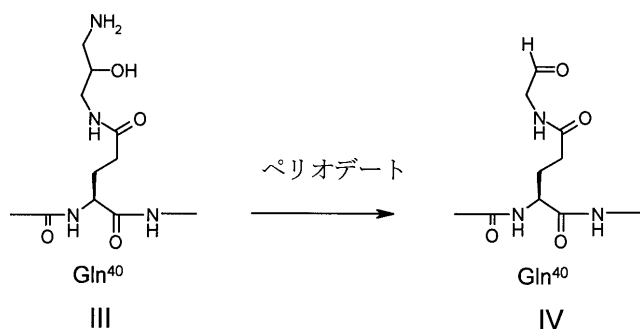
20

【0503】

アミノ基転移したGH化合物(III)の酸化：

【0504】

【化65】



30

40

【0505】

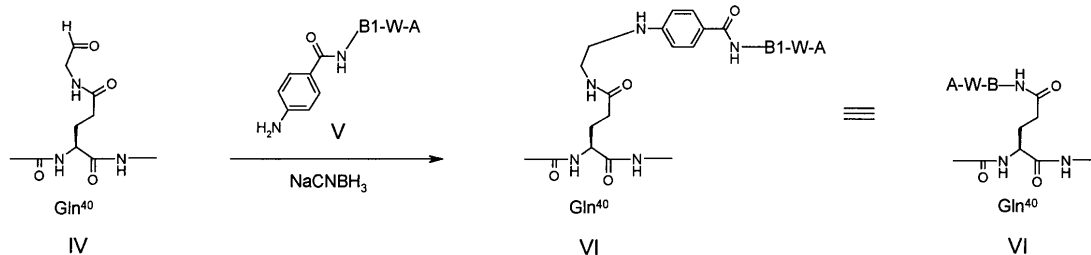
緩衝変化を実施することによって、効率的なナトリウムシアノボロハイドライド還元に必要な酸性溶液を得ることができる。通常、過剰なA-W-B1-NH2アミンを使用し、時間の経過と共により少ない分量のシアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加することができる。

【0506】

アルブミン結合剤リンカー(V)を用いた(IV)の還元的アミノ化：

【0507】

【化 6 6】



【 0 5 0 8 】

10

後半の反応を以下の通り実施することができる：

酸化したアミノ基転移したGH(IV)の溶液を、pH6.00の、胆汁酸リンカー(V)の、AcOH(1.5ml)と50mM MES(0.5ml)の混合物中溶液に添加する。生成した反応混合物を室温で30分間穏やかに振盪させ、30分後の時点でNaCNBH₃溶液(15 μL、(500 μLMilli-Q water+AcOH(15 μL)中に溶解した22mgのNaCNBH₃))を添加する。試料をスズ箔で覆い、室温で一晩撹拌する。

【 0 5 0 9 】

コンジュゲートは、陰イオン交換クロマトグラフィー以下の通り単離することができる：3×8分間の4000rpm/分での遠心分離により、Amicon Ultra15装置(Ultracel 10Kチューブ)を用いて、純水(3×)で緩衝変化により酢酸を取り除く。次いでこの混合物を、Amicon Filter装置を用いて、20mM TEA、pH:8.50へと緩衝変化させ、20mM TEAを用いて最終量50mlまで希釈し、HiLoad Q Sepharose、26/10カラムに充填する。最初にカラムを20mM TEA、pH8.50(緩衝液A)で洗浄し、次いで20mM TEA、500mM NaCl、pH8.50(緩衝液B)を用いて、20CV上での0~100%(B)勾配で、流速2mL/分で溶出させる。プールした留分にAmicon Ultra15装置(Ultracel 10Kチューブ)を用いて、3×8分の間、4000rpm/分で遠心分離することにより、純水中の10mM炭酸水素アンモニウム緩衝液へと5回緩衝液変化を行った。

