(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118767116 A
(43)申请公布日 2024.10.15

(21)申请号 202410764788.7

(22)申请日 2011.01.24

(30)优先权数据
10151405.7 2010.01.22 EP
61/297305 2010.01.22 US

(62)分案原申请数据
201180015252.6 2011.01.24

(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 C·贝伦斯 N·L·约翰森
H·S·安德森
L·诺斯科夫-劳里森 J·布哈特

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 黄登高 彭昶

(51)Int.Cl.
A61K 38/27(2006.01)
C07K 14/61(2006.01)
A61K 47/54(2017.01)
A61P 3/00(2006.01)

权利要求书11页 说明书126页
序列表（电子公布） 附图1页

(54)发明名称

体内功效延长的生长激素

(57)摘要

本发明涉及具有功效延长特征的生长激素化合物。通过使白蛋白结合残基通过亲水间隔基与生长激素变体连接来获得这种效果。还描述了制备这类化合物和使用这类化合物的方法。这些生长激素化合物基于其改变的特征,认为所述特征特别可用于治疗。

CN 118767116 A

1.一种包含生长激素化合物(GH)的生长激素缀合物或其药学上接受的盐,所述生长激素化合物(GH)具有

a)单个Cys突变,

b)额外的二硫键,或

c)单个Cys突变和额外的二硫键,

其中白蛋白结合残基通过亲水间隔基与所述GH连接,

其中所述生长激素缀合物具有下式(I):

A-W-B-GH (I)

其中

GH表示生长激素化合物

B表示亲水间隔基

W是连接A和B的化学基团,和

A表示白蛋白结合残基。

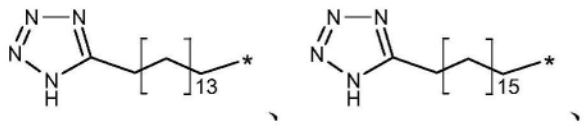
2.权利要求1的缀合物,其中所述亲水间隔基连接至

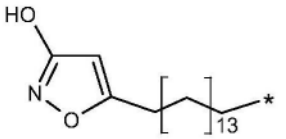
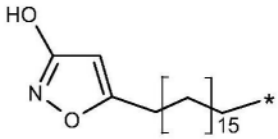
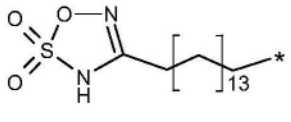
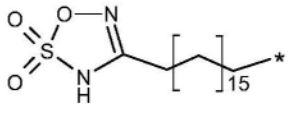
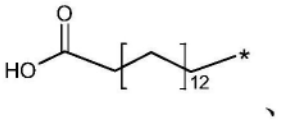
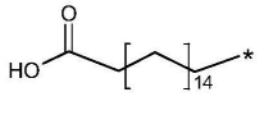
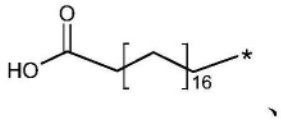
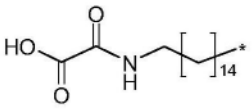
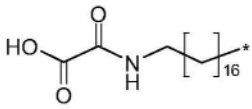
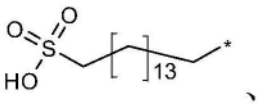
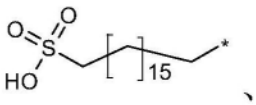
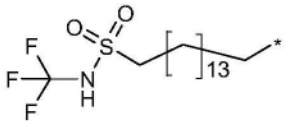
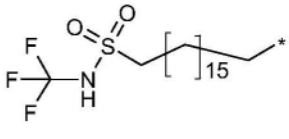
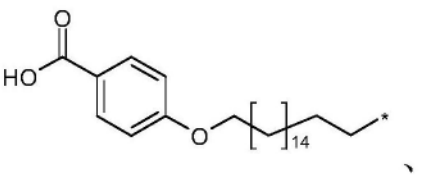
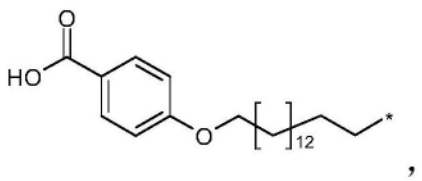
a)生长激素化合物的N端或Gln40或Gln141,或者

b)存在于生长激素化合物中的单个Cys突变的硫残基,所述Cys突变选自hGH(SEQ ID NO:1)的以下任一个:T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C和G190C,例如以下的任一个:T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C。

3.权利要求1或2的缀合物,其中所述GH具有额外二硫键,其介于相当于hGH(SEQ ID NO:1)的以下位置中的至少一个氨基酸对之间:R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、I73C/S132C、I73C/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。

4.权利要求1-3中任一项的缀合物,其中A选自


、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

，

其中*表示通过W与B连接。

5.权利要求1-4中任一项的缀合物,其中W具有下式

$-W_7-Y-$,

其中

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

I7为0-6,

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

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

6.权利要求1-5中任一项的缀合物,其中B具有下式

$-X_1-X_2-X_3-X_4-$

其中

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

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

X_3为$-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$,

X_4为$F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$,

I1、I2、I3、I4、I5和I6独立选自0-16,例如选自0-6

m1、m3、m4、m6和m7独立选自0-10,例如选自0-6

m2和m5独立选自0-25,例如选自0-10

n1、n2、n3和n4独立选自0-16,例如选自0-10

F为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键,其中芳基和杂芳基任选被卤素、-CN、-OH、-C(O)OH、$-C(O)NH_2$、$-S(O)_2OH$或C_{1-6}-烷基取代,

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

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

W_1-W_5独立选自$-C(O)NH-$、$-NHC(O)-$、$-C(O)NHCH_2-$、$-CH_2NHC(O)-$、$-C(O)NHS(O)_2-$、$-S(O)_2NHC(O)-$、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、$-C(O)CH_2-$、$-CH_2C(O)-$、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、$-(CH_2)_{s2}-$、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或价键;其中s2为0或1,

W_6选自$-C(O)NH-$、$-NHC(O)-$、$-C(O)NHCH_2-$、$-CH_2NHC(O)-$、$-C(O)NHS(O)_2-$、$-S(O)_2NHC(O)-$、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、$-C(O)CH_2-$、$-CH_2C(O)-$、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、$-(CH_2)_{s1}-$、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、$-NHC(O)C_{1-6}$-烷基、$-C(O)NHC_{1-6}$-烷基或价键;其中s1为0或1,C_{1-6}-烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、$-NHC(O)CH*CH_2COOH$或$-NHC(O)CH_2CH*COOH$取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

7.权利要求6的缀合物,其中D1和D2独立选自-O-或$-N(R^6)-$或价键。

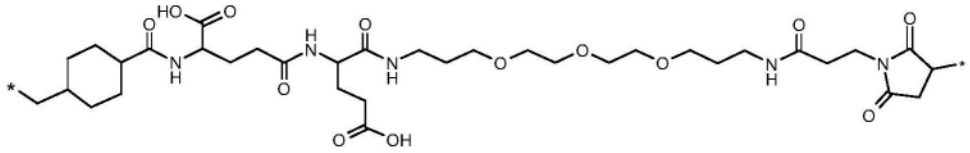
8.权利要求6或7的缀合物,其中E1和E2独立选自-O-或$-N(R^6)-$或价键。

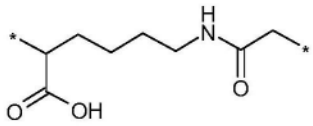
9.权利要求1-8中任一项的缀合物,其中W_1-W_8独立选自$-C(O)NH-$、$-NHC(O)-$、$-CH_2NHC(O)-$、$-C(O)NHS(O)_2-$、$-S(O)_2NHC(O)-$、$-NHC(O)C_{1-6}$-烷基或$-C(O)NHC_{1-6}$-烷基或价键;其中烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、$-NHC(O)CH*CH_2COOH$或$-NHC(O)CH_2CH*COOH$取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

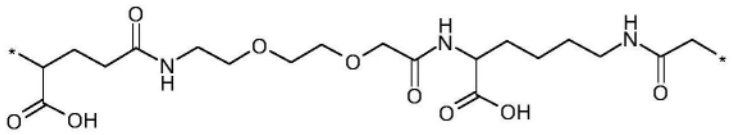
10.权利要求6-9中任一项的缀合物,其中R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、$-C(O)OH$、$-C(O)NH_2$、$-S(O)_2OH$或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被$-C(O)OH$、$-C(O)NH_2$或$-S(O)_2OH$取代。

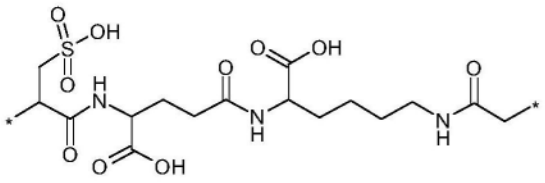
11.权利要求6-10中任一项的缀合物,其中X_4为价键,W_6选自吡咯烷-2,5-二酮、$-NHC(O)CH*CH_2COOH$或$-NHC(O)CH_2CH*COOH$,其中(*)表示CH的碳原子与GH的连接点。

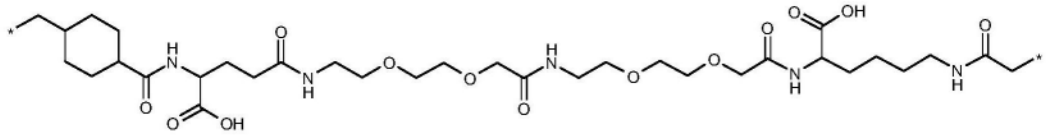
12.权利要求6-11中任一项的缀合物,其中B选自

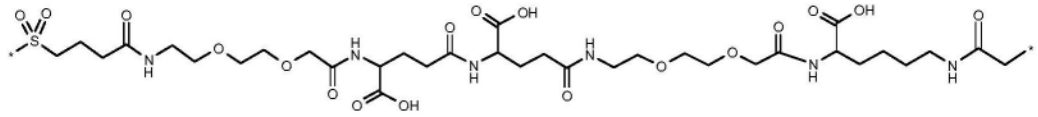


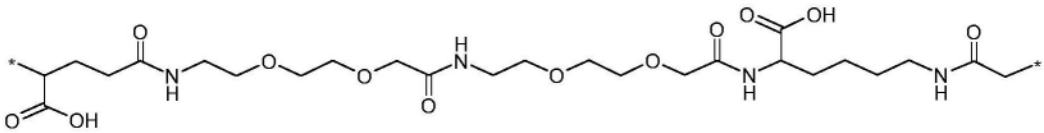


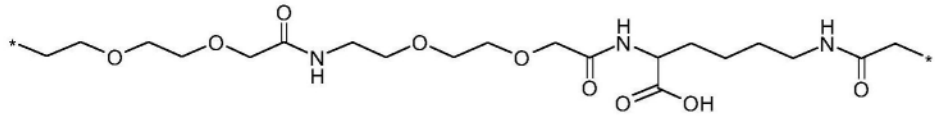


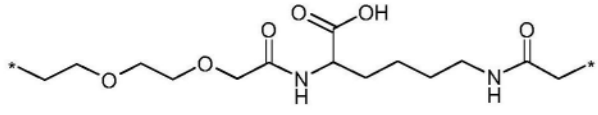


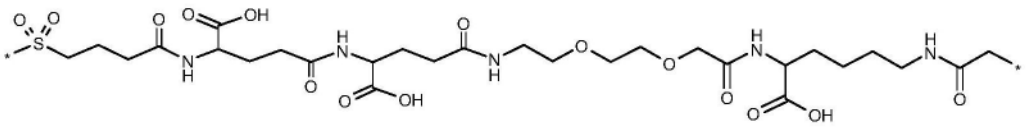


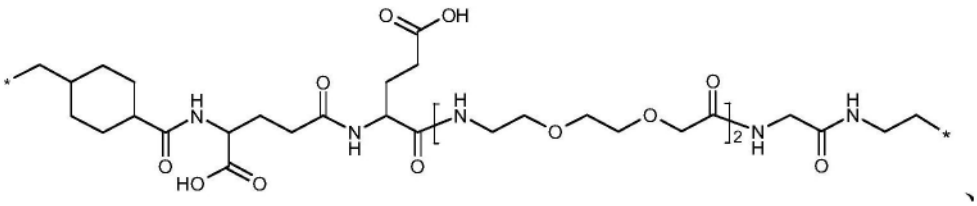


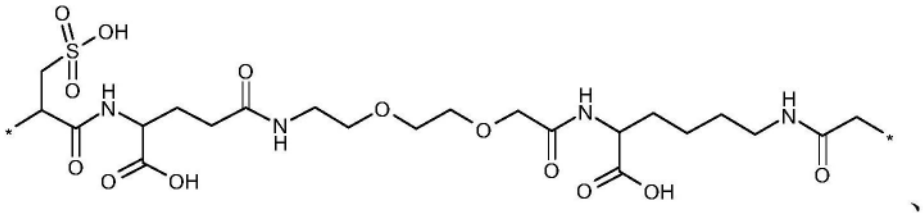


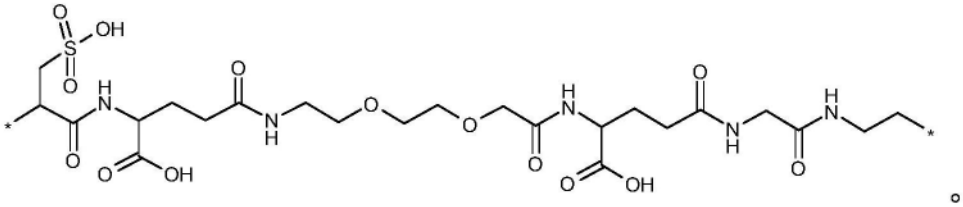




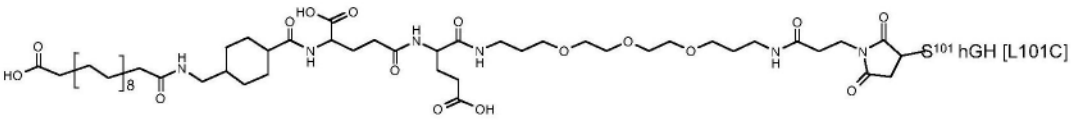


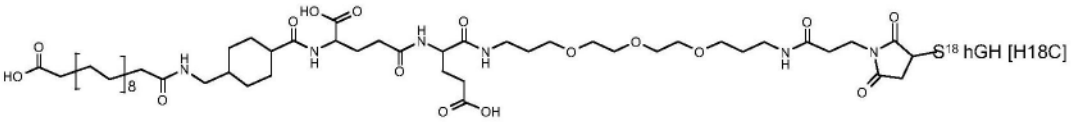


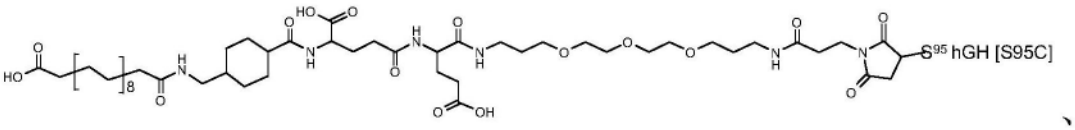


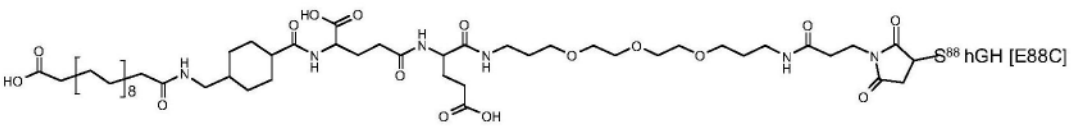


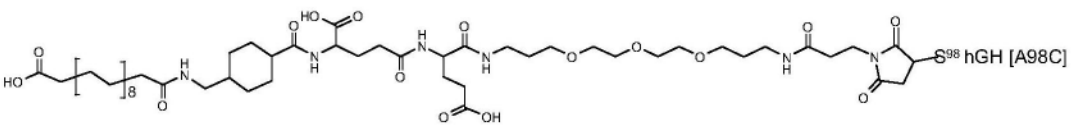
13.权利要求1的缀合物,其中所述化合物选自

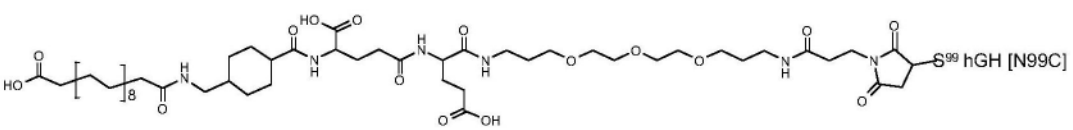


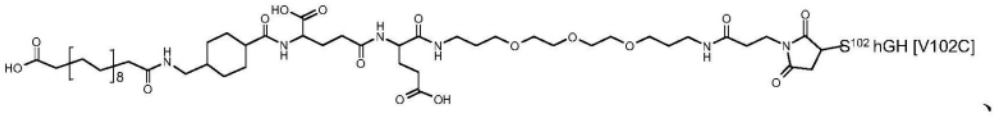


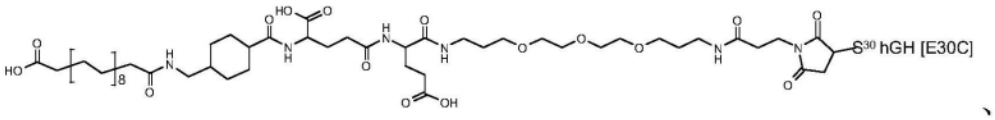


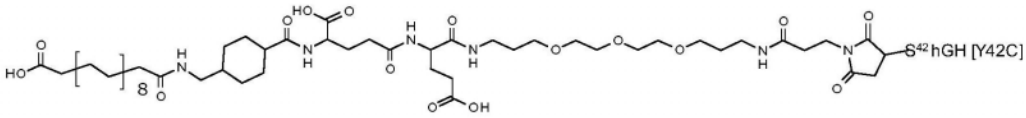


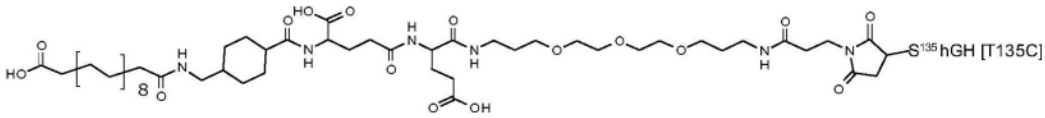


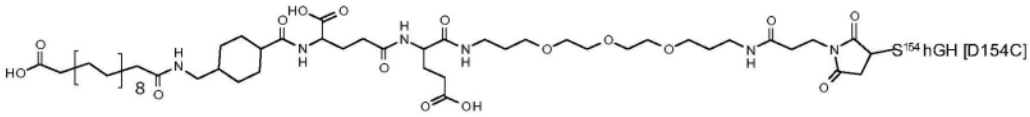


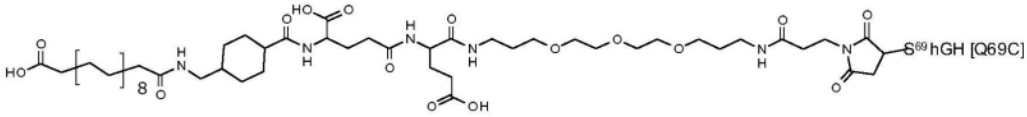

S102 hGH [V102C]

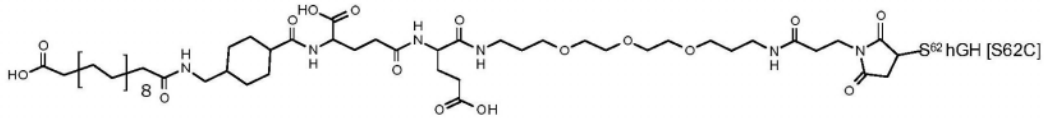

S30 hGH [E30C]

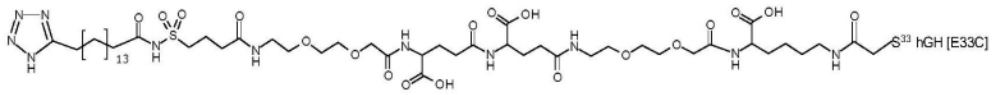

S42 hGH [Y42C]

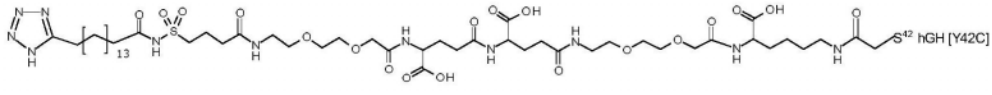

S135 hGH [T135C]

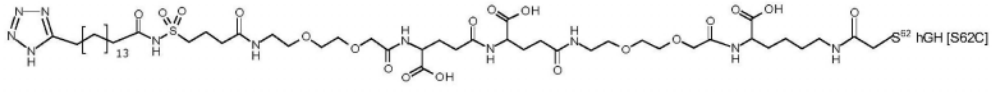

S154 hGH [D154C]

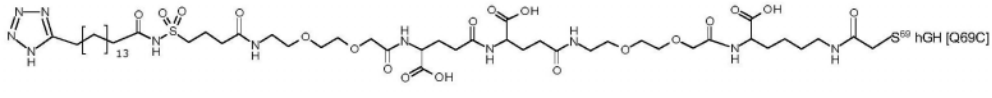

S69 hGH [Q69C]

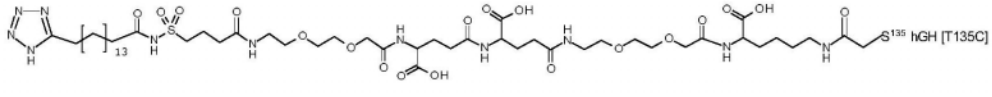

S62 hGH [S62C]

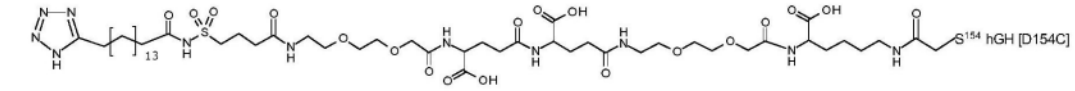

S33 hGH [E33C]

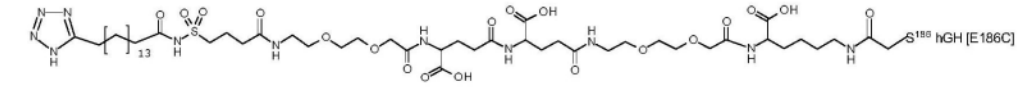

S42 hGH [Y42C]

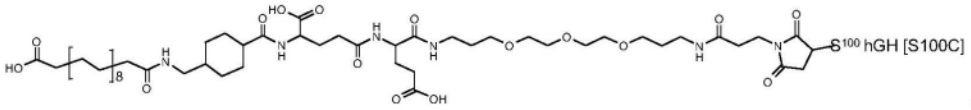

S62 hGH [S62C]

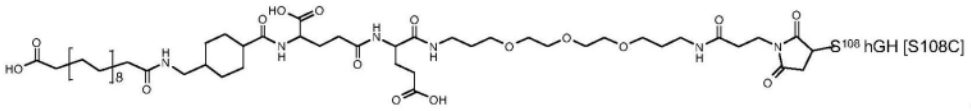

S69 hGH [Q69C]

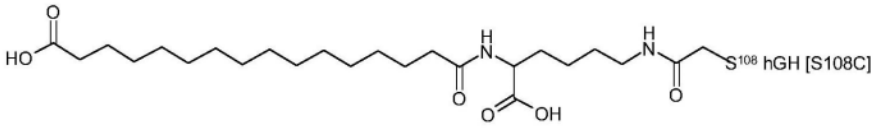

S135 hGH [T135C]

