



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103269720 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 28

(21) 申请号 201180045858. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 07. 15

A61K 47/48 (2006. 01)

A61P 5/06 (2006. 01)

(30) 优先权数据

10170439. 3 2010. 07. 22 EP

61/367704 2010. 07. 26 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 03. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/062152 2011. 07. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02012/010516 EN 2012. 01. 26

(71) 申请人 诺沃—诺迪斯克保健股份有限公司

地址 瑞士苏黎世

(72) 发明人 H. S. 安德森 K. 马德森 H. 德姆思

C. B. 席奥特 L. 诺斯科夫—劳里森

P. 蒂格森 C. 贝伦斯

M. 古尔布兰特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 孔青 梁谋

权利要求书2页 说明书95页 附图2页

(54) 发明名称

生长激素缀合物

(57) 摘要

本发明涉及包含胆汁酸残基的生长激素缀合物,所述缀合可通过野生型或突变型氨基酸残基而发生。生长激素多肽可以是野生型人生长激素或生长激素变体。

1. 一种下式 (I) 的生长激素缀合物和药学上可接受的盐：

A-W-B-GH (I)

其中

GH 表示生长激素化合物，

A 表示胆汁酸残基，

B 表示与 GH 共价连接的亲水间隔物，

W 是连接 A 和 B 的化学基团。

2. 权利要求 1 的生长激素缀合物，其中与 SEQ ID NO 1 限定的人生长激素 (hGH) 相比，所述生长激素化合物 GH 包含一个或多个额外的二硫键。

3. 权利要求 2 的生长激素缀合物，其中所述生长激素化合物包含连接环区段和螺旋区段的一个或多个额外的二硫键。

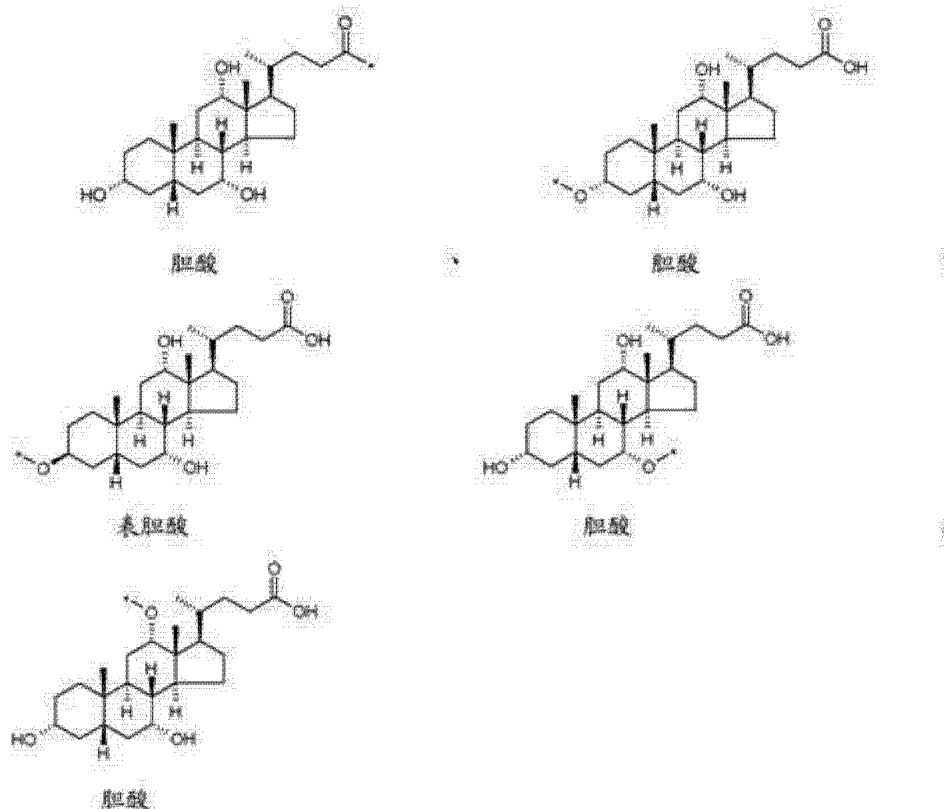
4. 前述权利要求中任一项的生长激素缀合物，其中所述化合物包含至少一对突变，所述突变对应于 SEQ ID NO 1 中的 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26/V102C、D26/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 和 / 或 V185C/S188C。

5. 权利要求 2-4 中任一项的生长激素缀合物，其中所述生长激素化合物包含一个或多个额外的二硫键，其中所述二硫键的至少一个半胱氨酸存在于对应于 SEQ ID NO 1 的 AA 128-154 的环 3 (L3) 上。

6. 权利要求 5 的生长激素缀合物，其中所述生长激素化合物包含连接 L3 与螺旋 2 (H2) 或环 1 (L1) 的一个或多个额外的二硫键。

7. 前述权利要求中任一项的生长激素缀合物，其中所述胆汁酸残基 (A) 是胆酸残基。

8. 7 的生长激素缀合物，其中所述胆酸残基选自



其中 (*) 表示亲水间隔物 (B) 通过 W 的连接点。

9. 前述权利要求中任一项的生长激素缀合物, 其中 GH 在选自以下的野生型氨基酸残基上缀合: N 端、Gln40 和 Gln141。

10. 前述权利要求 1-8 中任一项的生长激素缀合物, 其中 GH 在突变型氨基酸残基上缀合。

11. 权利要求 10 的生长激素缀合物, 其中所述突变型氨基酸残基是半胱氨酸 (Cys)。

12. 权利要求 11 的生长激素缀合物, 其中所述 cys 突变体存在于对应于人生长激素 101 位的位置。

13. 一种用于制备权利要求 1 的生长激素缀合物的方法, 所述方法包括

- a) 使胆酸接头与生长激素化合物 (GH) 缀合
- b) 得到所述生长激素缀合物。

14. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1-12 中任一项的生长激素缀合物和药学上可接受的载体。

15. 一种治疗疾病的方法, 其中所述生长激素活性可用于治疗其中患者可获益于循环生长激素的量增加的疾病或状态, 所述方法包括给予患者有效量的权利要求 1-12 中任一项的生长激素缀合物或权利要求 14 的药物组合物。

生长激素缀合物

发明领域

[0001] 本发明涉及包含胆汁酸衍生物的生长激素缀合物。所述缀合物可用于生长激素缺乏的治疗或其中通常应用人生长激素的其它治疗。

[0002] 发明背景

[0003] 生长激素 (GH) 是一种由哺乳动物垂体前叶分泌的多肽激素。依物种而定, GH 是一种由大约 190 个氨基酸残基组成的蛋白质, 相当于约 22kDa 的分子量。GH 与细胞表面受体即 GH 受体 (GHR) 结合, 并通过 GH 受体发出信号。GH 在促进生长、保持正常身体组成、合成代谢和脂质代谢中起关键作用。它还对中间代谢具有直接作用, 例如葡萄糖摄取降低、脂解作用增加、氨基酸摄取和蛋白质合成增加。该激素还对其它组织发挥作用, 包括脂肪组织、肝、肠、肾、骨骼、结缔组织和肌肉。重组 hGH 已有生产且可市售获得, 例如: Genotropin™ (Pharmacia Upjohn)、Nutropin™ 和 Protropin™ (Genentech)、Humatrope™ (Eli Lilly)、Serostim™ (Serono)、诺地托品 (Norditropin) (NovoNordisk)、Omnitrope (Sandoz)、Nutropin Depot (Genentech 和 Alkermes)。另外, 在 N 末端具有额外甲硫氨酸残基的类似物还以例如 Somatonorm™ (PharmaciaUpjohn/Pfizer) 销售。

[0004] GH 与蛋白质 GH 家族的其它成员催乳素 (PRL) 和胎盘催乳激素 (PL) 有共同的拓扑结构。GH 被归类为 4 螺旋束蛋白质 (图 1), 显示具有两个保守二硫键的“上-上-下-下 (up-up-down-down)”拓扑结构。具体而言, 野生型人 GH (hGH) 由 191 个氨基酸残基组成, 并在 53、165、182 和 189 位上具有 4 个半胱氨酸残基, 其通过形成分别连接 C53 与 C165 和 C182 与 C189 的 2 个分子内二硫键而稳定蛋白质的三维结构 (图 1)。通过 X 射线晶体学实验性地测定了以下的 hGH 结构: 游离形式 (Chantalet L. 等, Protein and Peptide Letters (1995) 3, 333-340) 和与其结合蛋白 (人 GHR (hGHR) 的胞外结构域) 的复合物 (Devos, A. M. 等, Science (1992) 255, 306-312)。这些结构已保藏在蛋白质数据库 (PDB) 中, 并且可公开获取 (PDB 登录代码分别为 1HGU 和 1HWG)。因此, 根据已发表的 hGH 结构, 可鉴定出对 hGH 与 hGHR 结合是重要的残基。此外, 通过核磁共振 (NMR) 光谱法研究了 hGH 的动力学特性 (Kasimova M. R. 等, J. Mol. Biol. (2002) 318, 679-695)。将 X 射线与 NMR 数据结合可将结构化良好和界线明确的 hGH 的区域与结构化较少并且是动态的区域区分开来。预期 hGH 的较少结构化的动态区特别易遭蛋白酶剪切, 该区域的适当稳定可导致蛋白水解稳定性改进。

[0005] 已对 hGH 进行大量诱变以试图产生具有所需化学或生物性质的 hGH 类似物。具体而言, 已描述了用于若干目的的半胱氨酸突变体。

[0006] US2003/0162949 公开了 GH 超基因家族成员的半胱氨酸变体。提供了用于产生这些蛋白质的位点特异性的生物活性缀合物的通用方法。所述方法包括将半胱氨酸残基加到蛋白质的非必需区或采用定点诱变用半胱氨酸残基取代蛋白质中的非必需氨基酸, 然后通过所加入的半胱氨酸残基, 将半胱氨酸反应性聚合物或其它类型的半胱氨酸反应性部分与蛋白质共价偶联。

[0007] W002/055532 描述了遗传工程改造的具有至少一个共价连接的非多肽部分的 hGH

突变体,特别是其中所引入的半胱氨酸残基被用于聚乙二醇化的 hGH 突变体。

[0008] US5,951,972 描述了有生理活性的衍生化天然和重组的哺乳动物及人蛋白质和多肽,其中蛋白质内的至少一个天然存在的或掺入的半胱氨酸残基用各种取代基衍生化。

[0009] 详细研究了 hGH 的蛋白酶剪切。由残基 128-154 组成的长环具有例如以下几种蛋白酶的推定的切割位点:凝血酶、纤维蛋白溶酶、胶原酶、枯草杆菌蛋白酶和胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白酶。因此,hGH 的这个部分显示特别易受蛋白酶剪切影响 (Lewis, U. J. Ann. Rev. Physiol. (1984) 46, 33-42)。已报道的降解 hGH 的酶包括凝血酶、纤维蛋白溶酶、枯草杆菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白酶和激肽释放酶。

[0010] 已对大鼠组织中 hGH 的降解进行了研究 (Garcia-Barros 等, J. Endocrinol. Invest. (2000) 23, 748-754)。

[0011] 发现在大鼠甲状腺中,有利于在大型和亲脂性氨基酸残基处切割的胰凝乳蛋白酶样蛋白酶首先切割 Y143 和 S144 之间的肽键,产生 2 链分子,接着在 Y42 和 S43 之间切割,释放 N 端肽 F1-Y42。再通过胰凝乳蛋白酶样蛋白酶在 F146 和 D147 之间切割并再通过羧肽酶的作用,加工 2 链分子中的裂环 (split loop)。

[0012] 已报道了产生对蛋白水解性降解稳定的 hGH 类似物的几种方法。

[0013] Alam 等人 (J. Biotech. (1998) 65, 183-190) 通过特异性点突变,设计了抗凝血酶和纤维蛋白溶酶的 hGH 突变体。凝血酶特别在 R134 和 T135 之间切割 hGH, 双重突变体 R134D, T135P 产生抗凝血酶切割的 hGH 变体,而三重突变体 R134D, T135P, K140A 产生纤维蛋白溶酶抗性。此外,后一种 hGH 突变体具有在 7 天时间内抗人血浆蛋白酶解的抗性。

[0014] EP534568 描述了通过使 R134 突变成丙氨酸、亮氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸或组氨酸而对蛋白水解性降解稳定的 hGH 突变体。

[0015] W02004/022593/Nautilus 描述了通用的高通量定向进化方法,以产生蛋白水解稳定性提高的修饰细胞因子 (包括 GH 变体)。

[0016] W02006/048777/Nautilus 特别描述了蛋白水解稳定性改进的修饰的 hGH 类似物。该类似物在 1-55、57、58、60-63、67-87、89-91、93、95-100、102-128、131-132、135-139、141、142、144、148-182、184、185 和 187-191 位含有 1-5 个突变。半胱氨酸残基的引入可能导致形成不需要的二硫键连接的二聚体,在 W02006/048777 中,该范围明确不包括氨基酸残基被半胱氨酸取代;在 W02006/048777 (第 65 页) 中阐述:“明确避免氨基酸被半胱氨酸残基置换,因为这种改变可能导致形成分子间二硫键”。

[0017] 显然需要开发抗蛋白水解性降解的 hGH 化合物。这种稳定化合物对蛋白酶剪切应显示出稳定性提高,同时保持所需的 hGH 的生物学性质。这种 GH 分子应提高稳定性、降低清除率和 / 或延长体内半寿期。

[0018] 此外,蛋白质治疗剂通常需要静脉内或皮下给予,因为其通常不能通过口服而充分利用。蛋白质口服生物利用度低部分是由于胃肠道中的蛋白水解性降解所致。因此,还需要开发可以口服给予以治疗 hGH 相关病症的 hGH 化合物。

[0019] 天然存在的胆汁酸通过一系列转运蛋白的作用而在肝肠环路内受严格限制 (Carey, M. C.; Cahalane, M. J. Enterohepatic Circulation. 载于 The Liver: Biology and Pathobiology, 第 2 版; Raven Press: Ltd, New York, 1988; 第 33 章, 第 573-616 页)。这种肠与肝摄取机制确保分泌到肠中的约 90% 的胆汁酸在回肠中再吸收,在所谓的肝肠循环

中再循环,将胆汁盐从肠系统转移回到肝和胆囊中。

[0020] 具有类似于天然存在的胆汁酸性质的生长激素化合物或缀合物可具有口服生物利用度以及药理学上相关的肝水平和高肝-血浆(或肝-组织)比率,因此是极有吸引力的化合物。

[0021] 发明概述

[0022] 本发明描述了具有共价结合的胆汁酸共价的生长激素缀合物。如本文所述,胆汁酸可与各种生长激素化合物连接,例如蛋白酶稳定性生长激素变体。

[0023] 一方面,本发明涉及包括与生长激素化合物连接的胆汁酸残基的生长激素缀合物。可通过式(I)描述这类生长激素缀合物及其药学上可接受的盐

[0024] A-W-B-GH(I)

[0025] 其中

[0026] GH表示生长激素化合物,

[0027] A表示胆汁酸残基,

[0028] B表示与GH共价连接的亲水间隔物,

[0029] W是连接A和B的化学基团。

[0030] 在本发明进一步的实施方案中,生长激素化合物(GH)是人生长激素(SEQ ID N01)或其具有一个或多个氨基酸取代的变体。

[0031] 又一方面,本发明涉及这类生长激素缀合物的任何用途,例如其在治疗生长激素缺乏的方法中的用途。

[0032] 又一方面,本发明涉及制备包括与生长激素化合物连接的胆汁酸残基的生长激素缀合物的方法,其中所述胆汁酸残基与生长激素化合物共价连接。

[0033] 附图描述

[0034] 图1

[0035] 与2个拷贝hGH结合蛋白结合的hGH的结构(PDB1HWG)。hGH中4个主要螺旋以暗灰色显示,标为H1-H4。用箭头标示方向(N→C端)。hGH的N端和C端分别标为N和C。分别连接C53与C165和C182与C189的2个二硫键用黑色棒与球表示。还标记了L128和D154,分别表示连接H3和H4的长的柔性环中的第一个和最后一个残基。

[0036] 图2

[0037] 具有突出显示并标记的4个主要螺旋(H1-H4)的hGH的野生型氨基酸序列。还标记了连接主要螺旋的3个环(L1-L3)。螺旋定义涉及与其结合蛋白复合的hGH(PDB1HWG)。

[0038] 定义

[0039] 在本文中,术语“肽”和“多肽”可互换使用,欲表示相同含义。术语“肽”或“多肽”欲表示由肽键连接的两个或更多个氨基酸的序列,其中所述氨基酸可以是天然的或非天然的。组分氨基酸可来自遗传密码编码的氨基酸的组别,而且它们可以是非由遗传密码编码的天然氨基酸和合成氨基酸。非遗传密码编码的天然氨基酸例如Hyp(羟脯氨酸)、 γ -羧基谷氨酸(γ -carboxyglutamate)、Orn(鸟氨酸)、磷酸丝氨酸、D-丙氨酸和D-谷氨酰胺。合成氨基酸包括化学合成法制备的氨基酸,例如由遗传密码编码的氨基酸的D-异构体,例如D-丙氨酸和D-亮氨酸、Aad(α -氨基己二酸)、Aib(α -氨基异丁酸)、Abu(α -氨基丁酸)、Agl(α -氨基甘氨酸)、Asu(α -氨基辛二酸)、Cha(β -环戊基-丙氨酸)、Chg(环

己基甘氨酸)、Dab(α , γ -二氨基丁酸)、Dap(α , β -二氨基丙酸)、Hcy(高半胱氨酸)、Hpr(高脯氨酸)、Nle(正亮氨酸)、Phg(苯甘氨酸)、Hph(高苯丙氨酸)、1Nal(β -(1-萘基-丙氨酸)、2Nal(β -(2-萘基-丙氨酸)、2Pal(-(2-吡啶基)-丙氨酸、3Pal(β -(3-吡啶基)-丙氨酸)、Pip(4-氨基-哌啶-4-羧酸)、Pra(炔丙基-甘氨酸)、Pyr(焦谷氨酸)、Gla(γ -羧基-谷氨酸)、Hci(高瓜氨酸)、Nva(正缬氨酸)、Tle(叔丁基甘氨酸)、 β -丙氨酸、3-氨基甲基苯甲酸和邻氨基苯甲酸。

[0040] 该术语还包括术语“蛋白质”,其可由一条多肽链组成,或者由通过非共价或共价相互作用(例如半胱氨酸二硫桥)保持在一起的两条或更多条多肽链组成。

[0041] 要理解的是,该术语还欲包括这样的肽,除包含额外的二硫键以外,例如还通过例如但不限于以下部分与肽的侧链或主链连接而被衍生化:PEG、糖、脂肪酸、白蛋白结合剂、烷基链、亲脂基团、维生素、胆汁酸或间隔物(spacer)。术语肽包括任何合适的肽,并且可与术语多肽和蛋白质作为同义词使用,除非另有说明或与上下文抵触,只要读者认识到,含有各种氨基酸聚合物的分子的各个类型可能与显著差异有关,从而构成本发明的各个实施方案(例如由多个多肽链组成的肽(例如抗体)显著不同于例如单链抗体、肽免疫黏附素或单链免疫原性肽)。因此,本文的术语肽一般应理解为是指任何合适大小和组成(就氨基酸的数目和蛋白质分子中相关链的数目而言)的任何合适的肽。此外,本文所述肽可包含非天然存在的和/或非L氨基酸残基,除非另有说明或与上下文抵触。

[0042] 除非另有说明或与上下文抵触(且如果作为术语多肽和/或蛋白质的各个实施方案论述时),否则术语肽还包括衍生化肽分子。衍生化肽分子是这样的肽分子,其中肽的一个或多个氨基酸残基被化学修饰(例如通过烷基化、酰化、酯形成或酰胺形成)或与一个或多个非氨基酸有机和/或无机原子或分子取代基(例如聚乙二醇(PEG)基团、亲脂性取代基(其任选可通过间隔残基或基团例如 β -丙氨酸、 γ -氨基丁酸(GABA)、L/D-谷氨酸、琥珀酸等与肽的氨基酸序列连接)、荧光团、生物素、放射性核素等)缔合,并且衍生化肽分子可另外或备选地包含非必需的、非天然存在的和/或非L氨基酸残基,除非另有说明或与上下文抵触(然而,还应认识到,这种衍生物本身且自动被视为本发明的独立特征,肽的含义中包括这类分子是为了便于描述本发明,并非意味着裸肽和这种衍生物之间有任何等同性)。

[0043] 这类氨基酸残基的非限制性实例包括例如2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 β -丙氨酸、 β -氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、2,4-二氨基丁酸、锁链素、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、羟赖氨酸、别羟赖氨酸、3-羟脯氨酸、4-羟脯氨酸、异锁链素、别异亮氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、6-N-甲基赖氨酸、N-甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸、炔丙基-甘氨酸和抑制素(statine)卤化的氨基酸。

[0044] 本发明所述“化合物”可以是“蛋白质”或“肽”或“多肽”,不论其修饰方式,其均可以是保持所需要的类似于wGH的生物活性的“类似物”或“变体”。

[0045] 本文所用术语“类似物”或“变体”当指多肽时,意指所述肽的修饰形式,其中肽的一个或多个氨基酸残基被其它氨基酸残基取代和/或其中一个或多个氨基酸残基从肽中缺失,和/或其中一个或多个氨基酸残基被添加至肽中。氨基酸残基的这类取代或添加或缺失可发生在肽的N端和/或肽的C端和/或肽的N端或C端之间。未规定旋光异构体的

所有氨基酸要理解为意指 L- 异构体。

[0046] 术语“二硫键”或“二硫桥”可互换使用,意欲表示相同含义。在半胱氨酸残基的巯基之间形成蛋白质中的“二硫键”或“二硫桥”。

[0047] 术语“额外的半胱氨酸”或“引入的半胱氨酸”可互换使用,欲表示相同含义。该术语欲包括不存在于野生型 hGH 中的半胱氨酸残基。为了使结构变化降到最小,通常通过一个或多个氨基酸残基的取代引入一个或多个半胱氨酸残基,以此保持 hGH 的长度。在环部分中或在螺旋的边界 (boarder) 可容许额外 cys 残基的插入,但在螺旋内引入 cys 残基不太有吸引力。

[0048] 术语“额外的二硫键”或“引入的二硫键”可互换使用,欲表示相同含义。该术语欲包括在两个半胱氨酸残基之间形成的二硫键,其中至少一个半胱氨酸残基不存在于野生型 hGH 中。

[0049] 本文所用术语“单点突变”表示突变 (与 SEQ ID NO1 限定的 hGH 相比)。术语“额外的单点突变”可用来指与引入生长激素化合物中形成任何二硫桥的额外半胱氨酸突变无关的单点突变。术语“额外的单个 cys 突变”可用来指引入半胱氨酸残基的点突变。这类突变可以是“额外的单点突变”或甚至是 hGH 中的更多突变。

[0050] 本文用来定义本发明的术语“缀合物”是指肽或多肽,其中肽的一个或多个氨基酸残基与胆汁酸残基共价连接。因此,本发明的术语“缀合物”用作将胆汁酸缀合物与备选衍生物区分开的术语。但是注意到其它文献使用可互换使用的术语“缀合物”和“衍生物”,因此当涉及其它文献时,该术语可互换使用。作为动词,该术语欲表示使一部分 (在此为胆汁酸残基或连接基) 与蛋白质或多肽键合的过程。

[0051] 本文所用术语“衍生物”是指肽或多肽,其中肽的一个或多个氨基酸残基通过将聚合物 (例如 PEG)、糖部分、白蛋白结合剂、脂肪酸、亲脂基团、维生素或间隔物引入生长激素化合物的侧链或主链而被化学修饰。化学修饰在性质上也可以是暂时的,即其可容易地在体内除去。例如可通过细胞本身或通过表达后在肽上进行化学修饰,而在翻译后引入化学修饰。

[0052] 在本文中,措词“人生长激素 (hGH)”、“hGH wt”和“野生型 hGH(wthGH)”可互换使用,均指具有 SEQ ID No. 1 的氨基酸序列的蛋白质。

[0053] 本领域所知术语“同一性”是指两个或更多个肽序列间的关系,这通过比较序列来确定。本领域中,“同一性”还指肽之间序列相关性的程度,这通过两个或更多个氨基酸残基的串 (string) 之间的匹配数目确定。“同一性”测量两个或更多个序列之间相同匹配的百分比,这用由具体的数学模型或计算机程序 (即“算法”) 得出的空位比对 (如果有的话) 来进行。可以通过已知方法容易地计算出相关肽的同一性。这类方法包括但不限于描述于以下文献的方法:Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., 主编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., 主编, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, 第 1 部分, Griffin, A. M. 和 Griffin, H. G., 主编, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J., 主编, M. Stockton Press, New York, 1991; 以及 Carillo 等, SIAM J. Applied Math. (1988) 48, 1073。

[0054] 设计了测定同一性的优选方法以得到所测试序列之间的最大匹配。测定同一性的方法描述于可公开获取的计算机程序中。测定 2 个序列之间同一性的优选计算机程序方法包括 GCG 程序包, 包括 GAP (Devereux 等, Nucl. Acid. Res. (1984) 12, 387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)、BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul 等, J. Mol. Biol. (1990) 215, 403-410)。BLASTX 程序可公开获自美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 和其它来源 (BLAST 手册, Altschul 等, NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul 等, 同上)。众所周知的 Smith Waterman 算法也可用于测定同一性。

[0055] 例如, 运用计算机算法 GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), 针对其相应氨基酸的最佳匹配, 对待测定序列同一性百分比的两个肽进行比对 (“匹配跨度 (matched span)”, 由该算法确定)。空位开放罚分 (gap opening penalty) (经计算为平均对角线 (average diagonal) 的三倍; “平均对角线”是所用比较矩阵对角线的平均值; “对角线”是通过具体比较矩阵赋予每个完全匹配氨基酸的分值或数目)、空位延伸罚分 (其通常为 { 分数 (1/10) } 乘以空位开放罚分) 以及比较矩阵 (例如 PAM250 或 BLOSUM62) 与算法结合使用。该算法还利用了标准比较矩阵 (对于 PAM250 比较矩阵参见 Dayhoff 等, Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) 5, ; 对于 BLOSUM62 比较矩阵参见 Henikoff 等, PNAS USA (1992) 89, 10915-10919)。

[0056] 肽序列比较的优选参数包括下列参数: 算法: Needleman 等, J. Mol. Biol. (1970) 48, 443-453; 比较矩阵: Henikoff 等, PNAS US (1992) 89, 10915-10919 的 BLOSUM62; 空位罚分: 12, 空位长度罚分 (Gap Length Penalty): 4, 相似性阈值 (Threshold of Similarity):

[0057] 具有上述参数的 GAP 程序是有益的。上述参数对于运用 GAP 算法的肽比较 (连同末端缺口无罚分) 是默认参数。

[0058] 术语“蛋白酶”欲包括具有催化肽键水解切割的能力的所有酶。蛋白酶可以是胞内、胞外或膜结合的蛋白酶、蛋白水解酶或肽酶, 并包括哺乳动物肠腔中的蛋白酶和哺乳动物血浆中存在的蛋白酶。蛋白酶可以是内切蛋白酶和外切蛋白酶两种类型。蛋白酶可为下列类型, 但不限于下列类型: 丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。蛋白酶的具体实例为胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、弹性蛋白酶、因子 VIIa、因子 Xa、蛋白酶 K、羧基肽酶、DPPIV、中性内肽酶、粒酶 B、脯氨酸-内肽酶、嗜热菌蛋白酶、凝血酶、Arg-C 蛋白酶、Asp-N 内肽酶、胰天蛋白酶 1-10、梭菌蛋白酶、肠激酶、谷氨酰基内肽酶、LysC、LysN 和葡萄球菌肽酶 I。

[0059] 术语“抗蛋白水解性降解”或“对蛋白水解性降解的稳定性提高”或“对蛋白酶剪切的稳定性提高”或“蛋白水解稳定性改进”或“蛋白水解稳定性”可互换使用, 欲表示相同含义。如果与本发明的 hGH 化合物联用, 则该术语欲表示与野生型 hGH 相比, 所述 hGH 化合物的多肽链在特定情况下以较慢的速度被蛋白酶切割。

[0060] 蛋白质的蛋白酶剪切速度可通过本领域技术人员已知的几种技术测定。测量 hGH 或 hGH 化合物降解速率的测定法的实例描述于实施例 5。

[0061] 术语“功能性体内半寿期”以其标准意义使用, 即达到肽 (例如生长激素化合物) 的 50% 生物活性的时间, 其中生长激素化合物仍然存在于机体/靶器官中, 或肽 (例如生长

激素化合物)的活性是其起始值的50%时的时间。作为测定功能性体内半寿期的备选方法,可测定“体内血浆半寿期”和延长作用,即在被清除前50%的肽在血流中循环的时间。血浆半寿期的测定通常比测定功能性半寿期更简单,血浆半寿期的长短常常是功能性体内半寿期长短的良好指示物。

[0062] 术语“烷烃”或“烷基”欲表示饱和的直链、支链和/或环状烃。除非标明其它碳原子数,否则该术语欲表示具有1-30(包括1和30两者)个碳原子、例如1-20(包括1和20两者)、例如1-10(包括1和10两者)、例如1-5(包括1和5两者)个碳原子的烃。术语烷基和亚烷基分别是指相应的基团和双基。

[0063] 术语“C₁₋₆ 烷基”是指具有1-6(包括1和6)个碳原子的直链或支链饱和烃。这类基团的实例包括但不限于甲基、2-丙基、1-丁基、2-丁基、2-甲基-2-丙基、2-甲基-1-丁基和正己基。

[0064] 术语“C₃₋₁₀ 环烷基”通常是指环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环壬基和环癸基(cyclodecanyl)。

[0065] 术语“烯烃”欲表示包含至少一个碳-碳双键的直链、支链和/或环状烃。除非标明其它的碳原子数,否则该术语欲表示具有2-30(包括2和30两者)个原子、例如2-20(包括2和20两者)、例如2-10(包括2和10两者)、例如2-5(包括2和5两者)个碳原子的烃。术语烯基和亚烯基分别是指相应的基团和双基。

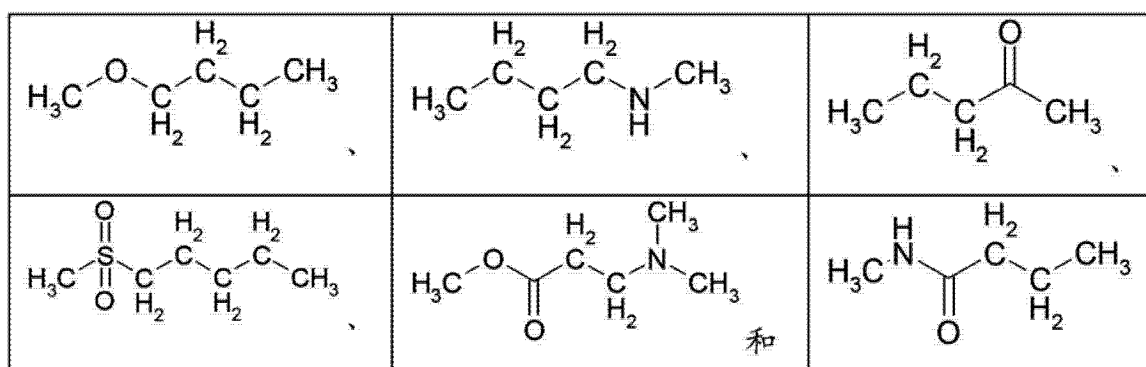
[0066] 术语“炔烃(alkyne)”欲表示包含至少一个碳-碳三键的直链、支链和/或环状烃,且可任选包含一个或多个碳-碳双键。除非标明其它的碳原子数,否则该术语欲表示具有2-30(包括两者)个碳原子、例如2-20(包括两者)、例如2-10(包括两者)、例如2-5(包括两者)个原子的烃。术语炔基和亚炔基分别是指相应的基团和双基。

[0067] 术语“碳环芳族化合物”欲表示芳族烃,例如苯和萘。

[0068] 术语“杂环化合物”欲表示包含5、6或7个环原子的环状化合物,其中的1、2、3或4个是选自N、O和/或S的杂原子。实例包括杂环芳族化合物,例如噻吩、呋喃、吡喃、吡咯、咪唑、吡唑、异噻唑、异噁唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪及其部分或完全氢化的等同物,例如哌啶、吡唑烷(pirazolidine)、吡咯烷、吡咯啉(pyroline)、咪唑烷、咪唑啉、哌嗪和吗啉。

[0069] 术语“杂烷烃”、“杂烯烃”和“杂炔烃”欲表示上文定义的烷烃、烯烃和炔烃,其中一个或多个杂原子或基团插入所述部分的结构中。杂基团和杂原子的实例包括-O-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-C(O)-、-C(S)-和-N(R*)-,其中R*表示氢或C₁-C₆-烷基。杂烷烃的实例包括:

[0070]



[0071] 术语“基团”或“双基”欲表示从中分别脱去一个或两个氢原子的化合物。当具体阐明时,基团也可表示通过从化合物中正式脱去较大的原子基团(例如羟基)所形成的部分。

[0072] 术语“卤素”欲表示周期表第七主族的成员,例如 F、Cl、Br 和 I。

[0073] 本文中,术语“芳基”欲表示其中至少一个环是芳族的碳环芳族环基团或稠合芳族环系基团。典型的芳基包括苯基、联苯基、萘基等。

[0074] 本文所用术语“杂芳基(heteroaryl/hetaryl)”单独地或组合地是指具有例如 5-7 个原子成员的芳族环基团,或者是具有例如 7-18 个原子成员的稠合芳族环系基团,其中至少一个环是芳族的,含有一个或多个选自氮、氧或硫杂原子的杂原子作为环原子,其中 N-氧化物及一氧化硫和二氧化硫允许杂芳族取代。实例包括呋喃基、噻吩基、苯硫基、吡咯基、咪唑基、吡啶基、三唑基、四唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、噻二唑基、异噻唑基、吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、嘧啶基、喹啉基、异喹啉基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基和呔唑基等。

[0075] 术语“基序”用来描述较大实体(例如间隔物(B))内的小化学实体,其中这类基序可由一个或多个化学基团构成。

[0076] 术语“残基”用于化学单位,等于有关氨基酸的通常用法,例如由共价连接的氨基酸残基组成的蛋白质或肽。具体地讲,涉及胆汁酸残基使用术语残基,表示通过化学连接基团与间隔物共价结合的胆汁酸。

[0077] 本文中,术语“药学上可接受的盐”欲表示对患者无害的盐。这类盐包括药学上可接受的酸加成盐、药学上可接受的金属盐、铵盐和烷基化铵盐。酸加成盐包括无机酸以及有机酸的盐。合适无机酸的代表性实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硫酸、硝酸等。合适有机酸的代表性实例包括甲酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、丙酸、苯甲酸、肉桂酸、柠檬酸、富马酸、乙醇酸、乳酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、草酸、苦味酸、丙酮酸、水杨酸、琥珀酸、甲磺酸、乙磺酸、酒石酸、抗坏血酸、双羟萘酸、双亚甲基水杨酸、乙二磺酸、葡萄糖酸、柠檬康酸、天冬氨酸、硬脂酸、棕榈酸、EDTA、乙醇酸、对氨基苯甲酸、谷氨酸、苯磺酸、对甲苯磺酸等。药学上可接受的无机酸或有机酸加成盐的其它实例包括列于以下文献中的药学上可接受的盐:J. Pharm. Sci. 66, 2, (1977), 其通过引用结合到本文中。金属盐的实例包括锂盐、钠盐、钾盐、镁盐等。铵盐和烷基化铵盐的实例包括铵、甲基铵、二甲铵、三甲铵、乙基铵、羟基乙基铵、二乙基铵、丁基铵、四甲基铵盐等。

[0078] 发明描述

[0079] 生长激素缀合物

[0080] 本发明的一个方面涉及包含与生长激素化合物共价连接的胆汁酸残基的生长激素缀合物。在一个实施方案中,可用式(I)描述缀合物及其药学上可接受的盐

[0081] A-W-B-GH(I)

[0082] 其中

[0083] GH 表示生长激素化合物,

[0084] A 表示胆汁酸残基,

[0085] B 表示与 GH 共价连接的亲水间隔物,

[0086] W 是连接 A 和 B 的化学基团。

[0087] 如本文下文中所述,这类缀合物的组分可通过包括不同的生长激素变体或衍生物、提供其它官能团同时保持对生长激素受体的刺激作用而改变。

[0088] 此外,通常在生长激素缀合物中保留人生长激素的主要官能团。可以任何生长激素化合物测试人生长激素缀合物的体外和体内活性。

[0089] 生长激素化合物

[0090] 按照本发明,生长激素化合物保留人生长激素的主要官能团,而在一个实施方案中,可与人生长激素 (SEQ ID NO1) 相同。

[0091] 在本发明的一个实施方案中,生长激素化合物是包含与 SEQ ID No. 1 具有以下同一性的氨基酸序列的多肽:至少 20%,例如至少 30%、例如至少 40%、例如至少 50%、例如至少 60%、例如至少 70%、例如至少 80%、例如至少 90% 同一性、例如至少 95%、例如至少 96%、例如至少 97%、例如至少 98%。

[0092] 在一个实施方案中,生长激素化合物具有与 SEQ ID NO1 限定的 hGH 的体外活性相当的体外活性。生长激素化合物的体外活性优选按本文方法 5 中描述的 BAF 测定法测量。

[0093] 在下文所述进一步的实施方案中,生长激素化合物具有至少 1% 的生长激素活性,例如至少 5%、例如至少 10%、例如至少 25% 的 hGH 活性,按 BAF 测定法测定(方法 5 中描述的和/或在垂体切除大鼠中测定(方法 6 中描述的))。

[0094] 在一个实施方案中,化合物可具有不同于 hGH 的体外活性的体外活性。如上所述,较低的体外活性可通过其它功能性补偿。

[0095] 在一个实施方案中,体外活性可为 hGH 活性的例如至少 1%、例如至少 5%、例如至少 10%、例如至少 25%。在进一步的实施方案中,化合物相对于由 SEQ ID No. 1 限定的野生型 hGH 的 EC_{50} 比率不超过 10、不超过 8、不超过 6、不超过 4、不超过 2。在一个实施方案中,所述化合物较之于由 SEQ ID No. 1 限定的野生型 hGH 的 EC_{50} 比率为 5-0.01 或例如 3-0.01 或例如为 2-0.01。在本发明的备选实施方案中, EC_{50} 可通过方法 7 中描述的表面等离子共振分析 (SPR) 测量。在相应的实施方案中,通过 SPR 测定的体外活性可为 hGH 活性的例如至少 1%、例如至少 5%、例如至少 10%、例如至少 25%。在进一步的实施方案中,通过 SPR 测定的化合物相对于由 SEQ ID No. 1 限定的野生型 hGH 的 EC_{50} 比率不超过 10、不超过 8、不超过 6、不超过 4、不超过 2。在一个实施方案中,所述化合物较之于由 SEQ ID No. 1 限定的野生型 hGH 的 EC_{50} 比率为 5-0.01 或例如 3-0.01 或例如 2-0.01。

[0096] 为了避免疑惑,生长激素化合物还可具有比这些测定法中的 hGH 高的活性。

[0097] 在一个实施方案中,其中生长激素化合物以某种方式衍生化(除胆汁酸缀合之外),可测量未衍生化生长激素化合物的生长激素相对于 hGH 的活性,因为衍生化可显著改变活性。例如在生长激素化合物用延长生长激素化合物的功能性体内半寿期的改性基团衍生化的情况下,衍生化生长激素化合物的活性可比 hGH 的活性低得多,这种降低被停留时间延长而抵消。

[0098] 在一个备选的实施方案中,可测量衍生化生长激素化合物的生长激素活化。在进一步的实施方案中,测定生长激素缀合物(包括胆汁酸缀合)和任何其它改性化学修饰的生长激素活性,确保这类缀合和/或修饰不干扰受体相互作用。应注意的是,试验将在摩尔浓度基础上或基于相对蛋白质/肽含量(例如不应包括任何衍化或缀合的重量)与 hGH 进行比较。

[0099] 在一个实施方案中,生长激素化合物是这类多肽的片段,所述片段保留大量的上述生长激素活性。

[0100] 在一个实施方案中,生长激素化合物是 hGH 的截短形式,即一个或多个氨基酸残基从对应于 SEQ No. 1 的 N 端和 / 或 C 端缺失,其中所述化合物保留所需的野生型 hGH 的生物学性质。