20

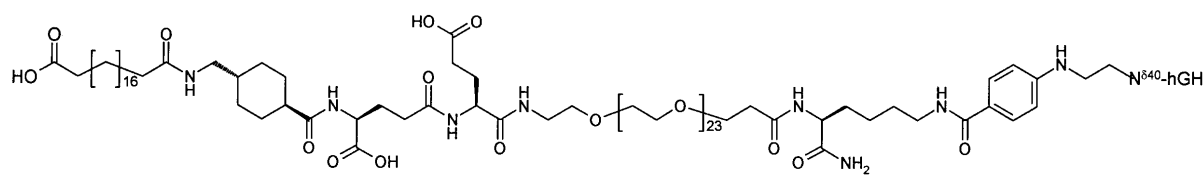
【 0 5 1 0 】

上記の実施例50に記載されているのと同様の方法で、以下の化合物を実施例6からのアルブミン結合剤を用いて調製した。

【 0 5 1 1 】

30

【化 6 7】



【 0 5 1 2 】

TOF-MS: 反応時間=4.7時間、質量23.473,81

【 0 5 1 3 】

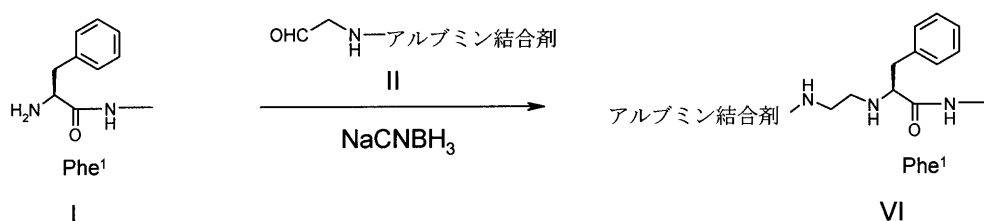
(実施例51)

1.N末端でのGH化合物(I)とアルブミン結合剤(II)との結合

(A)(I)とアルブミン結合剤アルデヒド(II)との還元アルキル化

【 0 5 1 4 】

【化 6 8】



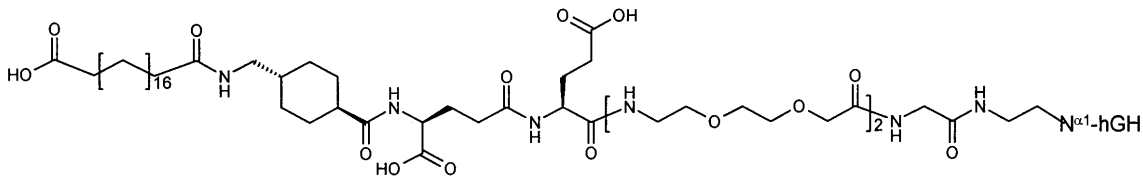
50

【 0 5 1 5 】

アルブミン結合剤(II)を実施例3に記載されているように得た。

【 0 5 1 6 】

【 化 6 9 】



10

【 0 5 1 7 】

2-(C₂₀二酸-Trx- Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-グリシンアミド)-エチル-N¹-hGH hGH(23mg)をHepes緩衝液(2.3ml、0.25mM、pH7.0)に溶解させた。C₂₀二酸-Trx- Glu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly-ジメチルアセタール(2mg、上記実施例3参照)を、TFA(50 μL)で6分間処理し、真空中で蒸発乾燥させた。残基を、EtOH(200 μL)でストリップし、真空中で蒸発乾燥させた。残渣を、DMF(100 μL)に溶解させ、hGH溶液を加えた。沈殿物を形成し、DMF(1ml)を加えることにより再溶解させた。1時間後、NaCNBH₃(20mg、0.5ml MeCN(230 μL)中)溶液を少量ずつ加え、20時間放置した。反応物を、AcOH(2ml)を加えることにより失活させ、全量20mlまで水で希釈し、水中の0.1%TFAに対して、40～80%のMeCN/0.1%TFAの勾配によるC18カラム上の調製HPLCで精製した。最終溶出ピークを集め、70%MeCNから10%まで水で希釈し、凍結乾燥させて、化合物4.51mgを得た。

TOF-MS: 質量23.237,6

20

【 0 5 1 8 】

(実施例52)

本明細書中に記載されているGH化合物を、本明細書中の上に記載されている一つまたは複数のアッセイで試験した。

【 0 5 1 9 】

BAFアッセイならびに半減期(Ty₂)および平均滞留時間(MRT)に基づくEC50値を測定し、以下のTable 2(表2)に含めた。

【 0 5 2 0 】

選択した化合物に対する消失速度を、5匹の、異種交配したLYDのメスブタで上述のように測定した。結果をTable 2(表2)のAUC(0～45時間)として提示する。