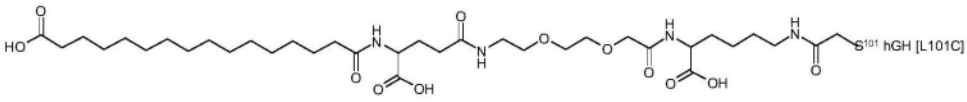

S154 hGH [D154C]

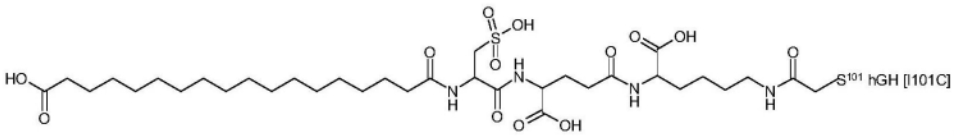

S186 hGH [E186C]

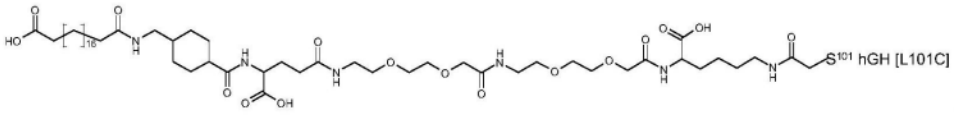

S100 hGH [S100C]

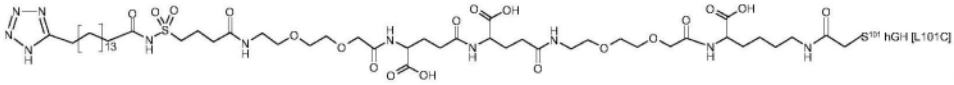

S108 hGH [S108C]

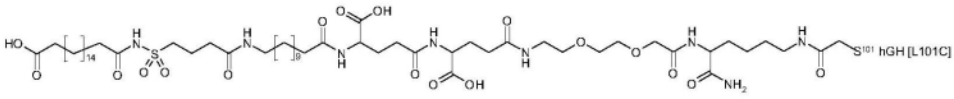

S108 hGH [S108C]

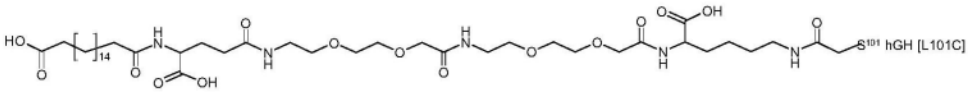

S101 hGH [L101C]

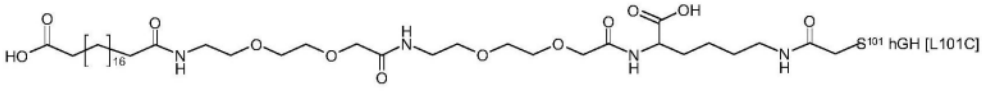

S101 hGH [I101C]

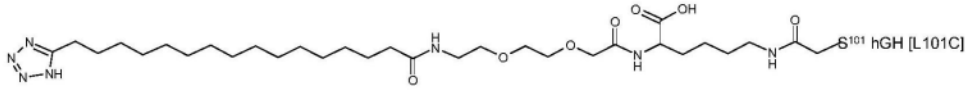

S101 hGH [L101C]

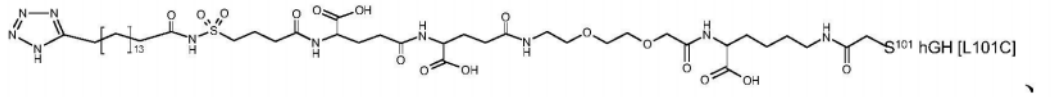

S101 hGH [L101C]

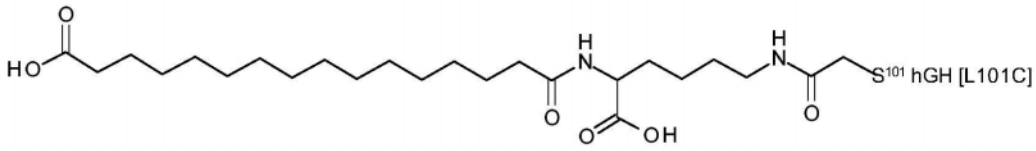

S101 hGH [L101C]

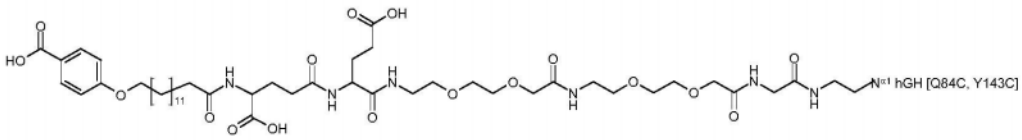

S101 hGH [L101C]

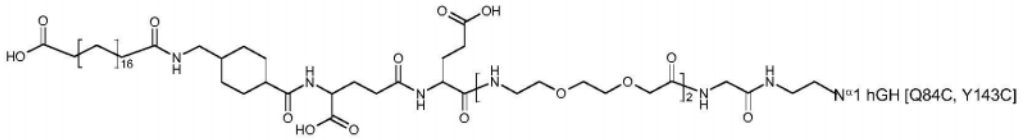

S101 hGH [L101C]

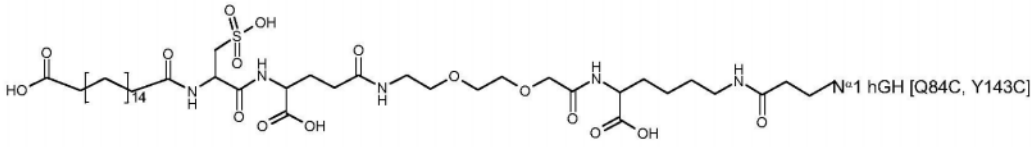

S101 hGH [L101C]

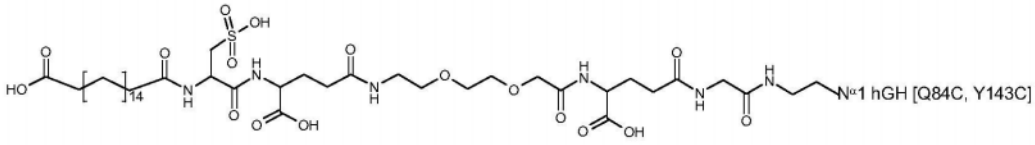

S101 hGH [L101C]

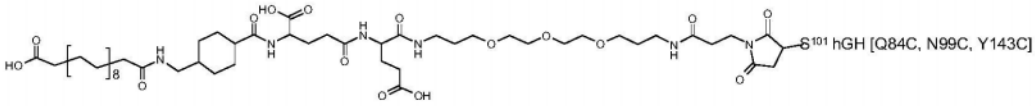

S101 hGH [L101C]

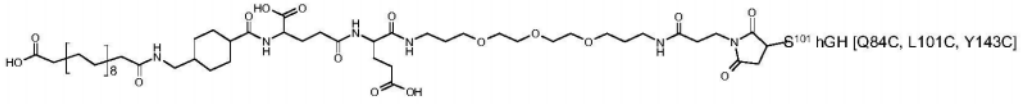

Nα1 hGH [Q84C, Y143C]

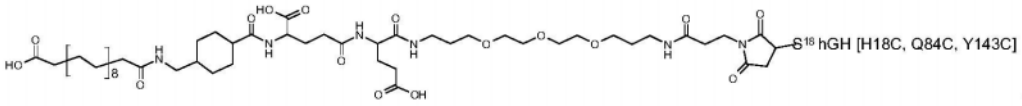

Nα1 hGH [Q84C, Y143C]

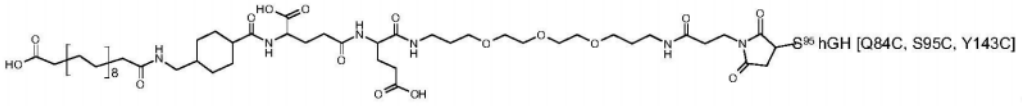

Nα1 hGH [Q84C, Y143C]

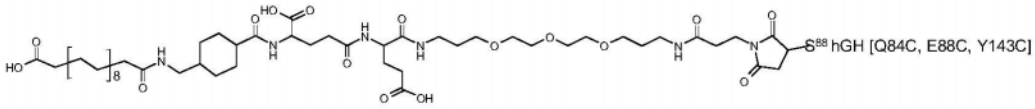

Nα1 hGH [Q84C, Y143C]

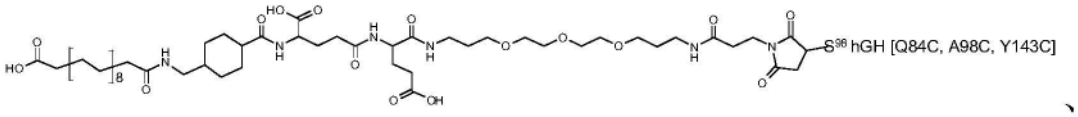

S101 hGH [Q84C, N99C, Y143C]

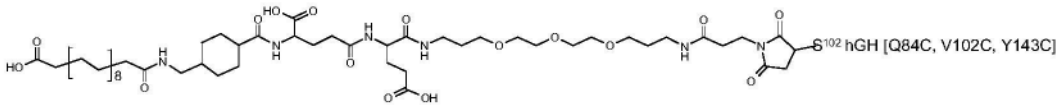

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]

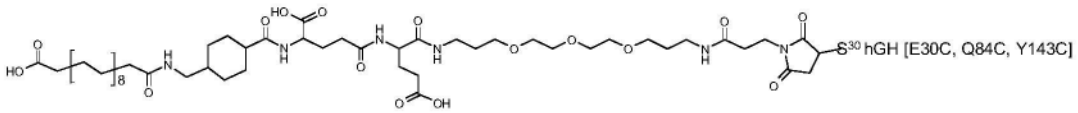

S18 hGH [H18C, Q84C, Y143C]

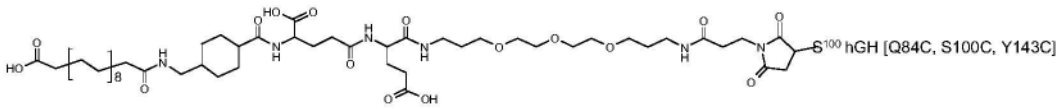

S95 hGH [Q84C, S95C, Y143C]

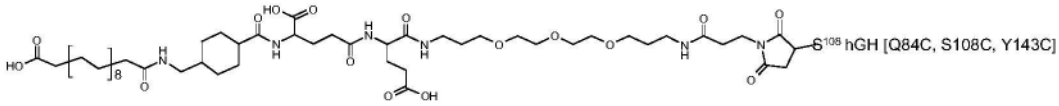

S88 hGH [Q84C, E88C, Y143C]

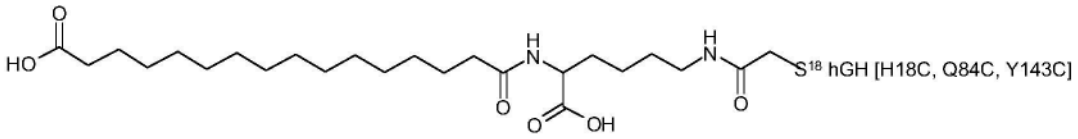

S96 hGH [Q84C, A98C, Y143C]

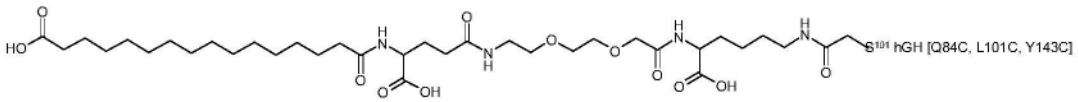

S102 hGH [Q84C, V102C, Y143C]

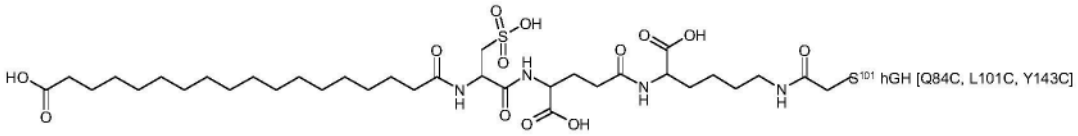

S30 hGH [E30C, Q84C, Y143C]

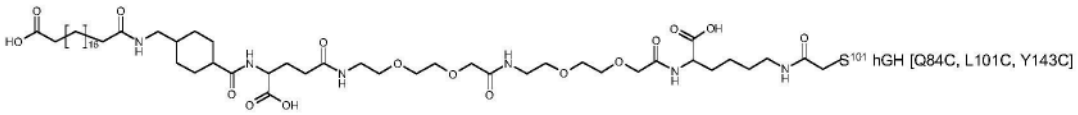

S100 hGH [Q84C, S100C, Y143C]

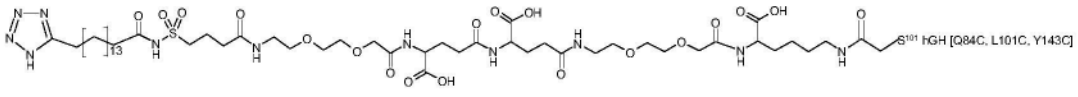

S108 hGH [Q84C, S108C, Y143C]

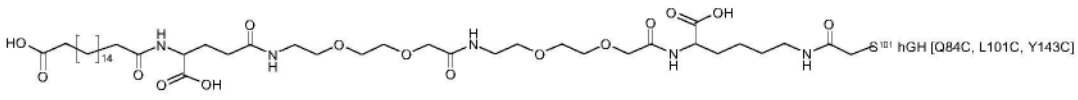

S18 hGH [H18C, Q84C, Y143C]

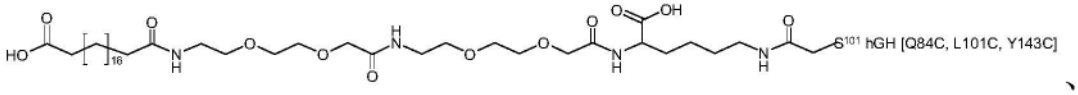

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]

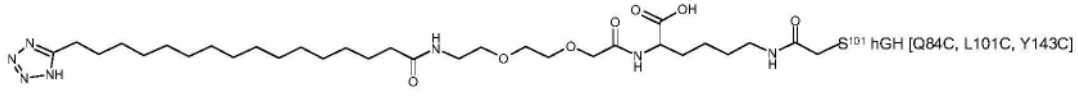

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]

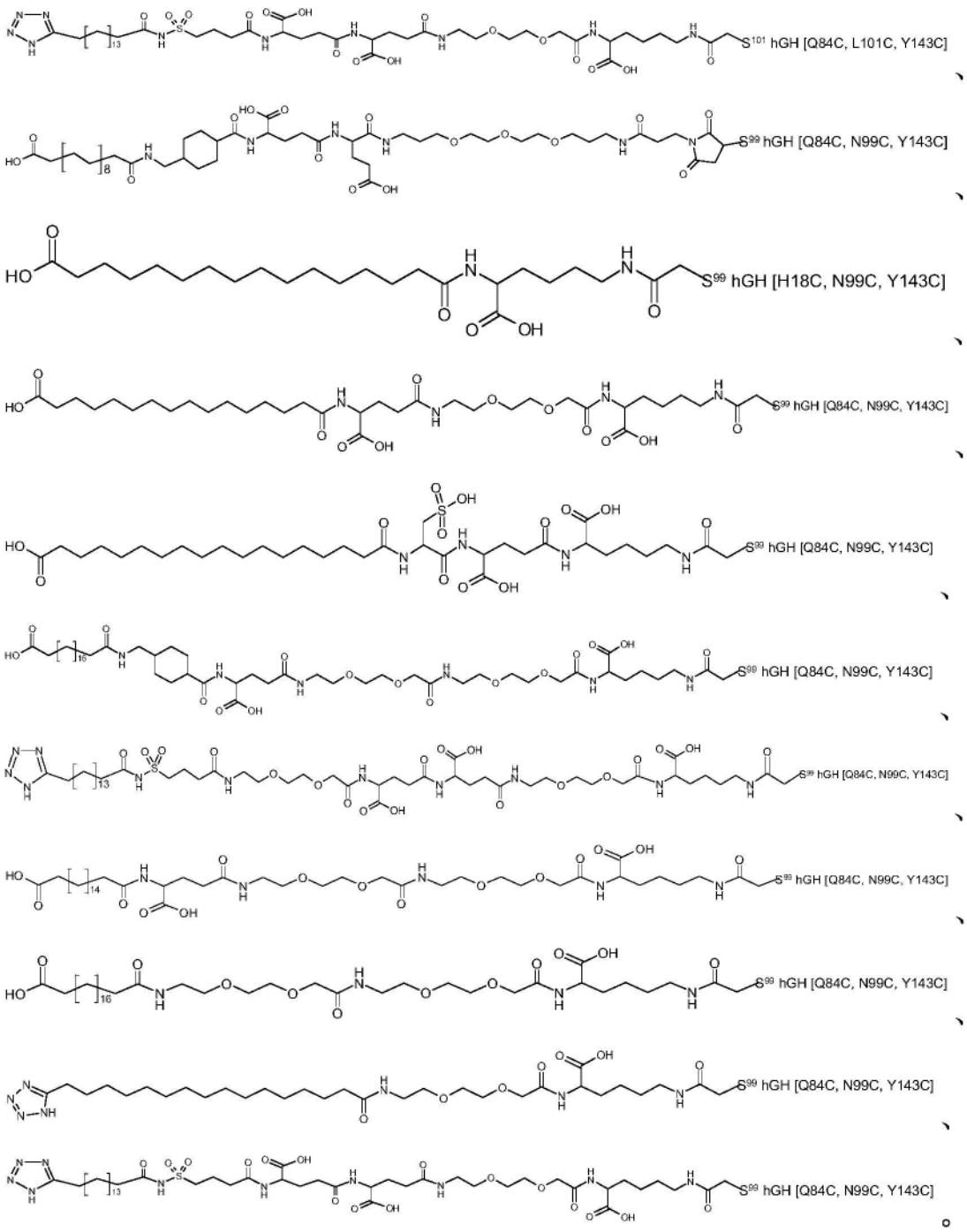

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]



14.一种下式(III)的化合物

A-W-B1-U (III)

其中A表示白蛋白结合残基,

B1表示亲水间隔基,

W是连接A和B1的化学基团,U表示缀合部分

其中缀合部分U,

a)包含芳基、杂芳基、取代的马来酰亚胺或吡咯烷-2,5-二酮例如-NHC(O)CH_2CH_2-吡咯烷-2,5-二酮或由芳基、杂芳基、取代的马来酰亚胺或吡咯烷-2,5-二酮例如-NHC(O)CH_2CH_2-吡咯烷-2,5-二酮组成,

b)包含D1-$(CH_2)_{I6}$-D2,其中D1和D2独立选自-O-、-N(R6)-、-NC(O)R7-或价键;其中R6和R7独立表示氢或C_{1-6}-烷基,

c)包含离去基团或由离去基团组成,所述离去基团例如Cl、Br、I、-OH、-OS(O)$_2$Me、-OS(O)$_2$$CF_3$、-OTs,

d)包含烯丙基胺(H_2C=CH-CH2-NH_2)例如-C(O)NHCH_2-CH=CH_2或由烯丙基胺(H_2C=CH-CH2-NH_2)例如-C(O)NHCH_2-CH=CH_2组成,或者

e)包含胺例如-NH2或由胺例如-NH2组成。

体内功效延长的生长激素

[0001] 本申请是申请日为2011年1月24日,申请号为201180015252.6(针对的分案申请号是201610206249.7),发明名称为“体内功效延长的生长激素”的发明专利的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及通过亲水间隔基与白蛋白结合残基连接的生长激素化合物及制备和使用这类化合物的方法。这些生长激素缀合物对蛋白水解性降解的抗性提高且作用特征延长,并且可用于治疗。

背景技术

[0003] 生长激素是一种由哺乳动物垂体前叶分泌的多肽激素。依物种而定,生长激素是一种由大约190个氨基酸残基组成的蛋白质,对应分子量约为22kDa。生长激素与细胞表面受体即生长激素受体(GHR)结合,并通过生长激素受体发出信号。生长激素在促进生长、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(lipolysis)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。重组人生长激素(hGH)已有生产且可市售获得,例如:健豪宁(Genotropin™)(Pharmacia Upjohn)、Nutropin™和普兰品(Protropin™)(Genentech)、优猛茁(Humatrope™)(EliLilly)、Serostim™(Serono)、诺地托品(Novo Nordisk)、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速迈个(Somatonorm™)(Pharmacia Upjohn/Pfizer)销售。

[0004] 生长激素与蛋白质生长激素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。生长激素被归类为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,野生型人生长激素(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 3,333-340,(1995))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 255,306-312,(1992))。这些结构已保藏在蛋白质数据库(PDB)中,并且是可公开获取的(PDB登录代码分别为1HGU和1HWG)。因此,根据已发表的hGH结构,可鉴定出对于hGH与hGHR结合重要的残基。此外,通过核磁共振(NMR)波谱法研究了hGH的动力学性质(Kasimova M.R.等.J.Mol.Biol.318,679-695,(2002))。X射线和NMR数据结合可区分结构化良好和定义明确的hGH的区域与结构化较少并且是动态的区域。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] US 2003/0162949公开了GH超基因家族成员的半胱氨酸变体。提供用于产生这些

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] WO 02/055532描述了经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] US 5,951,972描述了有生理活性的衍生化的天然和重组的哺乳动物和人蛋白质和多肽,其中蛋白质内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.46,33-42,(1984))。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] 已对大鼠组织中的hGH降解进行了研究(Garcia-Barros等.J.Endocrinol.Invest.23,748-754,(2000))。

[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链分子中的裂解环(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.65,183-190,(1998))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] EP 534568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] WO 2004/022593/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] WO 2006/048777/Nautilus特别描述了蛋白水解稳定性改进的修饰hGH类似物。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WO 2006/048777的范围明确不包括氨基酸残基被半胱氨酸取代;在WO 2006/048777(第65页)中阐明:“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分子应具有高的稳定性、较慢的清除率和/或延长体内半衰期。

[0018] 此外,通过使基团与肽缀合(其适当改变肽的性质)来修饰肽的性质和特性是众所周知的。这类缀合一般需要肽中的某一官能团与缀合基团中的另一官能团反应。通常,氨基

例如N端氨基或赖氨酸中的ε-氨基与合适的酰化试剂组合使用。或者,聚乙二醇(PEG)或其衍生物可与蛋白质连接。有关综述参见Exp.Opion.Ther.Patent.14,859-894,(2004)。已表明PEG与生长激素的连接可对生长激素的血浆半衰期具有积极作用,见WO 03/044056。

[0019] 较早前描述了使用羧肽酶修饰肽的C端。WO 92/05271公开了使用羧肽酶和亲核化合物使C端羧基酰胺化,WO 98/38285公开了特别适于该目的的羧肽酶Y的变体。

[0020] EP 243929公开了使用羧肽酶将多肽、报道基团或细胞毒性剂掺入蛋白质或多肽的C端。

[0021] WO 2005/035553描述了通过在肽的C端酶促掺入官能团而选择性缀合肽的方法。

[0022] 活化卤素衍生物和马来酰亚胺代表了将缀合物掺入肽的巯基的一些最常用的官能团(G.T.Hermanson in Bioconjugate Techniques 2.Ed.2008,Elsevier)。

[0023] 转谷氨酰胺酶先前被用来改变肽的性质。在食品工业,特别是在乳品工业,可获得例如使用转谷氨酰胺酶使肽交联的许多技术。其它文献公开了使用转谷氨酰胺酶改变生理活性肽的性质。EP 950665、EP 785276和Sato,Adv.Drug Delivery Rev.54,487-504,(2002)公开了在转谷氨酰胺酶存在时包含至少一个Gln的肽与胺官能化PEG或类似配体之间的直接反应,而Wada,Biotech.Lett.23,1367-1372,(2001)公开了β-乳球蛋白通过转谷氨酰胺酶与脂肪酸的直接缀合。以WO 2005/070468公布的国际专利申请公开了使用转谷氨酰胺酶掺入柄(handle),其中缀合基团可与柄连接。