[0101] 在一个实施方案中,生长激素化合物的体内半寿期延长。

[0102] 在一个实施方案中,生长激素化合物的保存期限延长。

[0103] 在一个实施方案中,生长激素化合物可以是融合蛋白。

[0104] 在本发明的一个实施方案中,生长激素化合物通过使例如但不限于以下部分与生长激素化合物的侧链或主链连接而化学修饰(除胆汁酸缀合外):PEG、碳水化合物、白蛋白结合剂、脂肪酸、烷基链、亲脂基团、维生素或间隔物。

[0105] 在一个实施方案中,当与未经化学修饰的 hGH 或 hGH 变体相比时,生长激素化合物经化学修饰以利于跨上皮转运。化学修饰可以是例如本文所述胆酸残基的缀合。不同测定法例如 Caco-2 细胞测定法或 MDCK 细胞测定法可用来估算生长激素化合物跨细胞层的转运。

[0106] 在一个实施方案中,本发明的生长激素化合物经化学修饰以获得长时间的体内作用。

[0107] 在本发明的一个实施方案中,生长激素化合物经化学修饰以获得长时间的功能性体内半寿期。

[0108] 在一个实施方案中,生长激素化合物的化学修饰的性质可以是短暂的,即其可容易地体内除去。

[0109] 在一个实施方案中,生长激素化合物修饰可发生在干扰生长激素化合物与人生长激素受体(hGHR)结合的任何氨基酸残基上。

[0110] 在下文所述的进一步的实施方案中,缀合可发生在选自 wthGH 残基和突变体残基的不同位置上。

[0111] 在一个实施方案中,缀合通过 N 端或 C 端连接。

[0112] 在一个实施方案中,缀合通过 Gln 残基(例如 Gln40 或 Gln141)连接。

[0113] 在其中胆汁酸接头(或备选衍生物)通过突变体残基与 GH 连接的这类进一步的实施方案中,缀合物的 GH 可具有单个 Cys 突变,其选自 GH 的 N 端、H1、L1、H2、L2 或 H3 区中的单个 Cys 突变的任一个。

[0114] 在进一步的这类实施方案中,单个 Cys 突变位于 hGH(SEQ ID NO:1)的 N 端,突变为例如 T3C、P5C、S7C 的任一个;或位于 H1(对应于 AA9-35),突变为例如 D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C 的任一个;或位于相当于 AA36-71 的 L1,突变为例如 Q40C、K41C、Y42C、S55C、S57C、S62C 的任一个或位于 H2、L2 或 H3(对应于 AA72-98、AA99-106 和 AA107-127),突变为例如 E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 和 G126C 的任一个。如果单个 Cys 突变存在于 hGH 变体中,则突变位于相应的氨基酸残基上。

[0115] 进一步的实施方案包括这样的 GH 缀合物,其中 GH 中的单个 Cys 突变选自以下的任一个:hGH(SEQ ID NO:1)的 T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、

Q40C、S55C、S57C、S62C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 和 G126C,例如 Q40C、S62C 和 L101C 的任一个。

[0116] 在更进一步的实施方案中,单个 Cys 突变位于 hGH 的 AA93-106 或 hGH 变体的相应残基内。

[0117] 在更具体的实施方案中,单个 Cys 突变位于 L2 内,例如位于 AA99-106 或 AA99-103 或相应的残基内。

[0118] 为了获得体内停留时间延长的生长激素缀合物,使生长激素化合物的稳定性最优化,尤其应用对蛋白质降解较不敏感的生长激素化合物是有吸引力的。

[0119] 在一个实施方案中,生长激素化合物的蛋白酶稳定性提高。

[0120] 在一个实施方案中,生长激素化合物对蛋白酶剪切的稳定性提高。

[0121] 在一个实施方案中,生长激素化合物对因胰蛋白酶所致的蛋白水解性降解的稳定性提高。

[0122] 在一个实施方案中,生长激素化合物对因胃肠道中存在的蛋白酶所致的蛋白水解性降解的稳定性提高。

[0123] 在一个实施方案中,生长激素化合物对因哺乳动物血浆中存在的蛋白酶所致的蛋白水解性降解的稳定性提高。

[0124] 在一个实施方案中,生长激素化合物具有一个或多个额外的二硫键。在通过点突变引入野生型 hGH 序列中的一个或两个半胱氨酸对之间形成二硫键。选择突变位点,使得所引入的半胱氨酸残基适当置于折叠蛋白质的三维结构中以供形成二硫键。如果只引入一个半胱氨酸,则其形成二硫键的配偶体可包括野生型 hGH 中存在的 4 个半胱氨酸残基之一。具有额外二硫键的折叠蛋白质可通过合适的宿主生物表达可溶形式的合适的 hGH 半胱氨酸突变体获得,或利用本领域技术人员熟知的生长激素化合物的标准再折叠条件从包含体中回收 (Cabrita 和 Bottomley, *Biotechnology Annual Review* (2004) 10, 31-50)。引入额外二硫键的候选位置的鉴定可辅以计算方法,例如利用根据经验确定的与其两个拷贝的结合蛋白复合的 hGH (PDB 登录代码 1HWG) 的三维结构。引入二硫键的合适位置的选择可根据以下文献所述的二硫键距离和几何标准: Dombkowski A., A., *Bioinformatics* (2003) 19, 1852-1853 及 Petersen 等, *Protein Eng.* (1999) 12, 535-548。

[0125] 选择半胱氨酸突变体,使得引入的二硫键不会破坏蛋白质的天然结构,并且对与 hGH 有关的所需要生物活性具有最小的负面影响。因此,构建这样的化合物,使得引入的二硫键不会削弱与 hGHR 的相互作用。已从 1HWG 中鉴定出对受体相互作用重要的 hGH 区。因此,可通过分析 1HWG 结构,指导引入二硫键的合适位置(其对生物活性而言是中性的)的选择。

[0126] 可选择半胱氨酸突变体,使得引入的二硫键提供对蛋白酶剪切的稳定性提高。蛋白质对蛋白酶切割的敏感性部分由所述蛋白质的一级氨基酸序列确定。蛋白酶可以是相对无特异性的,或者可以可变的选择性程度识别一级氨基酸序列中的特定基序。然而,用作底物的蛋白质分子的三维结构和动力学强烈地影响蛋白水解稳定性。高柔性和动态环结构特别易受蛋白酶催化切割的影响,而结构化良好的区域一般不太如此。因此,可通过引入二硫键稳定蛋白质的动态区,来获得保护免于蛋白酶剪切。

[0127] 对于两个半胱氨酸残基间的二硫桥,可在本文所述任何区域或位置上引入或取代

为半胱氨酸残基,以利于形成一个或多个额外的二硫键。氨基酸残基的取代和插入可通过本领域技术人员已知的标准技术进行。

[0128] 在一个实施方案中,与 SEQ ID NO1 限定的 hGH 相比,所述生长激素化合物包含一个或多个额外的二硫键。如上文所述,本发明的生长激素化合物多肽优选与由 SEQ ID NO1 鉴定的人生长激素具有高水平的同一性。

[0129] 因此,将通过在由 SEQ ID No. 1 限定的 hGH 中引入一个或多个额外的二硫键而对蛋白水解性降解有抗性的稳定的 GH 化合物与本文所述的胆汁酸残基缀合。在一个实施方案中,生长激素化合物对于蛋白酶解是稳定的。

[0130] 在一个实施方案中,通过在环区段和螺旋结构间引入二硫键以实现生长激素化合物的蛋白水解稳定性提高。

[0131] 在一个实施方案中,通过在环区段内引入二硫键实现生长激素化合物的蛋白水解稳定性提高。

[0132] 在一个实施方案中,通过在环区段间引入二硫键实现生长激素化合物的蛋白水解稳定性提高。

[0133] 在一个实施方案中,通过在螺旋间引入二硫键实现生长激素化合物的蛋白水解稳定性提高。

[0134] 在一个实施方案中,至少一个引入的二硫键连接生长激素化合物的两个半胱氨酸残基,其中至少一个所述半胱氨酸残基不存在于野生型 hGH 中。

[0135] 在一个实施方案中,生长激素化合物所引入的二硫键稳定连接 H3 和 H4 的环 (L3, 残基 128-154),即在引入的二硫键中至少一个半胱氨酸位于包含残基 128-154 的区段 (图 1 和图 2)。

[0136] 在一个实施方案中,生长激素化合物所引入的二硫键位于采用以下文献描述的距离和几何标准选择的半胱氨酸残基之间:Dombkowski A., A., Bioinformatics (2003) 19, 1852-1853 及 Petersen 等, Protein Eng. (1999) 12, 535-548。

[0137] 如上所述,生长激素化合物包含额外的二硫键,其连接多肽的环区段和螺旋区段或在多肽的环区段内或连接多肽的环区段或连接多肽的螺旋区段。任何这类额外的二硫键的位置均是为了参照 SEQ ID NO1 限定的 hGH 多肽描述的本申请的目的。提供连接螺旋、环和环与螺旋的键的 cys 突变的非限制性实例列举在下表中。

[0138]

	由与 SEQ ID NO 1 序列 比对限定的第一氨基酸。	由与 SEQ ID NO 1 序 列比对限定的第二氨 基酸。	所连接的二级结构区 段 ^a
1.	16	117	H1-H3
2.	17	174	H1-H4
3.	21	170	H1-H4
4.	26	102	H1-L2
5.	26	103	H1-L2
6.	47	50	L1-L1
7.	49	161	L1-L1
8.	54	143	L1-L3
9.	54	144	L1-L3
10.	54	146	L1-L3

[0139]

	由与 SEQ ID NO 1 序列 比对限定的第一氨基酸。	由与 SEQ ID NO 1 序 列比对限定的第二氨 基酸。	所连接的二级结构区 段 ^a
11.	55	143	L1-L3
12.	57	143	L1-L3
13.	58	141	L1-L3
14.	58	143	L1-L3
15.	58	144	L1-L3
16.	59	137	L1-L3
17.	61	66	L1-L1
18.	61	67	L1-L1
19.	71	132	L1-L3
20.	73	132	H2-L3
21.	73	139	H2-L3
22.	77	138	H2-L3
23.	77	139	H2-L3
24.	81	141	H2-L3
25.	81	143	H2-L3
26.	84	143	H2-L3
27.	84	144	H2-L3
28.	85	143	H2-L3
29.	85	144	H2-L3
30.	89	146	H2-L3
31.	92	146	H2-L3
32.	92	148	H2-L3
33.	94	107	H2-H3
34.	102	105	L2-H3
35.	156	146	H4-L3
36.	156	148	H4-L3
37.	185	188	Ct-Ct

[0140] a) H1-H4 是指螺旋 1-4, L1-L3 是指环 1-3, Ct 是指 C 端区段。

[0141] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含至少一对突变,所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26/V102C、D26/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 和 / 或 V185C/S188C。

[0142] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含至少一对突变,所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 A17C/E174C、H21C/M170C、D26/V102C、D26/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/

F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 和 / 或 R94C/D107C。

[0143] 按照本发明的一个实施方案,缀合物的生长激素化合物包含额外的二硫键,其中至少一个半胱氨酸存在于 L3(SEQ ID NO1 中的 AA128-154) 中,或存在于例如由 AA135-148 限定的环的中区或相应的氨基酸残基中。

[0144] 在一个实施方案中,生长激素化合物具有存在于 L3 中的额外二硫键的至少一个半胱氨酸,其位置对应于 SEQ ID NO1 中的 AA141、AA142、AA143、AA144、AA145 或 AA146,优选 AA143 或 AA144。

[0145] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含至少一对突变,所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C 和 / 或 F92C/T148C。

[0146] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含至少一对突变,所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C 和 / 或 F92C/T148C。

[0147] 本发明的一个实施方案涉及其中生长激素化合物包含连接 L3 与 L1 的额外二硫键的缀合物。

[0148] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含使对应于 L3 中的 AA54、AA55、AA56、AA57、AA58 或 AA59 的氨基酸残基与对应于 SEQ ID NO1 中的 L1 的 AA143 或 AA144 的氨基酸连接的额外二硫键。

[0149] 在一个实施方案中,本发明的生长激素化合物包含至少一对突变,所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C 和 / 或 S71C/S132C。

[0150] 本发明的一个实施方案涉及包含额外二硫键的生长激素化合物,所述二硫键连接 L3 与螺旋区段例如螺旋 2(H2)。

[0151] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含使对应于 H2 中的 AA84 或 AA85 的氨基酸残基与对应于 SEQ ID NO1L3 中的 AA143 或 AA144 的氨基酸连接的额外二硫键。

[0152] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含至少一对突变,所述突变对应于 SEQ ID No 中的 L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C 和 F92C/T148C。

[0153] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含至少一对突变,所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C 和 / 或 F92C/T148C。

[0154] 本发明的一个实施方案涉及包含连接 L2 与螺旋 1 的额外二硫键的生长激素化合物。

[0155] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含至少一对突变,所述突变对应于 D26C/V102C 或 D26C/Y103C。

[0156] 在一个实施方案中,包含一个或多个额外的二硫键的生长激素化合物对因以下一种或多种蛋白酶所致降解是稳定的:例如消化蛋白酶,例如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、羧肽酶和/或弹性蛋白酶。

[0157] 在本发明的一个实施方案中,生长激素化合物对因胰蛋白酶、凝乳蛋白酶和/或弹性蛋白酶所致的蛋白水解性降解的稳定性提高。

[0158] 在一个实施方案中,生长激素化合物对胰凝乳蛋白酶和/或弹性蛋白酶的降解是稳定的。

[0159] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含至少一对突变,所述突变对应于 SEQ ID N01 中的 H21/M170、D26/V102C、D26/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 和/或 S85C/S144C。

[0160] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含至少一对突变,所述突变对应于 SEQ ID N01 中的 D26/V102C、D26/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 和/或 R94C/D107C。

[0161] 在一个实施方案中,生长激素化合物包含至少一对突变,所述突变对应于 SEQ ID N01 中的 S57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 和/或 S85C/S144C。

[0162] 在进一步的实施方案中,本发明涉及式 I 的生长激素缀合物,其中与人生长激素相比,该生长激素化合物包含一个或多个额外的二硫键和至少一个额外的单点突变。出于与生长激素化合物的功能性有关的多种原因,生长激素化合物中可包括至少一个额外的单点突变。所述至少一个额外的单点突变的目的在于例如通过引入包含适于化学修饰的化学实体的氨基酸残基,而进一步提高蛋白酶稳定性和/或提供适于化学修饰的“位点”。

[0163] 因此,本发明涉及任何生长激素缀合物,其中与由 SEQ ID N01 限定的人生长激素相比,生长激素化合物包含上文所述一个或多个额外的二硫键和至少一个额外的单点突变。

[0164] 在一个实施方案中,生长激素化合物的至少一个额外的单点突变位于已知的蛋白酶位点。

[0165] 在一个实施方案中,至少一个额外的单点突变位于对应于 SEQ ID N01 的 1-55、57、58、60-63、67-87、89-91、93、95-100、101、102-128、131-132、135-139、141、142、144、148-182、184、185 和/或 187-191 位的位置。

[0166] 在一个实施方案中,至少一个额外的单点突变位于对应于 hGH 的 T3、P5、S7、D11、H18、Q29、E30、E33、A34、Y35、E88、Q91、S95、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、D107、S108、D112、Q122 和 G126 位的位置。

[0167] 在一个实施方案中,至少一个额外的单点突变位于对应于 SEQ ID N01 的 10、40、41、42、55、57、62、101、134、136、139、142 和/或 144 位的位置。

[0168] 在一个实施方案中,至少一个额外的单点突变位于对应于 SEQ ID N01 的 55、57、62、101、134、136、142 和/或 144 位的位置。

[0169] 在一个实施方案中,至少一个额外的单点突变位于对应于 SEQ ID N01 的 62、101、134、136、142 和/或 144 位的位置。

[0170] 在一个实施方案中,至少一个单点突变存在于 L1 (对应于 SEQ ID N01 的 AA36-71)

和 / 或 L3 (对应于 SEQ ID N01 的 AA128-154) 中,而在进一步的实施方案中,至少一个单点突变存在于 L1 中。在一个实施方案中,至少一个单点突变存在于 L1 的中区 (对应于 SEQ ID N01 的 AA40-65)。在一个实施方案中,至少一个单点突变存在于对应于 SEQ ID N01 的 40、41、42、55、57 和 / 或 62 位的位置上。在一个实施方案中,至少一个单点突变存在于 L3 中,而在进一步的实施方案中,至少一个单点突变存在于 L3 的中区 (对应于 SEQ ID N01 的 AA134-148)。

[0171] 在一个实施方案中,至少一个单点突变位于对应于 SEQ ID N01 的 134、136、139、142 和 / 或 144 位的位置。

[0172] 在一个实施方案中,至少一个单点突变位于对应于 SEQ ID N01 限定的 hGH 的 62 位的位置上。

[0173] 在一个实施方案中,至少一个额外的单点突变位于对应于 SEQ ID N01 限定的 hGH 的 62 位的位置上。在一个这类的实施方案中,丝氨酸 (S62) 被选自以下的氨基酸残基取代: 苏氨酸 (T)、天冬酰胺 (N)、半胱氨酸 (C)、组氨酸 (H)、谷氨酰胺 (Q) 和谷氨酸 (E)。

[0174] 在一个实施方案中,至少一个额外的单点突变位于对应于 SEQ ID N01 限定的 hGH 的 55 位的位置上。在一个这类的实施方案中,丝氨酸 (S55) 被选自以下的氨基酸残基取代: 苏氨酸 (T)、天冬酰胺 (N)、半胱氨酸 (C)、组氨酸 (H)、谷氨酰胺 (Q) 和谷氨酸 (E)。

[0175] 在一个实施方案中,至少一个额外的单点突变位于对应于 SEQ ID N01 限定的 hGH 的 57 位的位置上。在一个这类的实施方案中,丝氨酸 (S57) 被选自以下的氨基酸残基取代: 苏氨酸 (T)、天冬酰胺 (N)、半胱氨酸 (C)、组氨酸 (H)、谷氨酰胺 (Q) 和谷氨酸 (E)。

[0176] 按照本发明,与 SEQ ID N01 相比,一个或多个额外的二硫键通过至少两个氨基酸的氨基酸取代来获得。

[0177] 在进一步的实施方案中,与 SEQ ID N01 相比,所述化合物包含正好一个额外的二硫键。

[0178] 在一个实施方案中,与 SEQ ID N01 限定的人生长激素相比,本发明的生长激素化合物的多肽包含至少两个额外的半胱氨酸。

[0179] 在进一步的实施方案中,与 SEQ ID N01 限定的人生长激素相比,所述多肽包含正好两个额外的半胱氨酸。

[0180] 在进一步的实施方案中,与 SEQ ID N01 限定的人生长激素相比,所述生长激素化合物包含至少两个额外的半胱氨酸。

[0181] 在一个实施方案中,与 SEQ ID N01 相比,所述生长激素化合物包含正好 3 个氨基酸取代。

[0182] 在一个实施方案中,与 SEQ ID N01 限定的人生长激素相比,所述生长激素化合物包含正好两个额外的半胱氨酸和正好一个额外的单点突变。

[0183] 在一个实施方案中,与 SEQ ID N01 相比,本发明的生长激素化合物的多肽包含总共至多 10 个氨基酸取代。在一个实施方案中,所述生长激素化合物包含总共至多 8 个、例如至多 7 个、例如至多 6 个、例如至多 5 个、例如至多 4 个氨基酸取代。在一个实施方案中,与 SEQ ID N01 限定的人生长激素相比,所述生长激素化合物包含正好 3 个额外的半胱氨酸。

[0184] 在一个实施方案中,与 SEQ ID N01 限定的人生长激素相比,所述生长激素化合物包含一个额外的二硫键和单个 Cys 突变。

[0185] 在一个实施方案中,单个 Cys 突变选自 GH 的 N 端、H1、H2、L2 或 H3 区中的任一个单个 Cys 突变。

[0186] 在一个实施方案中,生长激素化合物具有选自对应于以下的突变的单个 Cys 突变:hGH(SEQ ID NO:1) 的 T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、Q40C、S55C、S57C、S62C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 和 G126C。

[0187] 在一个实施方案中,生长激素化合物具有位于对应于 hGH 的 AA93-106、例如 AA99-106 或 AA99-103 的位置的单个 Cys 突变。

[0188] 在一个实施方案中,额外的单个 cys 突变为 N99C、S100C 或 L101C。在一个实施方案中,额外的单个 cys 突变位于对应于 hGH 的 AA55-62 的位置上。在一个实施方案中,额外的单个 cys 突变是 S55C、S57C 或 S62C。

[0189] 在一个实施方案中,与 SEQ ID NO1 相比,本发明的生长激素化合物的多肽包含总共至多 10 个氨基酸取代。在一个实施方案中,所述生长激素化合物包含总共至多 8 个、例如至多 7 个、例如至多 6 个、例如至多 5 个、例如至多 4 个氨基酸取代。

[0190] 在一个实施方案中,与 SEQ ID NO1 相比,本发明的生长激素化合物的多肽包含正好 3 个氨基酸取代。

[0191] 可将额外的二硫桥引入其中的 GH 化合物的其它实例包括以下文献公开的 GH 化合物:W092/09690 (Genentech)、US6,004931 (Genentech)、US6,143,523 (Genentech)、US6,136,536 (Genentech)、US6,057,292 (Genentech)、US5,849,535 (Genentech)、W097/11178 (Genentech)、W090/04788 (Genentech)、W002/055532 (Maxygen APS and Maxygen Holdings)、US5,951,972 (American Cyanamid Corporation)、US2003/0162949 (Bolder Biotechnologies, Inc.), 所述文献通过引用结合到本文中。还包括 hGH 的天然变体,例如描述于 Masuda, N 等, Biochim. Biophys. Acta 949 (1988) (1), 125-131 的 20kDa 天然变体。

[0192] 在本文所述所有实施方案中,还任选生长激素化合物在对应于 SEQ ID NO1 的 120 位的位置上具有 Gly 残基。

[0193] 本领域技术人员可按照方法 1 和 2 及下文中的描述,制备本文所述生长激素多肽。

[0194] 多肽的产生是本领域众所周知的。例如,多肽可通过经典肽合成产生,例如采用 tert-Boc 或 Fmoc 化学法的固相肽合成或其它已十分确定的技术,参见例如 Greene 和 Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 2006。

[0195] 多肽还可通过这样的方法产生,所述方法包括在允许肽表达的条件下,将含有编码该多肽的 DNA 序列和能够表达该多肽的宿主细胞培养在合适的营养培养基中。对于包含非天然氨基酸残基的多肽,应对重组细胞进行修饰,使得例如通过使用 tRNA 突变体将非天然氨基酸掺入多肽中。

[0196] 还可采用无细胞的体外转录/翻译系统制备多肽。含有新的非天然氨基酸的多肽还可采用例如描述于以下文献的移码或无义抑制系统 (nonsense suppression system) 制备: J. Am. Chem. Soc. (2003) 125, 11782-11783; Science (2003) 301, 964-967; Science (2001) 292, 498-500, Science (2004) 303, 371-373 及本文的参考文献。

[0197] 用于培养细胞的培养基可以是适于宿主细胞生长的任何常规培养基,例如含有适

当补充剂的极限培养基或复合培养基。合适的培养基可获自供应商或可按照已发表的配方制备（例如美国典型培养物保藏中心的目录）。然后用常规方法，从培养基中回收细胞产生的肽，包括通过离心或过滤将宿主细胞从培养基中分离出来。对于胞外产物，根据所述多肽的类型，通过以下方法分离上清液的蛋白质性组分：过滤、柱层析法或沉淀例如微过滤、超滤、等电沉淀、各种层析方法的纯化例如离子交换层析法、疏水作用层析法、凝胶过滤层析法、亲和层析法等。对于胞内或胞质产物，使自培养基分离的细胞破裂或透化，提取以回收产物多肽或其前体。

[0198] 编码多肽的 DNA 序列可适宜是基因组或 cDNA 来源，例如按照标准技术，通过制备基因组或 cDNA 文库，并使用特异性 DNA 或 RNA 探针通过杂交，筛选编码全部或部分肽的 DNA 序列而获得（参见例如 Sambrook, J, Fritsch, EF 和 Maniatis, T, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989）。编码多肽的 DNA 序列还可通过以下已确立的标准方法合成制备：例如 Beaucage 和 Caruthers, *Tetrahedron Letters* (1981) 22, 1859-1869 描述的亚磷酸酰胺 (phosphoamidite) 方法或 Matthes 等, *EMBO Journal* (1984) 3, 801-805 描述的方法。还可按例如 US4,683,202 或 Saiki 等, *Science* (1988) 239, 487-491 所述，使用特异性引物，通过聚合酶链式反应来制备 DNA 序列。

[0199] 可将编码待表达的肽的 DNA 序列插入适宜进行重组 DNA 方法的任何载体中，载体的选择常常取决于其将导入其中的宿主细胞。因此，载体可为自发复制载体，即作为染色体外实体存在的载体，其复制独立于染色体复制，例如质粒。或者，载体可以是当导入宿主细胞时整合至宿主细胞基因组并与其整合到其中的染色体一起复制的载体。

[0200] 载体可以是其中编码多肽的 DNA 序列与 DNA 转录所需的其它区段（例如启动子）有效连接的表达载体。启动子可以是任何 DNA 序列，其在所选宿主细胞中具有转录活性，可来源于编码与宿主细胞同源或异源的蛋白质的基因。用于指导编码待表达的肽的 DNA 在各种宿主细胞中转录的合适启动子的实例是本领域众所周知的，参见例如 Sambrook 等，同上。

[0201] 必要时，编码待表达的肽的 DNA 序列还可与合适的终止子、多腺苷酸化信号、转录增强子序列和翻译增强子序列有效连接。本发明的重组载体还可包含使载体能够在所述宿主细胞中复制的 DNA 序列。

[0202] 载体还可包含选择标记，例如其产物补偿宿主细胞缺陷或者赋予氨苄西林、卡那霉素、四环素、氯霉素、新霉素、潮霉素或甲氨蝶呤等药物抗性的基因。对于大批生产，选择标记可以不是例如抗生素抗性的，例如当载体用于大批生产时，载体中的抗生素抗性基因可被切离。用于从载体中消除抗生素抗性基因的方法是本领域已知的，参见例如 US6,358,705，其通过引用结合到本文中。

[0203] 为了将待表达的肽引入宿主细胞的分泌途径，在重组载体中可提供分泌信号序列（亦称前导序列、前序列原 (prepro-sequence) 或前序列）。将分泌信号序列在正确读框中与编码肽的 DNA 序列连接。分泌信号序列通常位于编码肽的 DNA 序列的 5'。分泌信号序列可为与肽正常结合的序列或可以来自编码另一分泌蛋白的基因。

[0204] 分别连接编码待表达的肽的 DNA 序列、启动子和任选终止子和 / 或分泌信号序列，并将其插入含有复制必需的信息的合适载体中所使用的方法为本领域技术人员所熟知

(参见例如 Sambrook 等, 同上)。

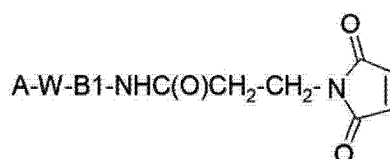
[0205] 向其中导入 DNA 序列或重组载体的宿主细胞可以是能够产生本发明肽的任何细胞, 包括细菌、酵母、真菌和高等真核细胞。众所周知并用于本领域的合适宿主细胞的实例为大肠杆菌 (*E. coli*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或者哺乳动物 BHK 或 CHO 细胞系, 但并不限于此。待表达的肽还可通过使用本领域普遍已知的体外转录 / 翻译系统产生。

[0206] 胆汁酸接头

[0207] 一方面, 本发明涉及胆汁酸接头。可按下文化学法部分中所述制备本发明的生长激素缀合物。缀合方法包括胆汁酸接头的共价连接, 胆汁酸接头取决于所采用的方法, 可用下式描述:

[0208] $A-W-B1-NH_2$ 、 $A-W-B1-CHO$ 、 $A-W-B1-LG$ 、 $A-W-B1-C(O)NHCH_2-CH=CH_2$ 和

[0209]



[0210] 其中 A 表示胆汁酸残基, B1 表示亲水间隔物, W 是连接 A 和 B1 的化学基团。下文提供有关与胆汁酸残基、间隔物和连接基团 W 有关的 A、W 和 B1 的更多详情。

[0211] B1 可视为下文描述的 B 的部分:

[0212] $A-W-B1-NH_2 \rightarrow A-W-B1-NH-GH \rightarrow A-W-B-GH$ ($B=B1-NH$)

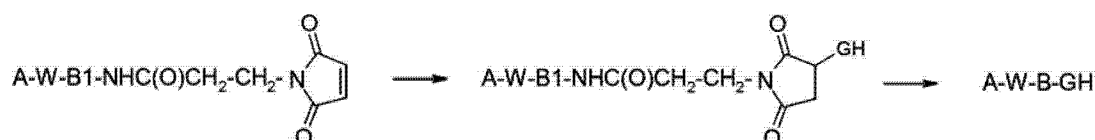
[0213] $A-W-B1-CHO \rightarrow A-W-B1-CH_2-GH \rightarrow A-W-B-GH$ ($B=B1-CH_2-$)

[0214] $A-W-B1-LG \rightarrow A-W-B1-GH \rightarrow A-W-B-GH$ ($B1=B$)

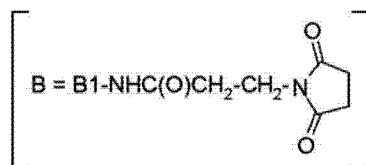
[0215] $A-W-B1-C(O)NHCH_2-CH=CH_2 \rightarrow A-W-B1-C(O)NHCH_2-CH_2-CH_2-GH \rightarrow A-W-B-GH$

[0216] ($B=B1-C(O)NHCH_2-CH_2-CH_2-$) 和

[0217]



[0218]



[0219] 胆汁酸残基

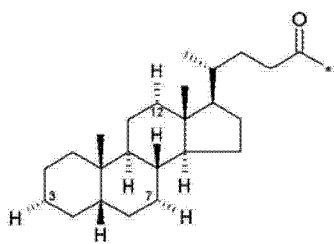
[0220] 胆汁酸在自然界中以各种形式存在, 还可在与生长激素化合物缀合前对其进行修饰。

[0221] 按照本发明, 生长激素缀合物包含选自以下的胆汁酸残基 (A): 胆烷酸、胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、乌索脱氧胆酸、石胆酸、甘胆酸盐、甘氨脱氧胆酸盐、甘氨鹅脱氧胆酸盐、牛磺胆酸盐、牛磺脱氧胆酸盐和牛磺鹅脱氧胆酸盐。

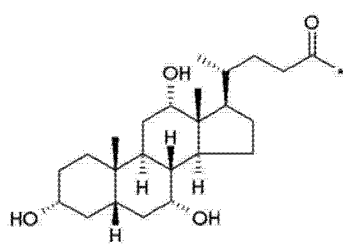
[0222] 在一个实施方案中, 胆汁酸接头和 / 或生长激素缀合物包含选自以下的胆汁酸残

基 (A) :

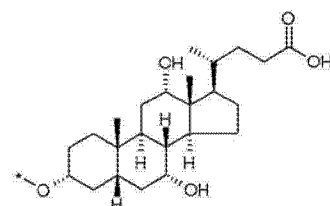
[0223]



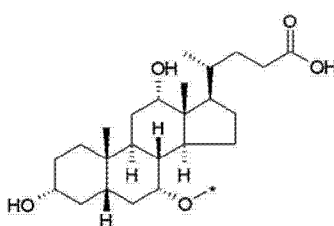
胆烷酸



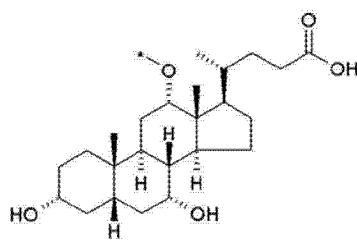
胆酸



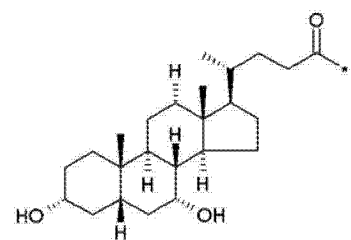
胆酸



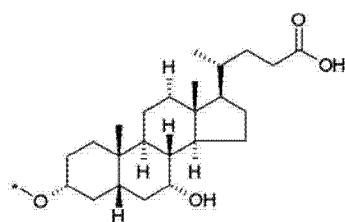
胆酸



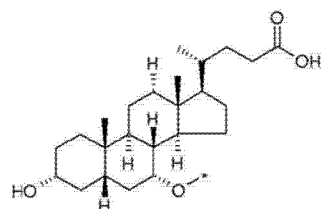
胆酸



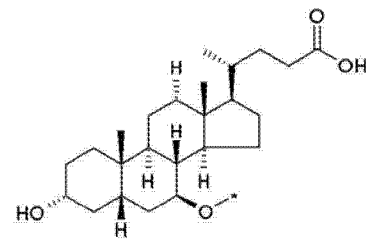
鹅脱氧胆酸



鹅脱氧胆酸

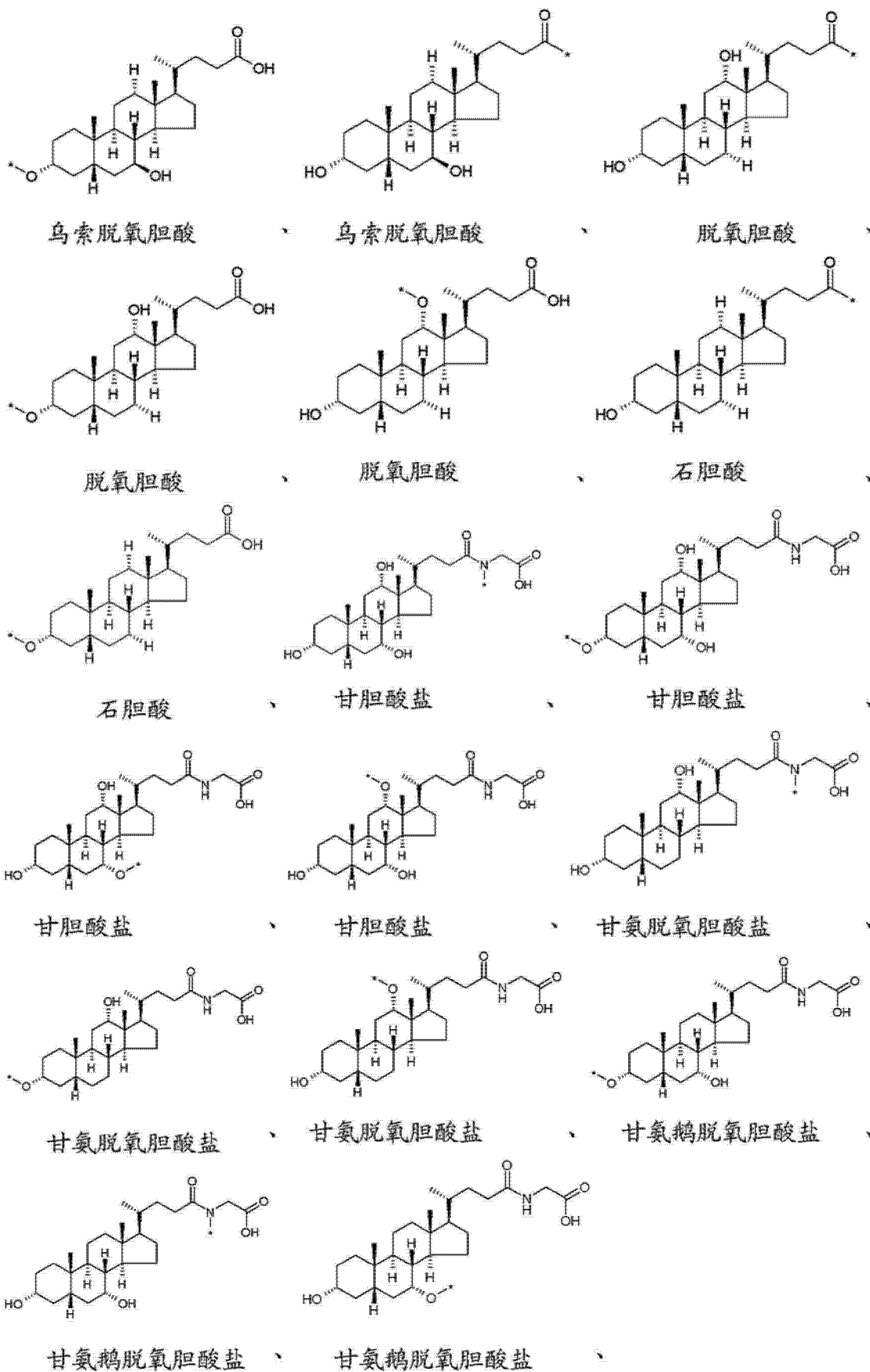


鹅脱氧胆酸

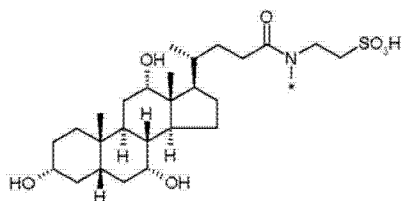


乌索脱氧胆酸

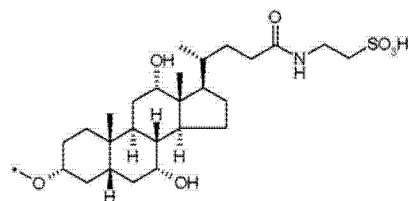
[0224]



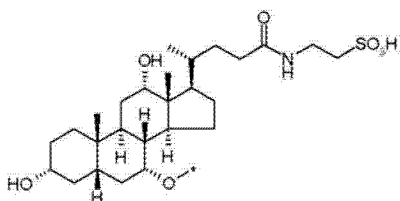
[0225]



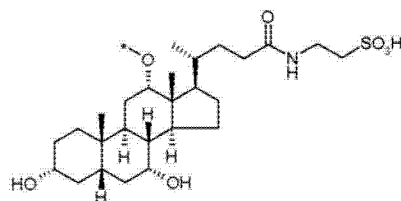
牛磺胆酸盐



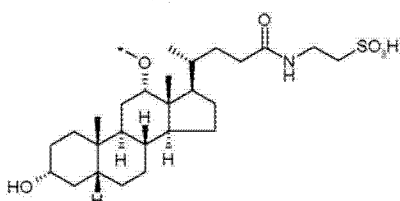
牛磺胆酸盐



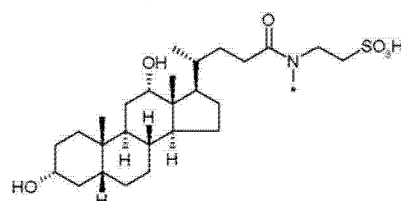
牛磺胆酸盐



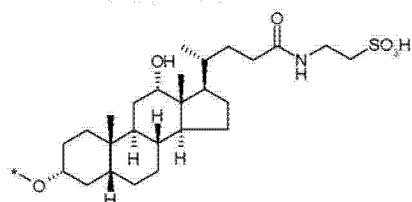
牛磺胆酸盐



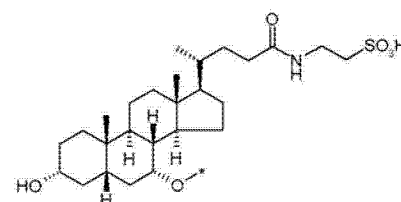
牛磺脱氧胆酸盐



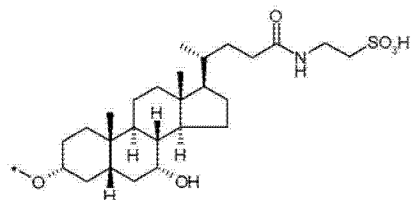
牛磺脱氧胆酸盐



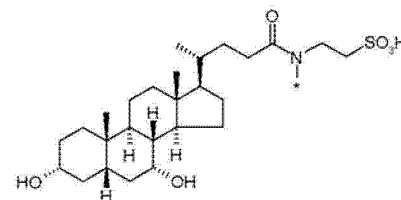
牛磺脱氧胆酸盐



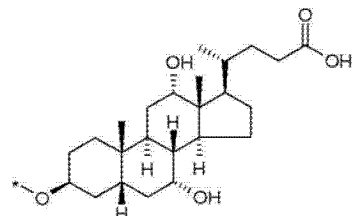
牛磺鹅脱氧胆酸盐



牛磺鹅脱氧胆酸盐

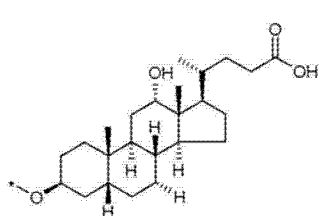


牛磺鹅脱氧胆酸盐



表胆酸

和

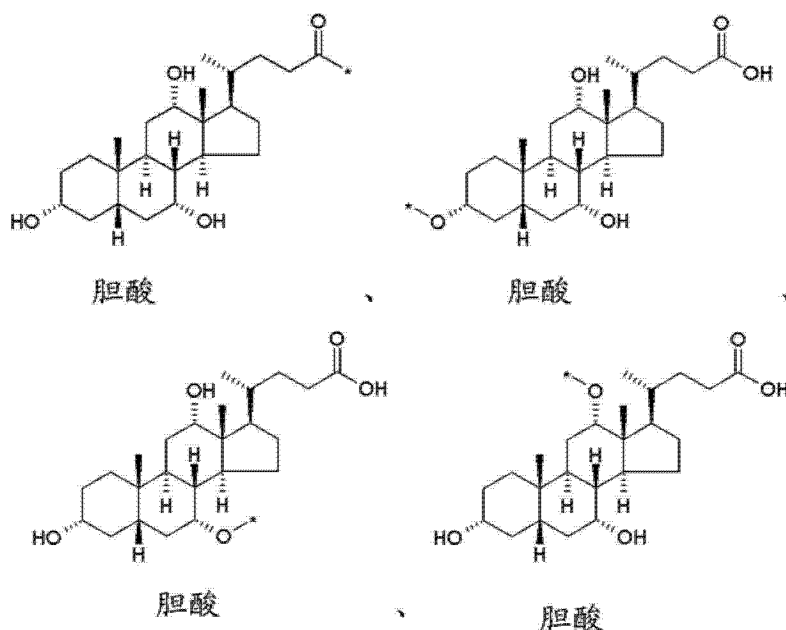


表脱氧胆酸

[0226] 其中(*)表示亲水间隔物(B)通过W的连接点。

[0227] 在一个实施方案中,胆汁酸残基(A)为胆酸残基,这类胆酸残基选自:

[0228]



[0229] 且其中 (*) 表示亲水间隔物 (B) 通过 W 的连接点。

[0230] 由上可见,在一个实施方案中,胆酸残基可经由胆酸残基的“3”、“7”、“12”或“24”位通过 W 与亲水间隔物 (B) 连接。

[0231] 在一个实施方案中,胆酸残基经由“3”、“7”或“12”位通过 W 与亲水间隔物 (B) 连接。

[0232] 在一个实施方案中,胆酸残基经由“3”位通过 W 与亲水间隔物 (B) 连接。

[0233] 在一个实施方案中,胆酸残基经由“7”位通过 W 与亲水间隔物 (B) 连接。

[0234] 在一个实施方案中,胆酸残基经由“12”位通过 W 与亲水间隔物 (B) 连接。

[0235] 亲水间隔物

[0236] 胆汁酸接头和 / 或生长激素缀合物的进一步的特征在于存在亲水间隔物。亲水间隔物旨在提供自生长激素化合物与胆汁酸残基的合适距离,以使胆汁酸接头的功能性最优化。其它功能性可与间隔物的基团以及各个接头相关,例如缀合物的优良合成或优良的次级作用。

[0237] 亲水间隔物 (B) 的溶解性可通过其 logP 值来描述。LogP, 亦称为分配系数,是在平衡时两种不混溶溶剂的混合物的两相中化合物的浓度之比的对数。通常一种溶剂是水,而第二种选自辛-1-醇、氯仿、环己烷和丙二醇二壬酸酯 (PGDP)。在这些不同溶剂中测量的 LogP 值显示主要由氢键结合效应引起的差异。辛醇可捐出和接受氢键,而环己烷是惰性的。氯仿可捐出氢键,而 PGDP 只可接受氢键。

[0238] 在本发明的一个实施方案中,亲水间隔物在辛-1-醇、氯仿、环己烷和丙二醇二壬酸酯 (PGDP) 中的 LogP 低于 -0.5。

[0239] 在进一步的实施方案中,亲水间隔物在辛-1-醇、氯仿、环己烷和丙二醇二壬酸酯 (PGDP) 中的 logP 低于 -1。

[0240] 或者,可应用已发表的算法,计算亲水间隔物部分的 LogP 值为 mLogP 和 / 或 cLogP (J. Am. Chem. Soc. (1964), 865175-5180 "A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients (从分配系数推导的新的取代基常数 π)", C. A. Lipinski 等. Advanced Drug Delivery Reviews, (1997) 233-25, "Experimental and Computational

Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings(在药物研发和发展背景下估算溶解性和渗透性的实验和计算方法)”和 I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, Chem. Pharm. Bull. (1994)42976-978”Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods(通过几种方法计算的药物 logP 值的可靠度的比较)”)。

[0241] 在本发明的一个实施方案中,亲水间隔物的 mLogP<0。在进一步的实施方案中,亲水间隔物 (hydrophilic space) 的 mLogP 低于 -0.50,例如低于 -1.00。例如低于 -1.50、-2.00、-2.50、-3.00、-3.50、-4.00 或 -4.50。

[0242] 在本发明的一个实施方案中,亲水间隔物的 cLogP<0。在进一步的实施方案中,亲水间隔物的 cLogP 低于 -0.50,例如低于 -1.00。例如低于 -1.50、-2.00、-2.50、-3.00、-3.50、-4.00 或 -4.50 或例如低于 -5.00、-5.50 或 -6.00。

[0243] 当使改性基团(例如胆酸残基)与多肽和蛋白质缀合时,蛋白质和胆酸残基间的距离可影响最终化合物的功能性,因此使用亲水间隔物可能是有利的。使用亲水间隔物可提高最终化合物的水溶性以及提高这类化合物的收率和合成简易性,因为接头(包括亲水间隔物)和蛋白质间的缀合反应常常在缓冲水溶液环境中进行。如下文所见,用于本发明的亲水间隔物提供呈 COOH 基团形式的多个负电荷和/或呈 $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n$ 重复的额外极性,这两者无疑可分别影响溶解性。

[0244] 在一个实施方案中,亲水间隔物是利用包含至少 5 个非氢原子(其中其 30-50% 为 N 或 O)的化学部分将生长激素化合物与胆汁酸残基分隔开的间隔物。

[0245] 在一个实施方案中,亲水间隔物是利用包含 0-5 个 COOH 基团的化学部分将生长激素化合物与胆汁酸残基分隔开的间隔物。

[0246] 在一个实施方案中,亲水间隔物是利用包含 0-100 个 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 基团的化学部分将生长激素化合物与胆汁酸残基分隔开的间隔物。

[0247] 在一个实施方案中,亲水间隔物 (B) 包含至少一个 OEG 基序,基团 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸 (dioxaoctanic acid) 即 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ 。在进一步的实施方案中,亲水间隔物包含至少两个 OEG 基序。在一个实施方案中,这类 OEG 基序的取向使得 $-\text{CO}-$ 最接近生长激素化合物, $-\text{NH}-$ 最接近白蛋白结合残基。

[0248] 在包含两个 OEG 基序的其它实施方案中,两个基序具有相同的方向或不同的方向。在一个实施方案中,两个这类 OEG 基序彼此邻接定位,而在备选的实施方案中,这类 OEG 基序被共价连接的一个或多个原子分隔开。

[0249] 在一个实施方案中,亲水间隔物包含至少一个谷氨酸残基。谷氨酸包含两个羧基基团。其可使用 γ -羧基与赖氨酸的 ϵ -氨基,或与 OEG 分子的氨基(如存在的话),或与另一个 Glu 残基的氨基(如果存在的话)形成酰胺键。或者可使用 α -羧基与赖氨酸的 ϵ -氨基,或与 OEG 分子的氨基(如存在的话),或与另一个 Glu 残基的氨基(如果存在的话)形成类似的酰胺键。Glu 的氨基进而可与白蛋白结合残基的羧基,或与 OEG 基序的羧基(如果存在的话),或与另一个 Glu 的 γ -羧基或 α -羧基(如果存在的话)形成酰胺键。

[0250] 在一个实施方案中,亲水间隔物 (B) 可包含两个或更多个谷氨酸残基。一个 Glu 的氨基与第二个 Glu 的 γ -羧基的连接可称为“ γ -Glu”基序。

[0251] 在一个实施方案中,亲水间隔物包含至少一个组合的 OEG-Glu 基序 $(-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-$

-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-NH-CH(-COOH)-(CH₂)₂-CO- 或至少一个组合的 Glu-OEG 基序 (-NH-CH(-COOH)-(CH₂)₂-CO-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-) 或其组合, 其中这类 Glu-OEG 和 OEG-Glu 基序可被一个或多个共价连接的原子分隔开, 或通过 Glu 形成 γ 1-Glu 的酰胺键彼此直接键合。

[0252] 在一个实施方案中, 亲水间隔物 (B) 具有下式

[0253] $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0254] 其中

[0255] X_1 为 $-W_1-[(CHR^3)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^4)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

[0256] X_2 为 $-[(CHR^5)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^6)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

[0257] X_3 为 $-[(CHR^7)_{I5}-W_6]_{m7}-$,

[0258] X_4 为 F-D1-(CH₂)_{I6}-D2-,

[0259] I1、I2、I3、I4、I5 和 I6 独立选自 0-10,

[0260] m1、m3、m4、m6 和 m7 独立选自 0-6,

[0261] m2 和 m5 独立选自 0-6,

[0262] n1、n2、n3 和 n4 独立选自 0-6,

[0263] F 为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键,

[0264] 其中芳基和杂芳基被卤素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆-烷基任选取代,

[0265] R³、R⁴、R⁵、R⁶ 和 R⁷ 独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆-烷基、芳基或杂芳基;

[0266] 其中烷基、芳基和杂芳基被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH 任选取代,

[0267] D1、D2、E1 和 E2 独立选自 -O-、-N(R⁸)-、-N(C(O)R⁹)- 或价键; 其中 R⁸ 和 R⁹ 独立表示氢或 C₁₋₆-烷基,

[0268] W₁-W₆ 独立选自 -NH-、-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-、-NHC(O)C₁₋₆-烷基、-C(O)NHC₁₋₆-烷基、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)- 或价键; 其中 s2 为 0 或 1。

[0269] 在更具体的实施方案中, 间隔物如上定义, 其中

[0270] I1、I2、I3、I4、I5 和 I6 独立地为 0-6,

[0271] m1、m3、m4、m6 和 m7 独立地为 0-6,

[0272] m2 和 m5 独立地为 0-6, 和

[0273] n1、n2、n3 和 n4 独立地为 0-6。

[0274] 在更具体的实施方案中, 间隔物如上定义, 其中 D1 和 D2 独立选自 -O- 或价键。

[0275] 在更具体的实施方案中, 间隔物如上定义, 其中 E1 和 E2 独立选自 -O- 或价键。

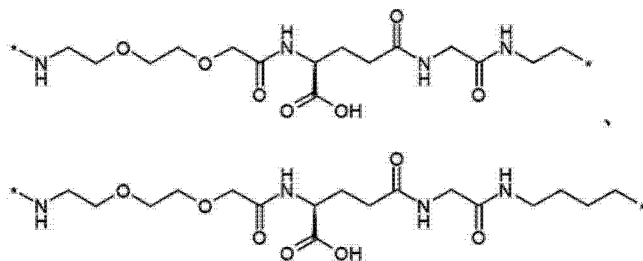
[0276] 在更具体的实施方案中, 间隔物如上定义, 其中 W₁-W₆ 独立选自: -NH-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆-烷基或 -C(O)NHC₁₋₆-烷基和价键。

[0277] 在更具体的实施方案中, 间隔物如上定义, 其中 R³、R⁴、R⁵、R⁶ 和 R⁷ 独立选自

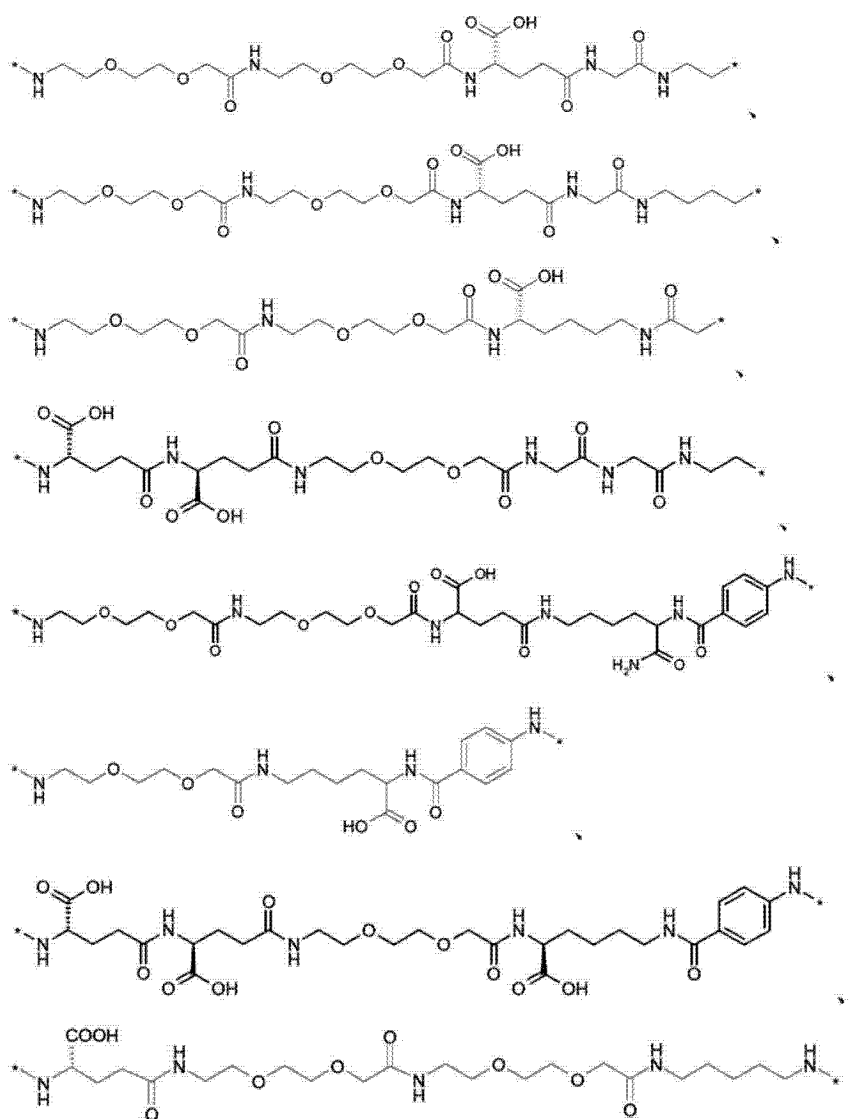
氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)_2OH$ 或 C_{1-6} -烷基；其中烷基被 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 或 $-S(O)_2OH$ 任选取代。

[0278] 在本发明的另一个实施方案中，生长激素缀合物包含选自以下的亲水间隔物 (B)：

[0279]



[0280]



[0281] 化学连接基团

[0282] 胆汁酸接头和 / 或生长激素缀合物的进一步特征在于由胆汁酸接头的合成方法而定的化学连接基团 (w)。化学连接基团是胆汁酸残基 (A) 和亲水间隔物 (B) 连接的结果，

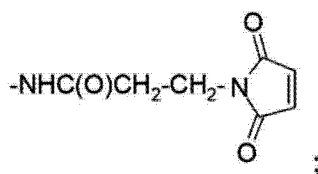
确切地说,作为化学活性基团的用于合成接头的中间体在胆汁酸接头合成期间可以改变(A-W-B1-X),其中X为离去基团(LG)例如卤素或可参与形成B1和被缀合的化合物(例如hGH或备选化合物)间的共价化学键的化学活性基团。

[0283] 在一个实施方案中,化学基团(W)选自: $-\text{NR}^1-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})[\text{CH}_2]_{n1}\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ 、或 $-\text{C}(\text{O})-$;

[0284] 其中 R^1 选自氢或 $-(\text{CH}_2)_{n2}\text{R}^2$, $n2$ 为1-4, R^2 选自 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 或四唑-1-基,其中 $n1$ 为2-8。

[0285] 在一个实施方案中,化学基团(X)选自: $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{LG}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$,或

[0286]



[0287] 其中LG为卤素。

[0288] 生长激素缀合物

[0289] 如本文所述,通过本文所述生长激素化合物和胆汁酸接头共价连接形成生长激素缀合物。

[0290] 胆汁酸接头可与生长激素化合物的任何残基共价结合,只要如之前部分所述保持GH的活性。在一个实施方案中,GH在野生型氨基酸残基上缀合。

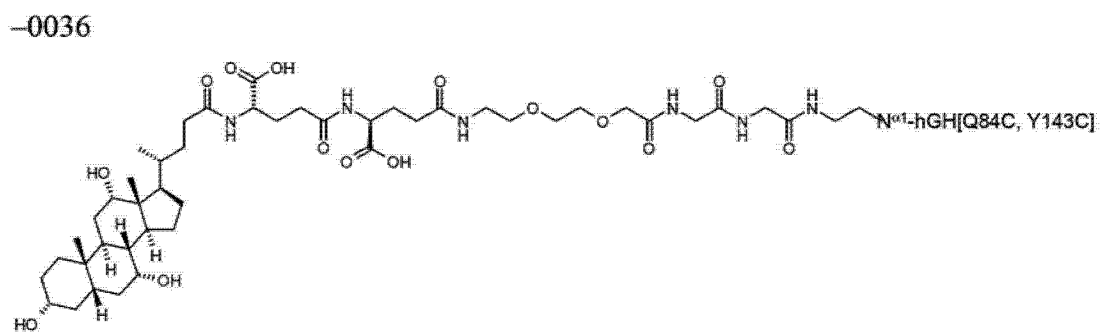
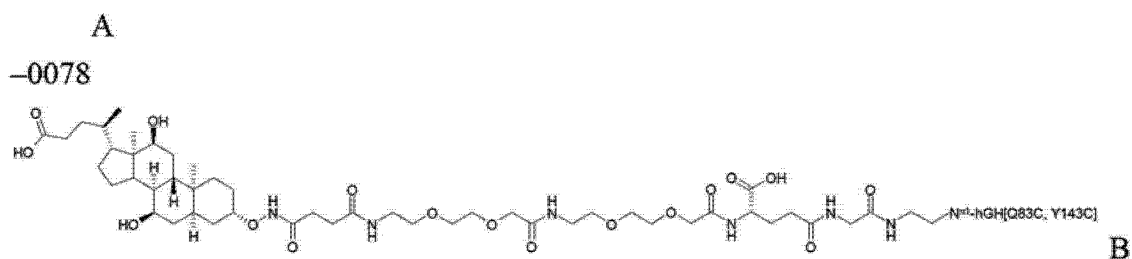
[0291] 在一个实施方案中,GH在选自以下的野生型氨基酸残基上缀合:N端、C端、Gln40和Gln141。

[0292] 在一个实施方案中,GH在突变体残基上缀合。

[0293] 在一个实施方案中,GH在突变体残基上缀合,所述突变体残基是作为单点突变引入生长激素化合物中的cys残基。

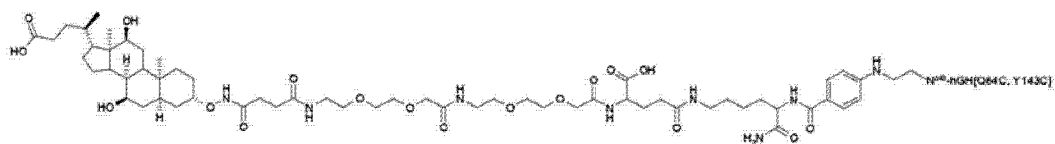
[0294] 在一个实施方案中,生长激素缀合物选自:

[0295]

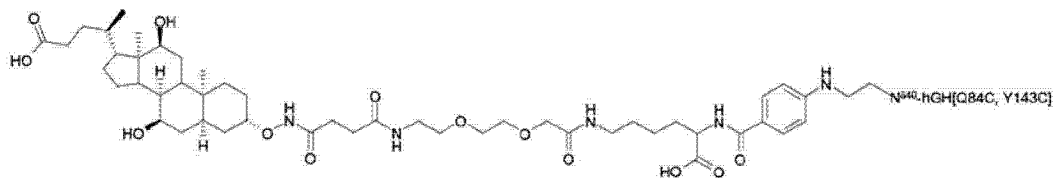


-0050

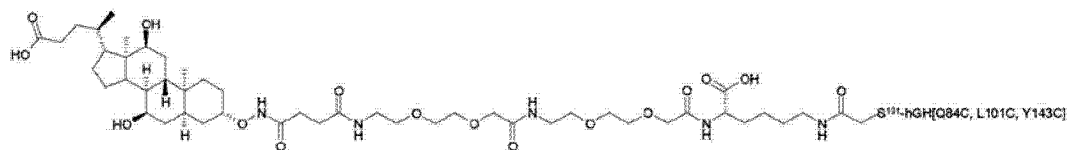
[0296]



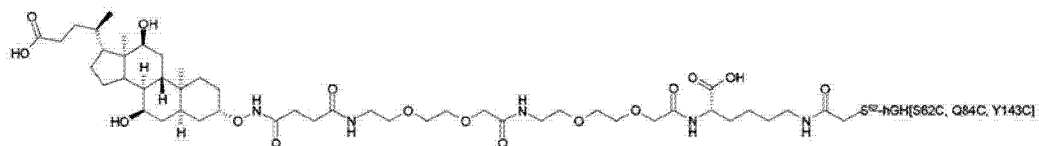
D-0061



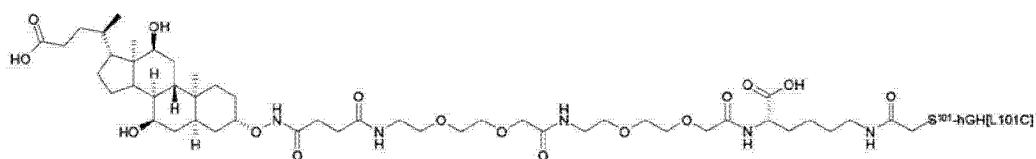
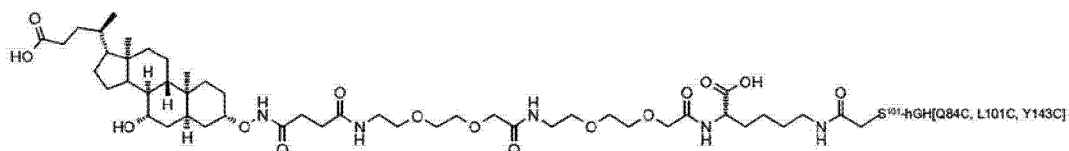
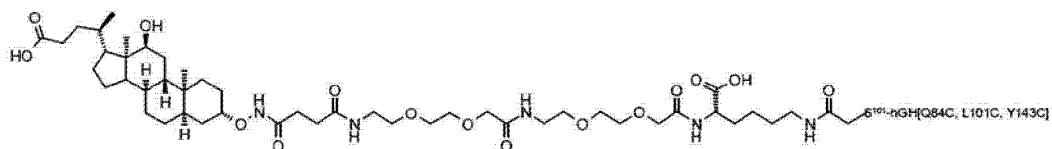
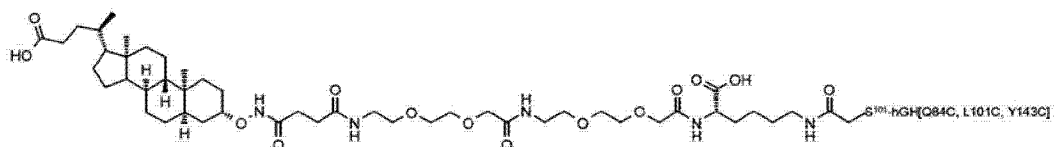
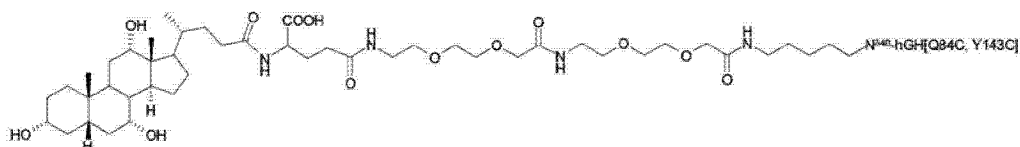
E-0081



F-0087

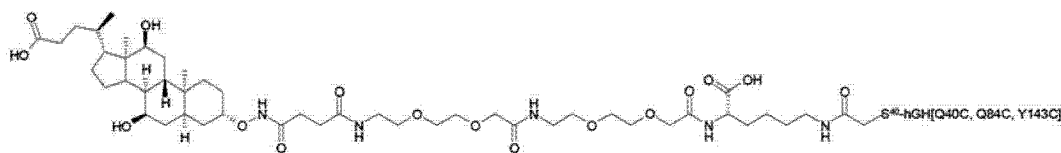


G-0088



[0297] 和

[0298]



[0299] 制备生长激素缀合物的方法

[0300] 以下本文提供的化学法部分描述了适于制备本发明的生长激素缀合物的方法。本领域技术人员可了解制备这类缀合物的备选方法。

[0301] 本发明的一个方面涉及用于制备生长激素缀合物的方法，所述方法包括以下步骤：

[0302] a) 使胆汁酸接头与生长激素化合物 (GH) 缀合，和

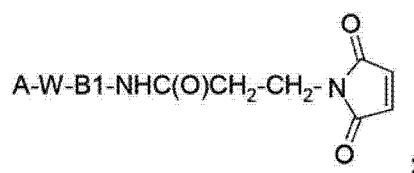
[0303] b) 得到生长激素缀合物。

[0304] 在一个实施方案中，所得到的生长激素缀合物用本文所述的式 I 限定，其中 A 表示胆汁酸残基，B 表示亲水间隔物，W 是连接 A 和 B 的化学基团。

[0305] 在一个实施方案中，用于所述方法的胆汁酸接头选自：

[0306] A-W-B1-NH₂、A-W-B1-CHO、A-W-B1-LG、A-W-B1-C(O)NHCH₂-CH=CH₂ 和

[0307]



[0308] 其中 A 表示胆汁酸残基，B1 表示亲水间隔物，W 是连接 A 和 B1 的化学基团。

[0309] 根据本文的描述，显然，B1 与有关所得到的生长激素缀合物的亲水间隔物中定义的 B 有关。

[0310] 在一个实施方案中，亲水间隔物 B1 包含亲水间隔物 B 的任一特征。在一个实施方案中，所得到的生长激素缀合物的亲水间隔物 B 包含亲水间隔物 B1。

[0311] 在一个实施方案中，亲水间隔物 B1 具有下式：-X₁-X₂-X₃-X₄-

[0312] 其中

[0313] X₁ 为 -W₁-[(CHR³)_{I1}-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR⁴)_{I2}-W₃]_{m3}}_{n2}-

[0314] X₂ 为 -[(CHR⁵)_{I3}-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁶)_{I4}-W₅]_{m6}}_{n4}-

[0315] X₃ 为 -[(CHR⁷)_{I5}]_{m7}-

[0316] X₄ 为价键，

[0317] I1、I2、I3、I4 和 I5 独立选自 0-10，

[0318] m1、m3、m4、m6 和 m7 独立选自 0-6，

[0319] m2 和 m5 独立选自 0-6，

[0320] n1、n2、n3 和 n4 独立选自 0-6，

[0321] R³、R⁴、R⁵、R⁶ 和 R⁷ 独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆-烷基、芳基或杂芳基；

[0322] 其中烷基、芳基和杂芳基被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH 任选取代，

[0323] E1 和 E2 独立选自 $-O-$ 、 $-NR^8-$ 、 $-N(COR^9)-$ 或价键；

[0324] 其中 R^8 和 R^9 独立表示氢或 C_{1-6} -烷基，

[0325] W_1-W_6 独立选自 $-NH-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 或价键；其中 $s2$ 为 0 或 1。

[0326] 药物组合物

[0327] 本发明还涉及包含本文定义和描述的生长激素缀合物的药物组合物。

[0328] 在一个实施方案中，可以若干剂型给予本发明的药物组合物，例如作为溶液剂、混悬剂、乳剂、微乳剂、复合型乳剂、泡沫剂、药膏剂、糊剂、硬膏剂 (plaster)、软膏剂、片剂、包衣片剂、用吸收促进化合物共配制的片剂、冲洗剂、胶囊剂（例如硬明胶胶囊剂和软明胶胶囊剂）、包衣胶囊剂、栓剂、滴剂、凝胶剂、喷雾剂、散剂、微粒剂、纳米粒剂、气雾剂、吸入剂、注射用溶液剂、原位转化溶液剂 (in situ transforming solution)（例如原位胶凝剂、原位沉降剂、原位沉淀剂、原位结晶剂）、输液剂和植入剂。

[0329] 在本发明的一个实施方案中，可通过口服、皮下、肌内、经鼻和静脉内给药给予药物组合物。

[0330] 在本发明的一个实施方案中，可以通过若干给药途径给予药物组合物，例如舌、舌下、含服、口内、直肠、胃或肠内。

[0331] 在一个实施方案中，使用全部为本领域技术人员熟知的装置，例如定量吸入器、干粉吸入器和喷雾器，将本发明的药物组合物用于固体剂、半固体剂、散剂和溶液剂的组合物中以用于经肺给予肽缀合物，例如 GH 缀合物。

[0332] 在一个实施方案中，本发明的药物组合物还可以例如通过共价、疏水或静电相互作用与药物载体、药物递送系统或高级药物递送系统混配或连接，以进一步提高 GH 缀合物的稳定性、提高生物利用度、提高溶解度、降低不良反应、实现本领域技术人员熟知的计时治疗和提高患者顺应性或其任何组合。载体、药物递送系统和高级药物递送系统的实例包括但不限于聚合物，例如纤维素及衍生物、多糖（例如葡聚糖及衍生物、淀粉及衍生物、脱乙酰壳多糖及衍生物）、聚乙烯醇、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯聚合物、聚乳酸和聚乙醇酸及其嵌段共聚物、聚乙二醇、载体蛋白（例如白蛋白）、凝胶（例如热凝胶系统，例如本领域技术人员熟知的嵌段共聚物系统）、微团、脂质体、微球、纳米颗粒、液晶及其分散体、脂质-水系统的相特征领域技术人员熟知的 L2 相及其分散体、聚合物微团、复乳（自乳化和自微乳化）、环糊精及其衍生物和树枝状大分子。

[0333] 通过引入结合到本文的用于口服制剂的递送系统的多个实例包括表面活性剂，已知其增加亲水化合物的渗透。表面活性剂的实例为癸酸钠、酒石酸、Brij56、Brij58、Brij35、Brij30、脂肪酸糖、牛磺脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠、对叔辛基酚聚氧乙烯-9.5 (Triton X-100)（参见 Takatsuka 等, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2006) 62, 52-58 (2006)）。口服递送系统还可包括蛋白酶抑制剂和粘液溶解物质。蛋白酶抑制剂的实例为大豆胰蛋白酶抑制剂、抑肽酶和胰凝乳蛋白酶抑制剂。粘液溶解物质的实例为二巯苏糖醇 (dithiotreitol) 和 N-乙酰基半胱氨酸。通过同时使用溶真菌剂和表面活性剂来增强较不被吸收的亲水化合物的肠吸收。还有 Emisphere 开发的 5-CNAC 和类似化合物 (W02008/101240、W02008/11283687、W02008/027854、W02008/014430、US2008/0095837)。

[0334] 口服制剂递送系统还可以包括紧密连接调节剂,其起上皮细胞的特异性紧密连接开孔 (opener) 的功能。这些紧密连接调节剂暂时地或非暂时地起作用,并且干扰将上皮细胞紧密保持在一起的蛋白质复合体 (Kondoh 等, *Mol Pharmacology* (2005) 67, 749-756)。口服制剂递送系统的其它实例包括粘膜粘着剂,例如含有硫醇的添加剂 (共制剂) 或共价连接的侧链可以增加与粘膜层、脱乙酰壳多糖和卡波姆分子、聚丙烯酸酯、PEG 及其衍生物的粘附 (Palmerberger 等, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2007) 66, 405-412; Leitner, V. M 等, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2003) 56, 207-214; H. L. Leuβ en 等, *Pharm. Res.* (1996) 13, 1668-1672; H. L. Leuβ en 等, *Int. J. Pharmaceuticals* (1996) 141, 39-52; Takatsuka 等, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2006) 62, 52-58。口服制剂递送系统的其它实例包括胞膜窖 / 脂质筏、SMVT (钠依赖性的多种维生素运载蛋白)。口服递送制剂的另一个实例包括受体介导的转胞吞作用 (transcytosis), 例如使用维生素 B12 (钴胺素) 作为底物的 IRF (内因子受体)、FcRn (新生 Fc 受体) 和运铁蛋白 (M. Gumbleton, *Adv. Drug. Del. Rev.* (2001) 49, 281-300; K. C. Partlow 等, *Biomaterials* (2008) 29, 3367-3375; Lee 等, *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2007) 46, 211-217; S. Y. Chae 等, *Bioconjugate Chem.* (2008) 19, 334-341; Russell-Jones G.: 载于 *Membrane Transporters as Drug Targets* 中的第 17 章 (1999); Said 和 Mohammed *Curr. Opin. Gastroent.* (2006) 22, 140-146; Chalasani 等, *J. Con. Release* (2007) 117, 421-429; H. Li 和 Z. M. Qian *Med. Res. Rev.* (2002) 22, 225-250; Liang 和 Yang *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2005) 225, 734-738)。

[0335] 在一个实施方案中,本发明的 GH 化合物发挥生长激素活性,可用于治疗可获益于循环生长激素的量增加的疾病或状态。这类疾病或状态包括生长激素缺乏 (GHD); 特纳综合征; 普 - 韦综合征 (Prader-Willi syndrome, PWS); 努南综合征; 唐氏综合征; 慢性肾病; 幼年型类风湿性关节炎; 囊性纤维化; 接受 HAART 治疗的儿童 HIV 感染 (HIV/HALS 儿童); 小于胎龄 (SGA) 出生的矮小儿童 (short children); 非 SGA 的以极低出生体重 (VLBW) 出生的儿童的身材矮小症; 骨骼发育不良; 软骨发育不良; 软骨发育不全; 特发性身材矮小症 (ISS); 成人 GHD; 长骨骨折, 所述长骨例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨 (metacarpal)、跖骨 (metatarsal) 和指骨 (digit); 海绵骨例如头骨 (skull)、手腕骨 (base of hand) 和脚底骨 (base of foot) 的骨折; 例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者; 经历或进行牵引成骨作用 (distraction osteogenesis) 的患者; 髋关节置换或关节盘置换 (disc replacement)、半月板修复、脊柱融合或例如在膝、髋、肩、肘、腕或颞中的假体固定后的患者; 其中已固定骨接合材料 (例如钉、螺钉和板) 的患者; 骨折不愈合或畸形愈合的患者; 例如胫骨或第一脚趾骨解剖 (osteotomy) 后的患者; 移植植物植入后的患者; 创伤或关节炎引起的膝关节软骨退化; 特纳综合征患者中的骨质疏松症; 男性骨质疏松症; 长期透析的成年患者 (APCD); APCD 中营养不良相关的心血管疾病; APCD 中的恶病质逆转; APCD 中的癌症; APCD 中的慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease); APCD 中的 HIV; APCD 老年人; APCD 中的慢性肝病; APCD 中的疲劳综合征; 克罗恩病 (Crohn's disease); 肝功能受损; 患有 HIV 感染的男性; 短肠综合征; 向心性肥胖; HIV 相关脂肪营养不良综合征 (HALS); 男性不育症; 重大选择性手术、酒精 / 药物解毒或神经创伤后的患者; 衰老; 虚弱的老年人; 骨关节炎; 创伤性损伤的软骨; 勃起功能障碍; 纤维肌痛; 记忆障碍; 抑郁; 创伤性脑损伤; 蛛网膜下腔出血; 极低出生体重; 代谢综合征; 糖皮质

激素性肌病或糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症。生长激素还可用于加快肌肉组织、神经组织或创伤的愈合；加快或改善血液流到受损组织；或降低受损组织的感染率。

[0336] 在一个实施方案中，本发明涉及治疗疾病的方法，其中生长激素化合物活性可用于治疗可获益于循环生长激素化合物的量增加的疾病或状态，所述方法包括给予患者有效量的 SEQ ID No. 1 的生长激素化合物或其缀合物的药物组合物。

[0337] 在一个实施方案中，本发明涉及一种方法，所述方法包括给予有需要的患者治疗有效量的本发明的生长激素化合物。本发明因此提供用于治疗这些疾病或状态的方法，所述方法包括给予有需要的患者治疗有效量的本发明的生长激素化合物。

[0338] 本文使用的本发明化合物的“治疗有效量”意指足以治愈、减轻或部分抑制给定疾病及其并发症的临床表现的量。将足以实现这一目的的量定义为“治疗有效量”。对每一目的而言，有效量将取决于例如疾病或损伤的严重性以及受试者的体重、性别、年龄和总体状态。应当理解，使用常规实验可以确定合适的剂量，这完全属于受过训练的医师或兽医的普通技术范围。

[0339] 在一个实施方案中，本发明提供生长激素化合物或其缀合物在制备用于治疗上述疾病或状态的药物中的用途。

[0340] 在本文中定义和描述的本发明的生长激素化合物欲用作治疗性蛋白质。

[0341] 本文引用的所有参考文献，包括出版物、专利申请和专利均通过引用以其整体结合到本文中，其程度与分别具体指明每一参考文献通过引用结合以及在本文中以其整体提供相同（至法律允许的最大程度）。

[0342] 在本文中使用的所有标题与副标题仅为了方便，而不应解释成以任何方式限制本发明。

[0343] 本文提供的任何和全部实施例或示例性用语（例如“例如”）的使用，只是欲更好地阐明本发明，并不对本发明的范围进行限制，除非另有说明。说明书中任何用语都不应解释为表明任何非要求保护的要素是实施本发明所必需的。

[0344] 本文中专利文献的引用和结合只是为了方便，并不反映对这些专利文献的有效性、专利性和/或可实施性有任何观点。

[0345] 根据适用法律的许可，本发明包括随附权利要求书中所述主题的所有的修改和等同内容。

[0346] 下面通过本文提供的实施方案的非限制性列表，对本发明作进一步地描述。

[0347] 实施方案 1. 一种下式 (I) 的生长激素缀合物和药学上可接受的盐

[0348] A-W-B-GH(I)

[0349] 其中

[0350] GH 表示生长激素化合物，

[0351] A 表示胆汁酸残基，

[0352] B 表示与 GH 共价连接的亲水间隔物，

[0353] W 是连接 A 和 B 的化学基团。

[0354] 实施方案 2. 实施方案 1 的生长激素缀合物，其中与 SEQ ID NO1 限定的人生长激素 (hGH) 相比，所述生长激素化合物 GH 包含一个或多个额外的二硫键。

[0355] 实施方案 3. 实施方案 2 的生长激素缀合物，其中所述生长激素化合物 GH 包含连

接环区段和螺旋区段的一个或多个额外的二硫键。

[0356] 实施方案 4. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含至少一对突变, 所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26/V102C、D26/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C 和 / 或 V185C/S188C。

[0357] 实施方案 5. 实施方案 4 的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含至少一对突变, 所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 A17C/E174C、H21C/M170C、D26/V102C、D26/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 和 / 或 R94C/D107C。

[0358] 实施方案 6. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含额外的二硫键, 其中至少一个半胱氨酸存在于对应于 SEQ ID NO1 中的 AA128-154 的 L3 中或存在于例如对应于 SEQ ID NO1 中的 AA135-148 的区域中。

[0359] 实施方案 7. 实施方案 6 的生长激素缀合物, 其中额外的二硫键的至少一个半胱氨酸存在于 L3 中对应于 SEQ ID NO1 中的 AA141、AA142、AA143、AA144、AA145 或 AA146、优选 AA143 或 AA144 的位置上。

[0360] 实施方案 8. 实施方案 6 的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含至少一对突变, 所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C 和 / 或 F92C/T148C。

[0361] 实施方案 9. 实施方案 8 的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含至少一对突变, 所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C 和 / 或 F92C/T148C。

[0362] 实施方案 10. 前述权利要求中任一项的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含连接 L3 与 L1 的额外二硫键。