30

【 0 5 2 1 】

上に記載の方法で測定された空間(B)のcLogPとして表現された溶解度を向上させる特性もTable 2(表2)に含まれている。

【 0 5 2 2 】

Biacorおよび/またはHPLCで測定したアルブミン結合親和性もTable 2(表2)に含まれている。

【 0 5 2 3 】

ペグ化されたhGH化合物に関するデータも含まれている。PEG-hGHは、国際公開第2006024953A2号の実施例1で開示した化合物と同一である。

40

【 0 5 2 4 】

【表 2】
TABLE 2

化合物	アルブミン 結合剤およ び結合	スパーサーの 溶解度(B) ¹ cLogP	EC50/能力 (BAF)	T _{1/2} (i.v. ラット) (時間)	平均滞留 時間 (MRT)	消失 AUC (0-45 時間)	アルブミ ン結合剤 親和性 (Biacor)	アルブミ ン結合 (HPLC) (Rt、分)
hGH	-	-	1	0.15	-	519	-	0.36
hGH-PEG	-	-	26	5.8	-	2426	-	-
実施例 28	Gln141 実施例 4	-5.32	1.4	1.6	8.3	ND	0.58	7.16
実施例 29	Gln141 実施例 5	0.25	1.3	1.5	12.3	1659	0.50	6.76
実施例 30	Gln141 実施例 6	-6.79	1.5	2	3.6	2283	0.76	7.00
実施例 31	Gln141 実施例 7	-7.05	1.7	ND	ND	1977	0.65	7.46
実施例 32	Gln141 実施例 8	-0.44	0.3	ND	ND	1500	ND	4.25
実施例 33	Gln141 実施例 9	-2.17	0.63	ND	ND	1789	0.02	6.57
実施例 34	Gln141 実施例 10	-0.44	0.62	0.84	ND	903	ND	6.01
実施例 35	Gln141 実施例 11	-3.43	0.78	1.6	7.0	ND	0.23	6.75
実施例 36	Gln141 実施例 12	-2.43	0.84	1.8	7.4	1606	0.41	6.88
実施例 37	Gln141 実施例 13	-5.07	0.64	0.86	1.5	1260	ND	6.45
実施例 41	Gln141 実施例 17	-2.74	2.52	2.3	6.2	1570	0.29	7.06
実施例 42	Gln141 実施例 18	-4.76	2.10	ND	ND	ND	ND	5.69
実施例 47	Gln141 実施例 23	-0.67	ND	ND	ND	ND	ND	7.00
実施例 50	Gln40 実施例 6	-6.79	1.60	2.8	4.3	ND	0.55	ND
実施例 51	N 末端基 実施例 3	-5.87	2.80	2.5	11.6	1935	0.74	7.07

¹⁾ 計算目的のため、*は、個々の B-スパーサーエレメントの炭素に設定

【配列表】

2016190871000001.app

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	1 0 1
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 39/02 (2006.01)	A 6 1 P 39/02	
A 6 1 P 15/10 (2006.01)	A 6 1 P 15/10	
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	

- (72)発明者 ヘンリク・スーン・アンデルセン
デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス
- (72)発明者 イェンス・ブヒアルト
デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス
- (72)発明者 カルステン・ペーレンス
デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス
- (72)発明者 ライフ・ナアスコウ・ラウリトスン
デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス
- (72)発明者 ジン・ス
デンマーク・DK - 2 8 8 0・パウスベア・ノヴォ・アレ・(番地なし)・ノヴォ・ノルディスク・アーノエス

F ターム(参考) 4C076 CC41 EE41M EE59 FF31
4C084 AA02 AA07 BA41 BA44 DB22 NA05 NA12 ZA022 ZA122 ZA362
ZA592 ZA682 ZA702 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962 ZA972 ZB082
ZB152 ZB262 ZB322 ZB352 ZC212 ZC372 ZC552
4H045 AA10 AA30 BA50 CA40 DA31 EA20 FA51 FA52 GA23

【外国語明細書】
2016190871000001.pdf