[0024] 生长激素是一种关键激素,不仅仅参与调节身体生长,而且还参与调节蛋白质、碳水化合物和脂质的代谢。生长激素的主要作用是促进生长。人生长激素是具有以下序列的191个氨基酸残基蛋白质:

[0025] FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSN REETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMG RLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEG SCGF (SEQ ID NO: 1)

[0026] 给予人生长激素及其紧密相关的变体被用来治疗各种生长激素缺乏相关疾病。由于是多肽,生长激素经胃肠外即借助针给予。此外,生长激素的特征还在于相对短的半衰期,因此需要频繁给药,给患者带来相当的疼痛和不方便。因此,仍然需要提供具有改进的药理学性质(例如半衰期延长)的生长激素化合物。

[0027] 本发明提供具有改进的药代动力学和药理学性质的新的生长激素化合物缀合物以及其生产方法。

发明内容

[0028] 皮下给予的药物化合物的生物利用度可与吸收速率有关。化合物通过皮下毛细血管的紧密连接的能力可能部分与其物理和化学性质以及化合物的分子大小或流体力学体积有关。具有40kDa PEG的蛋白质缀合物例如聚乙二醇化hGH(PEG-hGH)的表观分子量为150-250kDa。具有共价结合的白蛋白的hGH分子的分子量为87kDa,而具有非共价结合的白蛋白的hGH分子将因时间与白蛋白部分解离,因此分子量为22kDa。

[0029] 预期耗费在解离状态的时间至少部分取决于白蛋白结合部分的亲和力。因此具有非共价结合的白蛋白的hGH分子的吸收速率可比PEG-hGH的吸收速率快。当使用对白蛋白具

有较低亲和力的白蛋白结合部分时,可获得的吸收速率升高。

[0030] 另外,供白蛋白结合部分与hGH连接的接头和/或间隔基的物理和化学性质可影响化合物的官能度。

[0031] 本发明人出乎意料地发现,具有单个Cys突变和/或额外二硫键的生长激素化合物(GH)可通过分隔GH和白蛋白结合残基的亲水间隔基与白蛋白结合残基选择性连接,所述亲水间隔基通常具有mLogP<0-或cLogP<0.5的化学部分以获得具有改进性质的GH缀合物,例如高的体外效力,或者例如体内半衰期延长,或者例如可能与延长体内作用特征联合的抗蛋白水解性降解抗性提高。通过使白蛋白结合残基经由亲水间隔基与单个Cys突变连接可保持生物活性,并且可获得一个或多个上述改进。当白蛋白结合残基通过亲水间隔基与具有额外二硫键的生长激素(例如与hGH的N端、40位或141位)连接时,也可获得所述改进。生长激素化合物还可包含单个Cys突变和额外的二硫键两者,在此方面,白蛋白结合残基通过亲水间隔基与单个Cys突变连接。

[0032] 在宽的方面,本发明涉及包含生长激素化合物(GH)的生长激素缀合物或其药学上接受的盐,所述生长激素化合物具有

[0033] a)单个Cys突变,

[0034] b)额外的二硫键,或者

[0035] c)单个Cys突变和额外的二硫键,

[0036] 其中白蛋白结合残基通过亲水间隔基与所述GH连接。

[0037] 在本发明的一个实施方案中,稳定的hGH化合物具有一个或多个额外的二硫键。二硫键在半胱氨酸对之间形成,半胱氨酸对的一个或两个通过点突变引入到野生型hGH序列。

[0038] 在本发明的另一个实施方案中,稳定的hGH化合物具有额外的半胱氨酸。通过点突变将半胱氨酸引入野生型hGH序列。

[0039] 在本发明的又一个实施方案中,稳定的hGH化合物具有一个或多个额外的二硫键和一个或多个额外的半胱氨酸。一个或多个额外的二硫键在额外的半胱氨酸对之间形成,而额外的半胱氨酸通过点突变引入到野生型hGH序列。

[0040] 此外,本发明基于这样的观测结果,即通过亲水间隔基在人生长激素(hGH)中引入白蛋白结合残基可选择性地进行,其中保持大部分的活性。优选通过亲水间隔基将白蛋白结合残基引入具有SEQ ID NO:1序列的hGH中的对应于所引入半胱氨酸的位置上和/或位置谷氨酰胺40上和/或位置谷氨酰胺141上和/或N端。使用转谷氨酰胺酶(TGase)、特别是得自茂原链轮丝菌(Streptoverticillium mobaraenae)或利迪链霉菌(Streptomyces lydicus)的TGase允许通过亲水间隔基在40位或141位选择性引入白蛋白结合残基,而将剩余的11个谷氨酰胺残基保持不改变,尽管事实上谷氨酰胺是转谷氨酰胺酶的底物。

[0041] 因此,在本发明的一个实施方案中,生长激素化合物(GH)通过亲水间隔基与一个白蛋白结合残基连接。通常,白蛋白结合残基通过亲水间隔基与hGH的N端或18、30、40、42、62、69、88、95、98、99、100、101、102、108、135、141或154位连接。在其它实施方案中,2个白蛋白结合残基通过亲水间隔基与单个Cys突变和上述位置的任一个(例如HGH的N端、40位或141位)连接。

[0042] 与聚乙二醇化hGH相比,本发明的生长激素化合物缀合物具有较快的皮下吸收,因此,出现较少脂肪萎缩(lipoatrophy)或无脂肪萎缩。此外,与PEG大不相同,白蛋白结合残

基和亲水间隔基是生物可降解的。

[0043] 本发明的又一个目的是提供用于改进GH性质的方法,所述方法通过按照本发明方法缀合所述蛋白质来进行。

[0044] 在其它方面,本发明涉及包含单个Cys突变、额外二硫键的分离的生长激素化合物(GH)或包含单个Cys突变、额外二硫键的生长激素化合物。在本发明的又一个目的中,这类化合物是可溶的。

附图说明

[0045] 图1是野生型人生长激素的三维结构的图示。该图示显示连接C53和C165以及连接C182和C189的分子内二硫键。

[0046] 图2是人生长激素序列的图示,其标示出环区段和螺旋区段。

[0047] 定义

[0048] 在本发明上下文中,本文所用术语“生长激素化合物”意指哺乳动物源的生长激素(例如人、牛或猪生长激素)和重组生长激素(例如重组人、牛或猪生长激素)和这类生长激素的变体以及突变体。本文所用的“GH”和“生长激素化合物”可互换使用。当GH是哺乳动物源的生长激素的变体(例如hGH和重组hGH)时,要理解所述变体是通过以下而获得的化合物:通过生长激素(例如hGH)序列中的一个或多个氨基酸残基被另一个天然或非天然的氨基酸取代;和/或通过将一个或多个天然或非天然的氨基酸添加至生长激素(例如hGH)序列中;和/或通过从生长激素(例如hGH)序列中缺失一个或多个氨基酸残基,其中这些步骤的任一个可任选随后对以一个或多个氨基酸残基进行进一步衍生化。通常,GH与hGH具有至少80%同一性,且通常具有hGH生长激素活性的至少10%,如本文测定(I)(实施例46)中所测定的。

[0049] 在本发明上下文中,本文所用术语“白蛋白结合残基”意指与人血清白蛋白非共价结合的残基。与生长激素化合物(GH)连接的白蛋白结合残基通常对人血清白蛋白具有低于约10μM或甚至低于约1μM的结合亲和力。已知各种白蛋白结合残基,其中有含有12-40个碳原子的线性和分支的亲脂部分、具有环戊烷并菲骨架的化合物和/或具有10-45个氨基酸残基的肽等。可通过以下文献所述的表面等离振子共振测量白蛋白结合性质:J.Biol.Chem.277(38),35035-35042,(2002)。

[0050] 本文所用术语“亲水间隔基”意指将生长激素化合物与白蛋白结合残基分隔开的间隔基,其具有包含至少5个非氢原子(其中30-50%的这些非氢原子是N或O)的化学部分。

[0051] 在本发明上下文中,术语“转氨基作用”和相关术语意欲说明这样的反应,其中谷氨酰胺侧链中的酰胺氮与另一种化合物的氮,特别是来自另一种含氮亲核体的氮交换。

[0052] 转谷氨酰胺酶(E.C.2.3.2.13)亦称为蛋白质-谷氨酰胺-γ-谷氨酰转移酶,并催化以下通用反应

[0053] 

[0054] Q-C(O)-NH_2(胺受体)可表示含有谷氨酰胺残基的肽或蛋白质,Q’-NH_2(胺供体)表示含胺亲核体。或者,Q-C(O)-NH_2和Q’-NH_2可分别表示胺受体和含有赖氨酸的肽或蛋白质。

然而,在本发明中,Q-C(O)-NH_2表示含有谷氨酰胺残基的生长激素,Q'-NH_2表示上述含胺亲核体。

[0055] 有用的转谷氨酰胺酶的实例包括微生物转谷氨酰胺酶,例如来源于茂原链霉菌(Streptomyces mobaraense)、肉桂链霉菌(Streptomyces cinnamoneum)和灰肉链霉菌(Streptomyces griseocarneum)(全部公开于US 5,156,956,其通过引用结合到本文中)及来源于淡紫灰链霉菌(Streptomyces lavendulae)(公开于US 5,252,469,其通过引用结合到本文中)和拉达卡链霉菌(Streptomyces ladakanum)(JP 2003/199569,其通过引用结合到本文中)的转谷氨酰胺酶。应当注意的是以前的(轮枝链霉菌属(Streptoverticillium)的成员目前包括在链霉菌属(Streptomyces)中(Kaempfer,J.Gen.Microbiol.137,1831-1892,(1991))。已自枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)(公开于US 5,731,183,其通过引用结合到本文中)和自各种粘菌(Myxomycetes)分离出其它有用的微生物转谷氨酰胺酶。有用的微生物转谷氨酰胺酶的其它实例公开于WO 96/06931(例如来源于Bacilus lydicus的转谷氨酰胺酶)和WO 96/22366,两者均通过引用结合到本文中。有用的非微生物转谷氨酰胺酶包括豚鼠肝转谷氨酰胺酶和各种海产来源如扁鱼真鲷(Pagrus major)(公开于EP-0555649,其通过引用结合到本文中)和日本牡蛎长牡蛎(Crassostrea gigas)(公开于US 5,736,356,其通过引用结合到本文中)的转谷氨酰胺酶。

[0056] 在本发明上下文中,术语"不可接近的"意欲表示某物不存在或从其不能被触及的意义而言实际上不存在。当表明待缀合的蛋白质的官能团不可接近的时,意欲表示该蛋白质中不存在所述官能团,或若存在的话在某种程度上其被阻止参与反应。举例而言,所述官能团可埋在蛋白质结构深处,因而被屏蔽而不能参与反应。要认识到的是,官能团是否可接近视反应条件而定。可设想的是,例如在变性剂存在下或在高温下,蛋白质可解折叠而暴露出本来不可接近的官能团。应该理解,"不可接近的"意指"在选择用于特定目的反应的反应条件下不可接近的"。

[0057] 术语"烷烃"或"烷基"意欲表示饱和、线性、分支和/或环状烃。除非用另一碳原子数目规定,否则术语意欲表示具1-30(包括端值)个碳原子的烃,例如1-20(包括端值)个、例如1-10(包括端值)个、例如1-5(包括端值)个。术语烷基和亚烷基分别是指相应的自由基和二价自由基。

[0058] 术语"C_{1-6}烷基"是指具有1-6个碳原子的直链或分支饱和烃。所述基团实例包括但不限于甲基、2-丙基、1-丁基、2-丁基、2-甲基-2-丙基、2-甲基-1-丁基和正己基。

[0059] 术语"C_{3-10}环烷基"通常是指环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环壬基和环癸基。

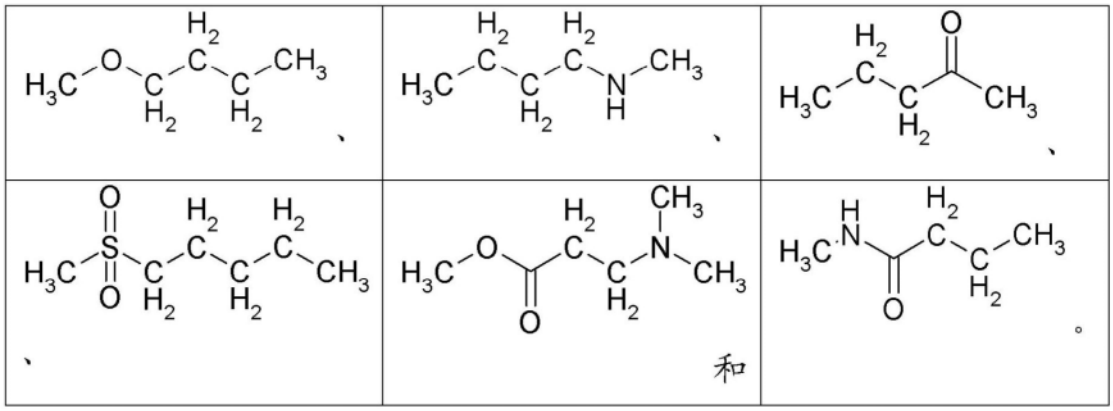
[0060] 术语"烯烃"意欲表示包含至少一个碳碳双键的线性、分支和/或环状烃。除非用另一碳原子数目规定,否则术语意欲表示具2-30(包括端值)个碳原子的烃,例如2-20(包括端值)个、例如2-10(包括端值)个、例如2-5(包括端值)个。术语烯基和亚烯基分别是指相应的自由基和二价自由基。

[0061] 术语"炔烃"意欲表示包含至少一个碳碳三键的线性、分支和/或环状烃,其可任选包含一个或多个碳碳双键。除非用另一碳原子数目规定,否则术语意欲表示具2-30(包括端值)个碳原子的烃,例如2-20(包括端值)个、例如2-10(包括端值)、例如2-5(包括端值)个。术语炔基和亚炔基分别是指相应的自由基和二价自由基。

[0062] 术语“同素环状芳族化合物”意欲表示芳族烃,例如苯和萘。

[0063] 术语“杂环化合物”意欲表示包含5、6或7个环原子的环状化合物,所述环原子中的1、2、3或4个为选自N、O和/或S的杂原子。实例包括杂环芳族化合物,例如噻吩、呋喃、吡喃、吡咯、咪唑、吡唑、异噻唑、异噁唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪以及其部分或完全氢化的等同物,例如哌啶、吡唑烷(pirazolidine)、吡咯烷、吡咯啉(pyroline)、咪唑烷、咪唑啉、哌嗪和吗啉。

[0064] 术语“杂烷烃”、“杂烯烃”和“杂炔烃”意欲表示其中一个或多个杂原子或基团已插入到所述部分的结构中的如上所定义的烷烃、烯烃和炔烃。杂基团和原子的实例包括-O-、-S-、-S(O)-、-$S(O)_2$-、-C(O)--C(S)-和-N(R*)-,其中R*表示氢或C_1-C_6-烷基。杂烷烃实例包括:

[0065] 

[0066] 术语“自由基”或“二价自由基”意欲表示其中分别移除一个或两个氢原子的化合物。当明确指出时,自由基亦可表示通过自化合物形式上移除较大原子基团(例如羟基)形成的部分。

[0067] 术语“卤素”意欲表示周期表的第7主族成员,例如F、Cl、Br和I。

[0068] 在本发明上下文中,术语“芳基”意欲表示碳环芳环自由基或稠合芳环系统自由基(其中至少一个环为芳族的)。典型的芳基包括苯基、联苯基、萘基等等。

[0069] 本文单独或联合所用术语“杂芳基(heteroaryl或hetaryl)”,是指含有选自氮、氧或硫杂原子的一个或多个杂原子作为环原子的具有例如5-7个环原子的芳环自由基或具有例如7-18个环原子的稠合芳环系统自由基(其中至少一个环为芳族的),其中N-氧化物和硫一氧化物和硫二氧化物为允许的杂芳族取代物。实例包括呋喃基、噻吩基、苯硫基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、噻二唑基、异噻唑基、吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、嘧啶基、喹啉基、异喹啉基、苯并呋喃基、苯并苯硫基、吲哚基和吲唑基等等。

[0070] 术语“缀合(物)”作为名词意欲表示经修饰的蛋白质,即含为了修改所述蛋白质的性质而与其键合的部分的蛋白质;作为动词,该术语意欲表示让部分与蛋白质键合以修改所述蛋白质性质的过程。

[0071] 术语“单个cys”或“游离半胱氨酸”是指不参与双键的半胱氨酸残基。因此除一个或多个额外的二硫键以外,蛋白质还可包括一个或多个单个cys残基,只要所述单个cys不会导致内部二硫键。

[0072] 本文所用术语“前药”表示可生物水解的酰胺和可生物水解的酯,亦包括:a)其中

在这类前药中的可生物水解官能团包含在本发明化合物中的化合物;和b)可在给定官能团处生物氧化或还原以产生本发明药物物质的化合物。这些官能团实例包括1,4-二氢吡啶、N-烷基羰基-1,4-二氢吡啶、1,4-环已二烯、叔丁基等等。

[0073] 本文所用术语“可生物水解的酯”为药物物质(在本情形中为本发明化合物)的酯,其a)不干扰母体物质的生物活性,但赋予该物质有利的体内性质,例如作用持续时间、起效等等;或b)生物学上无活性,但易于被受试者在体内转化为生物活性组分。优点为例如增加溶解性,或可生物水解的酯经口服从肠道吸收,在血浆中转化为本发明化合物。此类可生物水解的酯的很多实例为本领域已知,举例而言包括低级烷基酯(例如C_1-C_4)、低级酰氧基烷基酯、低级烷氧基酰氧基烷基酯、烷氧基酰氧基酯、烷基酰基氨基烷基酯和胆碱酯。

[0074] 本文所用术语“可生物水解的酰胺”为药物物质(在本情形中为本发明化合物)的酰胺,其a)不干扰母体物质的生物活性,但赋予该物质有利的体内性质,例如作用持续时间、起效等等;或b)生物学上无活性,但易于被受试者在体内转化为生物活性组分。优点为例如增加溶解性,或可生物水解的酰胺经口服从肠道吸收,在血浆中转化为本发明化合物。此类可生物水解的酰胺的很多实例为本领域已知,举例而言包括低级烷基酰胺、α-氨基酸酰胺、烷氧基酰基酰胺和烷基氨基烷基羰基酰胺。

[0075] 在本发明上下文中,术语“药学上可接受的盐”意欲表示对患者无害的盐。所述盐包括药学上可接受的酸加成盐、药学上可接受的金属盐、铵盐和烷化铵盐。酸加成盐包括无机酸以及有机酸的盐。合适的无机酸的代表性实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硫酸、硝酸等等。合适的有机酸的代表性实例包括蚁酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、丙酸、苯甲酸、肉桂酸、柠檬酸、富马酸、乙醇酸、乳酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、草酸、苦味酸、丙酮酸、水杨酸、琥珀酸、甲磺酸、乙磺酸、酒石酸、抗坏血酸、扑酸、双亚甲基水杨酸、乙二磺酸、葡糖酸、柠康酸、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、对甲苯磺酸等等。药学上可接受的无机酸或有机酸加成盐的另外实例包括J.Pharm.Sci.66,2,(1977)中所列举的药学上可接受的盐,其通过引用并入本文中。金属盐的实例包括锂盐、钠盐、钾盐、镁盐等等。铵盐和烷化铵盐的实例包括铵盐、甲基铵盐、二甲基铵盐、三甲基铵盐、乙基铵盐、羟基乙基铵盐、二乙基铵盐、丁基铵盐、四甲基铵盐等等。

[0076] 本文所用化合物的″治疗有效量″,意指足以治愈、减缓或部分阻止给定疾病及其并发症的临床表现的量。将足以实现此的量定义为″治疗有效量″。对于每一目的,有效量应视疾病或损伤的严重程度以及受试者的体重和一般状态而定。应该理解,可用常规实验通过构建值的矩阵并测定矩阵中的不同点来实现合适剂量的确定,这完全在训练有素的医生或兽医的普通技术范围内。

[0077] 本文所用术语“治疗”意指为以与病况例如疾病或病症斗争为目的而管理及护理患者。所述术语意欲包括对患者罹患的给定病况的全方位治疗,例如给予活性化合物,以减轻症状或并发症,延迟疾病、病症或病况的进展,减轻或减缓症状及并发症,和/或治愈或消除疾病、病症或病况,以及预防病况,其中预防应理解为以与疾病、病况或病症斗争为目的而管理及护理患者,并包括给予活性化合物以防止症状或并发症发作。待治疗的患者优选为哺乳动物;具体而言为人,但其亦可包括动物,例如狗、猫、牛、绵羊及猪。

[0078] 发明描述

[0079] 在宽的方面,本发明涉及包含生长激素化合物(GH)的稳定的生长激素缀合物或其

药学上接受的盐,所述生长激素化合物具有

[0080] a)单个Cys突变,

[0081] b)额外的二硫键,或者

[0082] c)单个Cys突变和额外的二硫键,

[0083] 其中白蛋白结合残基通过亲水间隔基与所述GH连接。

[0084] 如果单个Cys突变存在时,则白蛋白结合残基通过亲水间隔基与Cys的硫残基连接。如果额外的二硫键存在时(但无单个Cys突变),则白蛋白结合残基通过亲水间隔基与本文所述生长激素化合物中的某一位置连接,例如hGH的40位、141位或N端。如果两个或更多个白蛋白结合残基通过亲水间隔基与生长激素化合物连接,则所述白蛋白结合残基与单个Cys突变(如果该突变存在)连接,或者如果仅额外的二硫键存在,则白蛋白结合残基通过亲水间隔基与本文所述的生长激素化合物的某一位置连接。

[0085] 在一个实施方案中,生长激素化合物具有一个单独的Cys突变。

[0086] 在另一个实施方案中,生长激素化合物具有两个单独的Cys突变。

[0087] 在又一个实施方案中,生长激素化合物具有额外的二硫键。

[0088] 在又一个实施方案中,生长激素化合物具有一个单独的Cys突变和一个额外的二硫键。

[0089] 在又一个实施方案中,GH表示包含与人生长激素(hGH)的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)有至少90%同一性的氨基酸序列的生长激素化合物。在其它实施方案中,GH与hGH有至少80%、例如至少85%、例如至少95%同一性,例如与SEQ ID NO:1有至少96%、例如至少97%、例如至少98%或例如至少99%同一性。在其它实施方案中,所述与hGH的同一性与用本文测定法I测定的hGH的生长激素活性的至少10%、例如至少20%、例如至少40%、例如至少60%、例如至少80%关联。任一个序列同一性实施方案可与任一个活性实施方案联合,例如GH与hGH有至少80%同一性并与hGH的生长激素活性的至少60%关联;GH与hGH有至少90%同一性并与hGH的生长激素活性的至少40%关联;GH与hGH有至少95%同一性并与hGH的生长激素活性的至少80%关联等等。如本文所述,HG可表示为MetHG,其表明序列包含额外的N端甲硫氨酸。

[0090] 在一个实施方案中,GH是其中引入单个Cys突变的生长激素变体。在其它实施方案中,GH表示除单个Cys突变以外还含有1-5个突变的生长激素化合物。

[0091] 在又一个实施方案中,白蛋白结合残基通过亲水间隔基与单个Cys突变连接。在一个实施方案中,单个Cys突变位于GH的N端、H1、H2、L2或H3的位置。在其它实施方案中,单个Cys突变位于N端,所述突变是例如T3C、P5C、S7C的任一个或在H1(相当于AA 9-35)中;所述突变是例如D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C的任一个或在L1(相当于AA36-71)中;所述突变是例如K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、S57C、P59C、S62C、E65C、Q69C的任一个或优选Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C的任一个或在H2、L2或H3(相当于AA 72-98、AA 99-106和AA 107-127)中;所述突变是例如hGH(SEQ ID NO:1)的E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C的任一个或位于L3或H4(相当于AA128-154和AA155-184)。在L3和H4(128-154和AA155-184)中,所述突变是例如E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180C的任一个或位于C端,所述突变是例如E186C、G187C、G190C的任一个。