[0363] 实施方案 11. 实施方案 10 的生长激素缀合物, 其中所述化合物包含将对应于 SEQ ID NO1 中的 L3 中的 AA54、AA55、AA56、AA57、AA58 或 AA59 的氨基酸残基与对应于 L1 中的 AA143 或 AA144 的氨基酸连接的额外二硫键。

[0364] 实施方案 12. 实施方案 11 的生长激素缀合物, 其中所述化合物包含至少一对突变, 所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C 和 / 或 S71C/S132C。

[0365] 实施方案 13. 实施方案 2-9 中任一个的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含连接 L3 与螺旋区段的额外二硫键。

[0366] 实施方案 14. 实施方案 13 的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含连接 L3 与螺旋 2 的额外二硫键。

[0367] 实施方案 15. 实施方案 14 的生长激素缀合物, 其中所述化合物包含将对应于 SEQ ID NO1 的 H2 中的 AA84 或 AA85 的氨基酸残基与对应于 L3 中的 AA143 或 AA144 的氨基酸连接的额外二硫键。

[0368] 实施方案 16. 实施方案 14 的生长激素缀合物, 其中所述化合物包含至少一对突变, 所述突变对应于 SEQ ID No. 1 的 L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C 和 F92C/T148C。

[0369] 实施方案 17. 实施方案 16 的生长激素缀合物, 其中所述化合物包含至少一对突变, 所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C 和 / 或 F92C/T148C。

[0370] 实施方案 18. 实施方案 1-9 中任一个的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含连接 L2 与螺旋 1 的额外二硫键。

[0371] 实施方案 19. 实施方案 18 的生长激素缀合物, 其中所述化合物包含至少一对突变, 所述突变对应于 D26C/V102C 或 D26C/Y103C。

[0372] 实施方案 20. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述多肽序列与 SEQ ID NO1 限定的 hGH 有至少 80%、例如 90%、例如 95%、例如 96%、例如 97%、例如 98% 或例如 99% 同一性。

[0373] 实施方案 21. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含至少一个单点突变位于蛋白酶位点。

[0374] 实施方案 22. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含至少一个单点突变, 其位于对应于 SEQ ID NO1 的 1-55、57、58、60-63、67-87、89-91、93、95-100、102-128、131-132、135-139、141、142、144、148-182、184、185 和 / 或 187-191 位的位置上。

[0375] 实施方案 23. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含至少一个单点突变, 其位于对应于 SEQ ID NO1 的 55、57、62、101、134、136、142 和 / 或 144 位的位置上。

[0376] 实施方案 24. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中至少一个单点突变存在于 L1 (对应于 SEQ ID NO1 的 AA36-71) 和 / 或 L3 (对应于 SEQ ID NO1 的 AA128-154) 中。

[0377] 实施方案 25. 实施方案 24 的生长激素缀合物, 其中至少一个单点突变存在于 L1 中。

[0378] 实施方案 26. 实施方案 25 的生长激素缀合物, 其中至少一个单点突变存在于 L1 的中区 (对应于 SEQ ID NO1 的 AA40-65)。

[0379] 实施方案 27. 实施方案 26 的生长激素缀合物, 其中至少一个单点突变存在于对应于 SEQ ID NO1 的 40、41、42 和 / 或 62 位的位置上。

[0380] 实施方案 28. 实施方案 24 的生长激素缀合物, 其中至少一个单点突变存在于 L3 中。

[0381] 实施方案 29. 实施方案 28 的生长激素缀合物, 其中至少一个单点突变存在于 L3 的中区 (对应于 SEQ ID NO1 的 AA135-148)。

[0382] 实施方案 30. 实施方案 29 的生长激素缀合物, 其中至少一个单点突变存在于对应于 SEQ ID NO1 的 134、136、139、142 和 / 或 144 位的位置上。

[0383] 实施方案 31. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述化合物的体外活性是 SEQ ID NO1 限定的野生型 hGH 的活性的至少 5%。

[0384] 实施方案 32. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述多肽的功能性体内半寿期是人生长激素的 2 倍或更多倍。

[0385] 实施方案 33. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述多肽的功能性体内半寿期是人生长激素的 2 倍至 10 倍。

[0386] 实施方案 34. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述生长激素缀合物对以下一种或多种蛋白酶的降解是稳定的: 例如消化蛋白酶, 例如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、羧肽酶和 / 或弹性蛋白酶。

[0387] 实施方案 35. 实施方案 34 的生长激素缀合物, 其中所述化合物对胰凝乳蛋白酶和 / 或弹性蛋白酶的降解是稳定的。

[0388] 实施方案 36. 实施方案 35 的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含至少一对突变, 所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 和 / 或 S85C/S144C。

[0389] 实施方案 37. 实施方案 36 的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含至少一对突变, 所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 D26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C 和 / 或 R94C/D107C。

[0390] 实施方案 38. 实施方案 35 的生长激素缀合物, 其中所述生长激素化合物包含至少一对突变, 所述突变对应于 SEQ ID NO1 中的 S57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C 和 / 或 S85C/S144C。

[0391] 实施方案 39. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中与 SEQ ID NO1 相比, 一个或多个额外的二硫键通过至少两个氨基酸的氨基酸取代来获得。

[0392] 实施方案 42. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中与 SEQ ID NO1 相比, 所述生长激素化合物包含正好一个额外的二硫键。

[0393] 实施方案 41. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中与 SEQ ID NO1 限定的人生长激素相比, 所述生长激素化合物包含至少两个额外的半胱氨酸。

[0394] 实施方案 42. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中与 SEQ ID NO1 相比, 所述化合物包含正好 3 个氨基酸取代。

[0395] 实施方案 43. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 与 SEQ ID NO1 限定的人生长激素相比, 其包含正好两个额外的半胱氨酸和正好一个单点突变。

[0396] 实施方案 44. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中与 SEQ ID NO1 限定的人生长激素相比, 所述生长激素化合物包含正好两个额外的半胱氨酸。

[0397] 实施方案 45. 实施方案 1-43 中任一个的生长激素缀合物, 其中与 SEQ ID NO1 限

定的人生长激素相比,所述生长激素化合物包含正好 3 个额外的半胱氨酸。

[0398] 实施方案 46. 实施方案 45 的生长激素缀合物,其中与 SEQ ID NO1 限定的人生长激素相比,所述生长激素化合物包含一个额外的二硫键和单个 Cys 突变。

[0399] 实施方案 47. 实施方案 46 的生长激素缀合物,其中单个 Cys 突变选自 GH 的 N 端、H1、H2、L2 或 H3 区中的任一个单个 Cys 突变。

[0400] 实施方案 48. 实施方案 46 的生长激素缀合物,其中单个 Cys 突变选自对应于以下的突变:hGH(SEQ ID NO:1) 中的 T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、Q40C、S55C、S57C、S62C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 和 G126C。

[0401] 实施方案 49. 实施方案 47 的生长激素缀合物,其中单个 Cys 突变位于对应于 hGH 的 AA93-106、例如 AA99-106 或 AA99-103 的位置上。

[0402] 实施方案 50. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物,其中 GH 在野生型氨基酸残基上缀合。

[0403] 实施方案 51. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物,其中 GH 在选自以下的野生型氨基酸残基上缀合:N 端、C 端、Gln40 和 Gln141。

[0404] 实施方案 52. 前述实施方案 1-50 中任一个的生长激素缀合物,其中 GH 在突变体残基上缀合。

[0405] 实施方案 53. 实施方案 52 的生长激素缀合物,其中所述突变体残基是 cys 突变。

[0406] 实施方案 54. 实施方案 53 的生长激素缀合物,其中所述 cys 突变选自对应于以下的突变:hGH(SEQ ID NO:1) 中的 T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、Q40C、S55C、S57C、S62C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C 和 G126C。

[0407] 实施方案 55. 实施方案 54 的生长激素缀合物,其中所述 cys 突变体对应于人生长激素的 L101C 突变。

[0408] 实施方案 56. 实施方案 1-55 中任一个的生长激素缀合物,其中与人生长激素相比,所述生长激素缀合物对以下一种或多种蛋白酶的蛋白水解性降解是稳定的:例如消化蛋白酶,例如胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、羧肽酶和 / 或弹性蛋白酶。

[0409] 实施方案 57. 实施方案 1-56 中任一个的生长激素缀合物,其中所述生长激素化合物经化学修饰以促进跨上皮的转运。

[0410] 实施方案 58. 实施方案 1-58 中任一个的生长激素缀合物,其中当与 wt hGH 相比时,所述生长激素化合物经化学修饰以促进跨上皮的转运。

[0411] 实施方案 59. 实施方案 1-58 中任一个的生长激素缀合物,其中当与 wt hGH 相比时,所述生长激素化合物经化学修饰以获得延长的功能性体内半寿期。

[0412] 实施方案 60. 实施方案 59 的生长激素缀合物,其中所述生长激素化合物的功能性体内半寿期是 hGH 的 2 倍或更多倍。

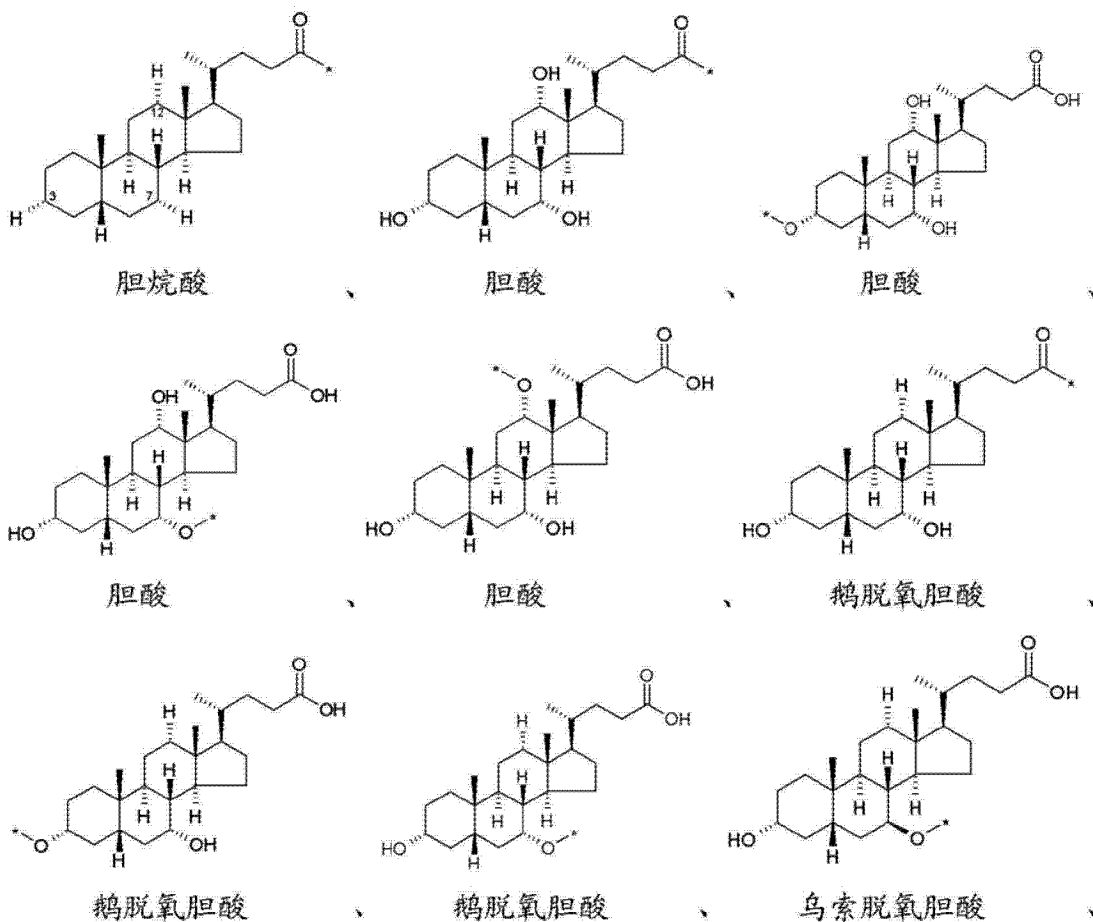
[0413] 实施方案 61. 实施方案 60 的生长激素缀合物,其中与 hGH 相比,功能性体内半寿期为 2 倍至 10 倍。

[0414] 实施方案 62. 实施方案 57-61 中任一个的生长激素缀合物,其中化学修饰发生在干扰生长激素化合物与 hGHR 结合的氨基酸残基上。

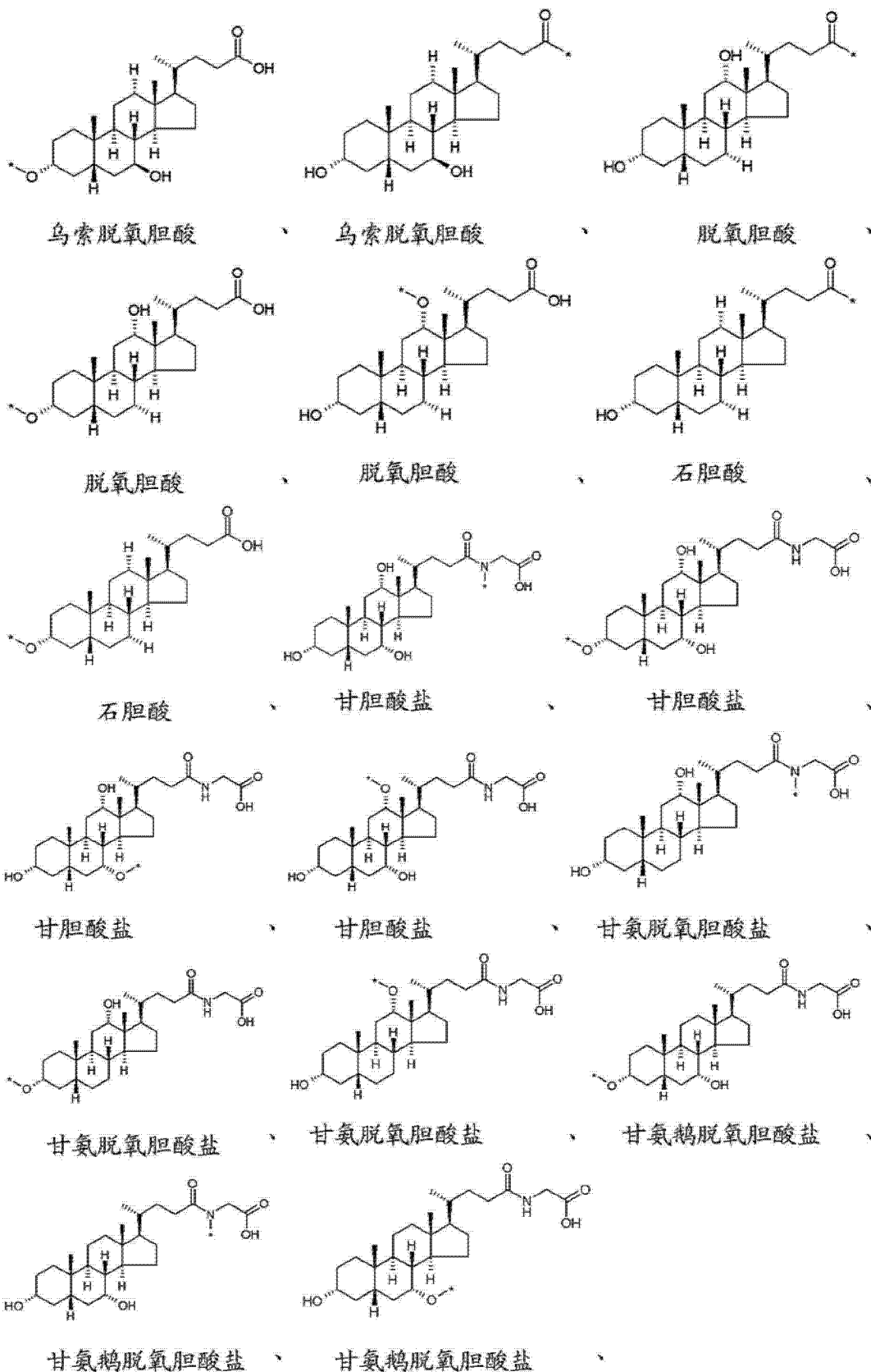
[0415] 实施方案 63. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述胆汁酸残基(A)选自: 胆烷酸、胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、乌索脱氧胆酸、石胆酸、甘胆酸盐、甘氨脱氧胆酸盐、甘氨鹅脱氧胆酸盐、牛磺胆酸盐、牛磺脱氧胆酸盐和牛磺鹅脱氧胆酸盐。

[0416] 实施方案 64. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述胆汁酸残基(A)选自:

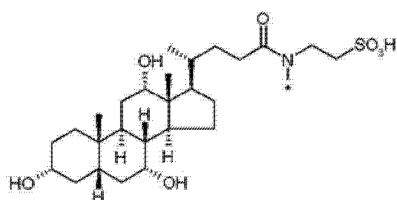
[0417]



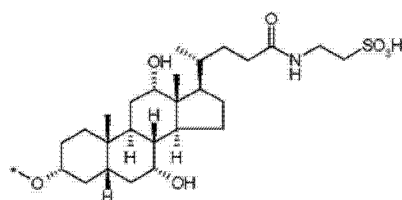
[0418]



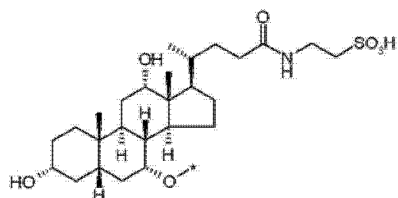
[0419]



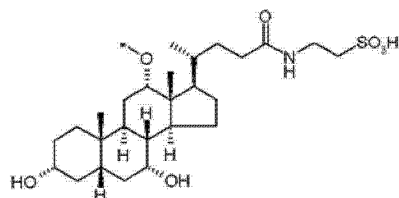
牛磺胆酸盐



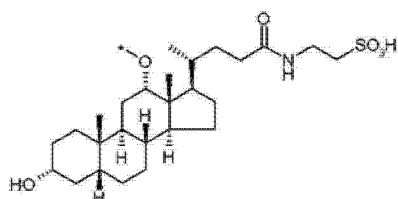
牛磺胆酸盐



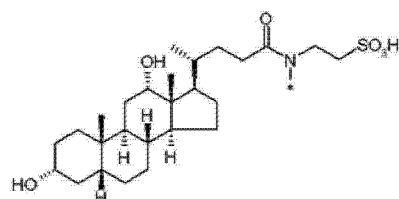
牛磺胆酸盐



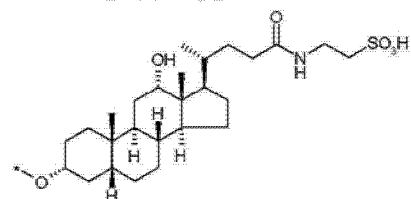
牛磺胆酸盐



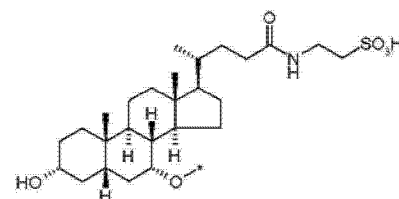
牛磺脱氧胆酸盐



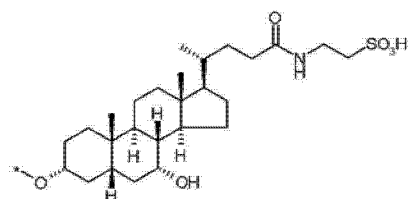
牛磺脱氧胆酸盐



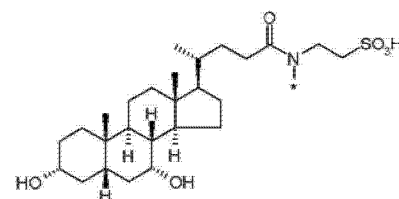
牛磺脱氧胆酸盐



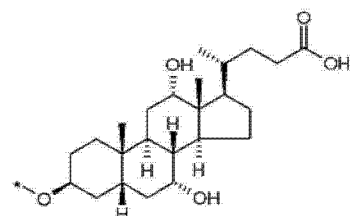
牛磺鹅脱氧胆酸盐



牛磺鹅脱氧胆酸盐

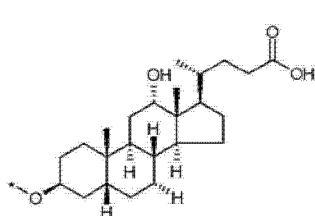


牛磺鹅脱氧胆酸盐



表胆酸

和



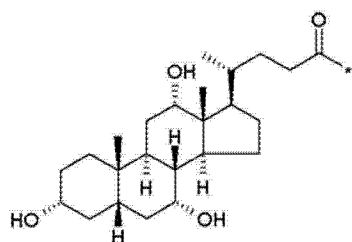
表脱氧胆酸

[0420] 其中 (*) 表示亲水间隔物 (B) 通过 W 的连接点。

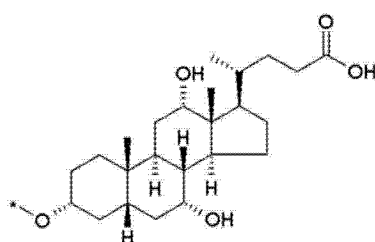
[0421] 实施方案 65. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述胆汁酸残基 (A) 是胆酸残基。

[0422] 实施方案 66. 实施方案 65 的生长激素缀合物, 其中胆汁酸残基选自

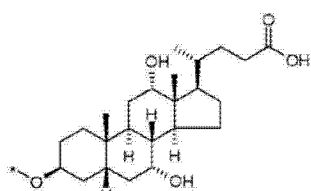
[0423]



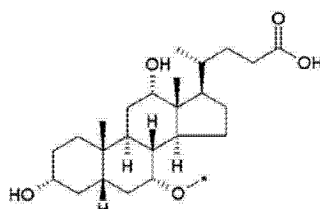
胆酸



胆酸

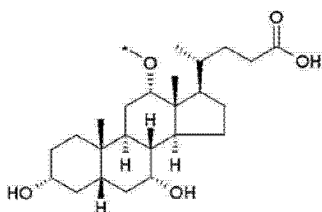


表胆酸



胆酸

和



胆酸

[0424] 其中(*)表示亲水间隔物(B)通过W的连接点。

[0425] 实施方案67. 实施方案63的生长激素缀合物,其中胆酸残基经由“3”、“7”、“12”或“24”位通过W与亲水间隔物(B)连接。

[0426] 实施方案68. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物,其中所述化学基团(W)选自: $-\text{NR}^1-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})[\text{CH}_2]_{n1}\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$ 或 $-\text{C}(\text{O})-$;

[0427] 其中 R^1 选自氢或 $-\text{[CH}_2\text{]}_{n2}\text{R}^2$, $n2$ 为1-4, R^2 选自 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 或四唑-1-基,且其中 $n1$ 为2-8。

[0428] 实施方案69. 前述实施方案中任一个的缀合物,其中所述亲水间隔物(B)具有下式

[0429] $-\text{X}_1-\text{X}_2-\text{X}_3-\text{X}_4-$

[0430] 其中

[0431] X_1 为 $-\text{W}_1-[(\text{CHR}^3)_{11}-\text{W}_2]_{m1}-\{[(\text{CH}_2)_{n1}\text{E}1]_{m2}-[(\text{CHR}^4)_{12}-\text{W}_3]_{m3}\}_{n2}-$,

[0432] X_2 为 $-\{[(\text{CHR}^5)_{13}-\text{W}_4]_{m4}-\{[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E}2]_{m5}-[(\text{CHR}^6)_{14}-\text{W}_5]_{m6}\}_{n4}-$,

[0433] X_3 为 $-\{[(\text{CHR}^7)_{15}-\text{W}_6]_{m7}-$,

[0434] X_4 为 $\text{F-D1}-(\text{CH}_2)_{16}\text{-D2}-$,

[0435] $\text{I}1$ 、 $\text{I}2$ 、 $\text{I}3$ 、 $\text{I}4$ 、 $\text{I}5$ 和 $\text{I}6$ 独立选自0-10,

[0436] $m1$ 、 $m3$ 、 $m4$ 、 $m6$ 和 $m7$ 独立选自0-6,

[0437] $m2$ 和 $m5$ 独立选自0-6,

- [0438] n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 独立选自 0-6,
- [0439] F 为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键,其中芳基和杂芳基被卤素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆-烷基任选取代,
- [0440] R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆-烷基、芳基或杂芳基;
- [0441] 其中
- [0442] 烷基、芳基和杂芳基被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH 任选取代,
- [0443] D1、D2、E1 和 E2 独立选自 -O-、-N(R⁸)-、-N(C(O)R⁹)- 或价键;其中 R⁸ 和 R⁹ 独立表示氢或 C₁₋₆-烷基,
- [0444] W₁-W₆ 独立选自 -NH-、-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-、-NHC(O)C₁₋₆-烷基、-C(O)NHC₁₋₆-烷基、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)- 或价键;其中 s2 为 0 或 1。
- [0445] 实施方案 70. 实施方案 69 的缀合物,其中
- [0446] I1、I2、I3、I4、I5 和 I6 独立地为 0-6,
- [0447] m1、m3、m4、m6 和 m7 独立地为 0-6,
- [0448] m2 和 m5 独立地为 0-6,和
- [0449] n_1 、 n_2 、 n_3 和 n_4 独立地为 0-6。
- [0450] 实施方案 71. 实施方案 69 或 70 的缀合物,其中 D1 和 D2 独立选自 -O- 或价键。
- [0451] 实施方案 72. 实施方案 69-71 中任一个的缀合物,其中 E1 和 E2 独立选自 -O- 或价键。
- [0452] 实施方案 73. 实施方案 69-72 中任一个的缀合物,其中 W₁-W₆ 独立选自: -NH-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)NHS(O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-NHC(O)C₁₋₆-烷基或 -C(O)NHC₁₋₆-烷基和价键。
- [0453] 实施方案 74. 实施方案 69-73 中任一个的缀合物,其中 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)₂OH 或 C₁₋₆-烷基;其中烷基被 -C(O)OH、-C(O)NH₂ 或 -S(O)₂OH 任选取代。
- [0454] 实施方案 75. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物,其中所述亲水间隔物(B)的溶解度(mLogP)低于 1。
- [0455] 实施方案 76. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物,其中所述亲水间隔物(B)包含至少一个 OEG 基序(-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-)。
- [0456] 实施方案 77. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物,其中所述亲水间隔物(B)包含至少两个 OEG 基序(-NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-CO-)。
- [0457] 实施方案 78. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物,其中所述亲水间隔物(B)包含至少一个谷氨酸残基。
- [0458] 实施方案 79. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物,其中所述亲水间隔物(B)包含至少一个谷氨酸残基。
- [0459] 实施方案 80. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物,其中所述亲水间隔物

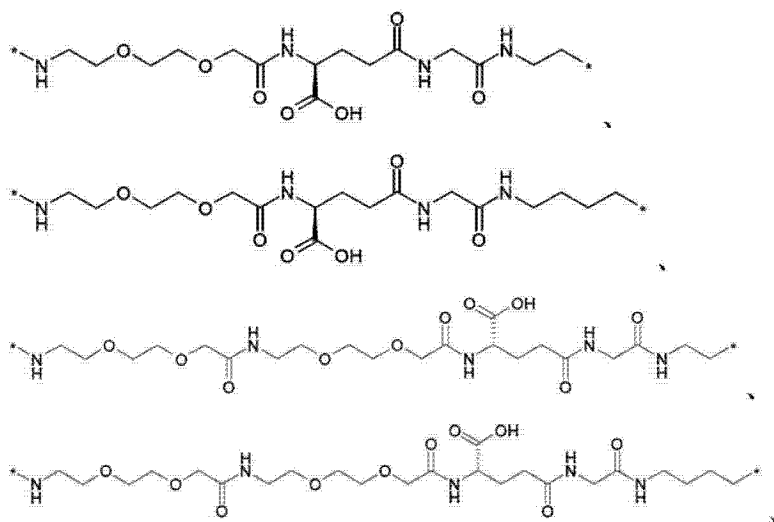
(B) 包含至少一个赖氨酸残基。

[0460] 实施方案 81. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述亲水间隔物 (B) 包含至少一个谷氨酸残基, 其通过 α 羧基或羧基与赖氨酸、OEG 基序或另一个 Glu 残基的胺基形成酰胺键。

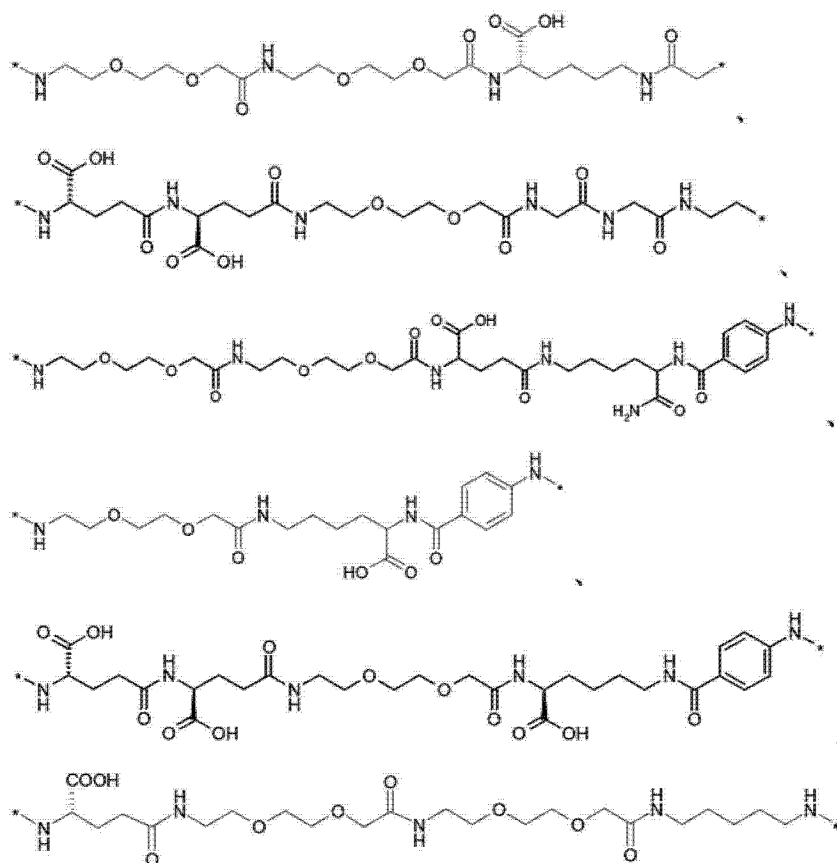
[0461] 实施方案 81. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述亲水间隔物 (B) 包含至少一个谷氨酸残基, 其通过氨基与白蛋白结合残基的羧基 (A)、OEG 基序的羧基或另一个 Glu 的 γ -羧基或 α -羧基形成酰胺键。

[0462] 实施方案 82. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述亲水间隔物 (B) 选自:

[0463]

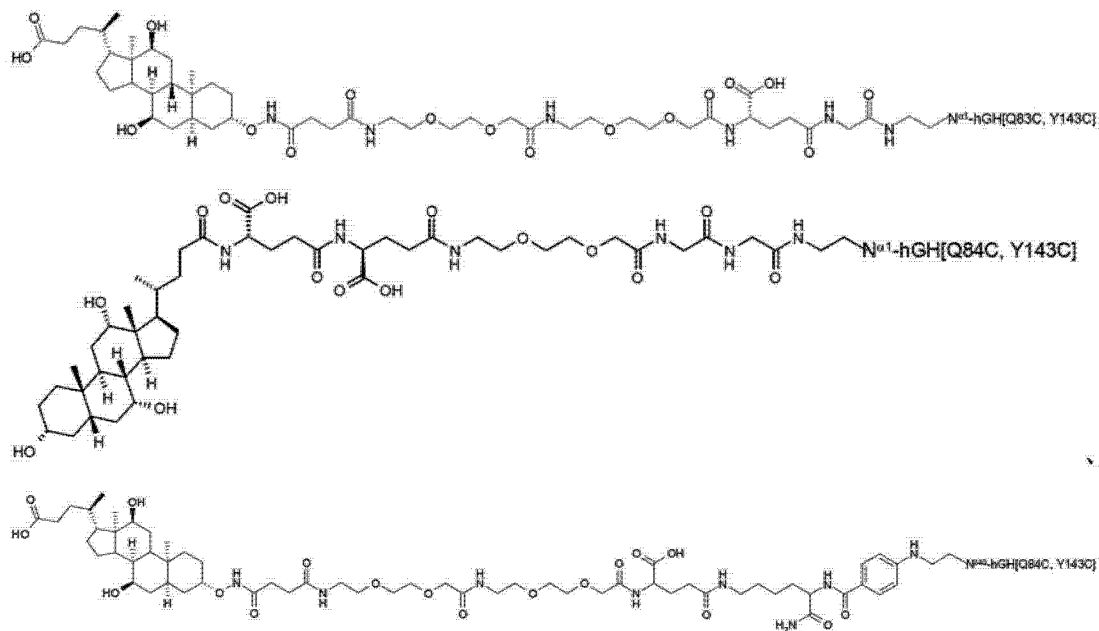


[0464]

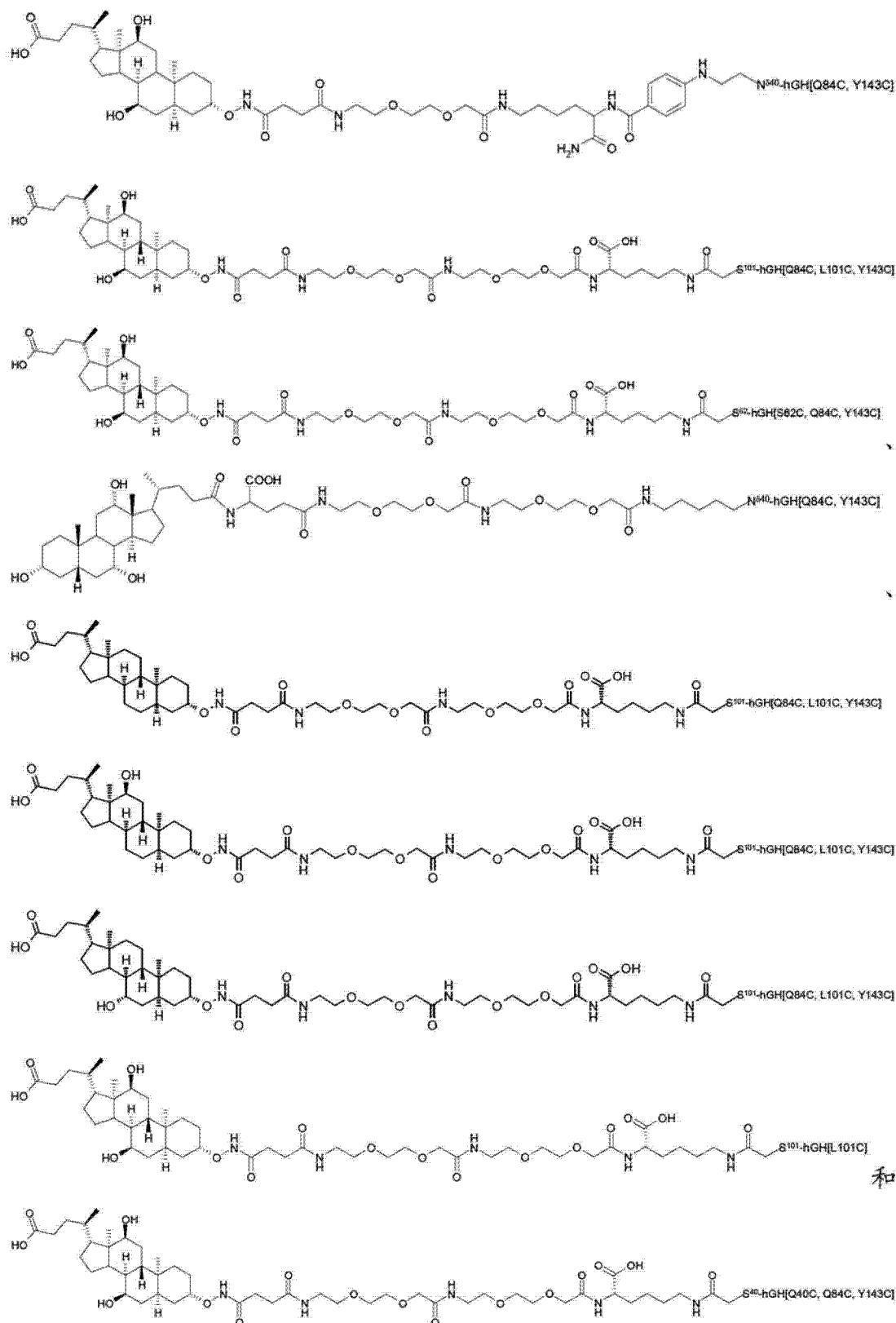


[0465] 实施方案 83. 前述实施方案中任一个的生长激素缀合物, 其中所述缀合物选自:

[0466]



[0467]



[0468] 实施方案 84. 一种用于制备实施方案 1 的生长激素缀合物的方法,所述方法包括以下步骤:

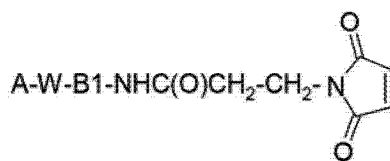
[0469] a) 使胆汁酸接头与生长激素化合物 (GH) 缀合,和

[0470] b) 得到前述实施方案中任一个的生长激素缀合物。

[0471] 实施方案 85. 实施方案 84 的方法,其中所述胆汁酸接头选自:

[0472] A-W-B1-NH₂、A-W-B1-CHO、A-W-B1-LG、A-W-B1-C(O)NHCH₂-CH=CH₂ 和

[0473]



[0474] 其中 A 表示胆汁酸残基, B1 表示亲水间隔物, W 是连接 A 和 B 的化学基团。

[0475] 实施方案 86. 实施方案 85 的方法, 其中所述亲水间隔物 B1 包含实施方案 70-82 中限定的亲水间隔物 B 的任一个特征, 或者其中所述亲水间隔物 B1 为实施方案 70-82 限定的亲水间隔物 B 所包含。

[0476] 实施方案 87. 实施方案 85 的方法, 其中所述亲水间隔物 B1 具有下式: -X₁-X₂-X₃-X₄-

[0477] 其中

[0478] X₁ 为 -W₁-[(CHR³)_{I1}-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR⁴)_{I2}-W₃]_{m3}}_{n2}-

[0479] X₂ 为 -[(CHR⁵)_{I3}-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁶)_{I4}-W₅]_{m6}}_{n4}-

[0480] X₃ 为 -[(CHR⁷)_{I5}]_{m7}-

[0481] X₄ 为价键,

[0482] I1、I2、I3、I4 和 I5 独立选自 0-10,

[0483] m1、m3、m4、m6 和 m7 独立选自 0-6,

[0484] m2 和 m5 独立选自 0-6,

[0485] n1、n2、n3 和 n4 独立选自 0-6,

[0486] R³、R⁴、R⁵、R⁶ 和 R⁷ 独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆-烷基、芳基或杂芳基;

[0487] 其中烷基、芳基和杂芳基被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH 任选取代,

[0488] E1 和 E2 独立选自 -O-、-NR⁸-、-N(COR⁹)-或价键; 其中 R⁸ 和 R⁹ 独立表示氢或 C₁₋₆-烷基,

[0489] W₁-W₆ 独立选自 -NH-、-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-、-C(O)-或价键; 其中 s₂ 为 0 或 1。

[0490] 实施方案 87. 一种药物组合物, 其包含实施方案 1-83 中任一个的生长激素缀合物和药学上可接受的载体。

[0491] 实施方案 88. 实施方案 87 的药物组合物, 其中可通过舌、舌下、含服、口内、口服、胃和肠内、经鼻、经肺、表皮、真皮、透皮和胃肠外将所述组合物给予患者。

[0492] 实施方案 89. 实施方案 87 或 88 的药物组合物, 其中所述组合物用于口服给药。

[0493] 实施方案 90. 一种制备药物组合物的方法, 其中所述组合物包含实施方案 1-83 中任一个的生长激素缀合物和药学上可接受的载体。

[0494] 实施方案 91. 一种用于治疗疾病的方法, 其中所述生长激素活性可用于治疗其中患者可获益于循环生长激素的量增加的疾病或状态, 所述方法包括给予患者有效量的实施方案 1-83 中任一个的生长激素缀合物或实施方案 87-89 中任一个的药物组合物。

[0495] 实施方案 92. 一种治疗其中患者可获益于生长激素活性提高的疾病或状态的方法,所述方法包括给予患者有效量的实施方案 1-83 中任一个的生长激素缀合物或实施方案 87-89 中任一个的药物组合物。

[0496] 实施方案 93. 一种治疗实施方案 90 或 91 的疾病的方法,其中所述疾病选自生长激素缺乏 (GHD);特纳综合征;普-韦综合征 (PWS);努南综合征;唐氏综合征;慢性肾病、幼年型类风湿性关节炎;囊性纤维化;接受 HAART 治疗的儿童 HIV 感染 (HIV/HALS 儿童);小于胎龄 (SGA) 出生的矮小儿童;非 SGA 的以极低出生体重 (VLBW) 出生的儿童的身材矮小症;骨骼发育不良;软骨发育不良;软骨发育不全;特发性身材矮小症 (ISS);成人 GHD (GHDA);长骨骨折,所述长骨为例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨、跖骨和指骨;海绵骨例如头骨、手腕骨和脚底骨的骨折;例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者;经历或进行牵引成骨作用的患者;髋关节置换或关节盘置换、半月板修复、脊柱融合或例如在膝、髋、肩、肘、腕或颞中的假体固定后的患者;其中已固定骨接合材料例如钉、螺钉和板的患者;骨折不愈合或畸形愈合的患者;例如胫骨或第一脚趾骨解剖后的患者;移植物植入后的患者;创伤或关节炎引起的膝关节软骨退化;特纳综合征患者中的骨质疏松症;男性骨质疏松症;长期透析的成年患者 (APCD);APCD 中营养不良相关的心血管疾病;APCD 中的恶病质逆转;APCD 中的癌症;APCD 中的慢性阻塞性肺病;APCD 中的 HIV;APCD 老年人;APCD 中的慢性肝病,APCD 中的疲劳综合征;克罗恩病;肝功能受损;患有 HIV 感染的男性;短肠综合征;向心性肥胖;HIV 相关脂肪营养不良综合征 (HALS);男性不育症;重大选择性手术、酒精/药物解毒或神经创伤后的患者;衰老;虚弱的老年人;骨关节炎;创伤性损伤的软骨;勃起功能障碍;纤维肌痛;记忆障碍;抑郁;创伤性脑损伤;蛛网膜下腔出血;极低出生体重;代谢综合征;糖皮质激素性肌病或糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症。

[0497] 实施方案 94. 用作药物的实施方案 1-83 中任一个的生长激素缀合物。

[0498] 实施方案 95. 实施方案 1-83 中任一个的生长激素缀合物用作用于治疗选自以下的疾病的药物:生长激素缺乏 (GHD);特纳综合征;普-韦综合征 (PWS);努南综合征;唐氏综合征;慢性肾病、幼年型类风湿性关节炎;囊性纤维化;接受 HAART 治疗的儿童 HIV 感染 (HIV/HALS 儿童);小于胎龄 (SGA) 出生的矮小儿童;非 SGA 的以极低出生体重 (VLBW) 出生的儿童的身材矮小症;骨骼发育不良;软骨发育不良;软骨发育不全;特发性身材矮小症 (ISS);成人 GHD (GHDA);长骨骨折,所述长骨为例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨、跖骨和指骨;海绵骨例如头骨、手腕骨和脚底骨的骨折;例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者;经历或进行牵引成骨作用的患者;髋关节置换或关节盘置换、半月板修复、脊柱融合或例如在膝、髋、肩、肘、腕或颞中的假体固定后的患者;其中已固定骨接合材料例如钉、螺钉和板的患者;骨折不愈合或畸形愈合的患者;例如胫骨或第一脚趾骨解剖后的患者;移植物植入后的患者;创伤或关节炎引起的膝关节软骨退化;特纳综合征患者中的骨质疏松症;男性骨质疏松症;长期透析的成年患者 (APCD);APCD 中营养不良相关的心血管疾病;APCD 中的恶病质逆转;APCD 中的癌症;APCD 中的慢性阻塞性肺病;APCD 中的 HIV;APCD 老年人;APCD 中的慢性肝病,APCD 中的疲劳综合征;克罗恩病;肝功能受损;患有 HIV 感染的男性;短肠综合征;向心性肥胖;HIV 相关脂肪营养不良综合征 (HALS);男性不育症;重大选择性手术、酒精/药物解毒或神经创伤后的患者;衰老;虚弱的老年人;骨

关节炎 ; 创伤性损伤的软骨 ; 勃起功能障碍 ; 纤维肌痛 ; 记忆障碍 ; 抑郁 ; 创伤性脑损伤 ; 蛛网膜下腔出血 ; 极低出生体重 ; 代谢综合征 ; 糖皮质激素性肌病和糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症。

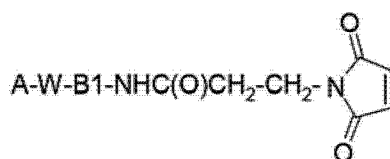
[0499] 实施方案 96. 实施方案 1-83 中任一个的生长激素作为药物的用途。

[0500] 实施方案 97. 实施方案 1-83 中任一个的生长激素化合物在治疗疾病的方法中的用途。

[0501] 实施方案 98. 实施方案 69 或实施方案 70 的用途, 其中所述疾病选自生长激素缺乏 (GHD) ; 特纳综合征 ; 普 - 韦综合征 (PWS) ; 努南综合征 ; 唐氏综合征 ; 慢性肾病、幼年型类风湿性关节炎 ; 囊性纤维化 ; 接受 HAART 治疗的儿童 HIV 感染 (HIV/HALS 儿童) ; 小于胎龄 (SGA) 出生的矮小儿童 ; 非 SGA 的以极低出生体重 (VLBW) 出生的儿童的身材矮小症 ; 骨骼发育不良 ; 软骨发育不良 ; 软骨发育不全 ; 特发性身材矮小症 (ISS) ; 成人 GHD ; 长骨骨折, 所述长骨例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨、跖骨和指骨 ; 海绵骨例如头骨、手腕骨和脚底骨的骨折 ; 例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者 ; 经历或进行牵引成骨作用的患者 ; 髋关节置换或关节盘置换、半月板修复、脊柱融合或例如在膝、髋、肩、肘、腕或颞中的假体固定后的患者 ; 其中已固定骨接合材料例如钉、螺钉和板的患者 ; 骨折不愈合或畸形愈合的患者 ; 例如胫骨或第一脚趾骨解剖后的患者 ; 移植物植入后的患者 ; 创伤或关节炎引起的膝关节软骨退化 ; 特纳综合征患者中的骨质疏松症 ; 男性骨质疏松症 ; 长期透析的成年患者 (APCD) ; APCD 中营养不良相关的心血管疾病 ; APCD 中的恶病质逆转 ; APCD 中的癌症 ; APCD 中的慢性阻塞性肺病 ; APCD 中的 HIV ; APCD 老年人 ; APCD 中的慢性肝病, APCD 中的疲劳综合征 ; 克罗恩病 ; 肝功能受损 ; 患有 HIV 感染的男性 ; 短肠综合征 ; 向心性肥胖 ; HIV 相关脂肪营养不良综合征 (HALS) ; 男性不育症 ; 重大选择性手术、酒精 / 药物解毒或神经创伤后的患者 ; 衰老 ; 虚弱的老年人 ; 骨关节炎 ; 创伤性损伤的软骨 ; 勃起功能障碍 ; 纤维肌痛 ; 记忆障碍 ; 抑郁 ; 创伤性脑损伤 ; 蛛网膜下腔出血 ; 极低出生体重 ; 代谢综合征 ; 糖皮质激素性肌病或糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症。

[0502] 实施方案 99. 一种选自以下的胆汁酸接头 : A-W-B1-NH₂、A-W-B1-CHO、A-W-B1-LG、A-W-B1-C(O)NHCH₂-CH=CH₂ 和

[0503]



[0504] 其中 A 表示胆汁酸残基, B1 表示亲水间隔物, W 是连接 A 和 B1 的化学基团。

[0505] 实施方案 100. 实施方案 99 的胆汁酸接头,

[0506] 其中 A 如实施方案 64-67 中一个或多个中定义,

[0507] 其中 B1 为如实施方案 69-82 中一个或多个中定义的 B 所包含和 / 或

[0508] 其中 W 如实施方案 68 中定义。

[0509] 实施方案 101. 实施方案 99 的胆汁酸接头, 其中所述胆汁酸接头选自 : 本文所述接头 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 和 13。

[0510] 化学法

[0511] 化学法 7361 化学法 I

[0512] 一方面,本发明涉及式 (I) 的生长激素缀合物的制备,其中采用 TGase 催化的化学法将 GH 化合物用改性基团处理。最初,使用氨基醇通过两步反应引入醛或酮官能团,随后用过碘酸盐处理以产生被氧化裂解的醛或酮官能团。仅用于说明的氨基醇的非限制性实例包括 1,3-二氨基-2-丙醇和 1-氨基-2,3-二羟基丙烷。

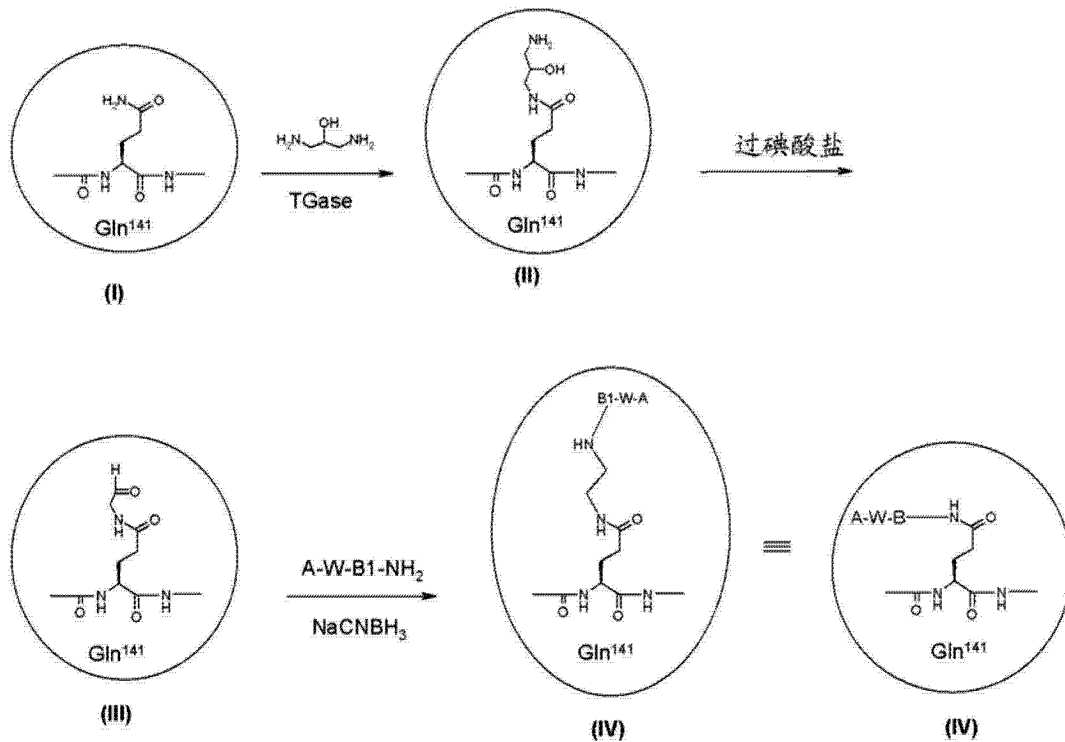
[0513] 又一方面,本发明涉及式 (I) 的生长激素缀合物的制备,其包括将来源于 GH 化合物的醛或酮用改性基团来源的苯胺或杂芳基胺处理得到胺 (III → IV)。

[0514] 在一个实施方案中,来源于 GH 化合物的醛用改性基团来源的苯胺或杂芳基胺处理。

[0515] 术语“GH 化合物来源的醛(或酮)”或“来源于 GH 化合物的醛或酮”欲表示醛或酮官能团与之共价连接的 GH 化合物,或在其上产生了醛或酮官能团的 GH 化合物。下述 GH 化合物来源的醛(例如化合物 (III)) 的制备为本领域技术人员所熟知,这些已知方法的任何一种均可用于制备实施本文公开的本发明所需要的 GH 化合物来源的醛 (III)。

[0516] 在一个实施方案中,如下所示制备缀合物 A-W-B-GH(IV) :

[0517]



[0518] TGase 介导的酶促反应导致 141 和 / 或 40 位的 Gln 的修饰 (II)。修饰的 GH(II) 用过碘酸盐处理,裂解氨基-醇,得到 GH 来源的醛 (III)。GH 与 A-W-B¹-NH₂ 的缀合通过还原烷基化 (III → IV) 而发生。本文所例示还原烷基化是本领域技术人员公知的。

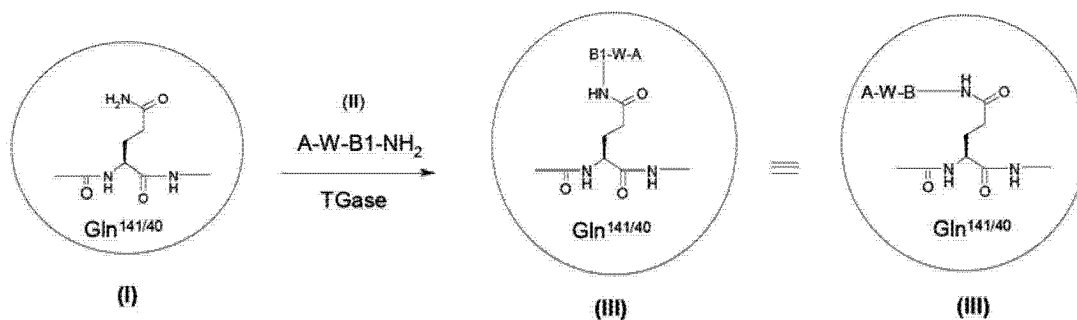
[0519] 化学法 I7361 化学法 I

[0520] 一方面,本发明涉及式 (I) 的生长激素缀合物的制备,其中采用 TGase 催化的化学法,将 GH 化合物用改性基团来源的胺、苯胺或杂芳基胺直接处理,得到生长激素缀合物 (I → III)。

[0521] 在一个实施方案中, GH 化合物用改性基团来源的胺、苯胺或杂芳基胺处理。

[0522] 在一个实施方案中,如下所示制备缀合物 A-W-B-GH(III) :

[0523]

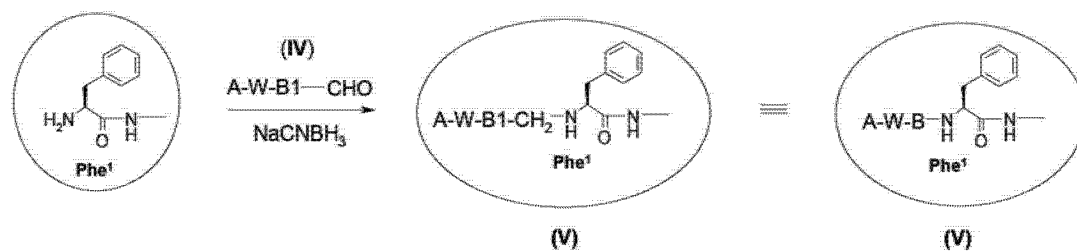


[0524] GH(I) 与 A-W-B1-NH₂(II) 的 TGase 介导的酶促反应导致 141 和 / 或 40 位的 Gln 的修饰,得到缀合物 A-W-B-GH(III)。

[0525] 化学法 II7361 化学法 I

[0526] 在一个实施方案中,如下所示,GH 缀合物 A-W-B-GH(V) 通过与 GH 的 N 端缀合来制备 :

[0527]



[0528] GH 与 A-W-B1-CHO(IV) 的缀合通过还原烷基化 (GH → V) 而发生。对于修饰蛋白质 (例如 GH) 的 N 端,如上所例示的还原烷基化是本领域公知的。

[0529] 其中亲水间隔物 B1 具有下式

[0530] -X₁-X₂-X₃-X₄-

[0531] 其中

[0532] X₁ 为 -W₁-[(CHR³)_{I1}-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{m1}E1]_{m2}-[(CHR⁴)_{I2}-W₃]_{m3}}_{n2}-

[0533] X₂ 为 -[(CHR⁵)_{I3}-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁶)_{I4}-W₅]_{m6}}_{n4}-

[0534] X₃ 为 -[(CHR⁷)_{I5}]_{m7}-

[0535] X₄ 为价键,

[0536] I1、I2、I3、I4 和 I5 独立选自 0-10,

[0537] m1、m3、m4、m6 和 m7 独立选自 0-6,

[0538] m2 和 m5 独立选自 0-6,

[0539] n1、n2、n3 和 n4 独立选自 0-6,

[0540] R³、R⁴、R⁵、R⁶ 和 R⁷ 独立选自 氢、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-NH-C(=NH)-NH₂、C₁₋₆-烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、芳基和杂芳基被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH₂、-S(O)OH、-S(O)₂OH、-CN 或 -OH 任选取代,

[0541] E1 和 E2 独立选自 -O-、-NR⁸-、-N(COR⁹)-或价键;其中 R⁸ 和 R⁹ 独立表示氢或 C₁₋₆-烷基,

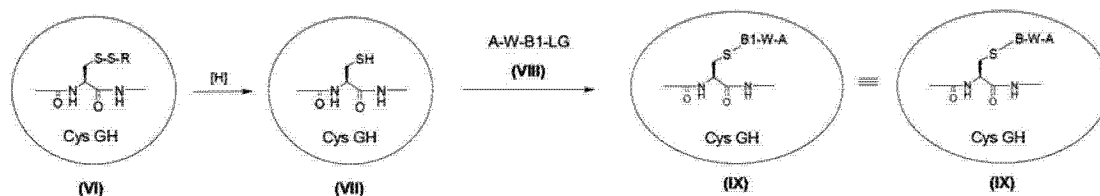
[0542] W₁-W₆ 独立选自 -NH-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH₂-、-CH₂NHC(O)-、-C(O)

NHS (O)₂-、-S(O)₂NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH₂-、-CH₂C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH₂)_{s2}-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)- 或价键；其中 s2 为 0 或 1。

[0543] 化学法 IV

[0544] 在一个实施方案中,如下所示制备缀合物 A-W-B-GH(IX) :

[0545]



[0546] 其中 GH 化合物含有单个半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基任选作为混合二硫化物 (mixeddisulfide) (GH-S-S-R¹⁰ (VI)) 被保护起来,其中 R¹⁰ 为小的有机部分。混合二硫化物的非限制性实例可包括以下间的二硫化物

[0547] 胱胺 (R¹⁰=-CH₂CH₂NH₂) ;半胱氨酸 (R¹⁰=-CH₂CH(C(O)OH)NH₂) ;

[0548] 高半胱氨酸 (R¹⁰=-CH₂CH₂CH(C(O)OH)NH₂) ;和

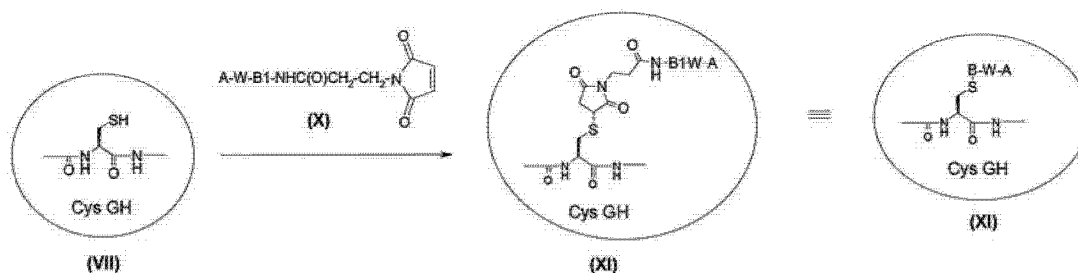
[0549] 谷胱甘肽 (glutathione) (R¹⁰=-CH₂CH(C(O)NH-CH₂C(O)OH)NH-C(O)CH₂CH₂CH(C(O)OH)NH₂) 。

[0550] 衍生化过程利用接头 A-W-B1-LG(VIII), 其中 LG 表示无机离去基团例如 -Cl、-Br、-I 或有机离去基团例如甲磺酸酯基或甲苯磺酸酯基。GH(VI) 与 A-W-B1-LG(VIII) 的缀合通过亲核取代 (VII → IX) 而发生。对于修饰蛋白质 (例如 GH) 中的游离半胱氨酸,如上所例示的亲核取代是本领域公知的。

[0551] 化学法 V

[0552] 在一个实施方案中,如下所示制备缀合物 A-W-B-GH(XI) :

[0553]



[0554] 可使获自上文 (VI) 的脱保护 CysGH 化合物 (VII) 与马来酰亚胺 (malimide) 取代的接头 (X) 反应,得到 GH 缀合物 A-W-B1-NHC(O)CH₂CH₂-吡咯烷-2,5-二酮-3-GH(XI)

[0555] 其中亲水间隔物 B1 具有下式

[0556] -X₁-X₂-X₃-X₄-

[0557] 其中

[0558] X₁ 为 -W₁-[(CHR³)_{I1}-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR⁴)_{I2}-W₃]_{m3}]_{n2}-

[0559] X₂ 为 -[(CHR⁵)_{I3}-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁶)_{I4}-W₅]_{m6}]_{n4}-

[0560] X₃ 为 -[(CHR⁷)_{I5}]_{m7}-

[0561] X₄ 为价键,

[0562] I1、I2、I3、I4 和 I5 独立选自 0-10,

[0563] m1、m3、m4、m6 和 m7 独立选自 0-6，

[0564] m2 和 m5 独立选自 0-6，

[0565] n1、n2、n3 和 n4 独立选自 0-6，

[0566] R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 独立选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 C_{1-6} -烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、芳基和杂芳基被卤素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ 或 $-OH$ 任选取代，

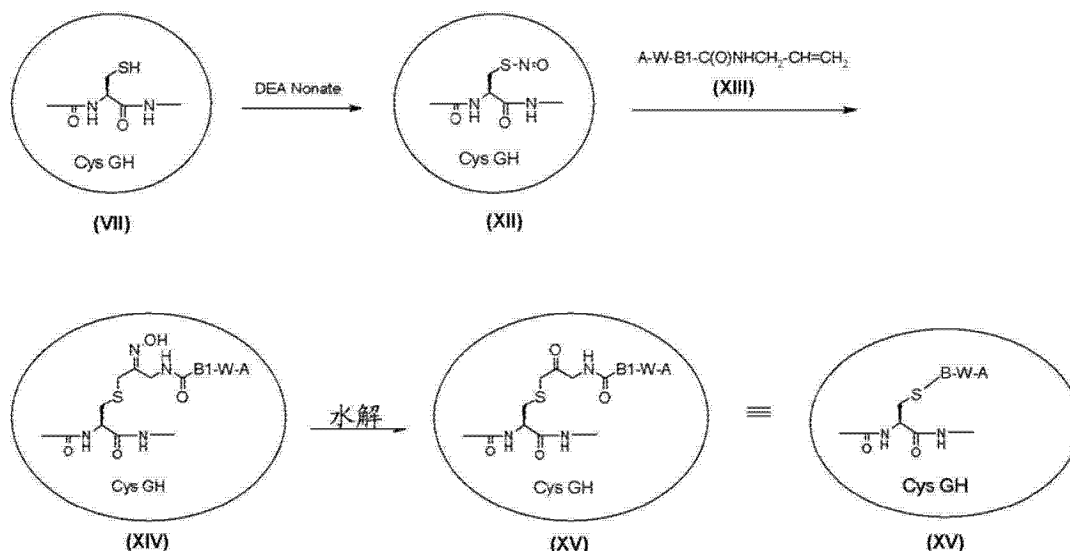
[0567] E1 和 E2 独立选自 $-O-$ 、 $-NR^8-$ 、 $-N(COR^9)-$ 或价键；其中 R^8 和 R^9 独立表示氢或 C_{1-6} -烷基，

[0568] W_1-W_6 独立选自 $-NH-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或价键；其中 $s2$ 为 0 或 1。

[0569] 化学法 VI

[0570] 在一个实施方案中，如下所示制备缀合物 A-W-B-GH：

[0571]



[0572] 可按照 W02009/024791 中所述，采用 S-亚硝酰基化学法，使胆汁酸接头与单个 cysGH 衍生物连接。

[0573] 通过加入 NO 供体例如 DEA Nonate (Sigma Aldrich)，对脱保护的 Cys GH 化合物 (VII) 进行 S-亚硝酰基化。然后使亚硝酰基化单个 cys GH (XII) 与烯丙基胺取代的胆汁酸接头 (XIII) 反应，得到肟 (XIV)，肟水解后，得到 GH 缀合物 A-W-B1-C(O)NHCH₂C(O)CH₂-Cys GH (XV)

[0574] 其中亲水间隔物 B1 具有下式

[0575] $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0576] 其中

[0577] X_1 为 $-W_1-[(CHR^3)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^4)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ ，

[0578] X_2 为 $-[(CHR^5)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^6)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$ ，

[0579] X_3 为 $-[(CHR^7)_{I5}]_{m7}-$ ，

[0580] X_4 为价键，

- [0581] I1、I2、I3、I4 和 I5 独立选自 0-10，
[0582] m1、m3、m4、m6 和 m7 独立选自 0-6，
[0583] m2 和 m5 独立选自 0-6，
[0584] n1、n2、n3 和 n4 独立选自 0-6，
[0585] R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 独立选自氢、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 、 C_{1-6} -烷基、芳基或杂芳基；
[0586] 其中
[0587] 烷基、芳基和杂芳基被卤素、 $-C(O)OH$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-S(O)OH$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-CN$ 或 $-OH$ 任选取代，
[0588] E1 和 E2 独立选自 $-O-$ 、 $-N(R^8)-$ 、 $-N(C(O)R^9)-$ 或价键；其中 R^8 和 R^9 独立表示氢或 C_{1-6} -烷基，
[0589] W_1-W_6 独立选自 $-NH-$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHCH_2-$ 、 $-CH_2NHC(O)-$ 、 $-C(O)NHS(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NHC(O)-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)O-$ 、 $-C(O)CH_2-$ 、 $-CH_2C(O)-$ 、 $-C(O)CH=CH-$ 、 $-CH=CHC(O)-$ 、 $-(CH_2)_{s2}-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 或价键；其中 $s2$ 为 0 或 1。

实施例

[0590] 可通过参照下列实施例，对本发明作进一步的定义，所述实施例描述了本文所述各种化合物的制备和表征及用于测定其生物活性的方法。对本领域技术人员显而易见的是，可对材料与方法两者实施许多修改而又不偏离本发明的范围。缩略语：

- [0591] amu= 原子质量单位
[0592] CV= 柱体积
[0593] hr= 小时
[0594] Hz= 赫兹
[0595] L= 升
[0596] M= 摩尔浓度
[0597] mbar= 毫巴
[0598] mg= 毫克
[0599] min.= 分钟
[0600] mL= 毫升
[0601] mM= 毫摩尔浓度
[0602] mm= 毫米
[0603] mmol= 毫摩尔
[0604] nmol= 纳摩尔
[0605] mol= 摩尔
[0606] μ L= 微升
[0607] N= 当量
[0608] nm= 纳米
[0609] sec= 秒钟
[0610] ppm= 百万分率

- [0611] ESI= 电喷雾电离
- [0612] i. v. = 静脉内
- [0613] m/z= 质荷比
- [0614] MS= 质谱法
- [0615] HPLC= 高压液相层析法
- [0616] RP= 反相
- [0617] HPLC-MS= 高压液相层析法 - 质谱法
- [0618] NMR= 核磁共振波谱法
- [0619] p. o. = 经口服
- [0620] rt 或 RT= 室温
- [0621] s. c. = 皮下
- [0622] R_t = 保留时间
- [0623] Boc= 叔丁氧羰基
- [0624] O-t-Bu= 叔丁酯
- [0625] t-Bu= 叔丁基
- [0626] Boc-4-ABZ-OH=4- 叔丁氧羰基氨基 - 苯甲酸
- [0627] DCM= 二氯甲烷, CH_2Cl_2
- [0628] DIC= 二异丙基碳二亚胺
- [0629] DIPEA=N, N- 二异丙基乙胺
- [0630] DMF=N, N- 二甲基甲酰胺
- [0631] DMSO= 二甲亚砜
- [0632] DTT= 二硫苏糖醇
- [0633] EDAC=1- 乙基 -3-(3- 二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐
- [0634] Et_2O = 乙醚
- [0635] EtOAc= 乙酸乙酯
- [0636] Fmoc=9H- 芴 -9- 基甲氧基羰基
- [0637] Fmoc-Glu-O-t-Bu=N-Fmoc- 谷氨酸 -1- 叔丁酯
- [0638] Fmoc-Lys(Mtt)-OH=(S)-6-[(二苯基-对甲苯基-甲基)-氨基]-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)己酸
- [0639] Fmoc-OEG-OH=(2[2-(Fmoc-氨基)乙氧基]乙氧基)乙酸
- [0640] OEG=(2[2-(氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基
- [0641] Fmoc-Thx-OH=N-Fmoc- 反式 -4- 氨基甲基环己烷甲酸
- [0642] H_2O = 水
- [0643] HOBT=1- 羟基苯并三唑
- [0644] MeCN= 乙腈
- [0645] MeOH= 甲醇
- [0646] MSNT=1-(1, 3, 5- 三甲基苯 -2- 磺酰基)-3- 硝基 -1, 2, 4- 三唑
- [0647] MTP=3- 甲基 - 硫基 -1- 丙醇
- [0648] NaCl= 氯化钠

- [0649] NaOH= 氢氧化钠
- [0650] NMP=N- 甲基吡咯烷 -2- 酮
- [0651] OEG=(2[2-(氨基) 乙氧基] 乙氧基) 乙酸
- [0652] TFA= 三氟乙酸
- [0653] THF= 四氢呋喃
- [0654] TIS= 三异丙基甲硅烷
- [0655] TSPP :三 (3- 磺苯基) 膦三钠盐
- [0656] CDCl_3 = 氘氯仿
- [0657] CD_3OD = 四氘代甲醇
- [0658] DMSO-d_6 = 六氘代二甲亚砜
- [0659] TNBS= 三硝基苯磺酸
- [0660] TSTU= 四氟硼酸 O-(N- 琥珀酰亚胺基)-1, 1, 3, 3- 四甲基铈
- [0661] TFAC= 三氟乙酸酐
- [0662] TEA= 三乙醇胺

[0663] 方法 1. 制备 hGH 化合物的通用方法。

[0664] 将编码生长激素化合物的基因重组插入质粒载体中。通过使用 Quik Change 定点诱变试剂盒 (Stratagene) 引入突变。随后使用质粒载体, 转化合适的大肠杆菌 (E. coli) 菌株。蛋白质被表达为具有富含 N 端组氨酸的肽标签的可溶蛋白, 所述肽标签适合于固定化金属亲和色谱纯化。可表达具有 N 端甲硫氨酸的 hGH 或 GH 变体, 或 hGH 或 GH 变体可作为 MEAE 融合物表达, 随后 MEAE 序列从中切割下来。

[0665] 在 50% 甘油中制备细胞原液, 并保存在 -80°C 下。将甘油原液菌株接种至 LBA 板中, 随后在 37°C 下孵育过夜。各板的内容物用 LB 培养基洗涤, 并稀释到 500ml LB+AMP 培养基中进行表达。在 220rpm 振荡下, 在 37°C 下孵育培养物直到达到 $\text{OD}_{600} 0.6$ 。使用 0.2m IPTG 在 30°C 下进行随后的诱导达 6 小时, 得到最终的 OD_{600} 为 2.0。最后通过离心收获细胞。

[0666] 随后将细胞悬浮于 20mM Tris-HCl (pH8.5) 中, 并使用细胞破碎仪在 30kPSI 下破碎。通过离心收集上清液, 随后进行层析法纯化。

[0667] 采用固定化金属亲和层析法作为俘获步骤进行纯化, 接着使用来自 Unizyme 的二氨基 - 肽酶除去肽标签。最后的纯化通过离子交换层析法实现。还可通过使用本领域技术人员已知的以下技术 (但不限于这些技术) 来实现纯化: 离子交换层析法、疏水作用层析法、亲和层析法、大小排阻层析法和基于膜的分离技术。

[0668] 方法 2. Cys 突变的 GH 蛋白的分离和纯化:

[0669] 该方法使用 MEAE-hGH[Q84C, Y143C, L101C] 为例。可对基于本领域公知常识的分离和纯化方案略加改动, 以可能的类似方式进行备选突变体的分离和纯化。

[0670] 通过离心 ($6056\times g$ 持续 30 分钟) 收获细胞, 并可保存在 -80°C 下。匀浆化: 将细胞沉淀 (2580g) 溶于约 20kg 缓冲液 (20mM Tris、0.1% 吐温 -20、5mM EDTA, pH=8.5) 中, 调整 pH 至 8.5, 接着用二次压降 1000 和 200 巴匀浆化。将细胞匀浆 (约 20kg) 以 1:1 稀释于 8M 脲中, 得到 4M 脲浓度。向该溶液中加入脲胺 2HCl (18g) (0.9g/L), 在轻轻搅拌下, 将所得混合物在 5°C 下孵育过夜。

[0671] 过滤: 通过死端过滤 1.0 和 $0.5\mu\text{m}$ 将匀浆物过滤, 得到约 42kg 透过物。

MEAE-hGH[Q84C, Y143C, L101C] 的纯化包括 3 个层析步骤, 并且酶消化除去 N 端 MEAE- 序列。使用 Q Sepharose XL (GE Healthcare) 俘获 MEAE-hGH[Q84C, Y143C, L101C], 通过线性梯度洗脱, 在 Tris-NaCl 缓冲液 (pH8.5) 中洗脱。向所收集的合并物中加入 1.0MNaCl, 然后加载到 Phenyl Sepharose 6FF(high sub) (GE Healthcare) 中。WFI 中的分步洗脱用来洗脱蛋白质, 并降低电导率用于酶消化。

[0672] 使用酶 DAPI (二肽基氨基肽酶 1) 除去 MEAE- 序列。DAPI 一次切割 2 个 N 端氨基酸, 并在 AE 后停止, 因为 hGH 的第二个氨基酸是脯氨酸残基, 其是 DAPI 消化的天然终止信号。以 2mg/mL (pH4.3) 的蛋白质浓度于 40℃ 进行消化。该反应后是 LC-MS, 约 60 分钟后当消化完成时终止反应。冷却至 5℃ 后, 加入 39%v/v 冷乙醇 (99%), 将蛋白质等电沉淀 (iso-precipitate) 后, 调节 pH 至 4.9。将反应混合物保存在 5℃ 下持续至少 2 小时以沉淀蛋白质。

[0673] 将沉淀的 hGH[Q84C, Y143C, L101C] 重新溶于 7M 脲-三乙醇胺缓冲液 (pH7.5) 中, 在 Source30Q (GE Healthcare) 上纯化, 将靶蛋白与少量未切割的物质和其它杂质分离开来。最终的产物通过线性梯度洗脱, 在三乙醇胺缓冲液 (pH7.5) 中洗脱。经 RP-HPLC 分析 (UV214nm), 产物纯度 >97%。

[0674] 方法 3. 制备胆酸缀合的化合物的方法。

[0675] 1. 通式 A-W-B1-CHO 的胆汁酸接头与 GH 化合物 (I) 的 N 端苯丙氨酸的偶联:

[0676] 目标胆汁酸接头通常作为二烷基缩醛 (即 A-W-B1-CH(OR)₂) 合成, 在缀合前需要转化成游离醛。这可如下进行: 胆汁酸接头二烷基缩醛用酸 (例如 TFA) 处理, 蒸发至干。所得游离醛无需进一步纯化便能使用。

[0677] 然后分批加入 GH 的缓冲液 (例如 HEPES, pH7.0) 溶液, 同时加入 1N NaOH 保持 pH 为 7.0。然后以 5 分钟的间隔分批加入溶于水的 NaCNBH₃。通常搅拌 1 小时后得到澄清溶液。反应烧瓶用锡纸包裹, 将反应混合物在室温下轻轻搅拌过夜。反应样品用 LC/MS 分析以证实产物形成。

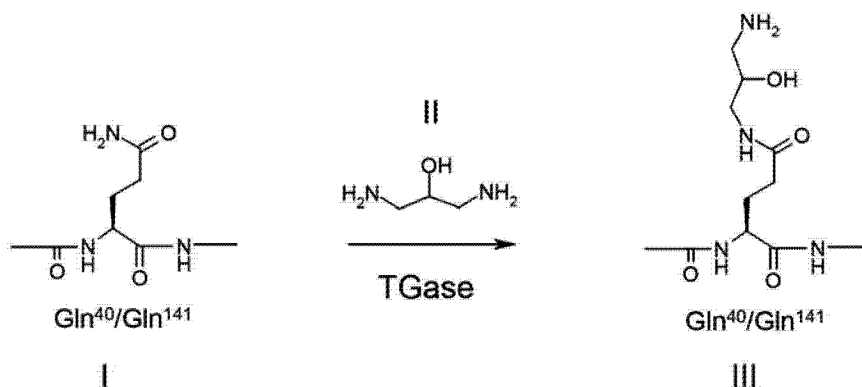
[0678] 然后, 将 IEX 和 HIC 层析法、大小排阻柱和超滤联用, 对 hGH 缀合物进行纯化。通常得到纯度为 95% 或更高的缀合物。

[0679] 2. 通式 A-W-B1-NH₂ 的胆汁酸接头与转氨基化和氧化 GH 化合物 (I) 的偶联

[0680] 之前 W02005/070468 中描述了使用转谷氨酰胺酶以使醛手柄 (aldehyde handle) 在谷氨酰胺残基上与 GH 连接。可根据本发明将该方法用于式 A-W-B1-NH₂ 的基于胆汁酸的接头的连接。按照 US5156956, 所用 TGase 是来自茂原链轮丝菌 (*Streptoverticillium mobaraense*) 的微生物转谷氨酰胺酶。

[0681] 如下进行该反应: 如 W02005/070468 中所述, GH(I) 最初用 1,3-二氨基-2-丙醇 (II) 转氨基化:

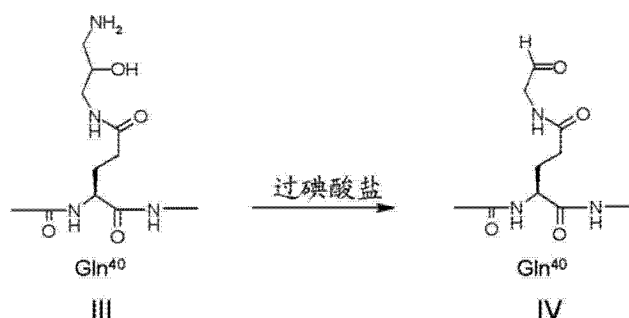
[0682]



[0683] 下一步,向转氨基化 GH(III) 中加入过碘酸盐。氧化通常在低温 (例如 4-10℃) 下在 30 分钟内任选避光进行。过碘酸盐可将 GH 中的甲硫氨酸残基氧化成其相应的甲硫氨酸亚砷残基。为了使这种氧化风险降到最小,可在过碘酸盐氧化期间加入小分子有机硫醚。合适的有机硫醚为 3- 甲基硫基丙 -1- 醇,但技术人员能够提出其它有机硫醚。

[0684] 转氨基化 GH 化合物 (III) 的氧化:

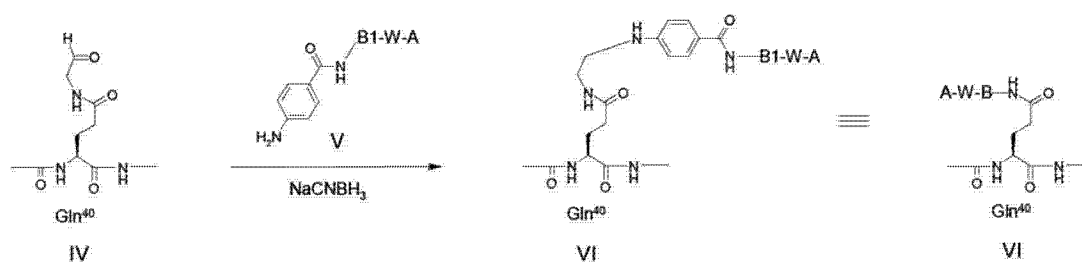
[0685]



[0686] 可进行缓冲液更换以得到有效氰基硼氢化钠还原所需要的酸溶液。通常使用过量的 A-W-B1-NH₂ 胺,并可随时间推移加入较少量的氰基硼氢化钠。

[0687] (IV) 用胆汁酸接头 (V) 的还原胺化:

[0688]



[0689] 后一反应可如下进行:

[0690] 将氧化转氨基化 GH(IV) 溶液加入胆汁酸接头 (V) 在 AcOH(1.5mL) 和 50mM MES(0.5mL) 的混合物中的溶液 (pH6.00) 中。将所得反应混合物在室温下轻轻振荡 30 分钟,届时加入 NaCNBH₃ 溶液 (15 μL, (22mg NaCNBH₃, 溶于 500 μL Milli-Q 水 + AcOH(15 μL)))。将样品用锡纸包覆,在室温下搅拌过夜。

[0691] 可如下通过阴离子交换层析法分离缀合物:

[0692] 使用 Amicon Ultra15 装置 (Ultracel10K 管),通过以 4000rpm/ 分钟离心 3x8 分钟,用纯水 (3X) 进行缓冲液更换除去乙酸。然后使用 Amicon Filter 装置,将混合物更换

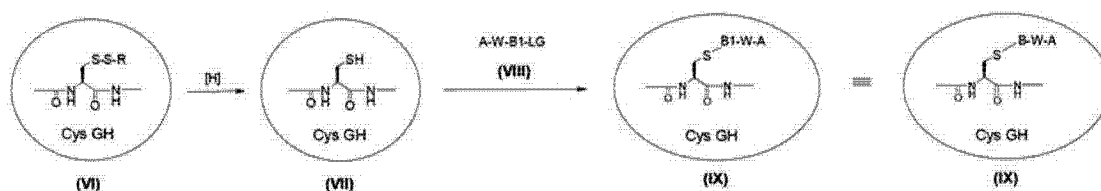
缓冲液为 20mM TEA (pH:8.50), 用 20mM TEA 稀释至 50mL 的最终体积, 然后加载到 HiLoad Q Sepharose, 26/10 柱中。柱先用 20mM TEA, pH8.50 (缓冲液 A) 洗涤, 然后用 20mM TEA, 500mM NaCl, pH8.50 (缓冲液 B) 洗脱, 采用 0-100%(B) 梯度, 20CV 内, 流速为 2mL/ 分钟。使用 Amicon Ultra15 装置 (Ultracel10K 管), 通过 4000rpm/ 分钟离心 3x8 分钟, 对合并的流分进行缓冲液更换 5 次至 10mM 碳酸氢铵缓冲液 / 纯水。

[0693] 3. 通式 A-W-B1-LG (VIII) 的胆汁酸接头与具有内部游离单一 cys 的 GH 化合物 (VII) 的偶联。

[0694] 1) 通过用合适的选择性还原剂 [H] 还原二硫化物 (VI) 释放游离 Cys GH (VII) :

[0695] 2) 游离 Cys GH (VII) 用离去基团 (LG) 活化的胆汁酸接头 (VIII) 烷基化, 得到 Cys 缀合的 GH 化合物 (IX)

[0696]



[0697] 半胱氨酸残基任选作为混合二硫化物 (GH-S-S-R(VI)) 被保护起来, 其中 R 为小的有机部分。混合二硫化物的非限制性实例可包括以下之间的二硫化物: 胱胺 ($R=-CH_2CH_2NH_2$); 半胱氨酸 ($R=-CH_2CH(C(O)OH)NH_2$); 高半胱氨酸 ($R=-CH_2CH_2CH(C(O)OH)NH_2$); 和谷胱甘肽 ($R=-CH_2CH(C(O)NH-CH_2C(O)OH)NH-C(O)CH_2CH_2CH(C(O)OH)NH_2$)。

[0698] 衍生化过程利用胆汁酸接头 A-W-B1-LG, 其中 LG 表示无机离去基团例如 -Cl、-Br、-I 或有机离去基团例如甲磺酸酯基或甲苯磺酸酯基。GH 与 A-W-B1-LG 的缀合通过亲核取代 (VII $\rightarrow$ IX) 而发生。如果衍生化过程利用丙烯酰基官能团的马来酰亚胺作为反应基团, 则缀合通过硫化物加入马来酰亚胺或丙烯酸酯官能团的双键而产生。

[0699] 按本发明所述制备的 GH 缀合物可通过 HPLC、大小排阻层析法和离子交换层析法等标准方法纯化。

[0700] 应注意, 上述通用偶联方法只用作说明目的, 本领域技术人员可选择用于制备缀合物的其它缓冲溶液、纯化方法和反应条件。

[0701] 方法 4. 纯化的生长激素化合物的蛋白质化学表征。

[0702] MalDI-ToF 质谱法

[0703] 采用 Autoflex MalDI-ToF 仪器 (Bruker) 测定分子量。使用 α -氰基-4-羟基-肉桂酸作为基质制备样品。

[0704] 采用 MALDI-MS 分析完整的纯化蛋白质。实测质量等于自氨基酸序列推导的理论质量。

[0705] 在二硫键用 DTT 还原之前和之后, 通过采用胰蛋白酶和 AspN 消化, 接着对消化物进行 MALDI-MS 分析对肽作图, 来表明各化合物中二硫键的连接。

[0706] 毛细管电泳

[0707] 毛细管电泳采用 Agilent Technologies3DCE 系统 (Agilent Technologies) 进行。数据采集和信号处理采用 Agilent Technologies3DCE ChemStation 进行。毛细管为得自 Agilent 的 64.5cm (56.0cm 有效长度)、内径 50 μ m 的“延长光程毛细管 (Extended Light

Path Capillary)”。UV 检测在 200nm(16nm Bw, 参比 380nm 和 50nm Bw) 处进行。电泳电解质为磷酸盐缓冲液 50mM pH7 (方法 A)。毛细管用 0.1M NaOH 调节 3 分钟, 然后用 Milli-Q 水调节 2 分钟并用电解质调节 3 分钟。每次电泳后, 毛细管依次用 milli-Q 水冲洗 2 分钟、用磷酸冲洗 2 分钟、用 milli-Q 水冲洗 2 分钟。在 50mbar 下进行流体动力学注射 4.0 秒钟。电压为 +25kV。毛细管温度为 30℃, 运行时间为 10.5 分钟。

[0708] RP-HPLC

[0709] 使用 Vydac218TP544.6mmx250mm5 μ mC-18 硅胶柱 (The Separations Group, Hesperia), 在 Agilent1100 系统上进行 RP-HPLC 分析。在 214nm、254nm、280nm 和 301nm 处通过 UV 检测。柱用 0.1% 三氟乙酸 /H₂O 平衡, 样品通过 0-90% 乙腈针对 0.1% 三氟乙酸 /H₂O 的合适梯度洗脱。

[0710] LC-MS

[0711] 在配备了 2 个 Perkin Elmer200 系列微型泵、Perkin Elmer200 系列自动进样器、Applied Biosystems785AUV 检测器和 Sedex75 蒸发光散射 (Evaporative Light) 检测器的 PE-Sciex API100 或 150 质谱仪上进行 LC-MS 分析。Waters Xterra3.0mmx50mm5 μ C-18 硅胶柱在室温下以 1.5ml/分钟洗脱。柱用 5%MeCN/0.1%TFA/H₂O 平衡, 用 5%MeCN/0.1%TFA/H₂O 洗脱 1.0 分钟, 然后在 7 分钟内用至 90%MeCN/0.1%TFA/H₂O 的线性梯度洗脱。检测在 214nm 和蒸发光散射下通过 UV 检测进行。将柱洗脱物的流分引入 PE-SciexAPI100 质谱仪的离子喷雾界面。在运行期间每 2 秒钟扫描质量范围 300-2000amu。

[0712] 蛋白质的定量测定

[0713] 采用 NanoDrop ND-1000UV-分光光度计, 通过在 280nm 处测量吸光度, 来估算蛋白质浓度。

[0714] 用于测定衍生化部位的酶促肽作图:

[0715] 使用还原和烷基化的蛋白质的 Asp-N 消化进行肽作图。首先, 按照标准方法, 用 DTT 和碘乙酰胺处理蛋白质。烷基化产物采用 HPLC 纯化。随后烷基化的纯化产物按 1:100 的酶: 底物之比用内切蛋白酶 Asp-N(Boehringer) 消化过夜。使用 C-18 柱和标准 TFA/MeCN 缓冲体系, 对消化物进行 HPLC 分离。将所得肽图谱与未衍生化 hGH 的肽图谱作比较, 随不同的保留时间收集流分, 并采用 Maldi-tof 质谱法进一步分析。

[0716] SDSpage

[0717] 使用 NuPAGE4%-12%Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen NP0321BOX), 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。对凝胶进行银染 (Invitrogen LC6100) 或考马斯染色 (Invitrogen LC6065)。

[0718] 蛋白质层析法

[0719] 蛋白质层析法在 Äkta Explorer 层析系统和得自 GE Health Care 的柱上进行。阴离子交换采用 Q-Sepharose HP26/10 柱进行。起始缓冲液为 20mM 三乙醇胺缓冲液 (pH8.5), 洗脱缓冲液为起始缓冲液 +0.2MNaCl。化合物通常用超过 15 倍柱体积的 0-75% 洗脱缓冲液的梯度洗脱。脱盐和缓冲液交换使用 HiPrep26/10 柱进行。

[0720] TNBS 试验

[0721] 制备 10%DIPEA/DMF 溶液 (溶液 1) 和 1M TNBS 水溶液 (溶液 2)。将少数树脂珠粒置于小试管中, 加入各溶液 (1 和 2) 1-3 滴。在短暂混合后, 将混合物置于室温下 10 分钟, 接着检查珠粒。强烈的橙色或红色珠粒表示阳性结果 (即存在游离胺); 黄色或略微橙色

的珠粒表示轻微阳性,无色珠粒为阴性。

[0722] 方法 5. 纯化生长激素化合物的生物活性分析。

[0723] 在基于细胞的受体效价增殖测定(即 BAF 测定)中,测量 hGH 化合物的生物活性。该方法是 hGH 化合物通用的。

[0724] BAF-3 细胞(源自骨髓的鼠前-B 淋巴样细胞系)的生长和存活是 IL-3 依赖性的。IL-3 激活 JAK-2 和 STAT,它们是 GH 在刺激时活化的相同介体。

[0725] 可用含有 hGH 受体的质粒转染 BAF-3 细胞。在 hGH 刺激时能增殖的克隆可变成 hGH 依赖性的细胞系,下文称作 BAF3-GHR。所述细胞系以剂量相关生长模式对 GH 做出响应,因此可在增殖测定中用来评价不同的 hGH 化合物的作用。

[0726] 在饥饿培养基(不含 GH 的培养基)中在 37°C、5%CO₂ 下培养 BAF-3GHR 细胞 24 小时。将细胞离心,去除培养基,并将细胞重新悬浮于饥饿培养基中至 2.22×10^5 个细胞/ml。将多份 90 μ L 细胞上清液接种到微量滴定板(96 孔 NUNC-clone)中。将不同浓度的生长激素化合物加入细胞中,将板于 37°C、5%CO₂ 下孵育 72 小时。

[0727] AlamarBlue 是一种氧化还原指示剂,因此被细胞代谢固有反应还原的 **AlamarBlue®** (BioSource 目录号 Dal1025) 提供活细胞数目的间接量度。将 **AlamarBlue®** 稀释 6 倍(5 μ L **AlamarBlue®** + 25 μ L 饥饿培养基),并将 30 μ L 稀释的 **AlamarBlue®** 加到每个孔中。然后再将细胞孵育 4 小时。最后,使用 544nm 的激发滤光片和 590nm 的发射滤光片,在荧光读板仪中,测量细胞的代谢活性。

[0728] 给定化合物的结果表示为所述化合物的 EC₅₀ 和平行运行的 withGH 的 EC₅₀ 之比。

[0729] 方法 6. 3A 之前的切除垂体的 Sprague Dawley 大鼠中的体内剂量反应研究

[0730] 可在切除垂体的雄性 Sprague Dawley 大鼠中,研究体内剂量反应关系。切除垂体的大鼠是众所周知和公认的生长激素缺乏动物模型,其中在手术切除脑垂体后,不产生生长激素。这还导致低的胰岛素样生长因子-1(IGF-1)循环水平,这是人生长激素缺乏的另一个重要临床特征。

[0731] 对重为 90-100g 的 4 周龄雄性大鼠进行垂体切除术。手术后 3-4 周重为 100-110g 的动物进入该研究。手术后 3-4 周期间体重增加大于 10% 的动物不允许进入该研究。

[0732] 通常将 70 只切除垂体的 Sprague Dawley 大鼠随机分配到 7 个给药组,每组 10 只动物。1 个组只接受溶媒,用作未治疗对照组。3 个组分别接受试验化合物(例如 hGH 变体)33、3.3 和 0.33nmol,3 个组分别接受作为比较物(comparator)的 50、5.0 和 0.5nmol hGH。将化合物和溶媒均作为单次皮下剂量给予颈部。每日在 8-10am 之间测量体重持续一周。

[0733] 可通过将第 0 天的体重与第 7 天的相比,获得对体重剂量依赖性增加的评价。

[0734] 通过非线性回归分析,将 S 形剂量反应方程式与实验数据拟合(第 0-7 天间的体重增加),以计算 E_{max}、E₀ 和 ED₅₀ 的参数估计值。所述方程式是用于 Windows 的 GraphPad Prism4.00 版 S 形剂量反应内置方程式(GraphPad Software Inc., San Diego, USA)。通常提供包括参数估计值和 95% 置信区间的数据。

[0735] 对于 hGH[Q84C, Y143C] 和 hGH,未观察到 E₀ 和 E_{max} 的参数估计值的差异。然而,与 hGH 相比,hGH[Q84C, Y143C] 的 ED₅₀ 显著较低,这就表明了 hGH[Q84C, Y143C] 的体内效价增加。

[0736] 方法 7. 通过表面等离子共振分析的受体相互作用研究。

[0737] 采用表面等离子共振分析,对 hGH 化合物的受体相互作用进行了分析。该方法对 hGH 化合物是通用的。采用 Biacore T100 (GE Health Care, Sweden),通过表面等离子共振对 hGH 和类似物与 hGH 结合蛋白 (hGHBP) 的相互作用进行了研究。按照生产商说明书,以通常 5000RU 的水平将抗 hGH mAb (Fitzgerald Industries International, USA, #10G05B) 固定在 CM-5 芯片上。在运行缓冲液 (10mM HEPES、0.15M NaCl、30mM EDTA、0.05% 表面活性剂 P20, pH7.4) 中以 10–25 μ g/mL 俘获 wthGH 或类似物,这得到 250–400RU 俘获配体。随后将 0–800nM 浓度的 hGHBP 以 30 μ L/分钟注射在表面上。具有固定化抗 hGH mAb 但没有俘获 hGH 的表面用作参考。

[0738] 用带有 1:1Langmuir 结合模型的 Biacore™ 评价软件 2.0 对动力学数据进行了分析。

[0739] 方法 8. 测量野生型 hGH 和 GH 化合物蛋白酶降解速率的测定法

[0740] 在适当的缓冲液 (例如 PBS 或碳酸氢铵) 中,在 37°C 下用有关的蛋白酶 (胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、弹性蛋白酶、因子 VIIa、因子 Xa、蛋白酶 K、羧肽酶、DPPIV、中性内肽酶、粒酶 B、脯氨酸-内肽酶、葡萄球菌肽酶 I、嗜热菌蛋白酶、凝血酶、Arg-C 蛋白酶、Asp-N 内肽酶、胰天蛋白酶 1–10、梭菌蛋白酶、肠激酶、谷氨酰内肽酶、粒酶 B、LysC、LysN、脯氨酸-内肽酶和葡萄球菌肽酶 I 或组织提取物) 消化目标化合物,直到 24 小时。通过 HPLC 测定,评估蛋白水解性降解。

[0741] 蛋白水解消化:

[0742] 1mg/mL 溶于碳酸氢铵缓冲液的 100 μ L 试验化合物溶液用酶在 37°C 下降解,直到 24 小时。在不同时间点取出子样品,通过 10 倍稀释于 1%TFA 中使样品酸化,来终止蛋白水解反应。通过反相 HPLC 分析这些稀释样品,以估算蛋白水解消化的程度。

[0743] HPLC 方法:

[0744] 将 10 μ L 上述溶液注入反相 VydacC42 $\times$ 150mm 柱中,在 30 分钟时间内以 0.2mL/分钟的流速,用 0.1%TFA/水至含有 0.1%TFA 的 100%MeCN 线性梯度洗脱。在 214nm UV 吸收处进行峰检测。由时间点 $t=T$ 的峰面积 (A_T) 和 $t=0$ 的峰面积 (A_0) 计算时间点 $t=T$ 的 % 完整化合物,为 $(A_T/A_0) \times 100\%$ 。

[0745] 4 小时 (在上述方程式中 $T=4$) 后,得到以下实施例提供的结果。应用 GraphPad Prims 软件 5.01 版,将 % 完整化合物对时间作图。另通过 GraphPad Prism 软件, $T_{1/2}$ 计算为单相衰减 (one phase decay)。用于实施例中的酶是弹性蛋白酶 (Sigma, 得自猪胰) 和胰凝乳蛋白酶 (Roche 测序级)。缓冲液为 50mM 碳酸氢铵 (pH8.5)。

[0746] 方法 9. 通过肠内和 i. v. 给予 **Göttingen** 迷你猪的生长激素化合物的药代动力学性质

[0747] 通常在研究中使用获自 Ellegaard **Göttingen** Minipigs A/S 重约为 30kg 的 8 只 **Göttingen** 雄性迷你猪。在 2 周适应期后,对动物进行手术,将 2 个中心静脉导管插入每只动物中。手术后,将动物关养在其正常的各个围栏内。给药前给动物称重。对于接受肠内给药的动物,在给药前 2 天从围栏中撤除稻草和垫料,以确保 GI 道中没有外来物质。

[0748] 对于 i. v. 给药,通过短的中心导管给予 20nmol/kg,导管在给药后用 2mL 盐水冲洗。

[0749] 对于肠内给药,通过内窥镜(Pentax 胃镜)给予 800nmol/kg。将胃镜经口插入,穿过食道和胃室经由幽门直到空肠。在空肠中释放试验制剂,抽出胃镜。在给药过程中,用 Sedator 和异丙酚使迷你猪镇静,该过程后,肌肉给予 Antisedan。

[0750] 通常在下列时间点采集血样:

[0751] i. v. 给药:给药前,给药后 5 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟、1、1.5、2、3、4、6、8、24、48 和 72 小时。

[0752] 肠内给药:给药前、给药后 15 分钟、30 分钟、45 分钟、1、1.5、2、3、4、6、8、24、48 和 72 小时。

[0753] 在每个采样时间,从每只动物抽取 2mL 血液。血样通过中心导管采集。在每次抽取血样后,导管用 5mL 含肝素(10U/mL)的盐水冲洗。采样期间,弃去第一 ml 血。在血液采样期间需要无菌技术,以避免细菌污染和凝血风险。

[0754] 将血样收集在装有 EDTA8mM 的试管中。在离心(4000rpm, 4℃, 10 分钟)前,将血样置于冰上最多 20 分钟。立即收集血浆,并保存在 -20℃ 下直到测定。针对试验化合物对血浆样品进行分析。

[0755] 使用豚鼠抗 hGH 多克隆抗体作为收集器,生物素化 hGH 结合蛋白(人 GH 受体的可溶部分)作为检测器,通过夹心 ELISA 测定试验化合物浓度。该测定法的检测限为 0.2nM。

[0756] 对于 i. v. 给药,将化合物在甘氨酸 20mg/mL、甘露醇 2mg/mL、NaHCO₃ 2.4mg/mL 中溶解成 0.6mM,调节 pH 至 8.2。

[0757] 对于肠内给药,将化合物在甘氨酸 20mg/mL、甘露醇 2mg/mL、NaHCO₃ 2.4mg/mL 中溶解成 6mM,调节 pH 至 8.2。

[0758] 方法 10. 通过肠内给予 Sprague Dawley 大鼠的生长激素化合物的药代动力学性质

[0759] 通常约 250-300g 的 24 只 Sprague Dawley 大鼠,获自 Taconic M&B(Rekv. No. 2010 0824)。将动物关养在 IV 型笼中,每个笼 4-5 只动物。研究期间大鼠任意接近饮用水(自来水),但给药前 18 小时禁食。禁食期间,将动物放入没有垫料或窝料的笼的网格上,给药前一天 2pm 撤出食物,以确保至少 18 小时的禁食时间。在禁食期间,动物任意接近饮用水。

[0760] 在手术当天,在麻醉前给大鼠称重,以计算镇痛药的准确剂量。恰在称重后,动物接受麻醉前剂量的稀释于盐水(1+9)的兽用卡洛芬 50mg/mL, 0.1mL/100g s. c。

[0761] 虽然该研究不是无菌研究,但是尽可能无菌地进行手术方法。手术部位用 70% 乙醇消毒,采取预防措施使手术部位的污染减到最低。

[0762] 初始阶段,将大鼠用异氟烷(Isofluran)3% 麻醉直到动物进入睡眠,然后在手术其余时间减少异氟烷至 2-2.5%。术前给腹部剃毛,用 70% 乙醇消毒。

[0763] 恰在手术前,每只大鼠接受 0.3mg/mL 稀释于盐水(1+9)的 Temgesic s. c. 剂量 0.125mL/100g。如果使动物过夜,则给药后 1 小时和给药后 6-8 小时,再次给予相同剂量。

[0764] 在麻醉期间,连续监测大鼠,重点特别放在肤色和呼吸上。因为使用阿片样物质可能引起丧失体热(低温),因此在研究期间,将大鼠放入 37℃ 的加热柜中。

[0765] 使麻醉的大鼠躺在其电热毯或绝缘板上。在皮肤上开一中线切口。在剑状软骨(剑突)下约 1cm 处开始,沿腹白线切一 2cm 切口进入腹腔。在腹部脂肪层下找出形成显著弯曲的距幽门约 50-60cm 的一段空肠。使用 G27 注射器,通过肠内注射将试验化合物

(0.2 mL/动物)递送到空肠。给药后,小心地抽出针,注射孔用一小滴 Histoacryl® 封住。30 秒钟后,将肠放回腹部,用手术缝线 (Vicryl4-0) 缝合腹壁,确保伤口端紧密匹配在一起。皮肤使用创缘夹闭合。在伤口闭合后,在腹胁处 s.c. 给予大鼠 2 mL 盐水以免脱水,并放入加热灯下的特殊的恢复笼中。

[0766] 当动物从麻醉中完全恢复后,将其放入加热柜中的正常笼中。

[0767] 按以下时间点,从全部动物的尾静脉中采集 200 μ L 血样:给药前、注射后 0.5、1、2、3、4 和 6 小时。将血样收集到装有 EDTA8mM 的试管中。离心 (4000rpm, 4°C, 10 分钟) 前将血样保持在冰上最多 20 分钟。立即收集血浆样品,并保存在 -20°C 下直到测定。针对试验化合物对血浆样品进行分析。使用豚鼠抗 hGH 多克隆抗体作为收集器,生物素化 hGH 结合蛋白 (人 GH 受体的可溶部分) 作为检测器,通过夹心 ELISA 测定试验化合物浓度。该测定法的检测限为 0.2 nM。

[0768] 对于肠内给药,将化合物在甘氨酸 20mg/mL、甘露醇 2mg/mL、NaHCO₃ 2.4mg/mL 中溶解至 1.5mM,调节 pH 至 8.2。

[0769] 方法 11—Caco-2 透性测定

[0770] 使用 Caco-2 细胞测量试验化合物跨细胞单层的转运。Caco-2 细胞系来源于人结肠直肠癌,广泛用于预测跨人肠的药物吸收。分化 Caco-2 细胞的细胞层类似于 (resemble) 小肠柱状上皮,因此可用于测试化合物的转运性质。获自 Caco-2 细胞转运研究的表观透性系数 (P_{app}) 表明与人小肠吸收有关 (J.D Irvine 等. J. Pharm. Sci. (1999) 88 和 P. Artursson. J. Pharm. Sci. (1990) 79)。将细胞培养在半透膜上来进行测定。将试验化合物加到细胞层的顶面,随时间推移测量其在底外侧上的出现,所计算出的 P_{app} 表示肠吸收。

[0771] 材料

[0772] Caco-2 细胞获自美国典型培养物保藏中心 ATCC (Manassas, VA, USA)。所有细胞培养试剂购自 LONZA BioWhittaker,除非另有说明。胰蛋白酶-EDTA 0.25% 来自 Invitrogen, Gibco (Denmark)。MEM (非必需氨基酸) 来自 Invitrogen, Gibco (Denmark); FBS HI 来自 Invitrogen, Gibco (Denmark) 和 Hank 平衡盐溶液 (HBSS) 目录号 14025 和 HEPES 目录号 15630 购自 Invitrogen, Gibco (Denmark)。甘露醇 D-[1-³H(N)]- 购自 Perkin Elmer Danmark A-S。Microscint40 闪烁液购自 Packard BioScience (Groningen, The Netherlands)。

[0773] 细胞培养物

[0774] 将 Caco-2 细胞接种到的培养瓶中的含 Ultraglutamine 的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) 中,并传代 (使用 DPBS 和胰蛋白酶 0.25%-EDTA),该培养基中补充了 10% 胎牛血清、青霉素-链霉素 (分别为 100U/mL 和 100 μ g/mL) 和 1% 非必需氨基酸。以 10⁵ 个细胞/cm² 的密度,将细胞 (介于传代 23-40 之间) 接种到组织培养物处理的 Transwells™ (Costar, NY, USA)。随后在接种后第 22-24 天进行转运实验。使 Caco-2 细胞单层培养物在 5%CO₂-95%O₂ 的气氛和 90% 湿度、37°C 下生长。每隔一天更换生长培养基。使用上皮欧姆计 (Millicell®-ers; Millipore, Denmark),在 37°C 下测量 TEER,单位 Ω cm²,转运实验中在使用前,成熟 Caco-2 细胞单层的 TEER. >600 Ω cm²。

[0775] 透性测定

[0776] 通过测量甘露醇 D-[1-³H(N)]-, (0.8 μ Ci/mL) P_{app} 并监测 2 小时实验期间 TEER 的

变化,来评价 Caco-2 的完整性。实验前,从成熟 Caco-2 细胞中去除生长培养基,细胞单层物用 37℃ HBSS 漂洗一次。所有化合物转运实验均使用试验化合物的 200 μ M 溶液进行,顶部体积为 400 μ L,底外侧体积为 1000 μ L。在转运实验中,将 pH7.4 的试验化合物加入顶室中,在 15、30、45、60 和 120 分钟时从底外侧室取出 200 μ L,然后用 200 μ L 新鲜的预热缓冲液补充底外侧室。在 120 分钟时,从供体室取出 2x10 μ L 样品,以确定实验结束时化合物的浓度。所有实验在 37℃ 下进行 2 小时。使用来自 Packard 的 TopCount NXT,对含有放射性对照甘露醇 D-[1-³H(N)] 的样品进行分析,同时采用冷光氧通道形成免疫测定法 (Luminescence Oxygen Channeling Immunoassay, LOCI),对含有试验化合物的样品进行分析,该方法是基于均质珠粒的测定法。LOCI 试剂包括 2 种乳胶珠粒试剂和生物素化抗体,所述抗体是夹心法中的抗体之一。珠粒试剂之一是用链霉抗生物素涂覆并含有光敏染料的通用试剂 (供体珠粒)。第二珠粒试剂 (接纳体珠粒) 用构成夹心法的另一种抗体涂覆。在测定期间,3 种反应物与分析物结合形成珠粒-聚集体-免疫复合物。照射复合物从形成通往接纳体珠粒的通道的供体珠粒上释放单线态氧,并引发化学发光,在 EnVision 读板仪中测量该光。所产生的光的量与试验化合物浓度成比例。将样品 / 校准物 / 对照在测定缓冲液中稀释 10x。将 1 μ L 稀释的样品 / 校准物 / 对照加至 384 孔 LOCI 板上。将 15 μ L 生物素化 mAb HGH-7 (ES7) 和 mAb HGH-3A7 (ES3)-缀合的接纳体-珠粒的混合物加入各孔 (21-22℃) 中。将板在 21-22℃ 下温育 1 小时。将 30 μ L 链霉抗生物素涂覆的供体-珠粒 (67 μ g/mL) 加至各孔中,将全部在 21-22℃ 下温育 30 分钟。用 680nm 激光激发后,在 21-22℃ 下,在具有带宽为 520-645nm 的滤光片的 Envision 读板仪中读板。每孔的总测量时间为 210ms,包括 70ms 激发时间。

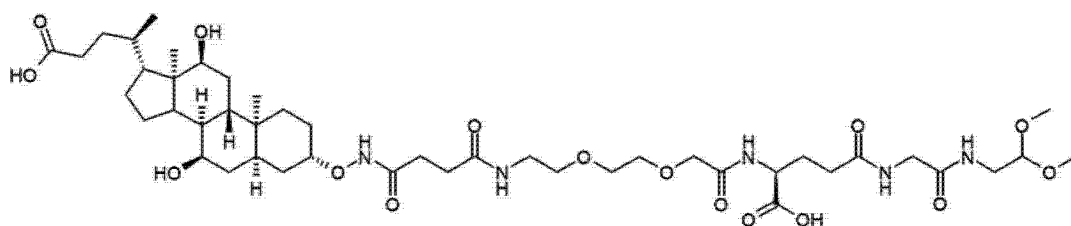
[0777] 透性的计算

[0778] 运用下列方程式,使用随时间推移而出现在底外侧室的试验化合物的累积量 dQ/dt ,来计算 P_{app} : $P_{app} = dQ/dt \times 1/(AC_0)$,其中 A 为滤光片的面积 (1cm²), C_0 为供体室的起始浓度。

[0779] 胆汁酸接头的制备

[0780] 接头 1 :-NN-AU-0087

[0781]



[0782] 材料

[0783] 固相支持体 :PAM 树脂 0.7-1.3mmol/g, 100-200 目, Sigma。

[0784] Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸 (dioxaoctonic acid)、MSNT(1-(1,3,5-三甲基苯-2-磺酰基)-3-硝基-1,2,4-三唑)(得自 Chemimpex)、Fmoc-Glu-O^tBu (Novabiochem)、Fmoc-Gly-OH (GLBiochem)、胆酸 (Sigma)。

[0785] Fmoc-Gly-OH 与 PAM 树脂的连接

[0786] 使 PAM 树脂 (3g, 3.3mmol) 在无水 DCM (经 P₂O₅ 蒸馏) 中溶胀 1 小时。将

Fmoc-Gly-OH(4.9g,5eq,16.5mmol)、MSNT(4.9g,5eq,16.5mmol)、N-甲基咪唑(0.75mL,3.75eq,12.4mmol)溶于含有2-3滴THF的无水DCM(20mL)中。然后将该溶液加入预先溶胀的树脂中。使树脂在Robbins scientific旋转器中在室温下旋转。反应2小时后,将树脂过滤,用DCM(6x10mL)和DMF(6x10mL)洗涤。在相同条件下再次重复该过程。

[0787] 脱去 Fmoc-Gly-PAM 的 Fmoc 基团:

[0788] 通过用 20%(v/v) 哌啶 /DMF(15mL) 的溶液处理两次分别 5 和 15 分钟,使 Fmoc-Gly-PAM 的 Fmoc 基团脱保护。然后将树脂过滤,用 DMF(10x5mL)、DCM(6x10mL) 和 DMF(6x10mL) 洗涤。通过阳性茚三酮试验证实 Fmoc 基团脱保护。

[0789] Fmoc-氨基酸/接头/胆酸序贯偶联的通用方法。

[0790] 使 Fmoc-脱保护的胺树脂在 DMF 中溶胀。将 Fmoc 保护的氨基酸(5 当量,相对于树脂负载)、HOBt(5 当量)和 DIC(5 当量)在无水 DMF 中的预活化溶液加入预先溶胀的树脂中,使反应混合物在室温下旋转 3 小时。将树脂过滤后,用 DMF(6x5mL)、DCM(6x5mL) 和 DMF(6x5mL) 洗涤。通过阴性茚三酮试验证实偶联反应完成。

[0791] 胆酸-琥珀酸偶联的通用方法。

[0792] 使 Fmoc-脱保护的胺树脂在 DMF 中溶胀。将胆酸-琥珀酸(3 当量,相对于树脂负载)、HOBt(3 当量)和 DIC(3 当量)在无水 DMF 中的预活化溶液加入预先溶胀的树脂中,使反应混合物在室温下旋转 16 小时。将树脂过滤后,用 DMF(6x5mL)、DCM(6x5mL) 和 DMF(6x5mL) 洗涤。通过阴性茚三酮试验证实偶联反应完成。

[0793] 从肽基树脂上切割叔丁基

[0794] 在靶分子与固相序贯连接后,将树脂用乙醚(6x10mL)洗涤,并在真空干燥器中干燥过夜。通过用由 95%TFA、2.5%TIS、2.5%水(25mL)组成的切割混合物在室温下处理肽-树脂 1 小时,来实现将肽从固相支持体上切割。树脂然后用 DCM(2x5mL)、DMF(2x5mL)、DCM(2x5mL) 洗涤。经干燥的切割了叔丁基侧链的肽树脂用 CHCl_3 /氨基乙醛二甲基缩醛(54:36)mL 的混合物在 45℃ 下处理 26 小时。切割后,将树脂滤干,用 DCM、MeOH、 H_2O 、0.1%TFA、HFIP、DCM、MeOH 和 DCM 洗涤。合并滤液,真空蒸发,将所得油状物溶于规定体积的蒸馏水中。用 TFA 调节 pH 至 7,将溶液冷冻并冻干,得到粗产物。粗产物用制备型 HPLC 纯化,得到 263mg 化合物,通过 LC-MS 证实其特征。

[0795] 肽的纯化和表征

[0796] 分析型(Agilent1100 系列)

[0797] 柱:Zorbax Eclipse XDB- C_{18} (4.6X150mm,5 μm)。

[0798] 温度:25℃。

[0799] 溶剂 A:0.1%TFA/ H_2O 。

[0800] 溶剂 B:9:1:0.1(MeCN/ H_2O /TFA)。

[0801] 流速 1mL/分钟

[0802] 监测波长:220nm(二极管阵列检测器)。

[0803] 梯度

[0804]

时间 (分钟)	0	2	15	20	25	30	32	35
%B	2	2	70	95	100	100	2	2

[0805] 将粗制肽溶于 MeCN/H₂O(1:1) 的混合物中。

[0806] 制备型 HPLC(Agilent1100 系列)

[0807] 柱:Zorbax-Eclipse XDB-C₁₈, 9.4X250mm, 5 μm。

[0808] 温度:25℃。

[0809] 溶剂 A :0.005%TFA/H₂O。

[0810] 溶剂 B :MeCN

[0811] 监测波长:220nm(二极管阵列检测器)。

[0812] 梯度

[0813]

时间 (分钟)	0	2	50
%B	25	30	80

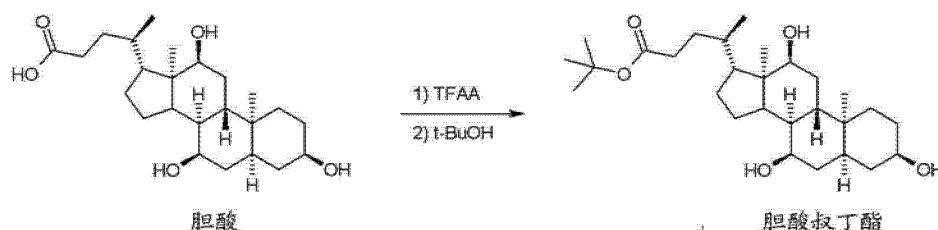
[0814]

接头#	HPLC纯度	LCMS
1	87.3 (+ 12.6% 醛)	942.1(M+1) 和 964.3(M+Na)

[0815] 胆酸叔丁酯-琥珀酸的合成

[0816] 步骤-1:自胆酸合成胆酸叔丁酯:

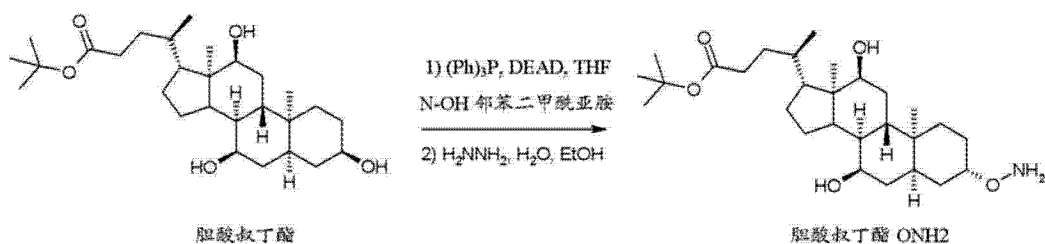
[0817]



[0818] 在冰浴温度下,将三氟乙酸酐(200mL, 1.43mol)在5分钟内加入胆酸(50g, 0.123mol)在无水 THF(1L)中的经搅拌溶液中。撤掉冰浴后,搅拌混合物80分钟,届时使之再冷却,加入叔丁醇(300mL, 3.16mol)。在室温下搅拌7小时后,在冷却时加入氨水溶液(280mL, 25%w/w),保持温度低于20℃,使溶液在室温下静置12小时。加入另一份氨水溶液(100mL),在室温下再过4小时后,使混合物在乙醚(2L)和水(1L)之间分配。(通过TLC监测三氟乙酸酯水解过程,用 EtOAc 作为洗脱液, RF=0.4)。有机相用 2N NaOH 溶液(6x1L)、水(6x1L)、盐水(1L)洗涤后,经硫酸钠干燥。将有机相过滤,挥发物经减压蒸发,得到胆酸叔丁酯,为固体(54g, 95%),通过 TLC 和 ¹H-NMR 纯化。

[0819] 步骤-2:自胆酸叔丁酯合成胆酸-ONH₂:

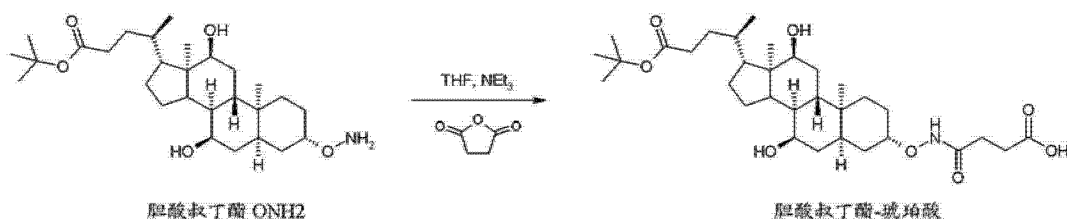
[0820]



[0821] 将胆酸叔丁酯 (15g, 32.3mmol) 溶于 THF (150mL) 中。在 0℃ 下将三苯膦 (16.9g, 2eq, 64.6mmol) 和 N-羟基邻苯二甲酰亚胺 (10.5g, 2eq, 64.6mmol) 加入反应混合物中。在 1 小时时间内, 滴加 DEAD (13mL, 2.5eq, 80.8mmol)。完成加入后, 使反应混合物达到室温, 并搅拌过夜。减压除去挥发物。将残余油状物溶于 EtOH (100mL) 中, 加入水合肼 (12mL, 247.3mmol), 使反应混合物在 45℃ 下加热 3 小时, 届时 TLC 表明反应完成。减压除去挥发物, 得到灰白色固体, 将其用 DCM (2x500mL) 洗涤。减压浓缩滤液, 得到黄色固体。粗产物通过使用硅胶 (60-120 目) 的柱层析法纯化。化合物在作为洗脱液的 1-2% MeOH/DCM 中洗脱。

[0822] 步骤 -3 : 自胆酸叔丁酯-ONH₂ 合成胆酸叔丁酯-琥珀酸

[0823]