[0092] 如果单个Cys突变存在于hGH变体中,则该突变位于相应的氨基酸残基上。

[0093] 在具体实施方案中,GH单个Cys突变在相当于母体GH的位置引入,其相当于选自以下的hGH(SEQ ID NO:1)的位置:T3、P5、S7、D11、H18、Q29、E30、E33、A34、Y35、K38、E39、Y42、S43、D47、P48、S55、S57、P59、S62、E65、Q69、E88、Q91、S95、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、D107、S108、D112、Q122、G126、E129、D130、G131、P133、T135、G136、T142、D147、N149、D154、A155、L156、R178、E186、G187和G190,例如选自: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。GH缀合物在所述单个半胱氨酸残基的侧链上还包含白蛋白结合部分。

[0094] 在其它实施方案中,单个Cys突变位于hGH中的AA 93-106或hGH变体中的相应残基内。在其它特定的实施方案中,单个Cys突变位于L2内,例如在AA 99-106或AA 99-103或相应残基内。

[0095] 如果单个Cys突变存在于本发明的生长激素化合物缀合物中,则典型的单个Cys突变是E30C。又一个典型的单个Cys突变是Y42C。又一个典型的单个Cys突变是S55C。又一个典型的单个Cys突变是S57C。又一个典型的单个Cys突变是S62C。又一个典型的单个Cys突变是Q69C。又一个典型的单个Cys突变是S95C。又一个典型的单个Cys突变是A98C。又一个典型的单个Cys突变是N99C。又一个典型的单个Cys突变是S100C。又一个典型的单个Cys突变是L101C。又一个典型的单个Cys突变是V102C。又一个典型的单个Cys突变是S108C。

[0096] 根据rhGH/受体复合物(PDB:3HHR)的晶体结构,束(bundle)由4个主要螺旋组成:第一螺旋(A)自残基9到34,第二螺旋(B)自残基72到92和自残基94到100,第三螺旋(C)自残基106到128,而第四螺旋(D)自残基155到184(M.R.Kasimova等.J.Mol.Biol.318,679-695,(2002))。4个主要螺旋称为蛋白质的核心。不是螺旋区的部分的残基被定义为环残基,并且可以是柔性区、环、β-转角、发夹和卷曲(coil)的部分。当hGH与其结合蛋白(PDB:1HWG)复合时,得到略微不同定位的螺旋,其是上文提及的螺旋定义。

[0097] 此外,本发明涉及包含至少一个引入的半胱氨酸残基的GH缀合物,该残基被引入到相当于hGH的螺旋或环区中的位置的位置上。具体地说,可将氨基酸残基引入到螺旋或环区中的表面暴露的位置上,所述螺旋或环区在例如仅hGH的模型结构中或与其2个受体分子复合的hGH的模型结构中,其侧链超过25%暴露在表面上、优选其侧链超过50%暴露在表面上。在一个优选的实施方案中,螺旋或环中的位置相当于hGH的受体结合部位以外的位置。可应用计算化学算法,鉴定表面暴露的残基。例如,可采用可公开获取的结构(PDB登录代码1HGU和1HWG结构)的原子坐标和默认参数设置,用来自Accelrys Inc.的计算机程序Quanta 2005计算相对表面可及性。该算法基本原理的描述可参见B.Lee和F.M.Richards,“The Interpretation of Protein Structures:Estimation of Static Accessibility(蛋白质结构解析:静态可及性的估算)”J.Mol.Biol.55,379-400,(1971)。

[0098] 在又一个实施方案中,白蛋白结合残基通过亲水间隔基与具有额外的二硫键的GH连接。通常,白蛋白结合残基通过亲水间隔基与hGH的N端、40位或141位连接。

[0099] 在又一个实施方案中,GH在环区段和螺旋区段之间或在环区段之内或在环区段之间或在螺旋区段之间包含额外的二硫键。

[0100] 在又一个实施方案中,GH包含额外的二硫键,其中至少一个半胱氨酸存在于例如来自氨基酸残基128-154(L3)的环区段中。

[0101] 在又一个实施方案中,GH包含额外的二硫键,其中额外的二硫键将环区段与螺旋区段连接。

[0102] 在又一个实施方案中,GH包含额外的二硫键,其中额外的二硫键将环区段与螺旋B或螺旋2(相当于AA 72-98)连接。

[0103] 在又一个实施方案中,GH包含额外的二硫键,且额外的二硫键将螺旋2(相当于AA 72-98)与环3(相当于AA 128-154)连接。

[0104] 在又一个实施方案中,GH在相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间包含额外的二硫键:R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C和/或V185C/S188C。

[0105] 在又一个实施方案中,GH的额外二硫键介于相当于hGH(SEQ ID NO:1)的以下位置中的至少一个氨基酸对之间:R16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C和/或V185C/S188C。

[0106] 在又一个实施方案中,额外的二硫键介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间:A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C和/或R94C/D107C。

[0107] 在又一个实施方案中,额外的二硫键介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间:D26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C和/或R94C/D107C。

[0108] 在又一个实施方案中,额外的二硫键介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间: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。

[0109] 在又一个实施方案中,额外的二硫键介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间:S57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C和/或S85C/S144C。通常,额外的二硫键是Q84C/Y143C。

[0110] 在又一个实施方案中,白蛋白结合残基通过亲水间隔基与具有单个Cys突变和额外二硫键的GH连接。通常,白蛋白结合残基通过亲水间隔基与单个Cys突变连接。在一个具体实施方案中,GH具有额外的二硫键Q84C/Y143C和单个Cys突变L101C,其通过亲水间隔基与白蛋白结合残基连接。

[0111] 在其它实施方案中,GH具有额外的二硫键和选自hGH(SEQ ID NO:1)的以下任一个

的单个Cys突变:T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C和G190C,例如以下的任一个:T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C或hGH变体的相应残基。

[0112] 在一个具体实施方案中,GH具有额外的二硫键和单个Cys突变,且所述单个Cys突变在相当于母体GH的位置上引入,其相当于选自hGH(SEQ ID NO:1)的以下位置:T3、P5、S7、D11、H18、Q29、E30、E33、A34、Y35、K38、E39、Y42、S43、D47、P48、S55、S57、P59、S62、E65、Q69、E88、Q91、S95、A98、N99、S100、L101、V102、Y103、D107、S108、D112、Q122、G126、E129、D130、G131、P133、T135、G136、T142、D147、N149、D154、A155、L156、R178、E186、G187和G190,优选选自;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。GH缀合物在所述单个半胱氨酸残基的侧链上还包含白蛋白结合部分。

[0113] 在又一个实施方案中,GH包含单个Cys突变和额外的二硫键,其在环区段和螺旋区段之间或在环区段之内或在环区段之间或在螺旋区段之间。

[0114] 在又一个实施方案中,GH包含单个Cys突变和额外的二硫键,其中至少一个半胱氨酸存在于例如来自氨基酸残基128-154(L3)的环区段中。

[0115] 在又一个实施方案中,GH包含单个Cys突变和额外的二硫键,其中额外的二硫键将例如来自氨基酸残基128-154的环区段与螺旋区段例如螺旋B或螺旋2(相当于AA 72-98)连接。

[0116] 在又一个实施方案中,GH包含单个Cys突变和将螺旋2(相当于AA 72-98)与环3(相当于AA 128-154)连接的额外二硫键。

[0117] 在又一个实施方案中,GH包含单个Cys突变和介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间的额外二硫键:R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C和/或V185C/S188C。

[0118] 在又一个实施方案中,GH包含单个Cys突变和介于相当于hGH(SEQ ID NO:1)的以下位置中的一个氨基酸对之间的额外二硫键:R16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C和/或V185C/S188C。

[0119] 在又一个实施方案中,GH包含单个Cys突变和介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间的额外二硫键:A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、

F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C和/或R94C/D107C。

[0120] 在又一个实施方案中,额外的二硫键介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间:D26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C和/或R94C/D107C。

[0121] 在又一个实施方案中,GH包含单个Cys突变和介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间的额外二硫键: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。

[0122] 在又一个实施方案中,GH包含单个Cys突变和介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间的额外二硫键:S57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C和/或S85C/S144C。

[0123] 亲水间隔基(B)的溶解度可通过其logP值来描述。LogP,亦称为分配系数,是平衡时化合物在两种不混溶溶剂的混合物在两相中的浓度比的对数。通常溶剂之一为水,而第二种溶剂选自辛-1-醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯(PGDP)。主要由于氢键合作用,在这些不同溶剂中测量的LogP值显示差异。辛醇可提供和接受氢键,而环己烷为惰性的。氯仿可提供氢键,而PGDP仅可接受氢键。LogP值可通过本领域已知的标准方法测量。

[0124] 在本发明的一个实施方案中,亲水间隔基在辛-1-醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯(PGDP)的任一种中的LogP低于0,例如低于0.5。

[0125] 在又一个实施方案中,亲水间隔基在辛-1-醇、氯仿、环己烷和二壬酸丙二醇酯(PGDP)任一种中的logP低于-1。

[0126] 或者,可应用已发表的算法,将白蛋白结合剂部分或亲水间隔基部分的LogP值计算为mLogP和/或cLogP(T.Fujita;J.Iwasa和C.Hansch,J.Am.Chem.Soc.86,5175-5180,(1964)"A New Substituent Constant,Pi,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,23,3-25,(1997)Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings(在药物发现和开发背景下估算溶解度和渗透性的实验和计算方法)"和I.Moriguchi,S.Hirono,I.Nakagome,H.Hirano,Chem.Pharm.Bull.42,976-978,(1994)"Comparison of Reliabivity 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)")。

[0127] 在本发明的一个实施方案中,亲水间隔基(B)的mLogP＜0。

[0128] 在又一个实施方案中,生长激素化合物(GH)通过亲水间隔基(B)与一个白蛋白结合残基结合。

[0129] 在又一个实施方案中,生长激素化合物(GH)通过亲水间隔基(B)与白蛋白结合残基连接,所述亲水间隔基(B)与生长激素化合物(GH)中的游离半胱氨酸偶联。

[0130] 在另一个实施方案中,生长激素化合物(GH)通过一个或两个亲水间隔基与2个白蛋白结合残基连接。因此,在一个实例中,一个白蛋白结合残基通过一个亲水间隔基(B)与

单个Cys突变连接,另一个白蛋白结合残基通过一个亲水间隔基(B')与40位或141位的谷氨酰胺连接;或者2个白蛋白结合残基通过一个亲水间隔基(B)与单个Cys突变或与40位、141位或N端的谷氨酰胺连接。在又一个实施方案中,生长激素化合物(GH)通过一个或多个亲水间隔基与3个白蛋白结合残基连接。

[0131] 在一个实施方案中,亲水间隔基包含至少一个OEG基序,即自由基8-氨基-3,6-二氧杂辛酸,即-NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-。在又一个特定的实施方案中,亲水间隔基包含至少两个OEG基序。在一个实施方案中,这类OEG基序的取向使得-C(O)-最接近生长激素化合物但不连接生长激素化合物和白蛋白结合剂接头,且使-NH-最接近白蛋白结合残基。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取向或不同的取向。在一个实施方案中,两个这类OEG基序彼此邻近定位,而在备选的实施方案中,这类OEG基序被一个或多个共价连接的原子分开。

[0132] 在一个实施方案中,亲水间隔基包含至少一个谷氨酸残基。氨基酸谷氨酸包含两个羧酸基团。其γ-羧基可用于与赖氨酸的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(如存在的话)形成酰胺键。或者α-羧基可用于与赖氨酸的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(如存在的话)形成相似的酰胺键。Glu的氨基可进而与白蛋白结合残基的羧基或与OEG基序的羧基(如存在的话)或与另一个Glu的γ-羧基或α羧基(如存在的话)形成酰胺键。一个Glu的氨基与第二Glu的γ-羧基的连接可称为"γ-Glu"基序。

[0133] 在一个实施方案中,亲水间隔基包含至少一个联合的OEG-Glu基序(-NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)NH-CH(C(O)OH)-$(CH_2)_2$-C(O)-)或至少一个联合的Glu-OEG基序(-NH-CH(C(O)OH)-$(CH_2)_2$-C(O)NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-)或其组合,其中所述Glu-OEG和OEG-Glu基序可被一个或多个共价连接的原子分开或可通过形成γ-Glu的Glu酰胺键彼此直接键合。

[0134] 又一方面,本发明涉及生长激素缀合物及其药学上可接受的盐,其中生长激素缀合物具有下式(I):

[0135] A-W-B-GH (I)

[0136] 其中

[0137] GH表示具有单个Cys突变的生长激素化合物,

[0138] B表示与Cys突变的硫残基连接的亲水间隔基,

[0139] W是连接A和B的化学基团,和

[0140] A表示白蛋白结合残基。

[0141] 在又一个实施方案中,GH表示包含与人生长激素(hGH)的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)有至少90%同一性的氨基酸序列的生长激素化合物。在其它实施方案中,GH与hGH(SEQ ID NO:1)具有至少80%、例如至少85%、例如至少95%、例如至少96%、例如至少97%、例如至少98%或例如至少99%同一性。在其它实施方案中,所述与hGH的同一性与用本文测定法I测定的hGH的生长激素活性的至少10%、例如至少20%、例如至少40%、例如至少60%、例如至少80%关联。任一个序列同一性实施方案可与任一个活性实施方案组合,例如GH与hGH有至少80%同一性并与hGH的生长激素活性的至少60%关联;GH与hGH有至少90%同一性并与hGH的生长激素活性的至少40%关联;GH与hGH有至少95%同一性并与hGH的生长激素活

性的至少80％关联等等。

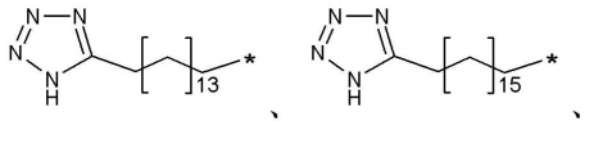
[0142] 在其它实施方案中,缀合物的GH具有单个Cys突变,其选自GH的N端、H1、H2、L2或H3区中的单个Cys突变中的任一个。在其它这类实施方案中,单个Cys突变位于N端,所述突变是例如T3C、P5C、S7C的任一个或在H1(相当于AA 9-35)中;所述突变是例如D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C的任一个或在L1(相当于AA36-71)中;所述突变是例如K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、S57C、P59C、S62C、E65C、Q69C的任一个或优选Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C的任一个或在H2、L2或H3(相当于AA 72-98、AA 99-106和AA 107-127)中;所述突变是例如hGH(SEQ ID NO:1)的E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C的任一个或在L3或H4(相当于AA128-154和AA155-184)中。在L3和H4(128-154和AA155-184)中,所述突变是例如E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180C的任一个或在C端,所述突变是例如E186C、G187C、G190的任一个。

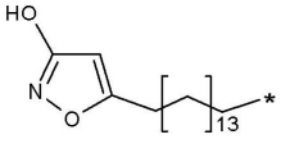
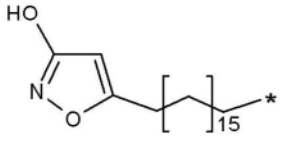
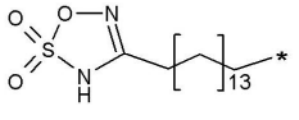
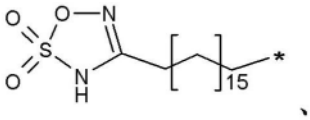
[0143] 如果单个Cys突变存在于hGH变体中,则该突变位于相应的氨基酸残基上。

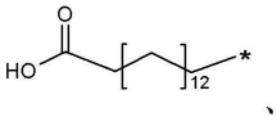
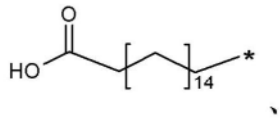
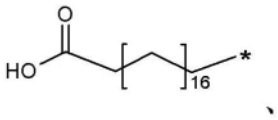
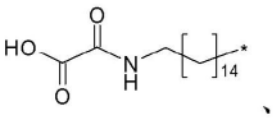
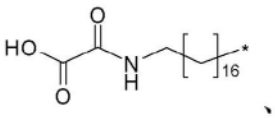
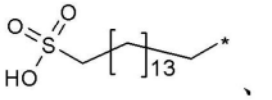
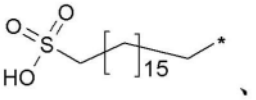
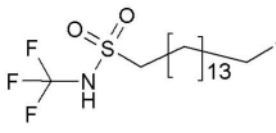
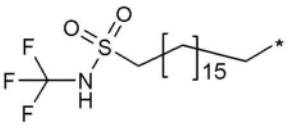
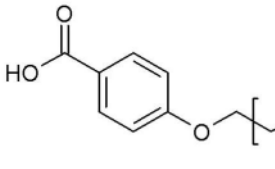
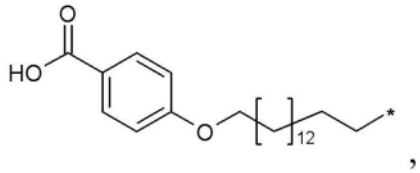
[0144] 其它实施方案包括其中GH中的单个Cys突变选自hGH(SEQ ID NO:1)的以下任一个的GH缀合物:T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C和G190C,例如以下的任一个;T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C。

[0145] 在甚至更多的实施方案中,单个Cys突变位于hGH中的AA 93-106或hGH变体中的相应残基内。在其它特定的实施方案中,单个Cys突变位于L2内,例如在AA 99-106或AA 99-103或相应残基内。

[0146] 在又一个实施方案中,A选自


、

、

、

、

、

、

[0147]

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

，

[0148] 其中*表示通过W与B连接。

[0149] 在又一个实施方案中,W具有下式

[0150] $-W_7-Y-$,

[0151] 其中

[0152] Y为$-(CH_2)_{I7}-C_{3-10}$-环烷基$-W_8-$或价键,

[0153] I7为0-6,

[0154] W_7选自$-C(0)NH-$、$-NHC(0)-$、$-C(0)NHCH_2-$、$-CH_2NHC(0)-$、$-C(0)NHS(0)_2-$、$-S(0)_2NHC(0)-$、$-OC(0)NH-$、$-NHC(0)O-$、$-C(0)CH_2-$、$-CH_2C(0)-$、$-C(0)CH=CH-$、$-CH=CHC(0)-$、$-(CH_2)_{s3}-$、$-C(0)-$、$-C(0)O-$、$-OC(0)-$或价键;其中s3为0或1,

[0155] W_8选自$-C(0)NH-$、$-NHC(0)-$、$-C(0)NHCH_2-$、$-CH_2NHC(0)-$、$-C(0)NHS(0)_2-$、$-S(0)_2NHC(0)-$、$-OC(0)NH-$、$-NHC(0)O-$、$-C(0)CH_2-$、$-CH_2C(0)-$、$-C(0)CH=CH-$、$-CH=CHC(0)-$、$-(CH_2)_{s4}-$、$-C(0)-$、$-C(0)O-$、$-OC(0)-$或价键;其中s4为0或1。

[0156] 在其它实施方案中,B包含一个或多个OEG和/或上述γ-Glu基序或由一个或多个OEG和/或上述γ-Glu基序组成。

[0157] 在又一个实施方案中,B具有下式

[0158] $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0159] 其中

[0160] X_1为$-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

[0161] X_2为$-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

[0162] X_3为$-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$,

[0163] X_4为F-D1-$(CH_2)_{16}$-D2-,

[0164] I1、I2、I3、14、I5和I6独立选自0-16,

[0165] ml、m3、m4、m6和m7独立选自0-10,

[0166] m2和m5独立选自0-25,

[0167] n1、n2、n3和n4独立选自0-16,

[0168] F为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键,其中芳基和杂芳基任选被卤素、-CN、-OH、-C(0)OH、-C(0)NH_2、-S(0)$_2$OH或C_{1-6}-烷基取代,

[0169] R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(0)OH、-C(0)NH_2、-S(0)OH、-S(0)$_2$OH、-NH-C(三NH)-NH_2、C_{1-6}-烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(0)OH、-C(0)NH_2、-S(0)OH、-S(0)$_2$OH、-CN或-OH取代,

[0170] D1、D2、E1和E2独立选自-O-、-N(R^6)-、-N(C(0)R^7)-或价键;其中R^6和R^7独立表示氢或C_{1-6}-烷基,

[0171] W_1-W_5独立选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)NHS(0)$_2$-、-S(0)$_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)O-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s2}$-、-C(0)-、-C(0)O-、-OC(0)-或价键;其中s2为0或1,

[0172] W_6选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)NHS(0)$_2$-、-S(0)$_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)O-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s1}$-、-C(0)-、-C(0)O-、-OC(0)-、-NHC(0)C_{1-6}-烷基、-C(0)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中s1为0或1,C_{1-6}-烷基任选被氧代基(oxo)、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(0)CH*CH_2COOH或-NHC(0)CH_2CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0173] 在又一个实施方案中,I1、I2、I3、I4、I5和I6独立地为0-6。

[0174] 在又一个实施方案中,m1、m3、m4、m6和m7独立地为0-6。

[0175] 在又一个实施方案中,m2和m5独立地为0-10。

[0176] 在又一个实施方案中,n1、n2、n3和n4独立地为0-10。

[0177] 在又一个实施方案中,D1和D2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

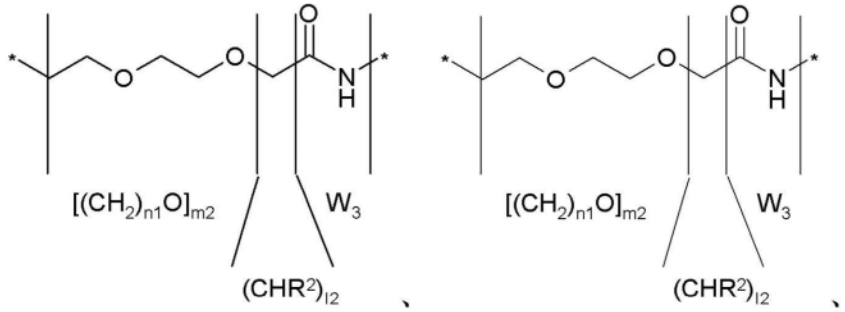
[0178] 在又一个实施方案中,E1和E2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

[0179] 在又一个实施方案中,W_1-W_8独立选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)NHS(0)$_2$-、-S(0)$_2$NHC(0)-、-NHC(0)C_{1-6}-烷基、-C(0)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(0)CH*CH_2COOH或-NHC(0)CH_2CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

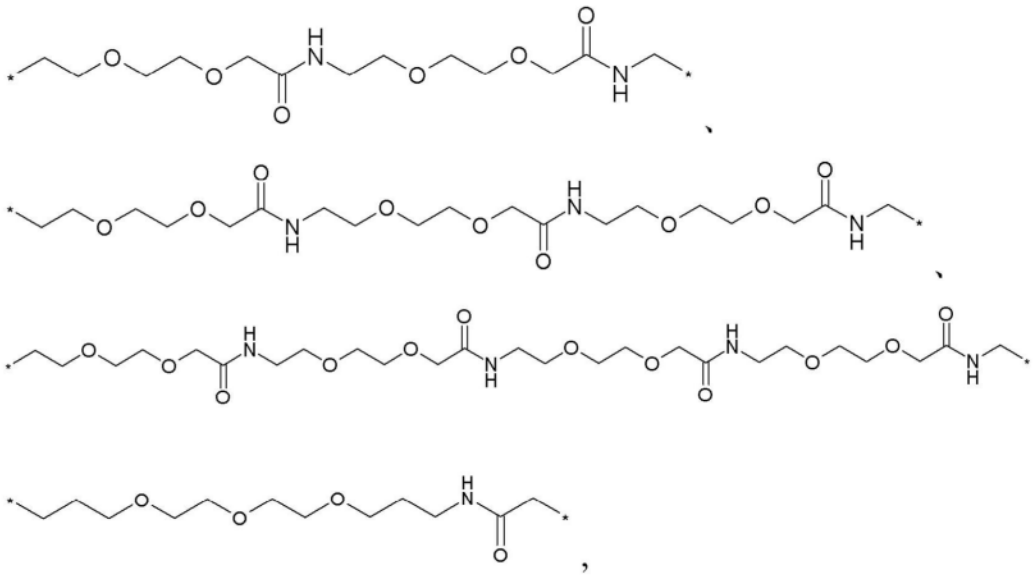
[0180] 在又一个实施方案中,R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(0)OH、-C(0)NH_2、-S(0)$_2$OH

或C_{1-6}-烷基;其中C_{1-6}-烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH_2或-S(O)$_2$OH取代。

[0181] 在又一个实施方案中,-{[$(CH_2)_{n1}$E1]$_{m2}$-[$(CHR^2)_{I2}$-W_3]$_{m3}$}$_{n2}$-和-{[$(CH_2)_{n3}$E2]$_{m5}$-[$(CHR^4)_{I4}$-W_5]$_{m6}$}$_{n4}$-,其中E1和E2为-O-,选自



[0182]



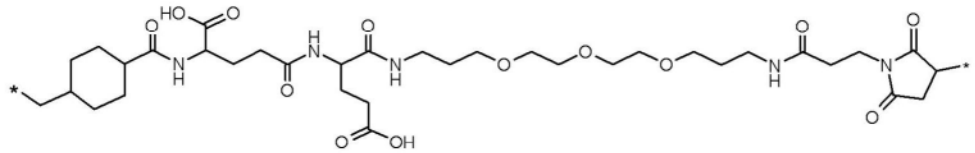
和

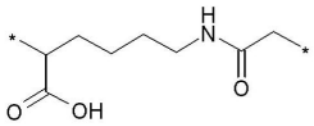
[0183] 其中*意欲表示连接点,即开放键(open bond)。

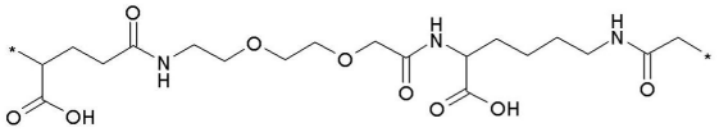
[0184] 在又一个实施方案中,X_4为价键,W_6选自吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH,其中(*)表示CH的碳原子与GH的连接点。

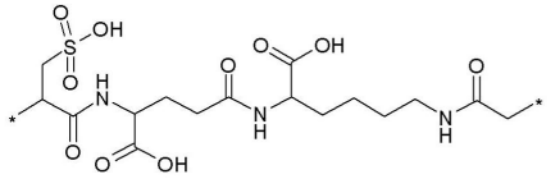
[0185] 在又一个实施方案中,B选自

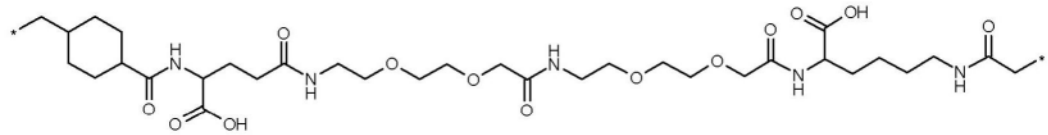
[0186]

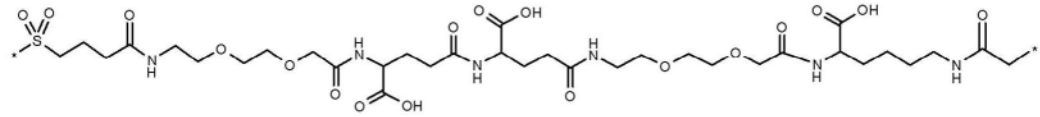


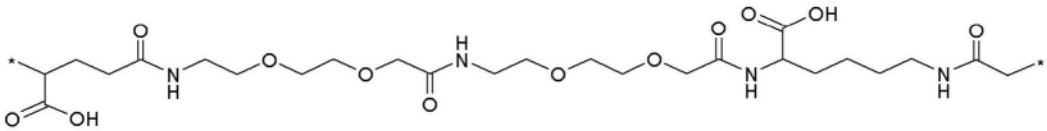


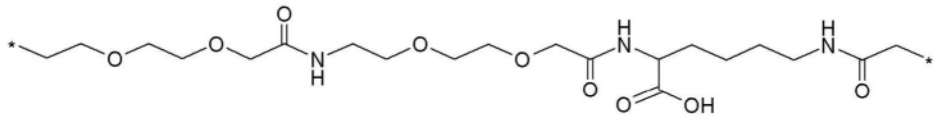


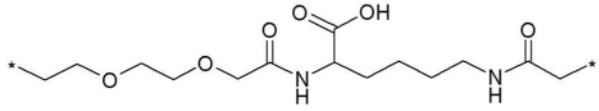


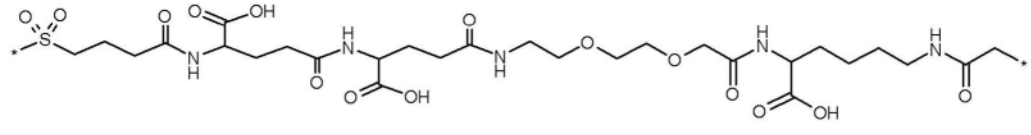


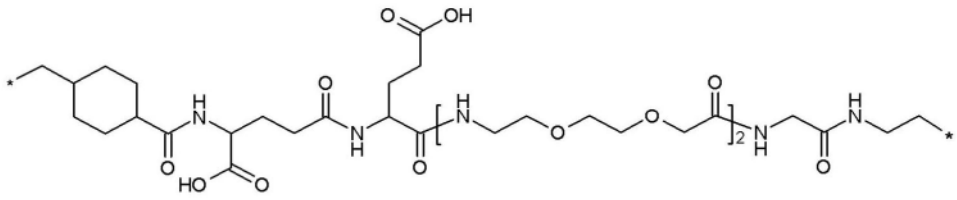


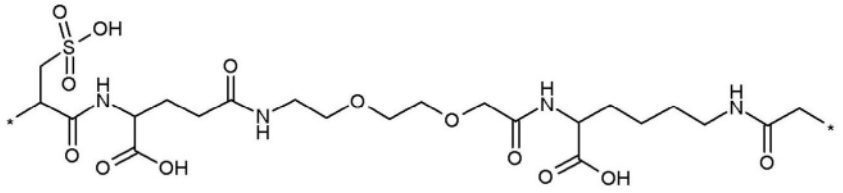




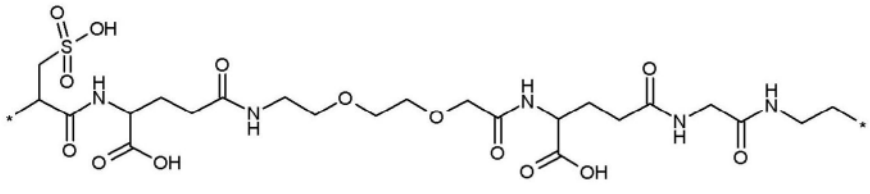




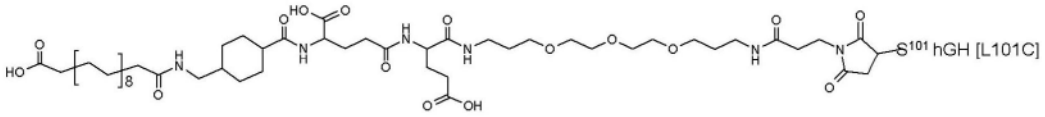


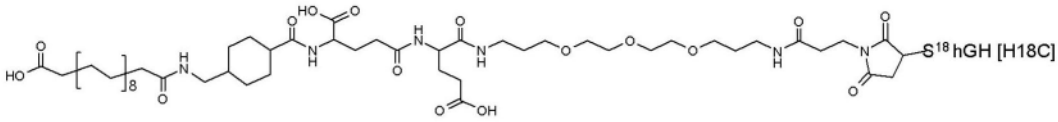


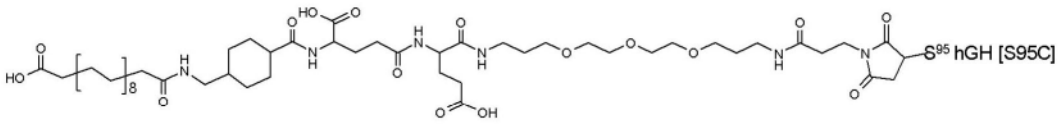
[0187]



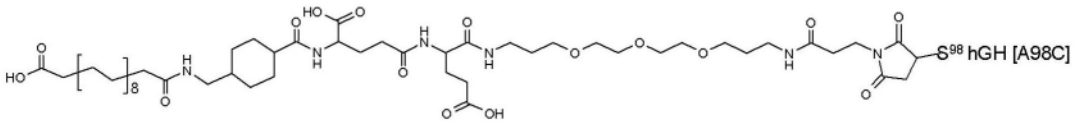
[0188] 在又一个实施方案中,GH缀合物选自

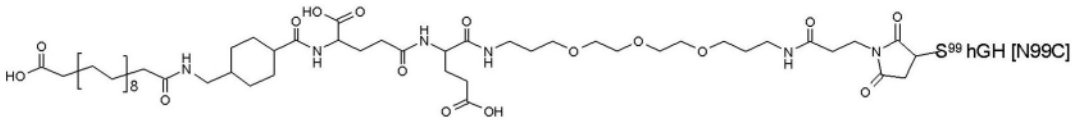


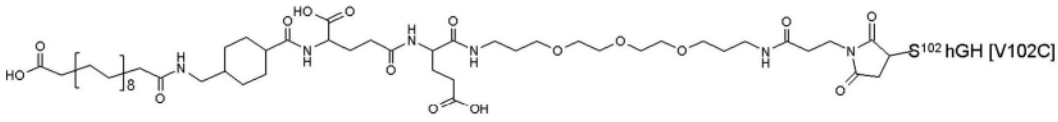


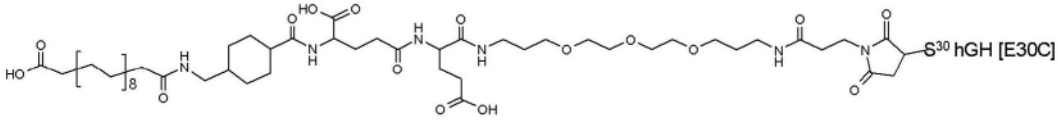


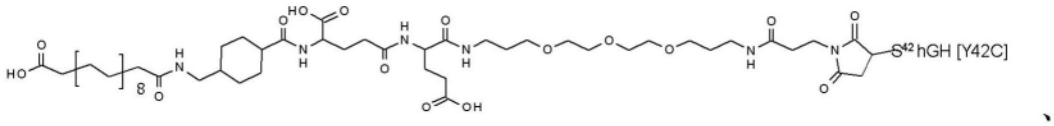
[0189]

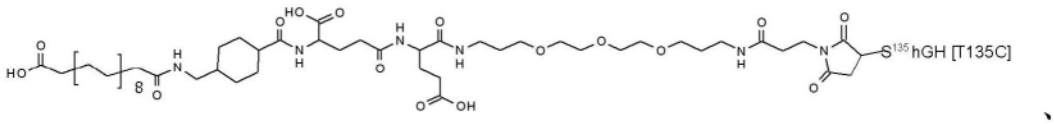


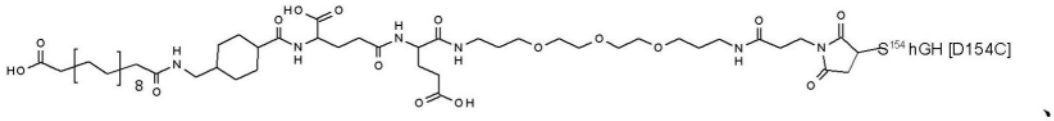


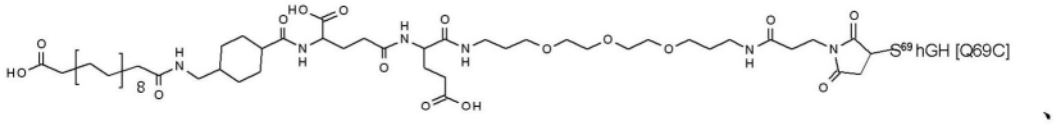


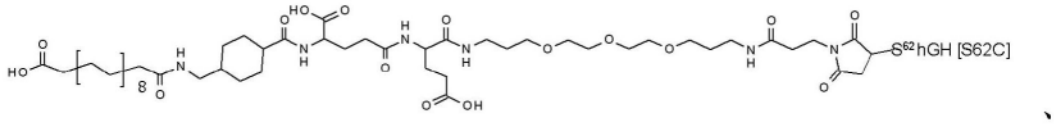



S42 hGH [Y42C]

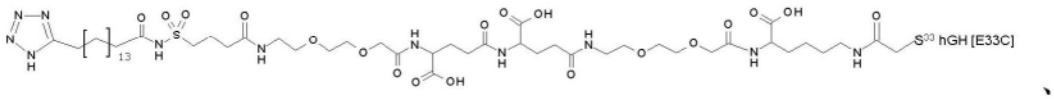

S135 hGH [T135C]

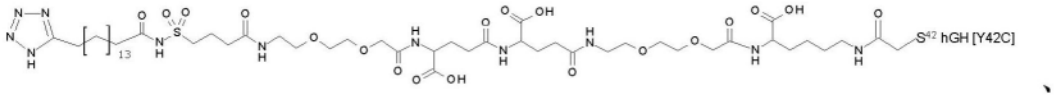

S154 hGH [D154C]

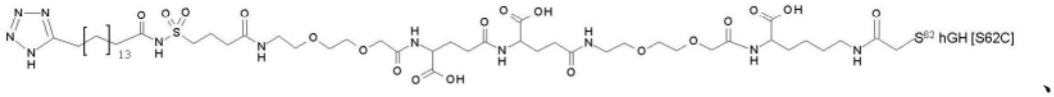

S69 hGH [Q69C]

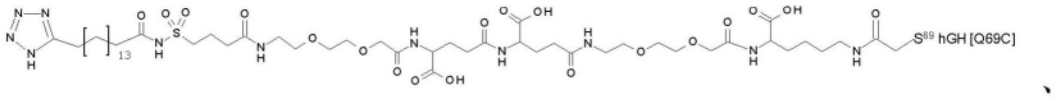

S62 hGH [S62C]

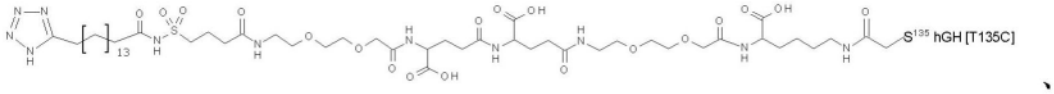
[0190]

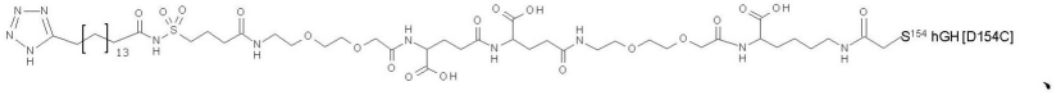

S33 hGH [E33C]

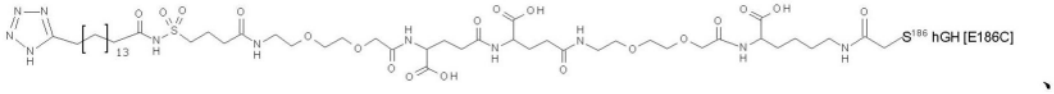

S42 hGH [Y42C]

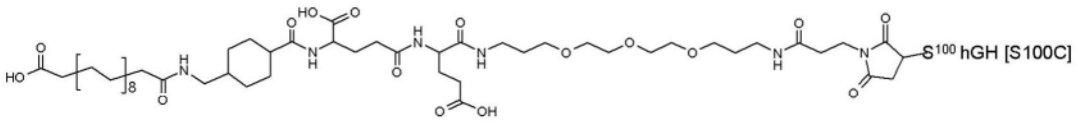

S62 hGH [S62C]

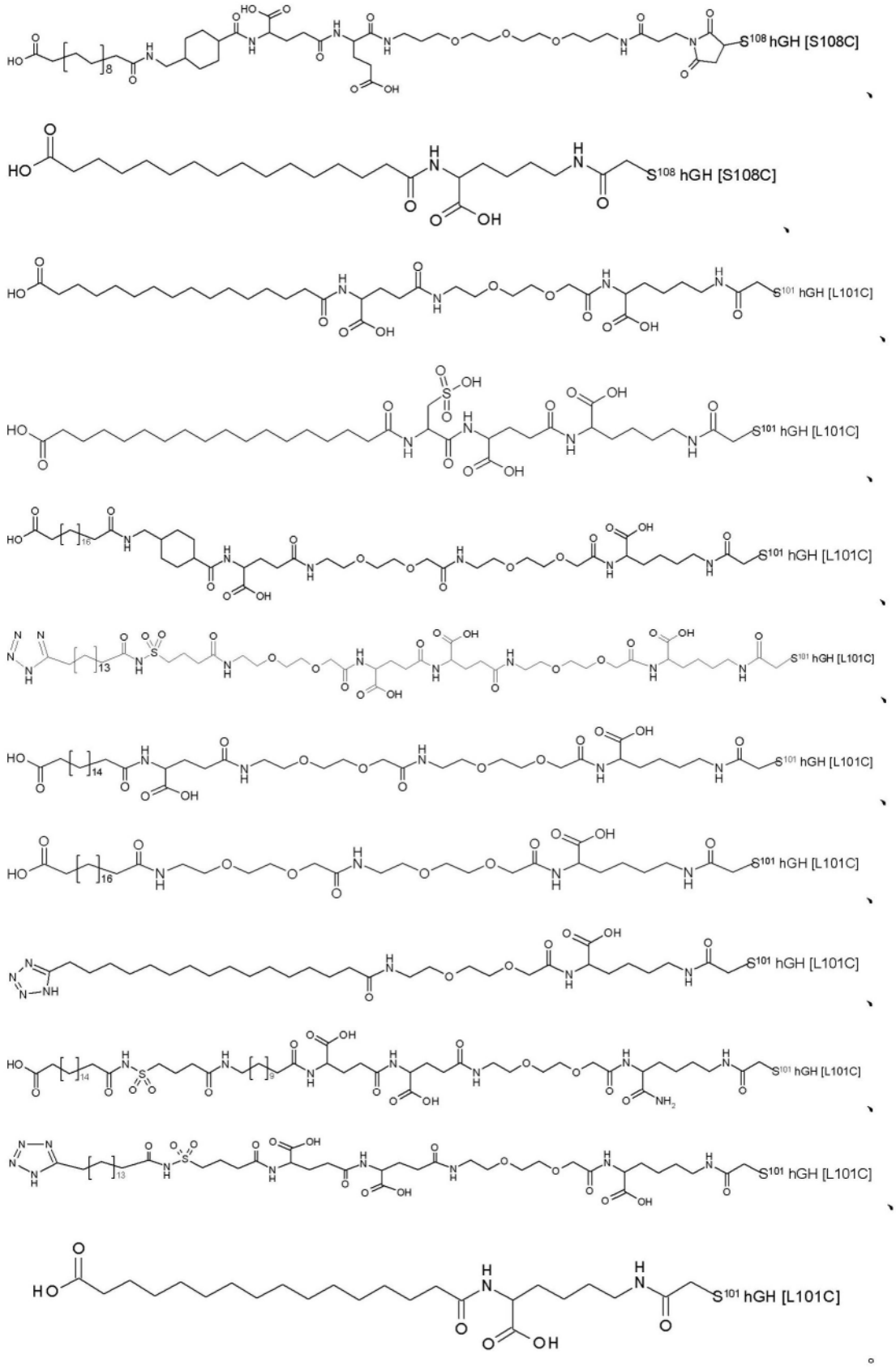

S69 hGH [Q69C]


S135 hGH [T135C]


S154 hGH [D154C]


S186 hGH [E186C]


S100 hGH [S100C]

[0191] 

[0192] 又一方面,本发明涉及具有下式(I)的生长激素缀合物及其药学上可接受的盐:

[0193] A-W-B-GH (I)

[0194] 其中

[0195] GH表示具有额外二硫键的生长激素化合物,

[0196] B表示亲水间隔基,

[0197] W是连接A和B的化学基团,和

[0198] A表示白蛋白结合残基。

[0199] 在又一个实施方案中,GH表示包含与人生长激素(hGH)的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)有至少90%同一性的氨基酸序列的生长激素化合物。在其它实施方案中,GH与hGH(SEQ ID NO:1)有至少80%、例如至少85%、例如至少95%、例如至少96%、例如至少97%、例如至少98%或例如至少99%同一性。在其它实施方案中,所述与hGH的同一性与用本文测定法I测定的hGH的生长激素活性的至少10%、例如至少20%、例如至少40%、例如至少60%、例如至少80%关联。任一个序列同一性实施方案可与任一个活性实施方案组合,例如GH与hGH有至少80%同一性并与hGH的生长激素活性的至少60%关联;GH与hGH有至少90%同一性并与hGH的生长激素活性的至少40%关联;GH与hGH有至少95%同一性并与hGH的生长激素活性的至少80%关联等等。

[0200] 在又一个实施方案中,缀合物的GH在环区段和螺旋区段之间或在环区段之内或在环区段之间或在螺旋区段之间包含额外的二硫键。

[0201] 在又一个实施方案中,缀合物的GH包含额外的二硫键,其中至少一个半胱氨酸存在于环区段(例如来自氨基酸残基128-154)中。

[0202] 在又一个实施方案中,缀合物的GH包含额外的二硫键,其中额外的二硫键将环区段,例如来自氨基酸残基128-154(H3)与螺旋区段例如螺旋B或螺旋2(相当于AA 72-98)连接。

[0203] 在又一个实施方案中,缀合物的GH包含额外的二硫键,其将螺旋2(相当于AA 72-98)与环3(相当于AA 128-154)连接。

[0204] 在又一个实施方案中,缀合物的GH包含介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间的额外二硫键:R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C和/或V185C/S188C。

[0205] 在又一个实施方案中,额外的二硫键介于相当于hGH(SEQ ID NO:1)的以下位置中的至少一个氨基酸对之间:R16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C和/或V185C/S188C。

[0206] 在又一个实施方案中,缀合物的GH包含介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间的额外二硫键:A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、

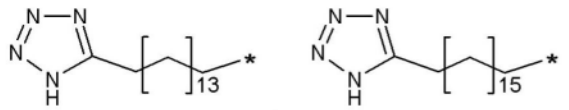
F92C/T148C和/或R94C/D107C。

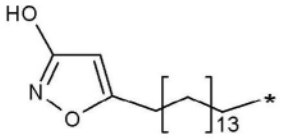
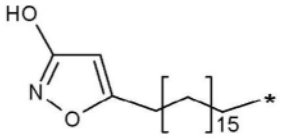
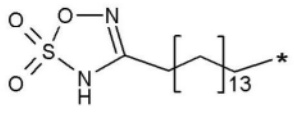
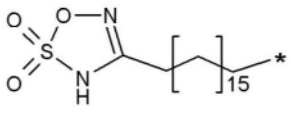
[0207] 在又一个实施方案中,额外的二硫键介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间:D26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C和/或R94C/D107C。