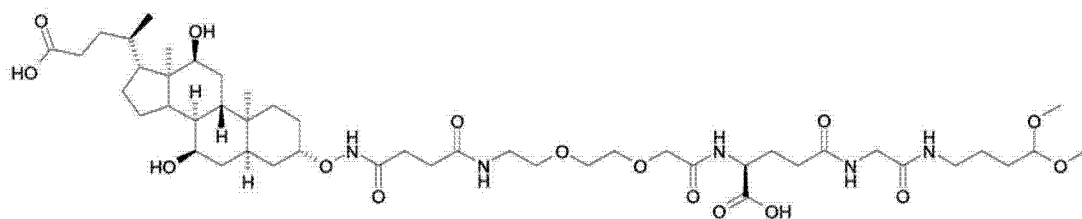
[0824] 将胆酸叔丁酯-ONH₂ (20g, 41.7mmol) 溶于 THF (200mL) 中。将琥珀酐 (4.6g, 1.1eq, 45.9mmol)、三乙胺 (11.5mL, 2eq., 83.5mmol) 加入反应混合物中, 在室温下搅拌 3 小时。TLC 表明反应完成。减压除去 THF, 得到粘性油状物。将油状物溶于 EtOAc (200mL) 中, 用柠檬酸溶液、水、盐水洗涤, 经硫酸钠干燥后, 减压浓缩, 得到粗制固体 (30g)。通过溶于 AcOEt/MeOH 的助溶剂中, 经重结晶纯化粗产物, 得到 10g (42%) 化合物, 纯度为 95%。

[0825] 通过 LC-MS 和 NMR 证实化合物特性。

[0826] 接头 2 :

[0827] 按上述有关接头 1 的类似方法, 使用 4, 4'-二甲氧基丁基胺代替氨基乙醛二甲基缩醛, 制备下列化合物。

[0828]

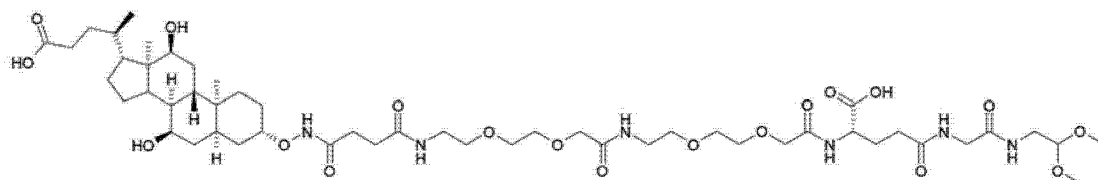


[0829] TOF-MS : 质量 970.93

[0830] 接头 3 : -NN-AU-0090

[0831] 按上述有关接头 1 的类似方法, 制备下列化合物。

[0832]

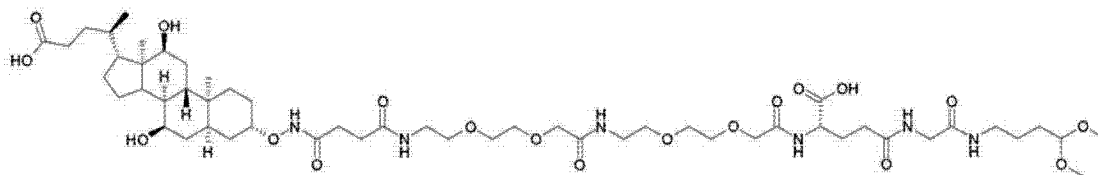


[0833] TOF-MS :质量 1087. 28

[0834] 接头 4 : (NN-AU-0109)

[0835] 按上述有关接头 1 的类似方法,使用 4, 4-二甲氧基丁基胺代替氨基乙醛二甲基缩醛,制备下列化合物。

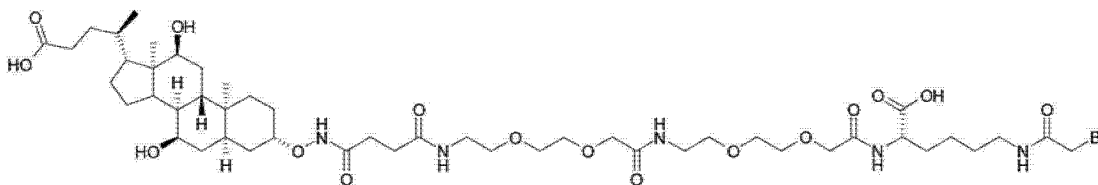
[0836]



[0837] TOF-MS :质量 1115. 34

[0838] 接头 5 :-(NN-AU-0091)

[0839]



[0840] 材料

[0841] 固相支持体 :氯三苯甲基氯树脂 (CTC) 1. 01mmol/g, 200-400 目。

[0842] Fmoc-8- 氨基 -3, 6- 二氧杂辛酸、Fmoc-Lys (Dde) -OH (Chemimpex)。

[0843] Fmoc-Lys (Dde) -OH 与聚合物支持体的连接 :

[0844] 使氯三苯甲基氯树脂 (CTC) (4g, 4mmol) 在无水 DCM (经 P_2O_5 蒸馏) 中溶胀 1 小时。将 Fmoc-Lys (Dde) -OH (2. 6g, 1. 2eq, 4. 8mmol) 和 DIPEA (3. 52mL, 4. 8eq, 19. 2mmol) 溶于无水 DCM (25mL) 中。将该溶液转移到树脂上。使树脂在 Robbins scientific 旋转器中在室温下旋转过夜。将反应物过滤,用 DCM (6x10mL) 和 DMF (6x10mL) 洗涤。

[0845] 除去 CTC-Lys (Dde) -Fmoc 树脂的 Fmoc 基团 :

[0846] 通过用 20% (v/v) 哌啶 /DMF 溶液 (20mL) 处理两次各 5 和 15 分钟,使 CTC-Lys (Dde) -Fmoc 的 Fmoc 基团脱保护。然后将树脂过滤,用 DMF (10x5mL)、DCM (6x10mL) 和 DMF (6x10mL) 洗涤。通过阳性茚三酮试验证实 Fmoc 基团脱保护。

[0847] Fmoc- 氨基酸 / 接头序贯偶联的通用方法 :

[0848] 使 Fmoc- 脱保护的胺树脂在 DMF 中溶胀。将 Fmoc 保护的氨基酸 (3 当量, 相对于树脂负载)、HOBt (3 当量) 和 DIC (3 当量) 在无水 DMF 中的预活化溶液加入预先溶胀的树脂中,使反应混合物在室温下旋转 3 小时。将树脂过滤后,用 DMF (6x5mL)、DCM (6x5mL) 和 DMF (6x5mL) 洗涤。通过阴性茚三酮试验证实偶联反应完成。以脱保护和偶联循环的类似方式,使氨基酸逐个偶联。

[0849] 胆酸叔丁酯 - 琥珀酸的偶联 :

[0850] 使 Fmoc- 脱保护的胺树脂在 DMF 中溶胀。将胆酸叔丁基 - 琥珀酸 (3 当量, 相对于树脂负载)、HOBt (3 当量) 和 DIC (3 当量) 在无水 DMF 中的预活化溶液加入预先溶胀的树脂中, 使反应混合物在室温下旋转过夜。将树脂过滤后, 用 DMF (6x5mL)、DCM (6x5mL) 和 DMF (6x5mL) 洗涤。通过阴性茚三酮试验证实偶联反应完成。

[0851] Dde 自肽基树脂上脱保护:

[0852] 通过用含 3%NH₂-NH₂ 的 DMF (20mL) 处理两次各 5 和 15 分钟, 使肽基树脂的 Dde 基团脱保护。然后将树脂过滤, 用 DMF (10x5mL)、DCM (6x10mL) 和 DMF (6x10mL) 洗涤。通过阳性茚三酮试验证实 Dde 基团脱保护。

[0853] 溴乙酸的偶联:

[0854] 使游离胺树脂在 DMF 中溶胀。将溴乙酸 (5 当量, 相对于树脂负载)、HOBt (5 当量) 和 DIC (5 当量) 在无水 DMF 中的预活化溶液加入游离胺树脂中, 使反应混合物在室温下旋转 3 小时。将树脂过滤后, 用 DMF (6x5mL)、DCM (6x5mL) 和 DMF (6x5mL) 洗涤。通过阴性茚三酮试验证实偶联反应完成。

[0855] 切割

[0856] 步骤 I : 作为受保护肽从固相中切割:

[0857] 在溴乙酸的最后偶联后, 树脂 (4g) 用乙醚 (6x10mL) 洗涤, 在真空干燥器中干燥过夜。通过用六氟异丙醇 : DCM (1:4, 40mL) 的混合物在室温下处理肽 - 树脂 3 小时, 来实现将肽从固相支持体上切割。经过滤收集切割混合物后, 树脂用 DCM (2x5mL) 洗涤。将过量试剂在氮气下浓缩至小体积, 将少量 DCM (5-10mL) 加入残余物中, 在氮气下蒸发。重复该过程 3-4 次以除去大部分挥发物。使残余物冷却至 0℃ 后, 加入无水乙醚使肽沉淀。将沉淀的肽离心, 除去上清液乙醚, 向肽中加入新的乙醚后再次离心。重复该过程 3x, 以除去全部有机物, 得到 3.0g 粗制化合物, 纯度为 40%。

[0858] 步骤 II : 侧链保护基团的切割:

[0859] 用由 25%TFA 和 2.5%TIPS/DCM 组成的切割混合物 (20mL) 处理粗制化合物, 来实现叔丁基最后的脱保护。搅拌溶液 30 分钟。在氮气下将过量试剂浓缩至小体积, 将少量 DCM (5-10mL) 加入残余物中, 在氮气下蒸发。重复该过程 3-4 次以除去大部分挥发物。使残余物冷却至 0℃ 后, 加入无水乙醚使肽沉淀。将沉淀离心, 除去上清液乙醚相, 向肽中加入新的乙醚后再次离心。重复该过程 3x, 以除去全部有机物, 得到 2.7g 粗制肽, 纯度约为 35%。化合物用制备型 HPLC 纯化, 得到纯的化合物。

[0860] 接头 5 的纯化和表征

[0861] 分析型 (Agilent1100 系列)

[0862] 柱 : Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (4.6X150mm, 5 μm)。

[0863] 温度 : 25℃。

[0864] 溶剂 A : 0.1%TFA/H₂O。

[0865] 溶剂 B : 9:1:0.1 (MeCN/H₂O/TFA)。

[0866] 流速 1mL/ 分钟

[0867] 监测波长 : 220nm (二极管阵列检测器)。

[0868] 梯度

[0869]

时间 (分钟)	0	2	15	20	25	30	32	35
%B	2	2	70	95	100	100	2	2

[0870] 将粗制肽溶于 MeCN/H₂O(1:1) 的混合物中并注射。

[0871] R_t=15.45 分钟。

[0872] 制备型 HPLC(Agilent1100 系列)

[0873] 柱 :Zorbax-Eclipse XDB-C₁₈, 9.4X250mm, 5 μm。

[0874] 温度 :25℃。

[0875] 溶剂 A :0.1%TFA/H₂O。

[0876] 溶剂 B :MeCN

[0877] 流速 7mL/ 分钟

[0878] 监测波长 :220nm(二极管阵列检测器)

[0879] 梯度

[0880]

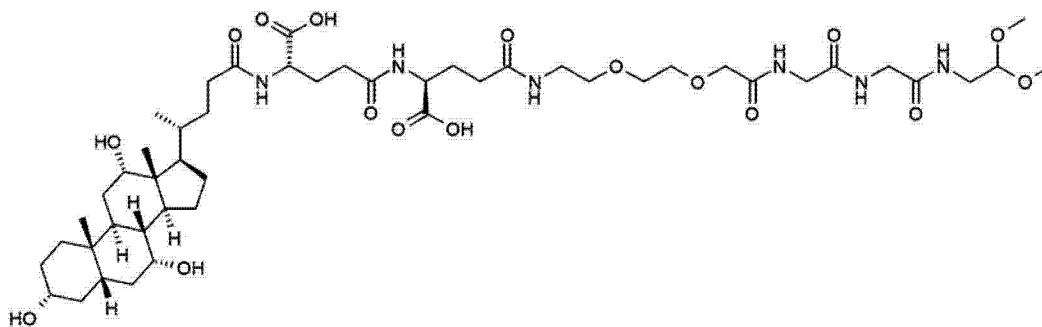
时间 (分钟)	0	5	15	17
%B	5	25	70	70

[0881]

接头 #	HPLC 纯度 (%)	LC-MS
5	95	1064.5 (M+1)

[0882] 接头 6 : (NN-AU-0078)

[0883]



[0884] 材料

[0885] 固相支持体 :PAM 树脂 0.7-1.3mmol/g, 100-200 目 (Sigma)。

[0886] Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸、MSNT (Chemimpex)、Fmoc-Glu-O^tBu (Novabiochem)、Fmoc-Gly-OH (GLBiochem)。

[0887] Fmoc-Gly-OH 与 PAM 树脂先连接：

[0888] 使 PAM 树脂 (3g, 3.3mmol) 在无水 DCM(经 P₂O₅ 蒸馏) 中溶胀 1 小时。将 Fmoc-Gly-OH (4.9g, 5eq, 16.5mmol)、MSNT (4.9g, 5eq, 16.5mmol)、N-甲基咪唑 (0.75mL, 3.75eq, 12.4mmol) 溶于含有 2-3 滴 THF 的无水 DCM (20mL) 中, 加到预先溶胀的树脂中。

使树脂在 Robbins scientific 旋转器中在室温下旋转。反应 2 小时后,将树脂过滤,用 DCM(6x10mL) 和 DMF(6x10mL) 洗涤。在相同条件下再次重复该过程。

[0889] 除去 Fmoc-Gly-PAM 的 Fmoc 基团:

[0890] 通过用 20%(v/v) 哌啶 /DMF 溶液 (15mL) 处理两次各 5 和 15 分钟,使 Fmoc-Gly-PAM 的 Fmoc 基团脱保护。然后将树脂过滤,用 DMF(10x5mL)、DCM(6x10mL) 和 DMF(6x10mL) 洗涤。通过阳性茚三酮试验证实 Fmoc 基团脱保护。

[0891] Fmoc-氨基酸 / 接头 / 胆酸序贯偶联的通用方法:

[0892] 使 Fmoc- 脱保护的胺树脂在 DMF 中溶胀。将 Fmoc 保护的氨基酸 (5 当量,相对于树脂负载)、HOBt (5 当量) 和 DIC (5 当量) 在无水 DMF 中的预活化溶液加入预先溶胀的树脂中,使反应混合物在室温下旋转 3 小时。将树脂过滤后,用 DMF(6x5mL)、DCM(6x5mL) 和 DMF(6x5mL) 洗涤。通过阴性茚三酮试验证实偶联反应完成。

[0893] 从肽基树脂上切割叔丁基:

[0894] 在靶分子与固相序贯连接后,树脂用乙醚 (6x10mL) 洗涤,在真空干燥器中干燥过夜。通过用由 95%TFA、2.5% 三异丙基甲硅烷 (TIS)、2.5% 水 (25mL) 组成的切割混合物在室温下处理肽-树脂 1 小时,来实现从固相支持体上切割肽。树脂用 DCM(2x5mL)、DMF(2x5mL) 和 DCM(2x5mL) 洗涤。经干燥的切割了叔丁基侧链的肽树脂用 CHCl_3 (54mL) 和氨基乙醛二甲基缩醛 (36mL) 的混合物在 45°C 下处理 26 小时。切割后,将树脂滤干,用 DCM、MeOH、 H_2O 、0.1%TFA、HFIP、DCM、MeOH 和 DCM 洗涤。合并滤液后,真空蒸发。将所得油状物溶于蒸馏水,用 TFA 调节 pH 至 7。将溶液冷冻并冻干,得到粗制油状物。粗制油状物用制备型 HPLC 纯化,得到 263mg 化合物。

[0895] 肽的纯化和表征

[0896] 分析型 (Agilent1100 系列)

[0897] 柱:Zorbax Eclipse XDB- C_{18} (4.6X150mm, 5 μm)

[0898] 温度:25°C。

[0899] 溶剂 A :0.1%TFA/ H_2O 。

[0900] 溶剂 B :9:1:0.1 (MeCN/ H_2O /TFA)。

[0901] 流速 1mL/ 分钟

[0902] 监测波长:220nm (二极管阵列检测器)。

[0903] 梯度

[0904]

时间 (分钟)	0	2	15	20	25	30	32	35
%B	2	2	70	95	100	100	2	2

[0905] 将粗制肽溶于 MeCN/ H_2O (1:1) 的混合物中并注射。

[0906] R_t =14.37 分钟。

[0907] 制备型 HPLC (Agilent1100 系列)

[0908] 柱:Zorbax-Eclipse XDB- C_{18} , 9.4X250mm, 5 μm

[0909] 温度:25°C。

[0910] 溶剂 A :0.005%TFA/ H_2O 。

[0911] 溶剂 B :MeCN

[0912] 监测波长 :220nm(二极管阵列检测器)。

[0913] 梯度

[0914]

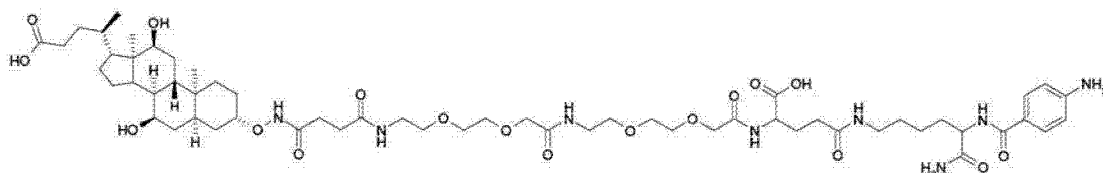
时间 (分钟)	%B
0	25
2	30
50	80

[0915]

接头#	HPLC纯度	LCMS
6	85.9 (+ 10%游离醛)	1013.5 (M+1) 和 1035.3 (M+Na)

[0916] 接头 7 : (NN-AU-0015)

[0917]



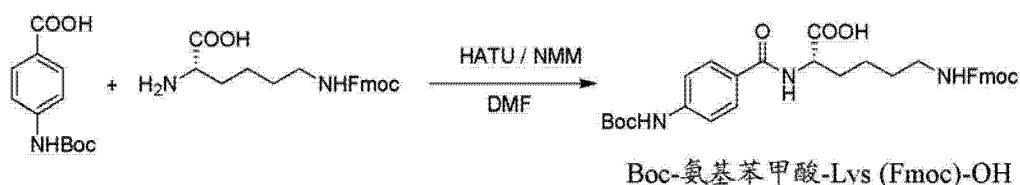
[0918] 材料

[0919] 固相支持体 :2gTentagelSRAM 树脂 0.24mmol/g,

[0920] Boc-4- 氨基苯甲酸、H-Lys (Fmoc) -OH、HATU、NMM、DMF、Fmoc-Glu-OtBu、Fmoc-8- 氨基-3,6- 二氧杂辛酸 (Chem Impex)、琥珀酐、胆酸、DIC(Sigma))、TFA、哌啶、DMF、DCM(Spectrochem Bombay, India) 和HOBt(Chemlabs, Leonid chemicals (Pvt) Ltd, India)。

[0921] Boc- 氨基苯甲酸 -Lys (Fmoc) -OH 的合成

[0922]



[0923] 将 Boc-4- 氨基苯甲酸 (1.16g, 4.8mmol, 0.9eq)、HATU(2.05g, 5.4mmol, 1.0eq) 和 NMM(1.2mL, 10.8mmol, 2eq.) 溶于 DMF (20ml) 中, 将反应混合物在冰浴温度下搅拌 5 分钟。在冰浴温度下向该混合物中加入 H-Lys (Fmoc) -OH(2g, 5.4mmol, 1.0eq.), 将混合物在室温下再搅拌 3 小时。反应完成后 (用 TLC 监测), 反应混合物用冰水猝灭, 滤出沉淀。所得沉淀进一步用冰水和己烷洗涤。干燥后得到的化合物 (2.1g, 65%) 无需进一步纯化便可用于下一步。

[0924] Boc- 氨基苯甲酸 -Lys (Fmoc) -OH 与聚合物支持体的连接 :

[0925] 使 Tentagel S RAM 树脂 (2g, 0.24mmol) 在 DCM 和 DMF 中各溶胀 1 小时。将 Boc-氨基苯甲酸-Lys(Fmoc)-OH (1.4g, 2.4mmol)、HOBt (327.6mg, 2.4mmol)、DIC (371.6mg, 2.4mmol) 溶于 DMF (10mL) 中, 并转移到预先溶胀的树脂中。使树脂在 Robbins scientific 旋转器中在室温下旋转 5 小时。将反应物过滤, 用 DCM (6x10mL) 和 DMF (6x10mL) 洗涤。

[0926] Boc-氨基苯甲酸-Lys(Fmoc)-树脂的 Fmoc 基团的脱去:

[0927] 通过用 20% (v/v) 哌啶/DMF 溶液 (20mL) 处理两次各 5 和 15 分钟, 使上述 Boc-氨基苯甲酸-Lys(Fmoc)-树脂的 Fmoc 基团脱保护。然后将树脂过滤, 用 DMF (10x5mL)、DCM (6x10mL) 和 DMF (6x10mL) 洗涤。Fmoc 基团的脱保护通过阳性茚三酮试验证实。

[0928] Fmoc-氨基酸序贯偶联的通用方法:

[0929] 使 Fmoc-脱保护的胺树脂在 DMF 中溶胀。将 Fmoc 保护的氨基酸 (3 当量, 相对于树脂负载)、HOBt (3 当量) 和 DIC (3 当量) 在无水 DMF 中的预活化溶液加入预先溶胀的树脂中, 使反应混合物在室温下旋转 3 小时。将树脂过滤后, 用 DMF (6x5mL)、DCM (6x5mL) 和 DMF (6x5mL) 洗涤。通过阴性茚三酮试验证实偶联反应完成。以脱保护和偶联循环的类似方式, 使氨基酸逐个偶联。

[0930] 琥珀酐的偶联:

[0931] 使 Fmoc-脱保护的胺树脂在 DMF 中溶胀。将琥珀酐 (5eq., 相对于树脂负载) 与 DIPEA (5 当量) 在 NMP 中的溶液加入预先溶胀的树脂中, 使反应混合物在室温下旋转 2 小时。将树脂过滤后, 用 DMF (6x5mL)、DCM (6x5mL) 和 DMF (6x5mL) 洗涤。通过阴性茚三酮试验证实偶联反应完成。

[0932] 胆酸羟基胺的偶联:

[0933] 将胆酸叔丁酯-ONH₂ (5 当量, 相对于树脂负载)、HOBt (5 当量) 和 DIC (5 当量) 在无水 DMF 中的溶液加入预先溶胀的树脂中, 使反应混合物在室温下旋转 24 小时。将树脂过滤后, 用 DMF (6x5mL)、DCM (6x5mL) 和 DMF (6x5mL) 洗涤。

[0934] 树脂上的肽切割:

[0935] 在靶分子与固相序贯连接后, 树脂用乙醚 (6x10mL) 洗涤, 在真空干燥器中干燥过夜。通过用由 95%/2.5%/2.5% (TFA/TIS/水) 组成的切割混合物 (25mL) 在室温下处理肽-树脂 3 小时, 来实现从固相支持体上切割肽。经过滤收集切割混合物后, 树脂用 DCM (2x5mL) 洗涤。将过量试剂在氮气下浓缩至小体积, 将少量 DCM (5-10mL) 加入残余物中, 在氮气下蒸发。重复该过程 3-4 次以除去大部分挥发物。使残余物冷却至 0°C 后, 加入无水乙醚使肽沉淀。将沉淀的肽离心, 除去上清液乙醚相, 向肽中加入新的乙醚后再次离心。重复该过程 3x, 以除去全部有机物, 得到粗制化合物 (1.3g, 15% 纯度)。目标化合物用 prep-HPLC 纯化, 得到化合物。

[0936] 肽的纯化和表征

[0937] 分析型 (Agilent1100 系列)

[0938] 柱: Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (4.6X150mm, 5 μm)

[0939] 温度: 25°C。

[0940] 溶剂 A: 0.1%TFA/H₂O。

[0941] 溶剂 B: 9:1:0.1 (MeCN/H₂O/TFA)

[0942] 流速 1mL/分钟

[0943] 监测波长 :220nm(二极管阵列检测器)。

[0944] 梯度

[0945]

时间 (分钟)	0	2	15	20	25	30	32	35
%B	2	2	70	95	100	100	2	2

[0946] 将粗制肽溶于 MeCN/H₂O(1:1) 并注射。

[0947] R_t=7.46 分钟。

[0948] 制备型 HPLC(Agilent1100 系列)

[0949] 柱 :Zorbax-Eclipse XDB-C₁₈, 9.4X250mm, 5 μ m。

[0950] 温度 :25℃。

[0951] 溶剂 A :0.005%TFA/H₂O。

[0952] 溶剂 B :MeCN

[0953] 流速 5mL/ 分钟

[0954] 监测波长 :220nm(二极管阵列检测器)。

[0955] 梯度

[0956]

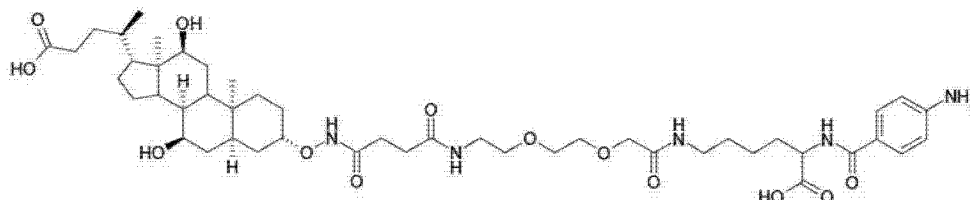
时间 (分钟)	%B
0	5
40	30
15	40

接头#	HPLC纯度(%)	LCMS
7	96	1189.9 (M+1) 和 1211.9 (M+Na)

[0957]

[0958] 接头 8 : (NN-AU-0016) (NN-AU-0016) 按以上有关接头 7 中所述类似方法, 使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Wang 树脂, 制备下列化合物。

[0959]

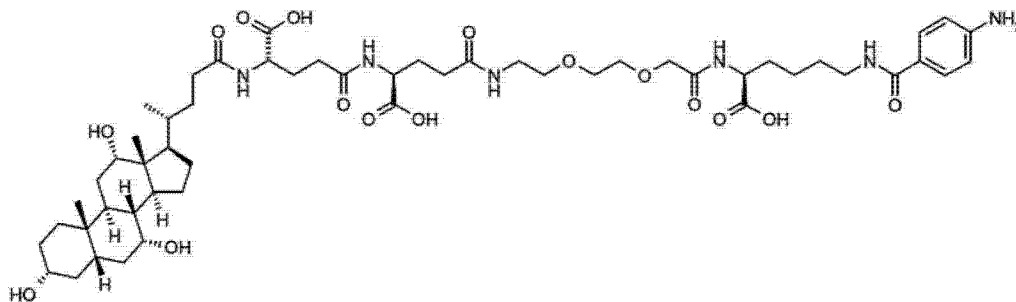


[0960] TOF-MS :质量 916.13。

[0961] 接头 9 : (NN-AU-0086)

[0962] 按以上有关接头 7 中所述类似方法, 使用 FMOC-Lys(Mtt)-OH 和 Wang 树脂, 制备下列化合物。

[0963]



[0964] TOF-MS :质量 1059.4

[0965] HPLC :

[0966] 柱 :Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (4.6X150mm, 5 μm)

[0967] 温度 :25℃。

[0968] 溶剂 A :0.1%TFA/H₂O。[0969] 溶剂 B :9:1:0.1 (MeCN/H₂O/TFA)

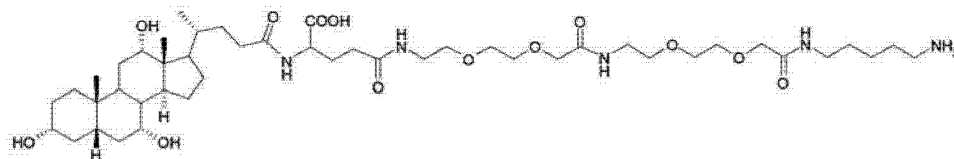
[0970] 流速 1mL/ 分钟

[0971] 监测波长 :220nm (二极管阵列检测器)。

[0972] R_t=14.02 分钟。

[0973] 接头 10 :

[0974]



[0975] 材料

[0976]

	名称	密度	Mw	Mol	n	W	V
		[g/ml]	[g/mol]	比率	[mmol]	[mg]	[ul]
A	尸胺		102.18	10	10	1021.81	
B	产物 :C ₄₆ H ₈₁ N ₅ O ₁₃		912.18				
C	2- 氯三苯甲基树脂			1, 1	1, 1	1000	
D	Fmoc-OEG-OH		385.42	4	4	1541.68	
F	DIC	0.815	126.2	4	4	504.8	619
E	HOBt		153.2	4	4	612.8	
G	Fmoc-OEG-OH		385.42	4	4	1541.68	

H	DIC	0.815	126.2	4	4	504.8	619
I	HOBt		153.2	4	4	612.8	
J	Fmoc-Glu-OtBu		425.49	4	4	1701.96	
K	DIC	0.815	126.2	4	4	504.8	619
L	HOBt		153.2	4	4	612.8	
M	胆酸		408.58	4	4	1634.32	
N	DIC	0.815	126.2	4	4	504.8	619
O	HOBt		153.2	4	4	612.8	

[0977] 方法：

[0978] 在 NMP 中制备 0.5MHOBt 溶液。

[0979] 使树脂在 DCM 中溶胀 30 分钟。

[0980] 树脂用尸胺：DCM(10mL, 1:9) 的混合物处理 30 分钟。

[0981] 树脂用 5%DIPEA ;5%MeOH/DCM 处理 30 分钟。

[0982] 树脂用 DCM(3x) 洗涤。

[0983] Fmoc-OEG-OH 的偶联：

[0984] 在 NMP (8mL) 中制备 Fmoc-OEG-OH/DIC/HOBt 的 0.5M 溶液，混合 2 分钟后加入三苯甲基树脂 (1g) 中。将树脂在室温下振荡 45 分钟，接着用 NMP (5x) 和 DCM (5x) 洗涤。少量产物从树脂上切割，并通过 LCMS 进行分析。

[0985] 帽化：

[0986] 加入 Ac₂O/DIPEA/NMP (1:1:5) 的溶液。将树脂在室温下搅拌 10 分钟后，用 NMP (5x) 和 DCM (5x) 洗涤。

[0987] De-Fmoc：

[0988] 树脂用 30% 哌啶 -NMP 处理 2x10 分钟。

[0989] 树脂用 NMP (5x) 和 DCM (5x) 洗涤。

[0990] 第二 Fmoc-OEG-OH 的偶联：

[0991] 在 NMP (8mL) 中制备 Fmoc-OEG-OH/DIC/HOBt 的 0.5M 溶液，混合 2 分钟后，加入上述树脂中。将树脂在室温下振荡 45 分钟，接着用 NMP (5x) 和 DCM (5x) 洗涤。少量产物从树脂上切割，并通过 LCMS 进行分析。

[0992] De-Fmoc：

[0993] 树脂用 30% 哌啶 -NMP 处理 2x10 分钟。

[0994] 树脂用 NMP (5x) 和 DCM (5x) 洗涤。

[0995] Fmoc-Glu-tBu 的偶联：

[0996] 在 NMP (8mL) 中制备 Fmoc-Glu-tBu/DIC/HOBt 的 0.5M 溶液，混合 2 分钟后，加入树脂中。将树脂在室温下振荡 45 分钟，用 NMP (5x) 和 DCM (5x) 洗涤。少量产物从树脂上切割，

并通过 LCMS 进行分析。

[0997] De-Fmoc :

[0998] 树脂用 30% 哌啶 -NMP 处理 2x10 分钟。

[0999] 树脂用 NMP (5x) 和 DCM (5x) 洗涤。

[1000] 胆酸的偶联 :

[1001] 在 NMP (8mL) 中制备胆酸 /DIC/HOBt 的 0.5M 溶液,混合 2 分钟后,加入树脂中。将树脂在室温下振荡过夜。接着用 NMP (5x) 和 DCM (5x) 洗涤。少量产物从树脂上切割,并通过 LCMS 进行分析。

[1002] 从树脂上切割 :

[1003] 树脂用 TFA/ 水 /Et₃SiH (15mL, 90:5:5) 的混合物处理 10 分钟两次。将合并的滤液浓缩后,通过 LCMS 分析。LCMS 表明形成产物 (60%) 和三氟乙酰化产物 (40%)。因此将残余油状物溶于 2MNH₃/MeOH (10mL) 中,在室温下搅拌 1 小时。真空除去挥发物,将残余物溶于 MeCN 和 MQ (11mL, 1:10) 的混合物,过滤,采用 Waters 通过 prepHPLC 纯化 :

[1004]	名称	密度	Mw	Mol	n	W	V
		[g/ml]	[g/mol]	比率	[mmol]	[g]	[ml]
[1005]	A		102.181	1			
	B	产物 : C46H81N5O13	912.184				

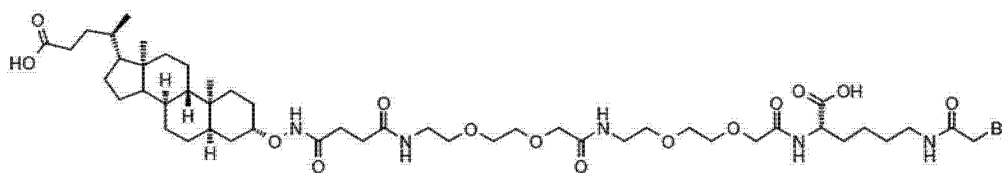
[1006] 合并流分,真空浓缩,得到 194mg 无色油状物。

[1007] TOF-MS :质量 912. 13

[1008] 按上文有关接头 5 所述类似方法,使用 FMOC-L_ys (Mtt)-OH 和 Wang 树脂,制备下列化合物。

[1009] 接头 11 :

[1010]

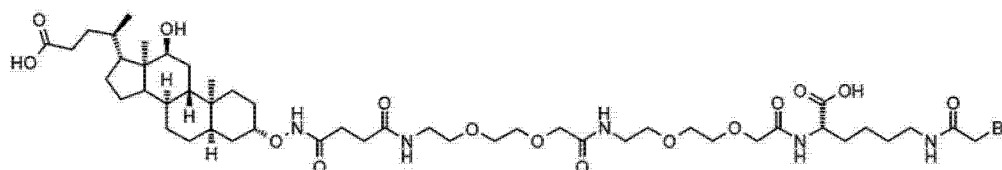


[1011]

接头 #	HPLC 纯度 (%)	LC-MS
11	96	1032. 7 (M+1)

[1012] 接头 12 :

[1013]



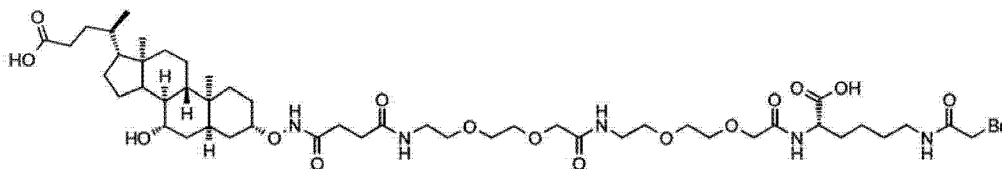
[1014]

接头 #	HPLC 纯度 (%)	LC-MS
12	94	1047.6 (M+1)

[1015] 和

[1016] 接头 13：

[1017]



[1018]

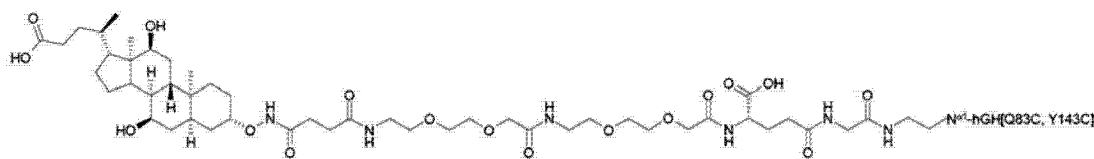
接头 #	HPLC 纯度 (%)	LC-MS
13	95	1048.7 (M+2)

[1019] 胆酸缀合的化合物的合成

[1020] 按照方法 3.1 在 N 端 Phe 处连接接头 3。

[1021] 化合物 A-NNC0186-0000-0078

[1022]



[1023] hGH[Q83C, Y143C] 在 N 端处用接头 3 还原烷基化。

[1024] 样品：

化合物	Mw	比率	μmole	mg
hGH[Q83C, Y143C]	22.038 g/摩尔	1	6.8	150
接头 3	1.087 g/摩尔	1.5	10.2	11
NaCNBH ₃	62.84 g/摩尔	124	841	53

[1025]

[1026] 将冻干的 hGH[Q83C, Y143C] (150mg) 溶于 10mM 碳酸氢铵缓冲液, 采用 Amicon Ultra15 装置 (Ultracel10K 管) 通过在 4000rpm/ 分钟、10℃ 下离心 3x8 分钟, 更换缓冲液为 25mM HEPES, pH7.0。

[1027] 方法：

[1028] 接头 3 (11mg) 用 TFA (500 μL) 处理 6 分钟, 以释放醛, 蒸发后, 用 EtOH (0.5mL) 反萃取两次至干。

[1029] 分批加入上述 hGH[Q83C, Y143C] 的溶液, 同时通过加入 1N NaOH 保持 pH 约为 7.0。以 5 分钟的间隔分批加入溶于水 (500 μL) 的 NaCNBH₃ (53mg) (5x100 μL)。

[1030] 反应烧瓶用锡纸包裹, 将反应混合物在室温下轻轻搅拌过夜。搅拌 1 小时后得到

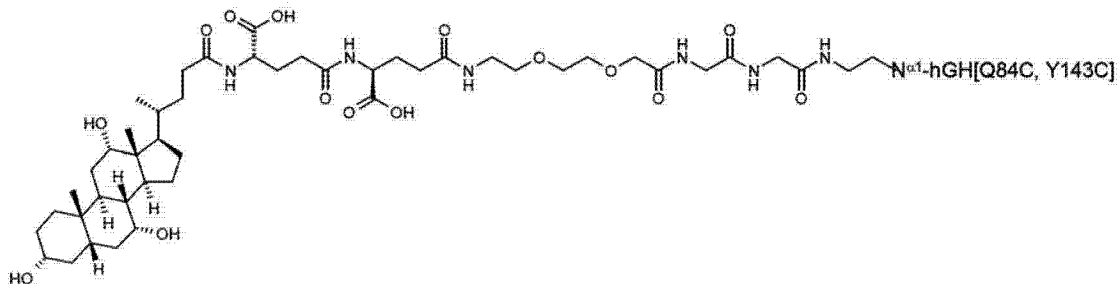
澄清溶液。在搅拌过夜后,用 LC/MS 分析样品:产物的 m/z :23.063, $R_t=6$ 分钟,但起始蛋白质仍剩余。

[1031] 混合物使用 IEX 和 HIC 层析法联合纯化,在 G25 柱上进行缓冲液交换,超滤,得到 4mg,95% 纯化合物。

[1032] 产物的 m/z :23.063 [M+1]。

[1033] 化合物 B-NNC0186-0000-0036

[1034]



[1035] 按照方法 3.1, hGH[Q83C, Y143C] 在 N 端用接头 6 还原烷基化

[1036] 样品:

[1037]

化合物	Mw	比率	μ mole	mg
hGH[Q83C, Y143C]	22.038g/ 摩尔	1	8.67	191
接头 6	1.013g/ 摩尔	4.5	39.0	39.5
NaCNBH3	62.84g/ 摩尔	124	1075	67.6

[1038] 将冻干的 hGH[Q83C, Y143C] (200mg) 溶于 10mM 碳酸氢铵缓冲液中,使用 Amicon Ultra15 装置 (Ultracel10K 管) 通过以 4000rpm/ 分钟、10℃ 离心 3x7 分钟,更换缓冲液为 25mM HEPES, pH7.00。最终体积:40mL。

[1039] 方法:

[1040] 接头 6 (39.6mg) 用 50%TFA/H₂O (2mL) 的混合物处理 20 分钟,在旋转蒸发仪 (rotavapor) 中蒸发至干,用 EtOH (2x1mL) 反萃取。

[1041] 当加入 hGH[Q83C, Y143C] 时,将 1N NaOH (5 μ L) 加入无水接头中以防止 pH 下降。

[1042] 将上述 hGH[Q83C, Y143C] 的溶液加入接头中,用 1N NaOH (90 μ L) 调节 pH 至 7.00。在加入反应混合物期间 pH 下降至 6.55。用 1N NaOH (40 μ L) 调节 pH 至 7.00。