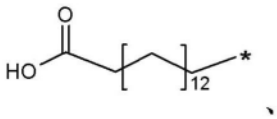
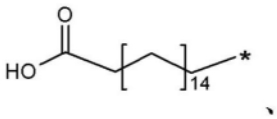
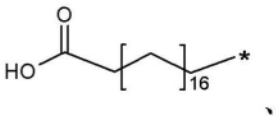
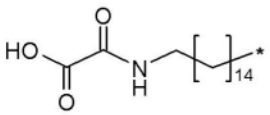
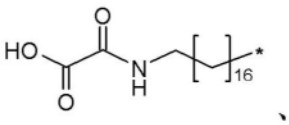
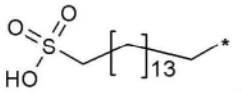
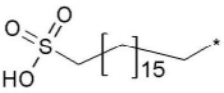
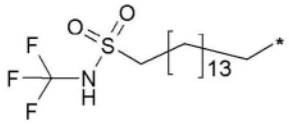
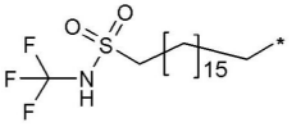
[0208] 在又一个实施方案中,缀合物的GH包含介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间的额外二硫键:H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C和/或S85C/S144C。

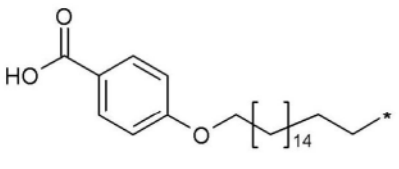
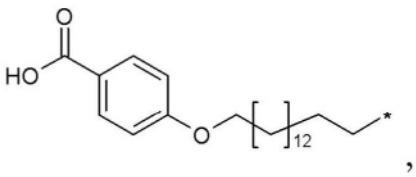
[0209] 在又一个实施方案中,缀合物的GH包含介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间的额外二硫键:S57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C和/或S85C/S144C。

[0210] 在又一个实施方案中,A选自


、

、

、

、

、

、

[0211]

、

、

、

、

、

、

、

、

、

[0212]

、

，

[0213] 其中*表示通过W与B连接。

[0214] 在又一个实施方案中,W具有下式

[0215] $-W_7-Y-$,

[0216] 其中

[0217] Y为$-(CH_2)_{I7}-C_{3-10}$-环烷基$-W_8-$或价键,

[0218] I7为0-6,

[0219] W_7选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)$NHS(0)_2$-、-$S(0)_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)0-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s3}$-、-C(0)-、-C(0)0-、-OC(0)-或价键;其中s3为0或1,

[0220] W_8选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)$NHS(0)_2$-、-$S(0)_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)0-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s4}$-、-C(0)-、-C(0)0-、-OC(0)-或价键;其中s4为0或1。

[0221] 在其它实施方案中,B包含一个或多个OEG和/或一个或多个上述γ-Glu基序或者由一个或多个OEG和/或一个或多个上述γ-Glu基序组成。

[0222] 在又一个实施方案中,B具有下式

[0223] $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0224] 其中

[0225] X_1为$-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

[0226] X_2为$-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

[0227] X_3为$-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$,

[0228] X_4为F-D1-$(CH_2)_{I6}$-D2-,

[0229] I1、I2、I3、I4、I5和I6独立选自0-16,

[0230] m1、m3、m4、m6和m7独立选自0-10,

[0231] m2和m5独立选自0-25,

[0232] n1、n2、n3和n4独立选自0-16,

[0233] F为芳基、杂芳基(hetaryl)、吡咯烷-2,5-二酮或价键,其中芳基和杂芳基任选被卤素、-CN、-OH、-C(0)OH、-C(0)NH_2、-$S(0)_2$OH或C_{1-6}-烷基取代,

[0234] R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(0)OH、-C(0)NH_2、-S(0)OH、-$S(0)_2$OH、-NH-C(=NH)-NH_2、C_{1-6}-烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(0)OH、-C(0)NH_2、-S(0)OH、-$S(0)_2$OH、-CN或-OH取代,

[0235] D1、D2、E1和E2独立选自-O-、-N(R^6)-、-N(C(0)R^7)-或价键;其中R^6和R^7独立表示氢或C_{1-6}-烷基,

[0236] W_1-W_5独立选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)$NHS(0)_2$-、-$S(0)_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)0-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s2}$-、-C(0)-、-C(0)0-、-OC(0)-或价键;其中s2为0或1,W_6选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)$NHS(0)_2$-、-$S(0)_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)0-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s1}$-、-C(0)-、-C(0)0-、-OC(0)-、-NHC(0)C_{1-6}-烷基、-C(0)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中s1为0或1,C_{1-6}-烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(0)CH*CH_2COOH或-NHC(0)CH_2CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0237] 在又一个实施方案中,I1、I2、I3、I4、I5和I6独立地为0-6。

[0238] 在又一个实施方案中,m1、m3、m4、m6和m7独立地为0-6。

[0239] 在又一个实施方案中,m2和m5独立地为0-10。

[0240] 在又一个实施方案中,n1、n2、n3和n4独立地为0-10。

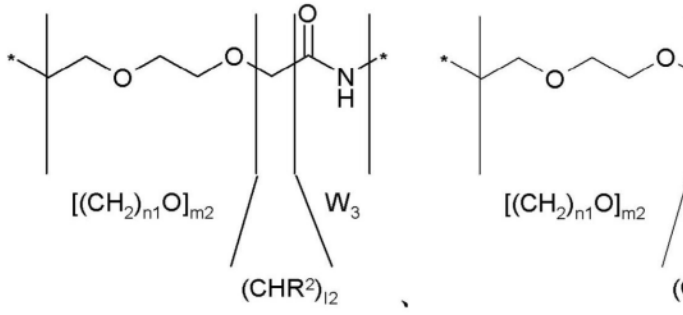
[0241] 在又一个实施方案中,D1和D2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

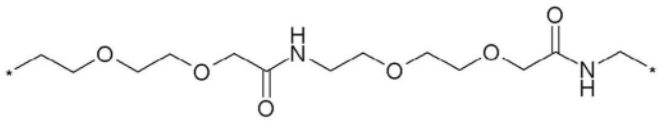
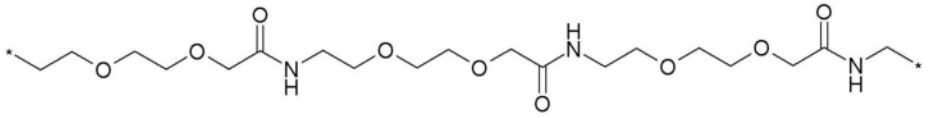
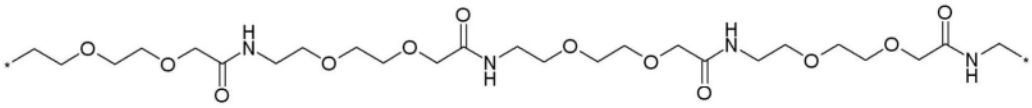
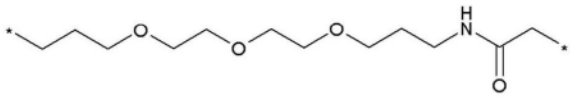
[0242] 在又一个实施方案中,E1和E2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

[0243] 在又一个实施方案中,W_1-W_8独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-、-NHC(O)C_{1-6}-烷基、-C(O)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH.取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0244] 在又一个实施方案中,R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基;其中C_{1-6}-烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH_2或-S(O)$_2$OH取代。

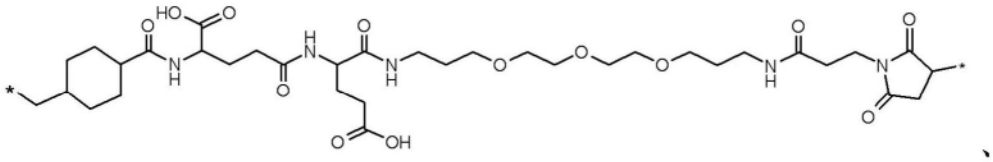
[0245] 在又一个实施方案中,-{[$(CH_2)_{n1}$E1]$_{m2}$-[$(CHR^2)_{I2}$-W_3]$_{m3}$}$_{n2}$-和-{[$(CH_2)_{n3}$E2]$_{m5}$-[$(CHR^4)_{I4}$-W_5]$_{m6}$}$_{n4}$-(其中E1和E2为-O-)选自

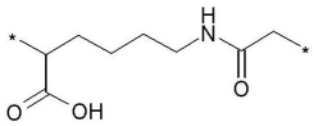
[0246] 

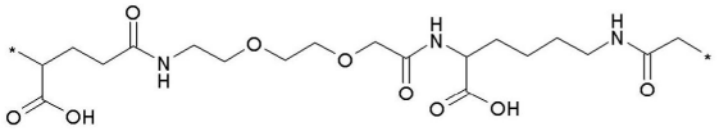
、

、

、

和

,

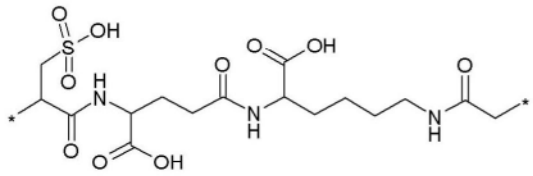
[0247] 其中*意欲表示连接点,即开放键。

[0248] 在又一个实施方案中,B选自

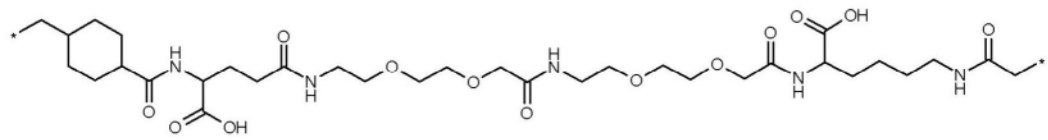


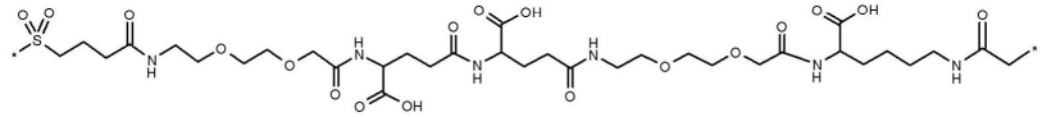


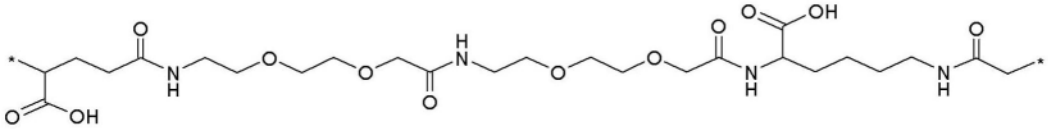


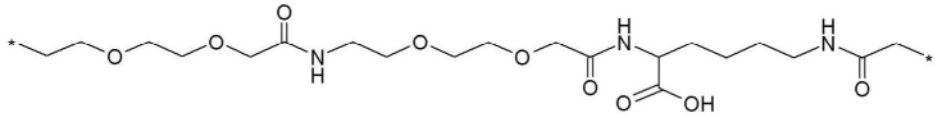


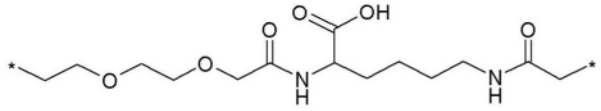
[0249]

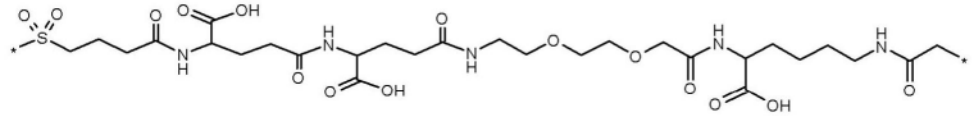


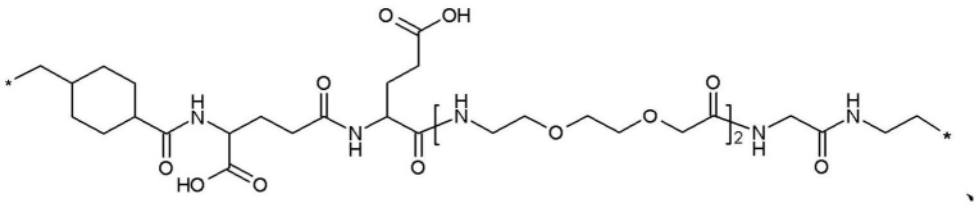




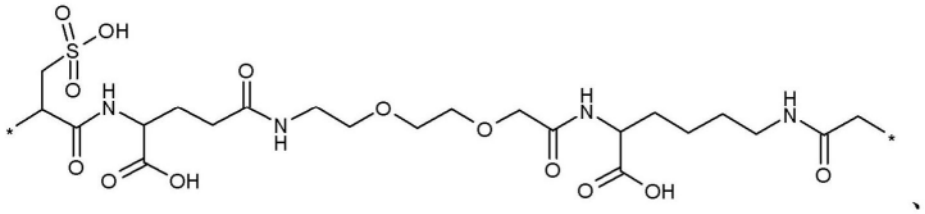


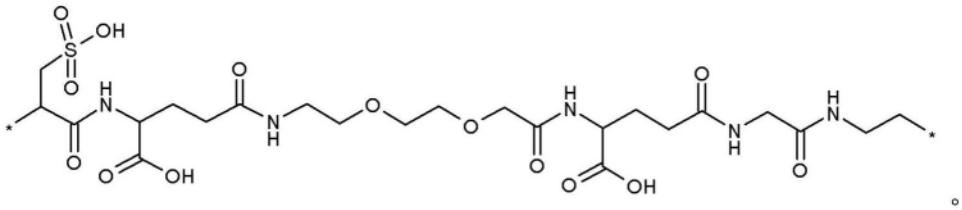






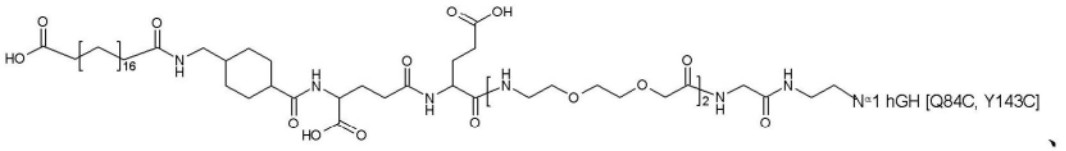
[0250]

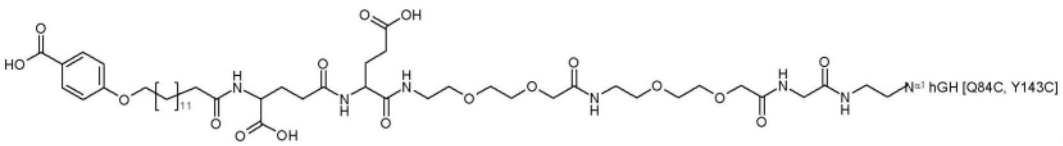




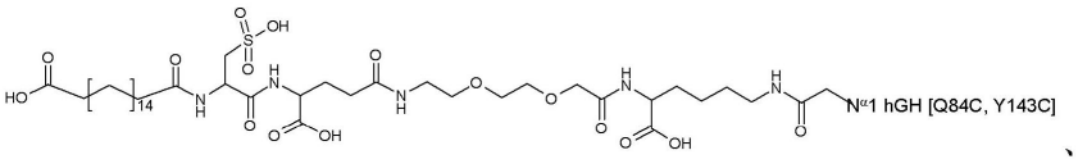
[0251] 在又一个实施方案中,A通过B与相当于SEQ ID NO:1中40位、141位的位置上的谷氨酰胺残基或生长激素化合物的N端残基连接。

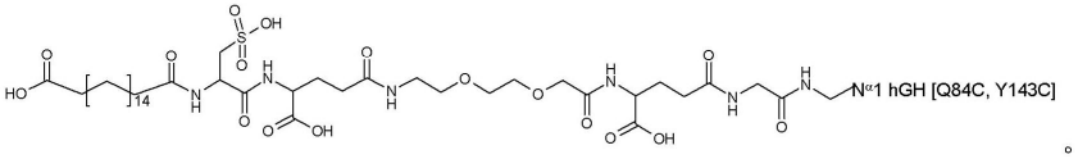
[0252] 在又一个实施方案中,GH缀合物选自





[0253]





[0254] 又一方面,本发明涉及生长激素缀合物及其药学上可接受的盐,其中生长激素缀合物具有下式(I):

[0255] A-W-B-GH (I)

[0256] 其中

[0257] GH表示具有单个Cys突变和额外二硫键的生长激素化合物,

[0258] B表示与Cys突变的硫残基连接的亲水间隔基,

[0259] W是连接A和B的化学基团,和

[0260] A表示白蛋白结合残基。

[0261] 在又一个实施方案中,GH表示包含与人生长激素(hGH)的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)有至少90%同一性的氨基酸序列的生长激素化合物。在其它实施方案中,GH与hGH(SEQ ID NO:1)具有至少80%、例如至少85%、例如至少95%、例如至少96%、例如至少97%、例如至少98%或例如至少99%同一性。在其它实施方案中,所述与hGH的同一性与用本文测定法I测定的hGH的生长激素活性的至少10%、例如至少20%、例如至少40%、例如至少60%、例如至少80%关联。任一个序列同一性实施方案可与任一个活性实施方案组合,例如GH与hGH有至少80%同一性并与hGH的生长激素活性的至少60%关联;GH与hGH有至少90%同一性并与hGH的生长激素活性的至少40%关联;GH与hGH有至少95%同一性并与hGH的生长激素活性的至少80%关联等等。

[0262] 在其它实施方案中,缀合物的GH具有额外的二硫键和选自GH的N端、H1、H2、L2或H3区中的单个Cys突变中任一个的单个Cys突变。在其它这类实施方案中,单个Cys突变位于N端,所述突变是例如T3C、P5C、S7C的任一个或在H1(相当于AA 9-35)中;所述突变是例如D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C的任一个或在L1(相当于AA36-71)中;所述突变是例如K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、S57C、P59C、S62C、E65C、Q69C的任一个或优选Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C的任一个或在H2、L2或H3(相当于AA 72-98、AA 99-106和AA 107-127)中;所述突变是例如hGH(SEQ ID NO:1)的E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C的任一个或在L3或H4(相当于AA128-154和AA155-184)中。在L3和H4(128-154和AA155-184)中,所述突变是例如E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180C的任一个或在C端,所述突变是例如E186C、G187C、G190C的任一个。

[0263] 如果单个Cys突变存在于hGH变体中,则该突变位于相应的氨基酸残基上。

[0264] 其它实施方案包括GH缀合物,其在GH中具有额外的二硫键和选自hGH(SEQ ID NO:1)的以下任一个的单个Cys突变:T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C和G190C,例如以下的任一个;T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C。

[0265] 在甚至更多的实施方案中,单个Cys突变位于hGH的AA 93-106或hGH变体的相应残基内。在其它特定的实施方案中,单个Cys突变位于L2内,例如在AA 99-106或AA 99-103或相应残基内。

[0266] 在其它实施方案中,额外的二硫键可以是在环区段和螺旋区段之间或在环区段之内或在环区段之间或在螺旋区段之间的额外二硫键。

[0267] 在又一个实施方案中,GH包含单个Cys突变型和额外的二硫键,其中至少一个半胱氨酸存在于环区段(例如来自氨基酸残基128-154(L3))中。

[0268] 在又一个实施方案中,GH包含单个Cys突变型和额外的二硫键,其中额外的二硫键将例如来自氨基酸残基128-154的环区段与螺旋区段例如螺旋B或螺旋2(相当于AA 72-98)连接。

[0269] 在又一个实施方案中,缀合物的GH包含单个Cys突变型和将螺旋2(相当于AA 72-98)与环3(相当于AA 128-154)连接的额外二硫键。

[0270] 在又一个实施方案中,缀合物的GH包含单个Cys突变型和额外二硫键,其介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间:R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C和/或V185C/S188C。

[0271] 在又一个实施方案中,额外的二硫键介于相当于hGH(SEQ ID NO:1)的以下位置中的至少一个氨基酸对之间:R16C/L117C、A17C/E174C、H18C/Y143C、H21C/M170C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/S144C、F54C/F146C、I58C/Q141C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C和/或V185C/S188C。

[0272] 在又一个实施方案中,缀合物的GH包含单个cys突变型和额外二硫键,其介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间:A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C和/或R94C/D107C。

[0273] 在又一个实施方案中,额外的二硫键介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间:D26C/V102C、D26C/Y103C、S57C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、F92C/T148C和/或R94C/D107C。

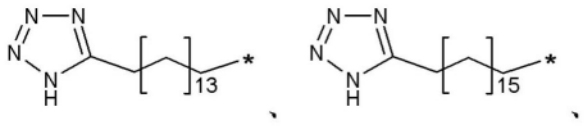
[0274] 在又一个实施方案中,额外的二硫键介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间:H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、F54C/Y143C、F54C/S144C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、S71C/S132C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C和/或S85C/S144C。

[0275] 在又一个实施方案中,额外的二硫键介于相当于SEQ ID NO:1的以下位置中的一个氨基酸对之间:S57C/Y143C,Q84C/Y143C,S85C/Y143C和/或S85C/S144C。

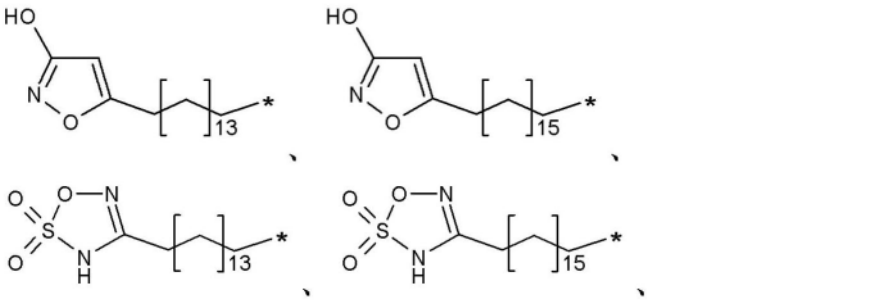
[0276] 在又一个实施方案中,GH包含L2中的单个半胱氨酸突变和额外二硫键,其将环区段例如来自氨基酸残基128-154(H3)与螺旋区段例如螺旋B或螺旋2(相当于AA 72-98)连接。

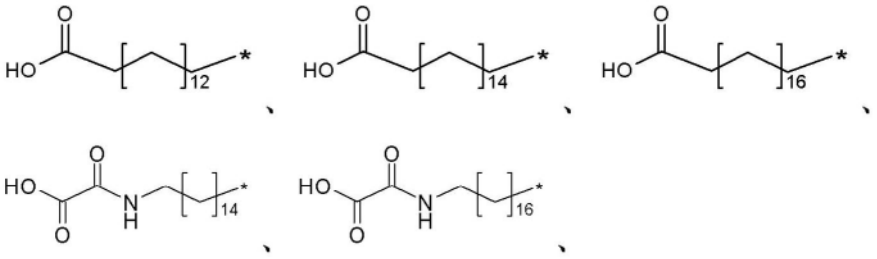
[0277] 在一个实施方案中,GH包含选自以下的突变的组合:A98C/Q84C/Y143C、A98C/S85C/Y143C、A98C/S85C/S144C、N99C/Q84C/Y143C、N99C/S85C/Y143C、N99C/S85C/S144C、S101C/Q84C/Y143C、S101C/S85C/Y143C、S101C/S85C/S144C、L101C/Q84C/Y143C、L101C/S85C/Y143C、L101C/S85C/S144C、C102C/Q84C/Y143C、C102C/S85C/Y143C和C102C/S85C/S144C。

[0278] 在又一个实施方案中,A选自

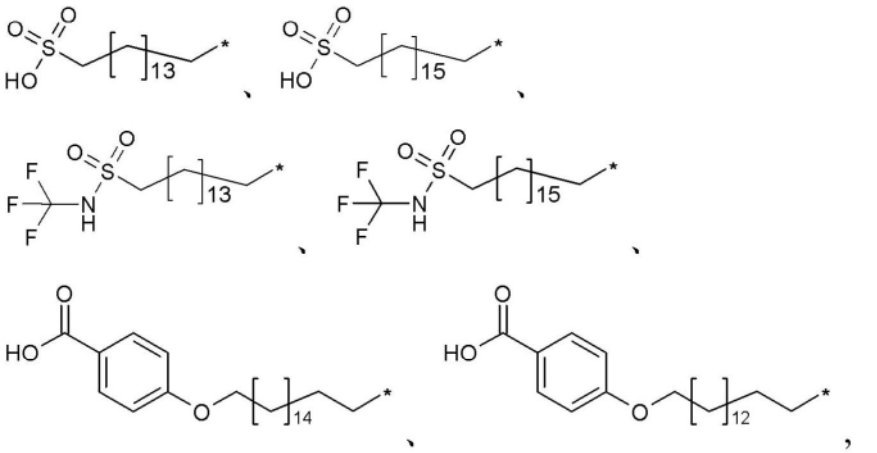


[0279]





[0280]



[0281] 其中*表示通过W与B连接。

[0282] 在又一个实施方案中,W具有下式

[0283] $-W_7-Y-$,

[0284] 其中

[0285] Y为$-(CH_2)_{I7}-C_{3-10}$-环烷基$-W_8-$或价键,

[0286] 17为0-6,

[0287] W_7选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)NHS(0)$_2$-、-S(0)$_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)O-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s3}$-、-C(0)-、-C(0)O-、-OC(0)-或价键;其中s3为0或1,

[0288] W_8选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)NHS(0)$_2$-、-S(0)$_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)O-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s4}$-、-C(0)-、-C(0)O-、-OC(0)-或价键;其中s4为0或1。

[0289] 在其它实施方案中,B包含一个或多个OEG和/或一个或多个上述γ-Glu基序或者

由一个或多个OEG和/或一个或多个上述γ-Glu基序组成。

[0290] 在又一个实施方案中,B具有下式

[0291] $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0292] 其中

[0293] X_1为$-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

[0294] X_2为$-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

[0295] X_3为$-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$,

[0296] X_4为F-D1-$(CH_2)_{I6}$-D2-,

[0297] I1、I2、I3、I4、I5和I6独立选自0-16,

[0298] m1、m3、m4、m6和m7独立选自0-10,

[0299] m2和m5独立选自0-25,

[0300] n1、n2、n3和n4独立选自0-16,

[0301] F为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键,其中芳基和杂芳基任选被卤素、-CN,-OH,-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基取代,

[0302] R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-S(O)$_2$OH、-NH-C(=NH)-NH_2、C_{1-6}-烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-S(O)$_2$OH、-CN或-OH取代,

[0303] D1、D2、E1和E2独立选自-O-、-N(R^6)-、-N(C(O)R^7)-或价键;其中R^6和R^7独立表示氢或C_{1-6}-烷基,

[0304] W_1-W_5独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(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,W_6选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s1}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O)C_{1-6}-烷基、-C(O)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中s1为0或1,C_{1-6}-烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0305] 在又一个实施方案中,I1、I2、I3、I4、I5和I6独立地为0-6。

[0306] 在又一个实施方案中,m1、m3、m4、m6和m7独立地为0-6。

[0307] 在又一个实施方案中,m2和m5独立地为0-10。

[0308] 在又一个实施方案中,n1、n2、n3和n4独立地为0-10。

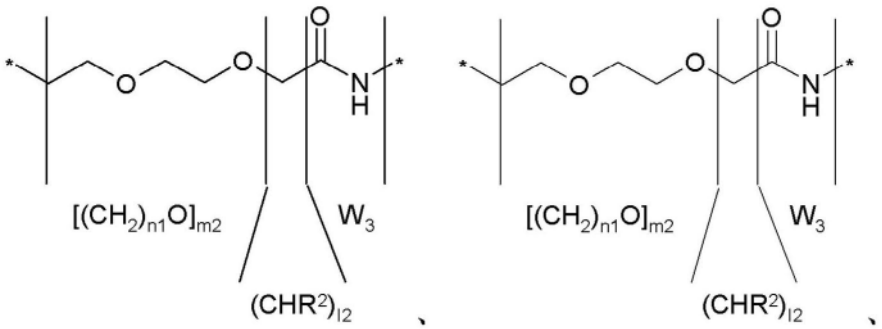
[0309] 在又一个实施方案中,D1和D2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

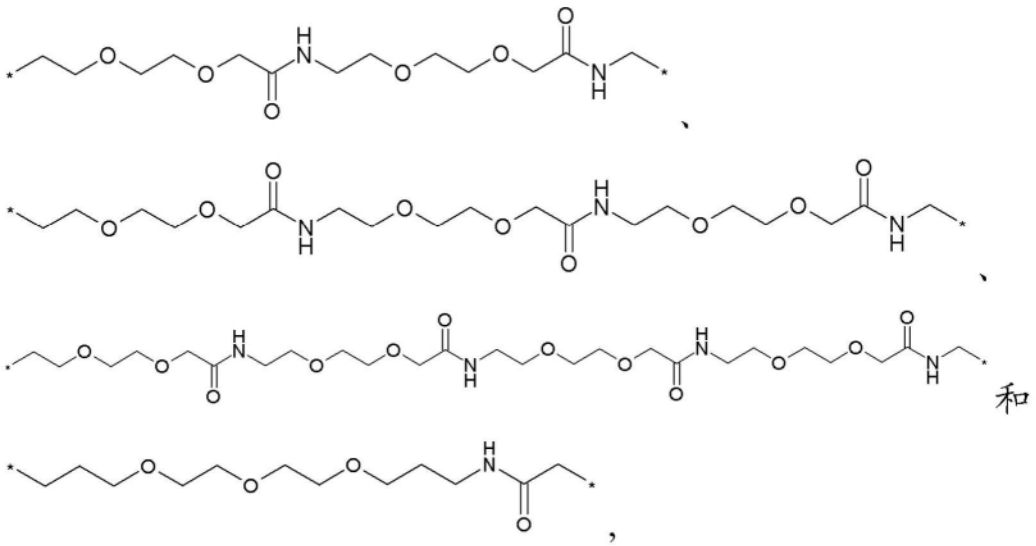
[0310] 在又一个实施方案中,E1和E2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

[0311] 在又一个实施方案中,W_1-W_8独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-、-NHC(O)C_{1-6}-烷基、-C(O)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0312] 在又一个实施方案中,R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基;其中C_{1-6}-烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH_2或-S(O)$_2$OH取代。

[0313] 在又一个实施方案中,-{[$(CH_2)_{n1}E1]_{m2}$-[$(CHR^2)_{I2}$-$W_3]_{m3}$}$_{n2}$-和-{[$(CH_2)_{n3}E2]_{m5}$-[$(CHR^4)_{I4}$-$W_5]_{m6}$}$_{n4}$-(其中E1和E2为-O-)选自

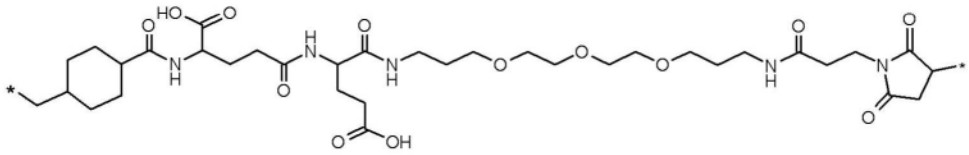
[0314] 

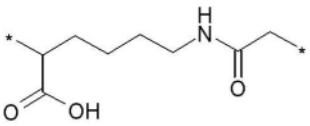
[0315] 
和

[0316] 其中*意欲表示连接点,即开放键。

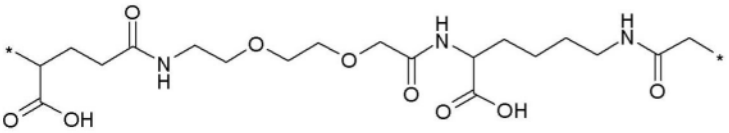
[0317] 在又一个实施方案中,X_4为价键,W_6选自吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH,其中(*)表示CH的碳原子与GH的连接点。

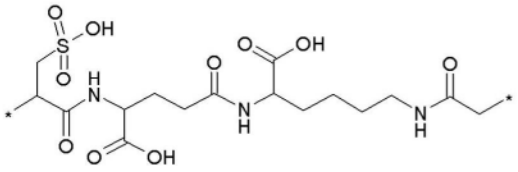
[0318] 在又一个实施方案中,B选自

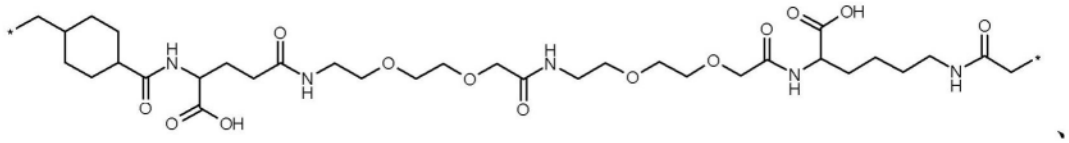




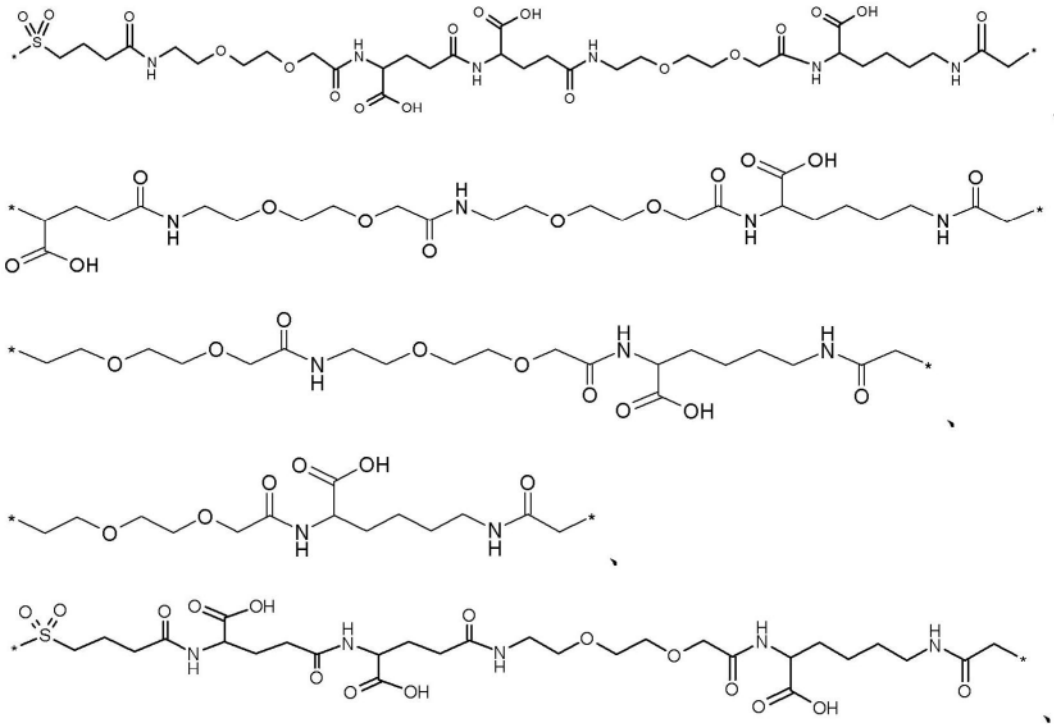
[0319]

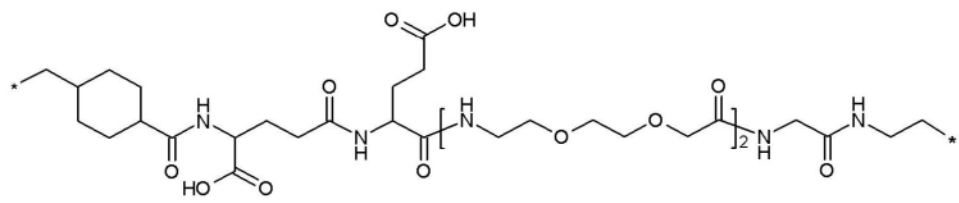


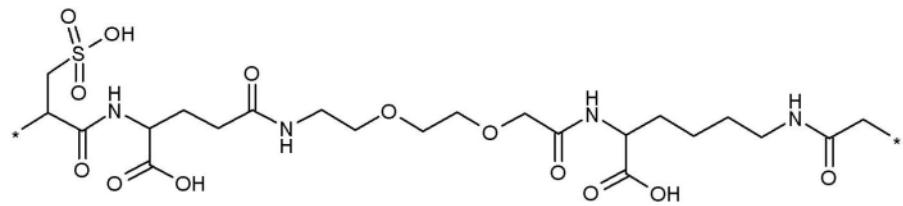


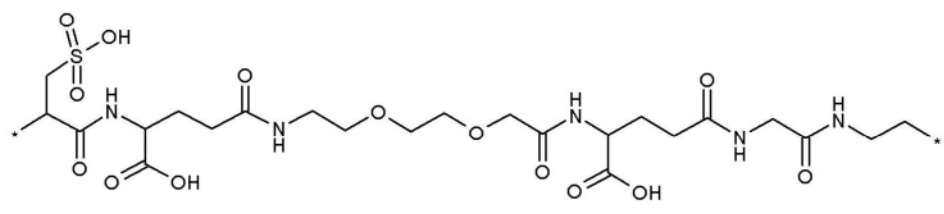


[0320]

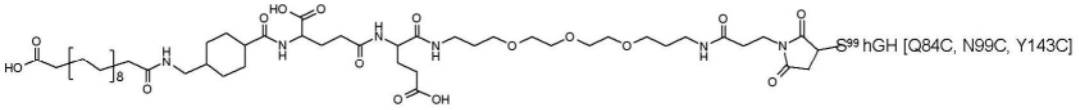




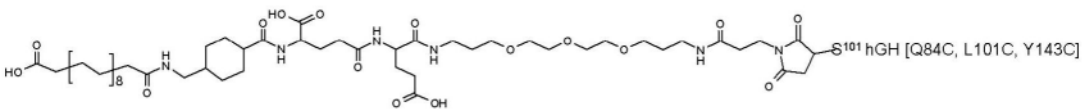


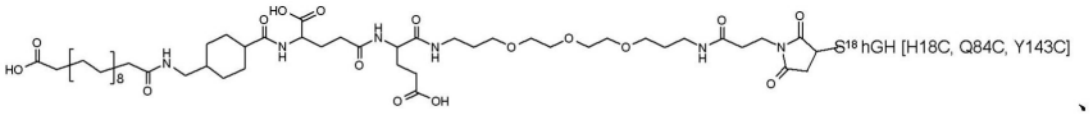


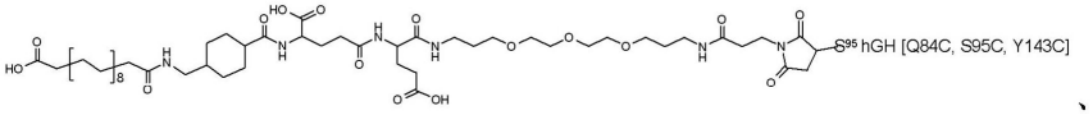
[0321] 在又一个实施方案中,GH缀合物选自

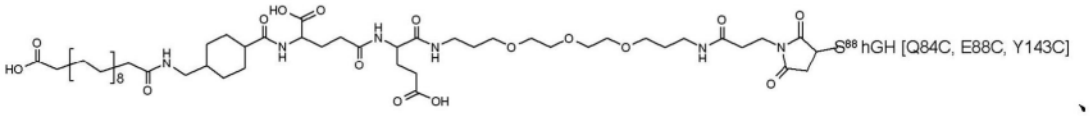


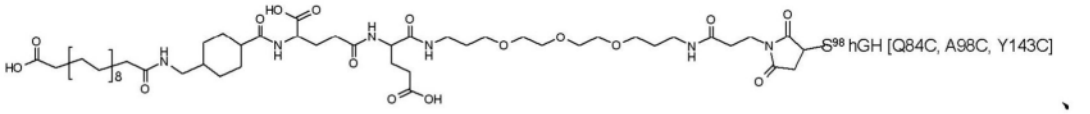
[0322]

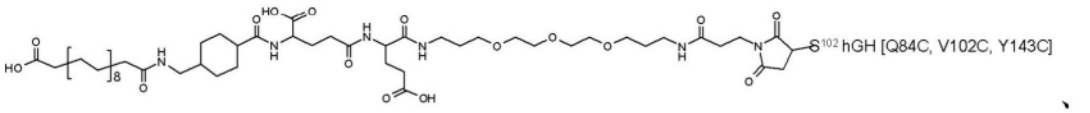


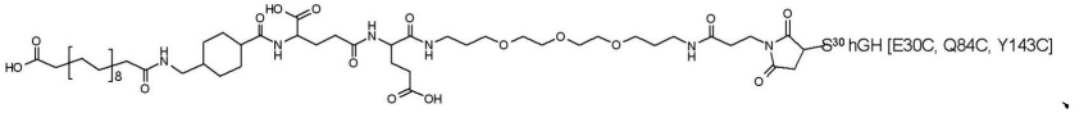

S18 hGH [H18C, Q84C, Y143C]


S95 hGH [Q84C, S95C, Y143C]

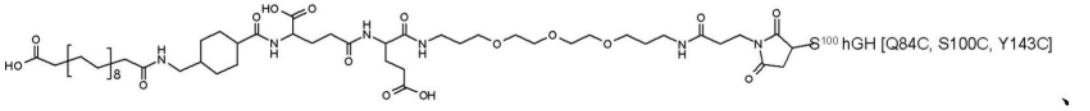

S88 hGH [Q84C, E88C, Y143C]

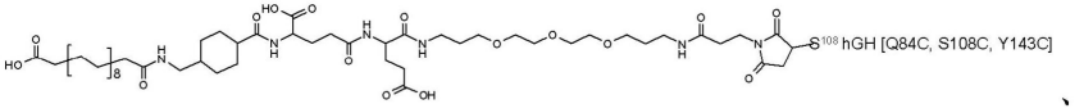

S98 hGH [Q84C, A98C, Y143C]

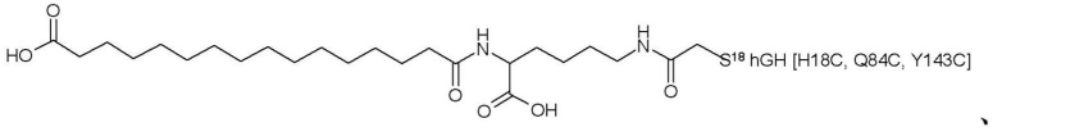

S102 hGH [Q84C, V102C, Y143C]

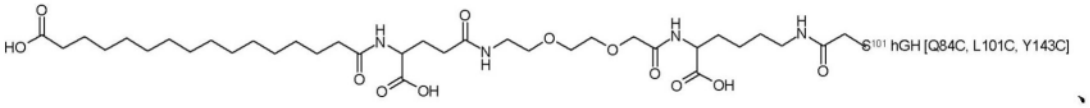

S30 hGH [E30C, Q84C, Y143C]

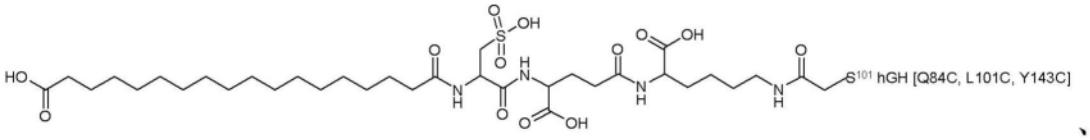
[0323]

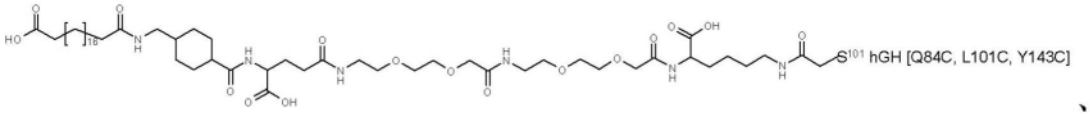

S100 hGH [Q84C, S100C, Y143C]

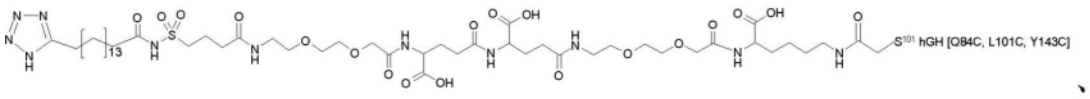

S108 hGH [Q84C, S108C, Y143C]

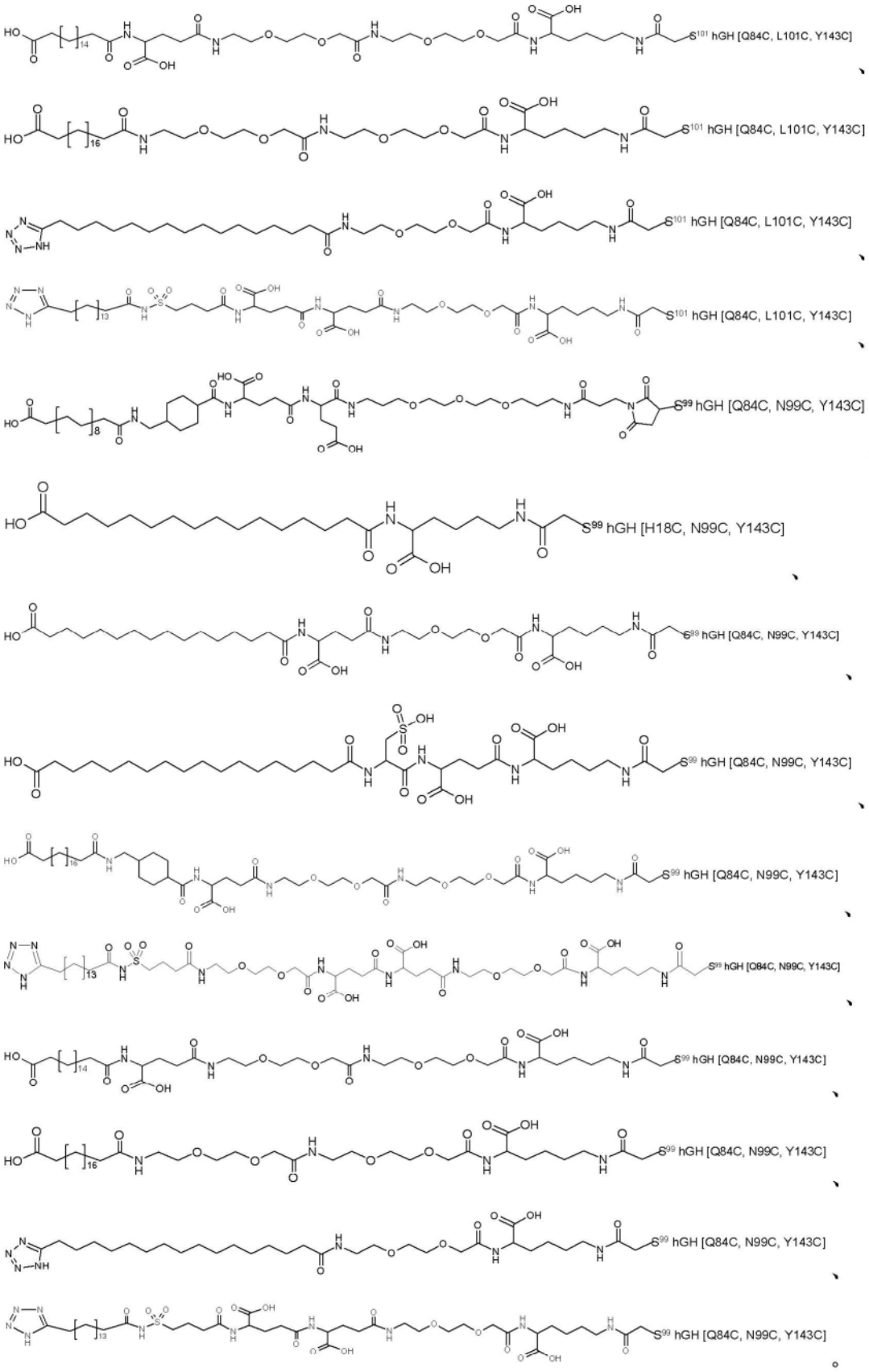

S18 hGH [H18C, Q84C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]