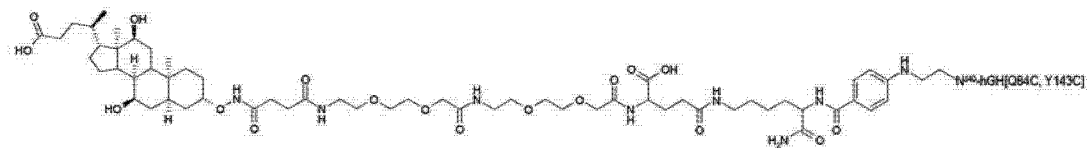
[1043] 将 NaCNBH₃ (67.6mg) 溶于水 (600 μ L),并以 5 分钟的间隔分批加入 (3x200 μ L)。将反应混合物用锡纸包裹,轻轻搅拌的同时温育过夜。LCMS 分析表明仍有一些起始原料。使反应混合物温育,在室温下轻轻搅拌,并在 4℃ 下静置过夜。在 Äkta 系统上纯化之前,调节反应混合物的 pH 至 7.50,用 Milli-Q 水稀释至 20mS 的电导率。

[1044] 样品体积:110mL

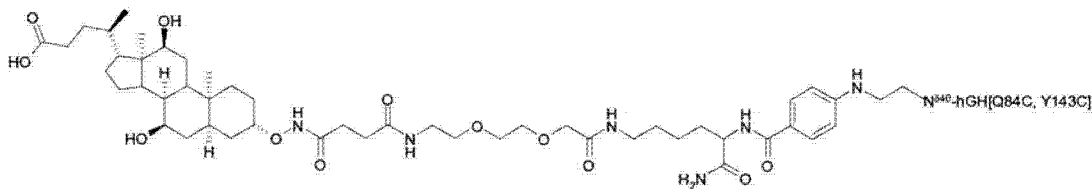
[1045] 柱:HiLoad26/10Q Sepharose

[1046] 缓冲液 A:20mM HEPES, pH:7.50+10% 乙二醇 (Ethylenglycol)

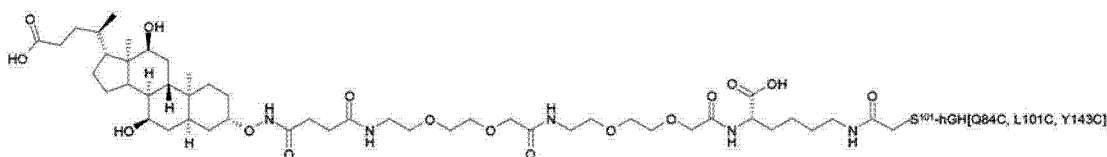
- [1047] 缓冲液 B :20mM HEPES, pH:7.50+1MNaCl+10% 乙二醇
- [1048] 流速 :6mL/ 分钟
- [1049] 梯度 :0-5%, 1CV, 5-40%, 12CV, 40-100%, 1CV
- [1050] 流分大小 :7mL。使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速加样品。流分 E4, 实测所需质量 :22.989
- [1051] 合并不充分纯的所有流分用于进一步纯化。
- [1052] 在 3 次运行中, 使流分 E4 更换缓冲液至 10mM 碳酸氢铵缓冲液 :
- [1053] 柱 :50/30Sephadex G25Fine
- [1054] 缓冲液 A :10mM 碳酸氢铵缓冲液。
- [1055] 流速 :10mL/ 分钟
- [1056] 流分大小 :45mL
- [1057] 1 轮 :合并的流分 A2-A3 ;16.6mg 纯化合物
- [1058] 2 轮 :合并的流分 A1-A2 ;12.9mg 纯化合物
- [1059] 3 轮 :合并的流分 A7-A8 ;19.2mg 纯化合物
- [1060] LC-MS(电喷雾) :m/z 实测 :22.989
- [1061] 化合物 C0186-0000-0050
- [1062] 按照方法 3.2 接头 7 在 Gln 残基上的连接。
- [1063]



- [1064] 如上所述产生转氨基化 hGH[Q83C, Y143C], 并与接头 7 缀合。TOF-LC-MS :质量 23.253, 99
- [1065] 合并物 1 :产量 12.8mg。纯度 :100%。
- [1066] 合并物 2 :产量 19.2mg。纯度 :100%。
- [1067] 化合物 D NNC0186-0000-0061
- [1068] 按上述有关化合物 C 的类似方式, 使用接头 8 制备下列化合物。
- [1069]



- [1070] 化合物 E - NNC0186-0000-0081
- [1071] 按照方法 3.3 接头 5 在 101 位 (L101C) 上的连接。
- [1072]



[1073] 按方法 2 所述得到的 [Q84C, L101C, Y143C] 的部分游离半胱氨酸被谷胱甘肽和胱胺封闭。使用含 TSPP 的 TEA/EDTA 缓冲液, 进行选择解封闭。

[1074] 向含 hGH[Q84C, L101C, Y143C] 的 20mM TEA- 缓冲液 (pH7.4) 与约 0.1M NaCl 的溶液 (170mL, 蛋白质浓度 :2.69mg/mL) 中加入 EDTA (126mg) 至 2mM 的浓度, 用 6N NaOH 调节 pH 至 8.5。加入 TSPP (339mg, 25eq.), 将所得混合物在室温下轻轻搅拌 4 小时。

[1075] LC-MS TOF :22.028 相当于脱保护的蛋白质 (-75)

[1076] 与接头偶联:

[1077]

试剂	Mw (g/ 摩尔)	比率	μ mole	mg
hGH[Q84C, L101C, Y143C]	22.028	1	6.35	140
接头 5	1.06	$\frac{5}{1}$	32	33

[1078] 向含解封闭的 hGH[Q84C, L101C, Y143C] (140mg, 13.3mL) 的 TRIS/NaCl 溶液中加入溶于 NMP (1mL)、NaCl (0.88mg) 和曲辛 /EDTA- 缓冲液 (14mL) 的混合物的接头 5 (33mg) 的溶液中。将所得混合物在环境温度下轻轻搅拌过夜 (16 小时)。

[1079] LC-MS TOF :在 Rt=6.6 分钟时实测 23.010。

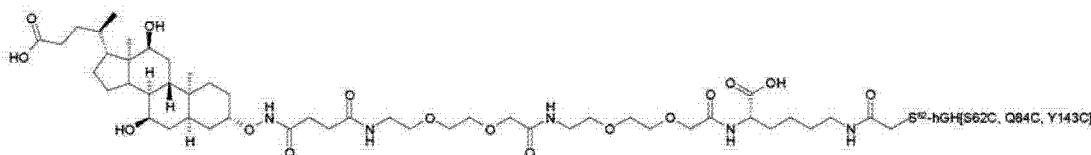
[1080] 粗产物的 HPLC 约为 92% 纯

[1081] 总量 :138mg。

[1082] 化合物 F NNC0186-0000-0087

[1083] 按有关化合物 E 所述类似方法, 使用接头 5 和 GH 化合物 hGH[S62C, Q84C, Y143C], 制备下列化合物。

[1084]



[1085] 在蛋白质和接头偶联过夜后, 使反应混合物更换缓冲液成 20mM 三乙醇胺 (triethanolamine)+10% 乙二醇 (Ethylene glycol) (pH8.50)。

[1086] 缓冲液更换:

[1087] 柱 :HiPrep26/10 脱盐

[1088] 缓冲液 A :20mM TEA, pH:8.50+10% 乙二醇

[1089] 流速 :8mL/ 分钟

[1090] 合并流分 A3 和 A5 用于纯化。

[1091] 纯化:

[1092] 柱 :HiLoad26/10Q Sepharose HP

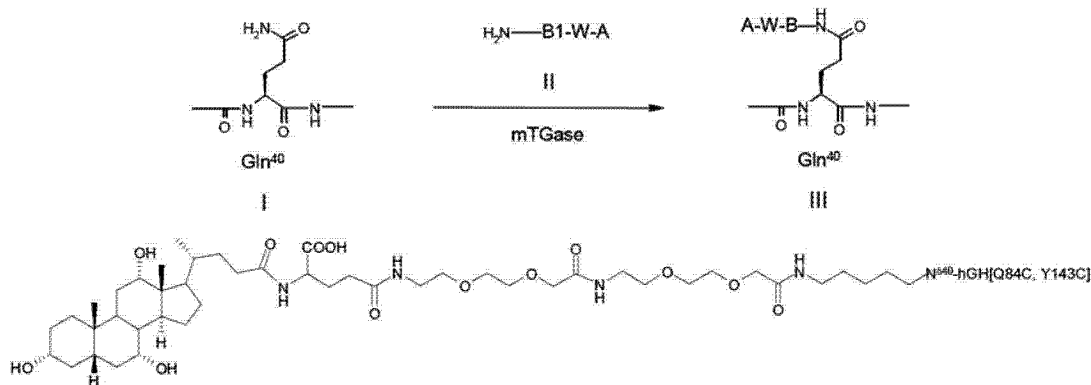
[1093] 缓冲液 A :20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇, pH8.50

[1094] 缓冲液 B :20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇, pH8.50+1M NaCl

[1095] 梯度 1 :0-10% 缓冲液 B, 在 1CV 内

[1096] 梯度 2 :10-40% 缓冲液 B, 在 12CV 内

- [1097] 梯度 3 :40-100% 缓冲液 B, 在 1CV 内
 [1098] 流速 :6mL/ 分钟
 [1099] 温度 :RT
 [1100] 流分 :7mL
 [1101] 合并流分 D11-D8, 并更换缓冲液, 且
 [1102] 合并流分 C12 和 D12, 更换缓冲液 :
 [1103] D11-D8 的缓冲液更换 :
 [1104] 柱 :HiPrep26/10 脱盐
 [1105] 缓冲液 A :10mM 碳酸氢铵缓冲液
 [1106] 流速 :8mL/ 分钟
 [1107] 收集流分 A2、A4、A6 和 B6 并合并, 得到 47.5mg (HPLC 定量测定) 100% 纯的化合物。
 [1108] C12 和 D12 的缓冲液更换 :
 [1109] 柱 :HiPrep26/10 脱盐
 [1110] 缓冲液 A :10mM 碳酸氢铵缓冲液
 [1111] 流速 :8mL/ 分钟
 [1112] 收集流分 B4, 得到 11.9mg (HPLC 定量测定) 90% 纯的化合物。
 [1113] LC-MSTOF :23.036, 62[M+1]
 [1114] 化合物 G NNC0186-0000-0088
 [1115] 按照方法 3.2, 接头 10 在 hGH[Q84C, Y143C] 的 Gln40 上连接。
 [1116] GH 化合物 (I) 用胆汁酸接头 A-W-B1-NH₂ (II) 和 mTGase 直接转氨基 (如方法 3(2) 所述)。
 [1117]



- [1118] 缓冲液 :
 [1119] 反应缓冲液 :20mM 三乙醇胺, pH8.5
 [1120] 咪唑缓冲液 :20mM 咪唑缓冲液 pH7.4、10mM CaCl₂、10% 甘油、0.02% Tween80。
 [1121] 溶液 :
 [1122] A :hGH[Q84C, Y143C] (4.4mg) 在反应缓冲液中的 227μM 溶液
 [1123] B :接头 10 在反应缓冲液中的 2.91mM 溶液
 [1124] D :Ajinomoto TGase (31mg) 在 20mM 咪唑缓冲液 (515 μL) (pH7.4)、10mM CaCl₂、10% 甘油、0.02% Tween80 中的溶液 ;C=60mg/mL=11.4 μM。
 [1125] 按照下述方案, 在 25℃ 下将溶液 A 和 B 混合, 加入 D。将所得混合物在室温下搅拌

42 小时。

[1126]

hGH[Q84C, Y143C]	接头 10	mTGase	咪唑 - 缓冲液	最终体积
A (μ L)	B (μ L)	D (μ L)	(μ L)	(μ L)
880	775	400	1945	4000

[1127] 采用下表描述的操作条件,在 Akta 100 系统上对反应混合物进行纯化:

[1128]

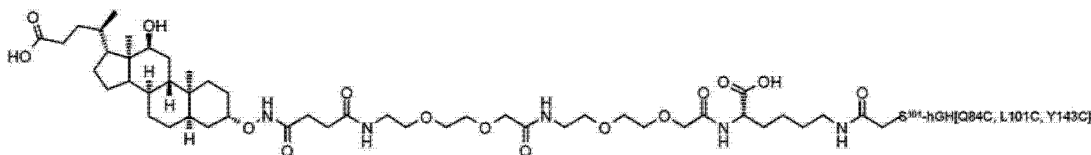
柱	HiTrapQHP, CV=5mL
缓冲液 A1	20mM HEPES, 10% 乙二醇, pH=7.5
缓冲液 B1	20mM HEPES, 10% 乙二醇, 1M NaCl, pH=7.5
流速	变量 (见下文)
波长	214/280nm
最大压力	0.7MPa (对于背压使用 FR-902)
温度	RT
流分体积	1.5mL, 对全部使用 96 孔微量测定板
注射体积	5mL
平衡	Predone, 100%A1
注射 + 洗出	2CV, 流速 = 2mL/ 分钟, 100%A1
体积	50CV
时间	约 85 分钟。
CV	梯度 ; 流速
16	0-12%B1 ; 3mL/ 分钟
10	12-25%B1 ; 3mL/ 分钟
10	25-50%B1 ; 3mL/ 分钟

[1129] 3 个峰用 40mL 的 9-18% 缓冲液 B1 洗脱。收集含有靶分子的流分 (LC-MS22.933)。

[1130] 化合物 H

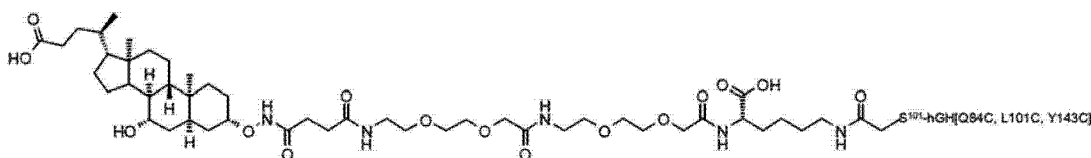
[1131] 按有关化合物 E 所述类似方法,使用接头 11 和 GH 化合物

- [1164] 流速 :8mL/ 分钟
[1165] 运行 :1.5CV
[1166] 温度 :RT
[1167] 流分 :45mL/ 流分
[1168] 使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速以 2 次运行加载样品 :
[1169] 将第一次运行的流分 A3-A5 与第二次运行的流分 A2-A4 合并在一起。
[1170] 体积 :270mL
[1171] 采用 Amicon Filter 装置以 10kDa 的截止限 (cut off) 浓缩合并物。
[1172] 以 4000rpm/6 分钟离心。
[1173] 总体积 :37.5mL
[1174] 用 HPLC 定量 :
[1175] 实测面积 :16576155, 注射 :5 μ L, ex. coef. :1000000=3.32mg/
mL $\times$ 37.5mL=124.5mg
[1176] LC-MS(电喷雾) :m/z :22.978, 4, Rt:6 分钟。
[1177] HPLC :Rt=14.23 分钟。
[1178] 化合物 I
[1179] 按有关化合物 E 所述类似方法,使用接头 12 和 GH 化合物 hGH[Q84C, L101C, Y143C], 制备下列化合物。
[1180]



- [1181] 在蛋白质和接头偶联过夜后,使反应混合物更换缓冲液成 20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 (pH8.50)。
[1182] 缓冲液更换:
[1183] 柱 :HiPrep26/10 脱盐
[1184] 缓冲液 A :20mM TEA, pH:8.50+10% 乙二醇
[1185] 流速 :8mL/ 分钟
[1186] 纯化:
[1187] 在 Äkta 中对反应混合物进行纯化。
[1188] 用 20mM TEA (pH8.50)+10% 乙二醇稀释至 0.1M NaCl 的盐浓度。
[1189] 柱 :HiLoad26/10Q Sepharose HP
[1190] CIP :1M NaOH
[1191] 缓冲液 A :20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 pH8.50
[1192] 缓冲液 B :20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 pH8.50+1M NaCl
[1193] 梯度 1 :0-15% 缓冲液 B, 在 1CV 内
[1194] 梯度 2 :15-25% 缓冲液 B, 在 10CV 内
[1195] 梯度 3 :25-100% 缓冲液 B, 在 1CV 内

- [1196] 流速 :5mL/ 分钟
[1197] 温度 :RT
[1198] 流分 :7mL/ 流分
[1199] 使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速加载样品 :
[1200] 窄峰的分离良好。
[1201] 对流分 C10、C12、D9 和 D7 进行了分析。全都是纯的,且含有产物。
[1202] 合并 C10-D7 的流分。
[1203] 体积 :63mL
[1204] 脱盐:
[1205] 在 Akta 中使产物更换缓冲液成 10mM 碳酸氢铵缓冲液。
[1206] 柱 :HiPrep G25Fine50/20 脱盐
[1207] 缓冲液 A :10mM 碳酸氢铵
[1208] 流速 :8mL/ 分钟
[1209] 运行 :1.5CV
[1210] 温度 :RT
[1211] 流分 :45mL/ 流分
[1212] 使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速在一次运行中加载样品 :
[1213] 合并流分 A3-A5。
[1214] 总体积 :135mL
[1215] 采用截止限为 10kDa 的 Amicon Filter 装置浓缩合并流分。
[1216] 以 4000rpm/6 分钟离心。
[1217] 体积 :21.3mL
[1218] 用 HPLC 定量 :
[1219] 实测面积 :16991257, 注射 :5 μ L, 2x FF, ex. coef. :1000000=6.80mg/
mLx21.3mL=144.5mg
[1220] 纯度 :100%
[1221] HPLC :Rt=13.65 分钟。
[1222] LC-MS(电喷雾) :Rt :6 分钟的 m/z :22.994, 5。
[1223] 化合物 J
[1224] 按有关化合物 E 所述类似方法,使用接头 13 和 GH 化合物 hGH[Q84C, L101C, Y143C], 制备下列化合物。
[1225]

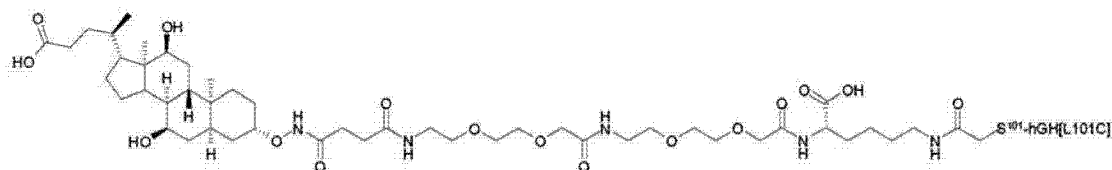


- [1226] 在蛋白质和接头偶联过夜后,使反应混合物更换缓冲液成 20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 (pH8.50)。
[1227] 缓冲液更换:

- [1228] 柱:HiPrep26/10 脱盐
- [1229] 缓冲液 A:20mM TEA, pH:8.50+10% 乙二醇
- [1230] 流速:8mL/ 分钟
- [1231] 纯化:
- [1232] 在 Äkta 中对反应混合物进行纯化。
- [1233] 用 20mM TEA (pH8.50)+10% 乙二醇稀释至 0.1M NaCl 的盐浓度。
- [1234] 柱:HiLoad26/10Q Sepharose HP
- [1235] CIP:1M NaOH
- [1236] 缓冲液 A:20mM 三乙醇胺+10% 乙二醇 pH8.50
- [1237] 缓冲液 B:20mM 三乙醇胺+10% 乙二醇 pH8.50+1M NaCl
- [1238] 梯度 1:0-14% 缓冲液 B, 在 1CV 内
- [1239] 梯度 2:14-25% 缓冲液 B, 在 10CV 内
- [1240] 梯度 3:25-100% 缓冲液 B, 在 2CV 内
- [1241] 流速:5mL/ 分钟
- [1242] 温度:RT
- [1243] 流分:7mL/ 流分
- [1244] 使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速加载样品:
- [1245] 用 TOF 检测流分 C2、C11 和 D8, 用 HPLC 检查流分 B1、C3、C6、C9、C12、D10。
- [1246] 全部合并流分 B1-D5。
- [1247] 脱盐。
- [1248] 在 Äkta 中使合并的流分更换缓冲液成 10mM 碳酸氢铵缓冲液。
- [1249] 柱:HiPrep G25Fine50/20 脱盐
- [1250] 缓冲液 A:10mM 碳酸氢铵
- [1251] 流速:8mL/ 分钟
- [1252] 运行:1.3CV
- [1253] 温度:RT
- [1254] 流分:45mL/ 流分
- [1255] 使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速以两次运行加载样品:
- [1256] 合并第一次运行的流分 A4、A5 和 A6, 合并第二次运行的流分 A3、A4 和 A5。
- [1257] 采用 Amicon Filter 装置以 10kDa 的截止限浓缩合并物。
- [1258] 以 4000rpm/6 分钟离心。
- [1259] 体积:30mL
- [1260] 用 HPLC 定量:
- [1261] 实测面积:17898813, 注射:5 μ L, 2x FF, ex. coef.:1000000=3.58mg/mL x29.5mL=105.5mg。
- [1262] Rt:13.63 分钟的纯度:96%。
- [1263] LC-MS(电喷雾):m/z:22.994。
- [1264] 化合物 K
- [1265] 按有关化合物 E 所述类似方法, 使用接头 5 和 GH 化合物 hGH[L101C], 制备下列化

合物。

[1266]



[1267] 在蛋白质和接头偶联过夜后,使反应混合物更换缓冲液成 20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 (pH8.50)。

[1268] 缓冲液更换:

[1269] 柱:HiPrep26/10 脱盐

[1270] 缓冲液 A:20mM TEA, pH:8.50+10% 乙二醇

[1271] 流速:8mL/ 分钟

[1272] 第 1 次纯化:

[1273] 在 Äkta 中对反应混合物进行纯化。

[1274] 用 20mM TEA (pH8.50)+10% 乙二醇稀释至 0.1M NaCl 的盐浓度

[1275] 柱:HiLoad26/10Q Sepharose HP

[1276] CIP:1M NaOH

[1277] 缓冲液 A:20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 pH8.50

[1278] 缓冲液 B:20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 pH8.50+1M NaCl

[1279] 梯度 1:0-15% 缓冲液 B, 在 1CV 内

[1280] 梯度 2:15-30% 缓冲液 B, 在 10CV 内

[1281] 梯度 3:30-100% 缓冲液 B, 在 2CV 内

[1282] 流速:5mL/ 分钟

[1283] 温度:RT

[1284] 流分:7mL/ 流分

[1285] 使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速加载样品:

[1286] 用 HPLC 分析流分 D5、D4、D1、E3 和 E4

[1287] 在所有流分中检测恰在所需产物前的峰。

[1288] 使用不同梯度合并全部流分用于第二次纯化。

[1289] 第 2 次纯化:

[1290] 在 Äkta 中对合并的流分进行纯化。

[1291] 用 20mM TEA (pH8.50)+10% 乙二醇稀释至 0.1M NaCl 的盐浓度

[1292] 柱:HiLoad26/10Q Sepharose HP

[1293] 缓冲液 A:20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 pH8.50

[1294] 缓冲液 B:20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 pH8.50+1M NaCl

[1295] 梯度 1:0-xx% 缓冲液 B, 在 1CV 内

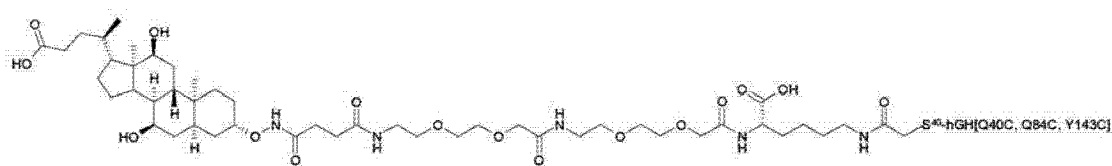
[1296] 梯度 2:xx% 缓冲液 B, 在 10CV 内

[1297] 梯度 3:xx-100% 缓冲液 B, 在 2CV 内

[1298] 流速:5mL/ 分钟

- [1299] 温度 :RT
- [1300] 流分 :7mL/ 流分
- [1301] 使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速加载样品 :
- [1302] 脱盐。
- [1303] 在 Äkta 中使产物更换缓冲液成 10mM 碳酸氢铵缓冲液。
- [1304] 柱 :HiPrep G25Fine50/20 脱盐
- [1305] 缓冲液 A :10mM 碳酸氢铵
- [1306] 流速 :8mL/ 分钟
- [1307] 运行 :1.3CV
- [1308] 温度 :RT
- [1309] 流分 :45mL/ 流分
- [1310] 使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速加载样品 :
- [1311] 合并流分 A3、A4 和 A5。
- [1312] 采用截止限为 10kDa 的 Amicon Filter 装置浓缩合并流分。
- [1313] 以 4000rpm/6 分钟离心。
- [1314] 体积 :18mL
- [1315] 用 HPLC 定量 :
- [1316] 实测面积 :11570188, 注射 :5 μ L, 2x FF, ex. coef. :1000000=2.31mg/mL
x2=4.62mg/mL x17.7mL=82mg
- [1317] Rt :13.70 分钟。
- [1318] LC-MS TOF :Rt :6 分钟的实测质量 :23.097。
- [1319] 化合物 L
- [1320] 按有关化合物 E 所述类似方法,使用接头 5 和 GH 化合物 hGH[Q40C, Q84C, Y143C], 制备下列化合物。

[1321]



- [1322] 在蛋白质和接头偶联过夜后,使反应混合物更换缓冲液成 20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 (pH8.50)。
- [1323] 缓冲液更换:
- [1324] 柱 :HiPrep26/10 脱盐
- [1325] 缓冲液 A :20mM TEA, pH:8.50+10% 乙二醇
- [1326] 流速 :8mL/ 分钟
- [1327] 纯化:
- [1328] 在 Äkta 中对反应混合物进行纯化。
- [1329] 用 20mM TEA (pH8.50)+10% 乙二醇稀释至 0.1M NaCl 的盐浓度。
- [1330] 柱 :HiLoad26/10Q Sepharose HP

- [1331] CIP :1M NaOH
- [1332] 缓冲液 A :20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 pH8.50
- [1333] 缓冲液 B :20mM 三乙醇胺 +10% 乙二醇 pH8.50+1M NaCl
- [1334] 梯度 1 :0-15% 缓冲液 B, 在 1CV 内
- [1335] 梯度 2 :15-25% 缓冲液 B, 在 11CV 内
- [1336] 梯度 3 :25-100% 缓冲液 B, 在 2CV 内
- [1337] 流速 :5mL/ 分钟
- [1338] 温度 :RT
- [1339] 流分 :7mL/ 流分
- [1340] 使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速加载样品 :
- [1341] 对流分 C2、C3、C5、C7、C9、C11、D12、D10、D8 和 D6 进行分析 (HPLC)。全部为纯的, 但做成两个合并物, 并分别脱盐。
- [1342] 合并物 I :C2-C10
- [1343] 合并物 II :C11-D8
- [1344] 脱盐。
- [1345] 在 Äkta 中使两份合并物更换缓冲液成 10mM 碳酸氢铵缓冲液。
- [1346] 合并物 I。
- [1347] 柱 :HiPrep G25Fine50/20 脱盐
- [1348] 缓冲液 A :10mM 碳酸氢铵
- [1349] 流速 :8mL/ 分钟
- [1350] 运行 :1.3CV
- [1351] 温度 :RT
- [1352] 流分 :45mL/ 流分
- [1353] 使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速加载样品 :
- [1354] 合并物 II。
- [1355] 柱 :HiPrep G25Fine50/20 脱盐
- [1356] 缓冲液 A :10mM 碳酸氢铵
- [1357] 流速 :8ml/ 分钟
- [1358] 运行 :1.3CV
- [1359] 温度 :RT
- [1360] 流分 :45mL/ 流分
- [1361] 使用样品泵以 5mL/ 分钟的流速加载样品 :
- [1362] 对两次运行, 均合并流分 A3、A4 和 A5。
- [1363] 采用 Amicon Filter 装置以 10kDa 的截止限浓缩合并物。
- [1364] 以 4000rpm/6 分钟离心。
- [1365] 体积 :31mL
- [1366] 用 HPLC 定量 :
- [1367] 合并物 1, 实测面积 :8819533, 注射 :5 μ L, ex. coeff. :1000000=1.76mg/mL
- [1368] 合并物 2, 实测面积 :8974748, 注射 :5 μ L, ex. coeff. :1000000=1.79mg/mL

[1369] 将两种合并物混合,得到 31mL 总体积。总共:55mg

[1370] LC-MS(电喷雾):Rt:7 分钟的 m/z:22.995,6。

[1371] HPLC:Rt=13.72 分钟。实施例 1

[1372] 如上所述通过 BAF 测定法和蛋白水解消化分析选定的化合物(方法 5 和 8)。

[1373] 制备包含额外二硫键的生长激素化合物,测定体外活性和蛋白酶稳定性。4 小时后获得以下给出的结果(T=4)。

[1374]

化合物	EC50 BAF 比率 (hGH 化合物 /hGH)	胰凝乳蛋白酶 稳定性 完整化合物(%)	弹性蛋白酶 稳定性 完整化合物(%)	通过额外二硫键 连接的结构域
GH	1.0	42	25	
hGH (A17C, E174C)	0.6	45	10	H1-H4
hGH (H21C, M170C)	0.5	72	10	H1-H4
hGH (D26C, V102C)	0.5	55	65	H1-L2
hGH (D26C, Y103C)	0.5	55	45	H1-L2
hGH (F54C, Y143C)	0.6	55	20	L1-L3
hGH (F54C, S144C)	0.5	60	20	L1-L3
hGH (F54C, F146C)	0.6	40	25	L1-L3
hGH (S55C, Y143C)	0.5	90	25	L1-L3
hGH (S57C, Y143C)	0.3	75	50	L1-L3
hGH (I58C, Q141C)	0.7	70	25	L1-L3
hGH (I58C, Y143C)	0.6	55	20	L1-L3
hGH (I58C, S144C)	1.2	65	30	L1-L3
hGH (P59C, Q137C)	0.7	72	35	L1-L3
hGH (S71C, S132C)	0.2	90	45	L1-L3
hGH (L81C, Y143C)	0.7	85	15	H2-L3
hGH (Q84C, Y143C)	0.5	100	80	H2-L3
hGH (S85C, Y143C)	0.5	80	70	H2-L3
hGH (S85C, S144C)	0.7	81	60	H2-L3
hGH (F92C, T148C)	0.6	40	55	H2-L3
hGH (R94C, D107C)	0.8	38	70	H2-H3

[1375] 表 1. GH 化合物的蛋白水解稳定性。

[1376] 实施例 2

[1377] 按方法 5 和 8 中所述通过 BAF 测定法和蛋白水解消化分析选定的化合物。

[1378] 按照方法 5 和 8 对生长激素化合物进行测试

[1379]

化合物	EC ₅₀ BAF 比率 (hGH 化合物)	胰凝乳蛋白酶 稳定性	弹性蛋白酶 稳定性
	/hGH)	完整化合物 (%)	完整化合物 (%)
hGH	1.00	42	25
hGH (Q84C, Y143C)	0.66	90	80
hGH (S62N)	1.83	50	70
hGH (S62Q)	1.02	50	70
hGH (Q84C, Y143C, S62T)	0.29	80	50
hGH (Q84C, Y143C, S62N)	0.80	90	90
hGH (Q84C, Y143C, S62C)	ND	90	70
hGH (Q84C, Y143C, S62q)	0.85	90	90
hGH (Q84C, Y143C, S62h)	ND	80	75
hGH (Q84C, Y143C, S62E)	ND	85	80
hGH (Q84C, Y143C, L101C)	0.99	100	75
hGH (Q84C, Y143C, r134v)	2.19	90	50
hGH (Q84C, Y143C, g136v))	0.94	80	50
hGH (Q84C, Y143C, t142n)	0.55	80	65
hGH (Q84C, Y143C, s144n)	0.60	85	80
hGH (Q84C, Y143C, s144n)	0.44	100	75

[1380]

[1381] 表 2. GH 变体化合物的蛋白水解稳定性。

[1382] 实施例 3

[1383] 采用 BAF-3hGH 受体测定法 (方法 5) 对胆汁酸缀合物的体外效价进行了分析。

[1384] 按通用方法中所述,通过使化合物与胰凝乳蛋白酶或弹性蛋白酶温育 4 小时,来测定本发明化合物的蛋白酶稳定性。测量了完整 GH 化合物的百分比 (%),结果见下表。

[1385]

化合物	EC ₅₀ (nM)	比率 (EC ₅₀ cmp/EC ₅₀ hGH)	胰凝乳蛋白酶 (%完整 GH 化合 物)	弹性蛋白酶 (%完整 GH 化合 物)
hGH	0.026	1.00	40	25
化合物 A	0.035	1.94	90	90
化合物 B	0.017	0.81	95	90
化合物 C	0.024	0.61	80	30
化合物 D	0.028	0.62	95	65
化合物 E	0.034	1.09	90	90

[1386]

化合物 F	0.054	2, . 3	85	80
化合物 H	0.016	1.34	80	65
化合物 I	0.020	1.18	80	65
化合物 J	0.009	1.17	70	ND
化合物 K	0.011	1.03	ND	ND
化合物 L	0.008	0.75	80	70

[1387] 表 3. GH 化合物的蛋白水解稳定性。ND(未测定)。

[1388] 实施例 4. CaCo2 测定中 GH 化合物的透性

[1389] 按上述方法 11 中所述,对 GH 化合物跨肠 Caco-2 细胞单层转运的能力进行了测定。在吸收方向上测量了表观透性 (P_{app}),系列 GH 化合物的 P_{app} 计算值见下表。

[1390]

化合物	$P_{app} (x10^{-8} \text{ cm/s})$
hGH(Q84C, Y143C)	0.24 ± 0.07
E	1.2 ± 0.87
F	9.0 ± 8.40
H	0.8 ± 1.10
I	0.4 ± 0.22
J	0.34 ± 0.06
K	0.3 ± 0.03
L	1.0 ± 0.11

[1391] 所有值为平均值 $\pm$ SD, n=4。

[1392] P_{app} 计算值表明,蛋白酶稳定的 GH 化合物和 / 或胆酸缀合的 GH 化合物跨 Caco-2 细胞单层转运。对于一些化合物获得高的 P_{app} ,而其它化合物显示低的转运,其 P_{app} 值低于 $0.5 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$ 。

[1393] 实施例 5. GH 化合物的药代动力学性质

[1394] 在迷你猪中,在内窥镜和 i. v. 给药后,对 hGH、hGH(Q84C, Y143C) 和具有胆酸衍生物的 hGH(Q84C, Y143C, L101C) 的药代动力学性质进行了研究。按照上述方法(本文的方法 9)对 hGH、hGH(Q84C, Y143C) 和具有胆酸衍生物的 hGH(Q84C, Y143C, L101C) (化合物 E) 进行了分析。计算的药代动力学参数见下表。

[1395]	化合物	给药途径	剂量 (nmol/kg)	t _{1/2} (小时)	AUC (0-8 小时) (hr*nmol/L/nmol)
	hGH	i.v.	20	0.6	
	hGH (Q84C, Y143C)	i.v.	20	1.2	
[1396]	具有胆酸缀合的 hGH (Q84C, Y143C, L101C) (化合物 E)	i.v.	20	1.7	
	hGH	肠内	800		0.072
	hGH (Q84C, Y143C)	肠内	800		0.433
[1397]	具有胆酸缀合的 hGH (Q84C, Y143C, L101C) (化合物 E)	肠内	800		2.675

[1397] 表 54A. 生长激素化合物和缀合物的药代动力学性质。

[1398] 在另一项研究中, 在 Sprague Dawley 大鼠中, 如上所述, 在肠内注射后, 对 hGH、hGH(Q84C, Y143C) 和具有胆酸衍生物的 hGH(Q84C, Y143C, L101C) 的药代动力学性质进行了研究。按照上述方法 (本文的方法 10), 对 hGH(Q84C, Y143C) 和具有胆酸衍生物的 hGH(Q84C, Y143C, L101C) (化合物 E) 进行了分析。计算的药代动力学参数见下表。

[1399]	化合物	给药途径	剂量 (nmol)	t _{1/2} (小时)	AUC (0-4 小时) (hr*nmol/L/nmol)
	hGH	肠内	300	1.1	0.372
	hGH (Q84C, Y143C)	肠内	300	1.1	15.4
[1400]	具有胆酸缀合的 hGH (Q84C, Y143C, L101C) (化合物 E)	肠内	300	1.4	33.1

[1400] 表 5B. 生长激素化合物和缀合物的药代动力学性质。

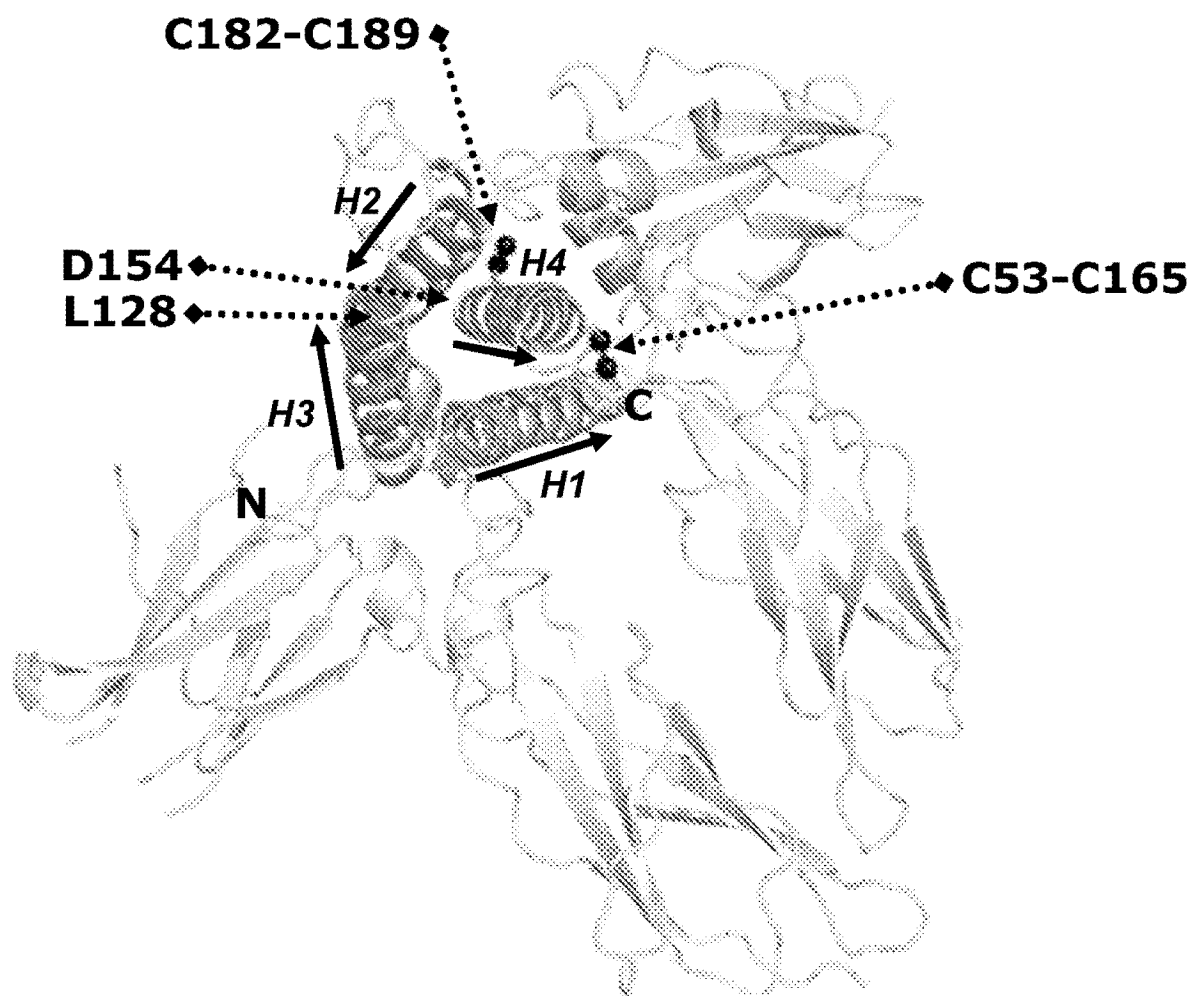


图 1

1	FPTIPLSR	LF	DNAMLR	AHRL	HQLAFD	TYQE	FEEAYIPKEQ	
	H1							
41	KYSFLQNPQT	SLCFSE	SIPT	PSNREET	QOK	SNLELLRISL		
	L1							
81	LLIQSWLEPV	QFLRSVFANS	LVGASD	SNV	YDLLKDLEEG			
	H2			L2		H3		
121	IQTLMGRL	ED	GSPRTG	QIFK	QTYSKF	DTNS	HNDDALLKNY	
	L3							
161	GLLYCFRKDM	DKVETFLRIV	QCRSVEGSCG	F				
	H4							

图 2