[0324]

[0325] 通常,本发明的缀合物具有通过亲水间隔基(B)(例如一个亲水间隔基(B))与生长激素化合物(GH)连接的一个白蛋白结合残基(A)。

[0326] 然而,生长激素化合物(GH)可通过亲水间隔基与2个白蛋白结合残基连接。

[0327] 因此,又一方面,本发明涉及下式(II)的生长激素缀合物及其药学上可接受的盐:

[0328] A-W-B-GH-B'-W'-A' (II)

[0329] 其中

[0330] GH表示具有单个Cys突变的生长激素化合物,

[0331] B和B'独立地为与Cys突变的硫残基连接的亲水间隔基,

[0332] W是连接A和B的化学基团,

[0333] W'是连接A'和B'的化学基团,

[0334] A和A'独立表示白蛋白结合残基。

[0335] 此外,另一方面,本发明涉及下式(II)的生长激素缀合物及其药学上可接受的盐:

[0336] A-W-B-GH-B'-W'-A' (II)

[0337] 其中

[0338] GH表示具有额外二硫键的生长激素化合物,

[0339] B和B'独立地为亲水间隔基,

[0340] W是连接A和B的化学基团,

[0341] W'是连接A'和B'的化学基团,

[0342] A和A'独立表示白蛋白结合残基。

[0343] 再一方面,本发明涉及下式(II)的生长激素缀合物及其药学上可接受的盐:

[0344] A-W-B-GH-B'-W'-A' (II)

[0345] 其中

[0346] GH表示具有单个Cys突变和额外二硫键的生长激素化合物,

[0347] B和B'独立地为与Cys突变的硫残基连接的亲水间隔基,

[0348] W是连接A和B的化学基团,

[0349] W'连接A'和B'的化学基团,

[0350] A和A'独立表示白蛋白结合残基。

[0351] 在上述式(II)的缀合物中,W'选自与W相同的基团,A'选自与A相同的基团,B'选自与B相同的基团,而且要理解的是W和W'、A和A'及B和B'独立选自如本文定义的相应基团的任一个。因此,本文W、A和B的任何实施方案也是W'、A'和B'的实施方案。此外,本文所述任一个实施方案独立地是指式(I)和式(II)的缀合物两者以及适当时其宽的方面和实施方案。

[0352] 上述实施方案以及下述实施方案应视为是指本文所述的任一个方面以及本文所述的任一个的实施方案,除非具体说明实施方案涉及本发明的某一方面或某些方面。

[0353] 在一个实施方案中,GH是hGH的变体,其中变体要理解为是通过以下方法而获得的化合物:将hGH序列的一个或多个氨基酸残基用另一个天然或非天然的氨基酸取代;和/或通过将一个或多个天然或非天然的氨基酸添加至hGH序列;和/或通过缺失hGH序列中的一个或多个氨基酸残基,其中这些步骤的任一个可任选随后对一个或多个氨基酸残基的进行进一步衍生化。

[0354] 在又一个实施方案中,GH表示包含与人生长激素(hGH)的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)有至少90%同一性的氨基酸序列的生长激素化合物。在其它实施方案中,GH与hGH(SEQ ID NO:1)具有至少80%、例如至少85%、例如至少95%、例如至少96%、例如至少97%、例如至少98%或例如至少99%同一性。在其它实施方案中,所述与hGH的同一性与用本文测定法

I测定的hGH的生长激素活性的至少10％、例如至少20％、例如至少40％、例如至少60％、例如至少80％关联。任一个序列同一性实施方案可与任一个活性实施方案组合,例如GH与hGH有至少80％同一性并与hGH的生长激素活性的至少60％关联;GH与hGH有至少90％同一性并与hGH的生长激素活性的至少40％关联;GH与hGH有至少95％同一性并与hGH的生长激素活性的至少80％关联等等。

[0355] 在再一个实施方案中,GH是hGH(SEQ ID NO:1)。

[0356] 在其它实施方案中,B包含一个或多个OEG和/或一个或多个上述γ-Glu基序或者由一个或多个OEG和/或一个或多个上述γ-Glu基序组成。

[0357] 在式(I)或式(II)的缀合物的又一个实施方案中,亲水间隔基B具有下式

[0358] $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0359] 其中

[0360] X_1为$-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)I_2-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

[0361] X_2为$-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

[0362] X_3为$-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$,

[0363] X_4为F-D1-$(CH_2)_{I6}$-D2-,

[0364] I1、I2、I3、I4、I5和I6独立选自0-16,

[0365] m1、m3、m4、m6和m7独立选自0-10,

[0366] m2和m5独立选自0-25,

[0367] n1、n2、n3和n4独立选自0-16,

[0368] F为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键,其中芳基和杂芳基任选被卤素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基取代,

[0369] R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-S(O)$_2$OH、-NH-C(=NH)-NH_2、C_{1-6}-烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-S(O)$_2$OH、-CN或-OH取代,

[0370] D1、D2、E1和E2独立选自-O-、-N(R^6)-、-N(C(O)R^7)-或价键;其中R^6和R^7独立表示氢或C_{1-6}-烷基,

[0371] W_1-W_5独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(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,

[0372] W_6选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)v、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s1}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O)C_{1-6}-烷基、-C(O)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中s1为0或1,烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0373] 在又一个实施方案中,W_1选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-或价键。通常,W_1选自-C(O)NH-、-NHC(O)-或-C(O)NHS(O)$_2$-。

[0374] 在又一个实施方案中,W_2选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-或价键。通常,W_2选自-C(O)NH-、-NHC(O)-或-C(O)NHS(O)$_2$-。

[0375] 在又一个实施方案中,W_3选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C

(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-或价键。通常,W_3选自-C(O)NH-、-NHC(O)-或-C(O)NHS(O)$_2$-。

[0376] 在又一个实施方案中,W_4选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH$_2$-、-CH$_2$NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-或价键。通常,W_4选自-C(O)NH-、-NHC(O)-或-C(O)NHS(O)$_2$-。

[0377] 在又一个实施方案中,W_5选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH$_2$-、-CH$_2$NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-或价键。通常,W_5选自-C(O)NH-、-NHC(O)-或-C(O)NHS(O)$_2$-。

[0378] 在又一个实施方案中,W_6选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH$_2$NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-、-NHC(O)C_{1-6}-烷基、-C(O)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中烷基任选被吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH$_2$COOH或-NHC(O)CH$_2$CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。通常,W_6选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-或-NHC(O)C_{1-6}-烷基。

[0379] 在又一个实施方案中,D1、D2、F均为价键,I6为0,W6选自吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH$_2$COOH或-NHC(O)CH$_2$CH*COOH,其中(*)表示CH的碳原子与GH的连接点。

[0380] 在又一个实施方案中,R^1选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)$_2$OH取代。通常,R^1选自-C(O)OH、-C(O)NH$_2$或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH$_2$或-S(O)$_2$OH取代。

[0381] 在又一个实施方案中,R^2选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)$_2$OH取代。通常,R^2选自-C(O)OH、-C(O)NH$_2$或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH$_2$或-S(O)$_2$OH取代。

[0382] 在又一个实施方案中,R^3选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)$_2$OH取代。通常,R^3选自-C(O)OH、-C(O)NH$_2$或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH$_2$或-S(O)$_2$OH取代。

[0383] 在又一个实施方案中,R^4选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)$_2$OH取代。通常,R^4选自-C(O)OH、-C(O)NH$_2$或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH$_2$或-S(O)$_2$OH取代。

[0384] 在又一个实施方案中,R^5选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)$_2$OH取代。通常,R^5选自-C(O)OH、-C(O)NH$_2$或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH$_2$或-S(O)$_2$OH取代。

[0385] 在又一个实施方案中,E1选自-O-或-N(R^6)-或价键。通常,E1选自-O-。

[0386] 在又一个实施方案中,E2选自-O-或-N(R^6)-或价键。通常,E2选自-O-。

[0387] 在又一个实施方案中,E1和E2两者均为-O-。

[0388] 在又一个实施方案中,E1和E2两者均为-N(R^6)-。

[0389] 在又一个实施方案中,F为苯基、吡咯烷-2,5-二酮或价键。

[0390] 在又一个实施方案中,D1选自-O-或-N(R^6)-或价键。通常,D1选自-N(R^6)-。

[0391] 在又一个实施方案中,D2选自-O-或-N(R^6)-或价键。通常,D1选自-N(R^6)-。

[0392] 在又一个实施方案中,I1为0-6,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0393] 在又一个实施方案中,I2为0-6,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0394] 在又一个实施方案中,I3为0-6,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0395] 在又一个实施方案中,I4为0-6,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0396] 在又一个实施方案中,I5为0-6,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0397] 在又一个实施方案中,I6为0-6,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0398] 在又一个实施方案中,m1为0-6,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0399] 在又一个实施方案中,m2为0-10,例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0400] 在又一个实施方案中,m3为0-5,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0401] 在又一个实施方案中,m4为0-5,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0402] 在又一个实施方案中,m5为0-10,例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0403] 在又一个实施方案中,m6为0-5,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0404] 在又一个实施方案中,m7为0-5,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0405] 在又一个实施方案中,n1为0-10,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0406] 在又一个实施方案中,n2为0-10,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0407] 在又一个实施方案中,n3为0-10,例如0、1、2、3、4、5或6。

[0408] 在又一个实施方案中,n4为0-10,例如0、1、2、3、4、5或6。

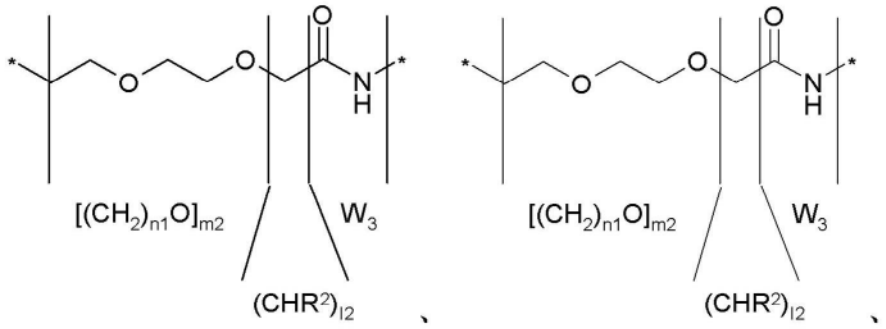
[0409] 在又一个实施方案中,

[0410] X_1为$-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

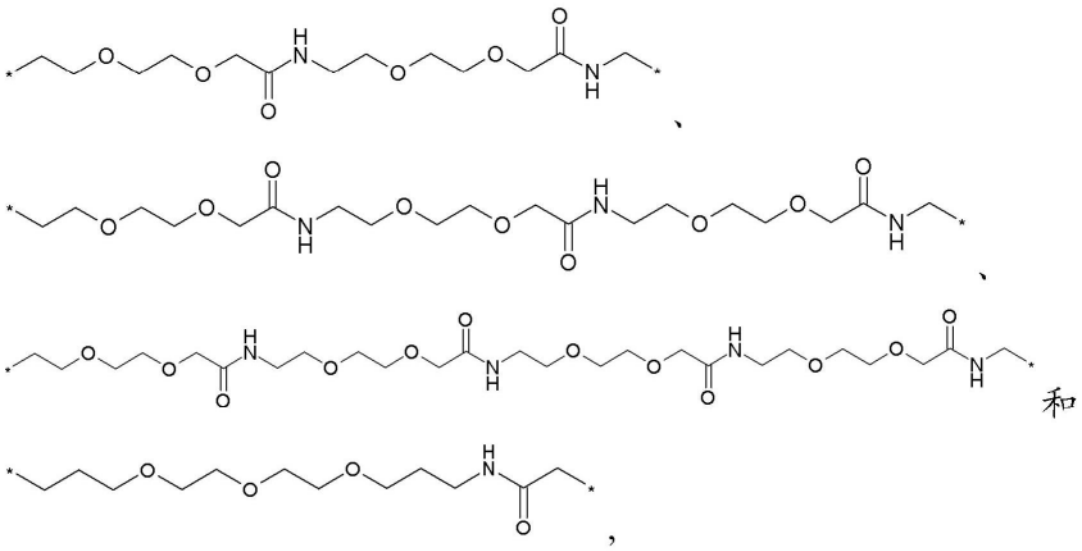
[0411] X_2为$-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

[0412] 其中$-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$和

[0413] $-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{I14}-$选自



[0414]



[0415] 其中*意欲表示连接点,即开放键。

[0416] 在又一个实施方案中,所述亲水间隔基的摩尔量在80道尔顿(D)-1500D的范围内或在300D-1100D的范围内。

[0417] 在再一个实施方案中,W具有下式

[0418] $-W_7-Y-$,

[0419] 其中

[0420] Y为$-(CH_2)_{I7}-C_{3-10}$-环烷基$-W_8-$或价键,

[0421] I7为0-6,

[0422] W_7选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s3}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或价键;其中s3为0或1,

[0423] W_8选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s4}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或价键;其中s4为0或1。

[0424] 在W的一个实施方案中,Y为$-(CH_2)_{I7}$-环已基$-W_8-$。

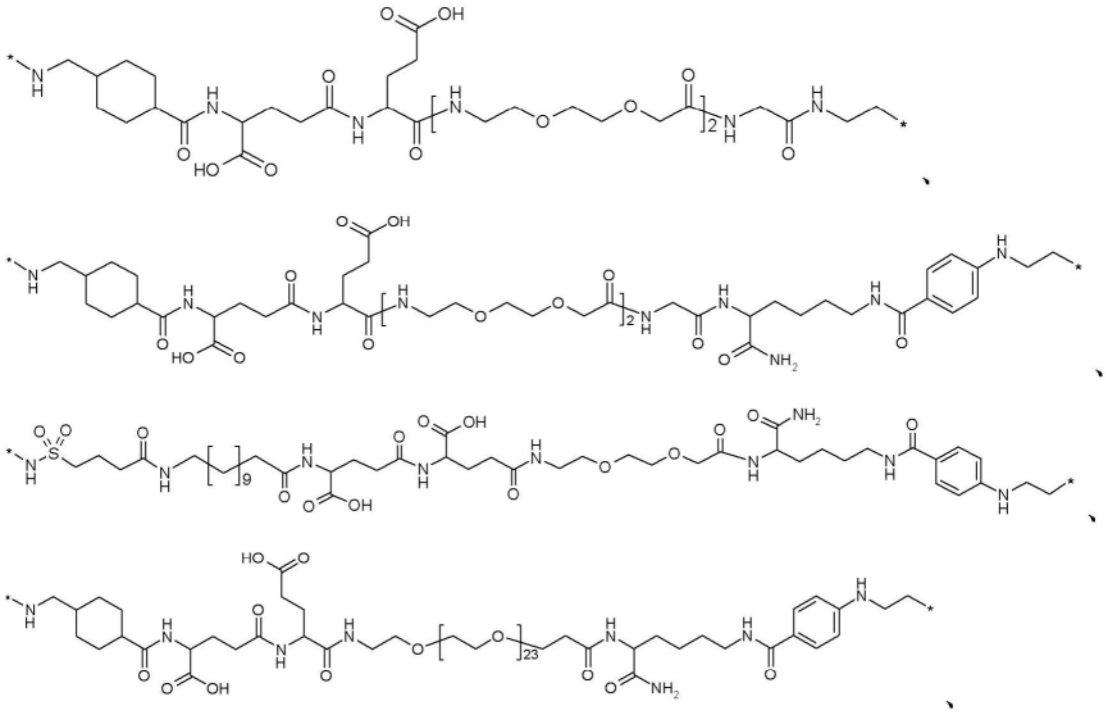
[0425] 在又一个实施方案中,Y为价键。

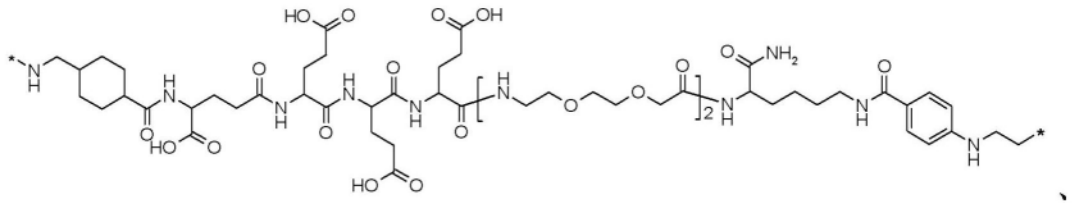
[0426] 在一个实施方案中,W_7选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-,-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(O)-或价键。通常,W_7选自-C(O)NH-、-NHC(O)-或-C(O)$NHS(O)_2$。

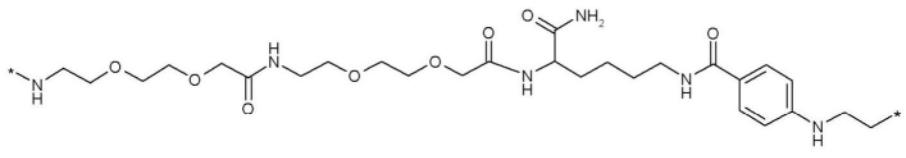
[0427] 在又一个实施方案中,W_8选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(O)-或价键。通常,W_8选自-C(O)NH-、-NHC(O)-或-C(O)$NHS(O)_2$。

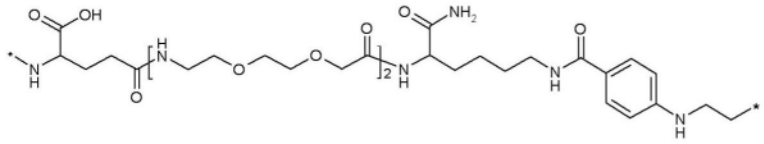
[0428] 在又一个实施方案中,I7为0或1。

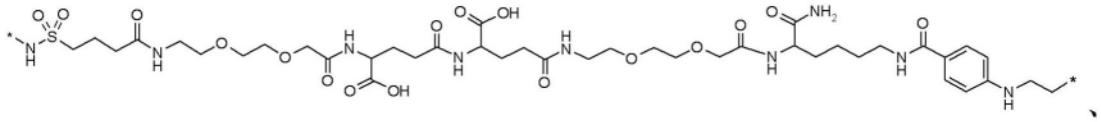
[0429] 在又一个实施方案中,本发明的亲水间隔基B选自

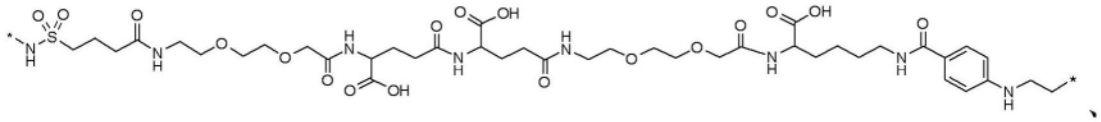
[0430] 



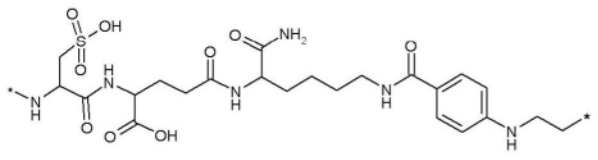


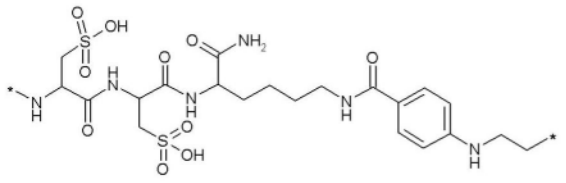


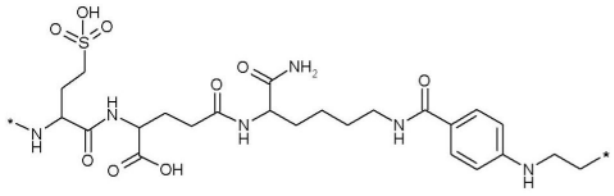


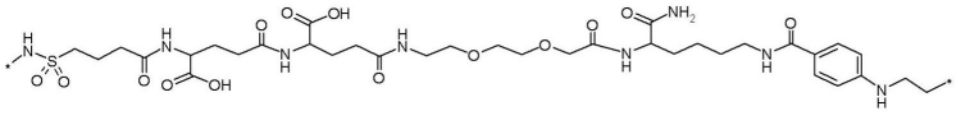


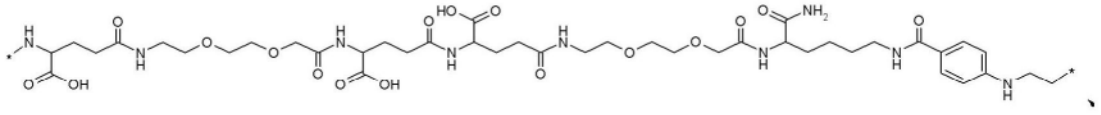
[0431]

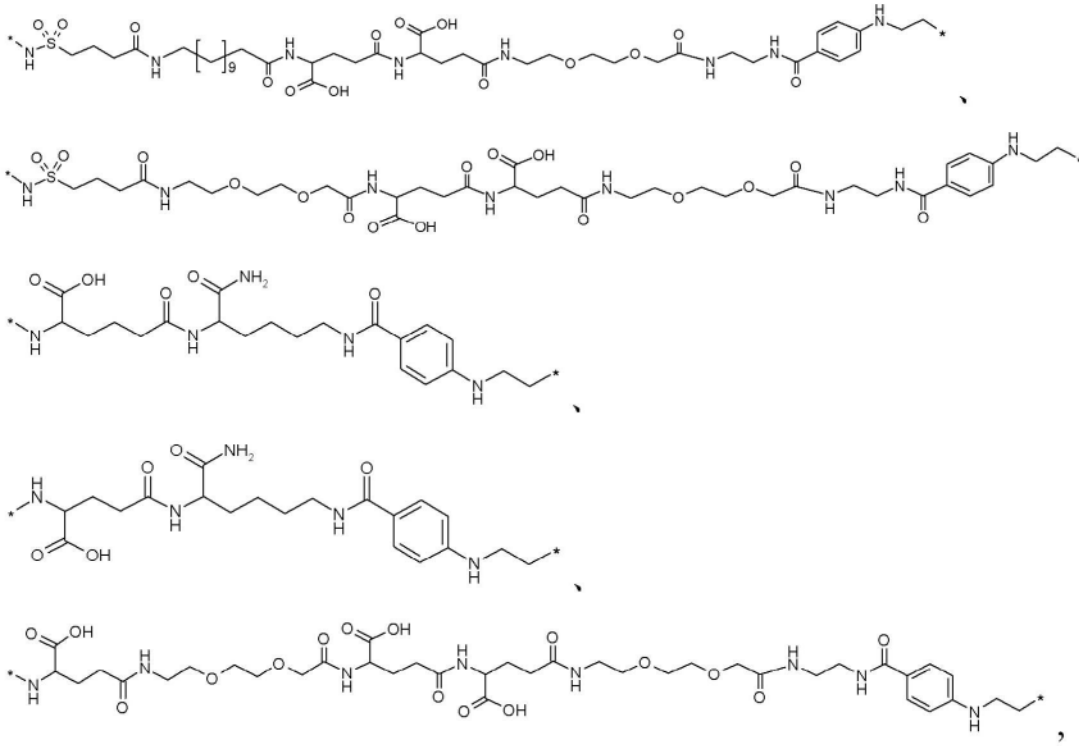










[0432] 

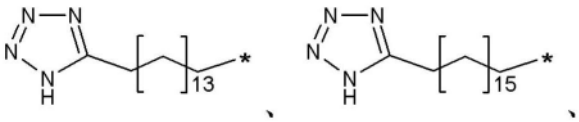
[0433] 其中*意欲表示连接点,即开放键。

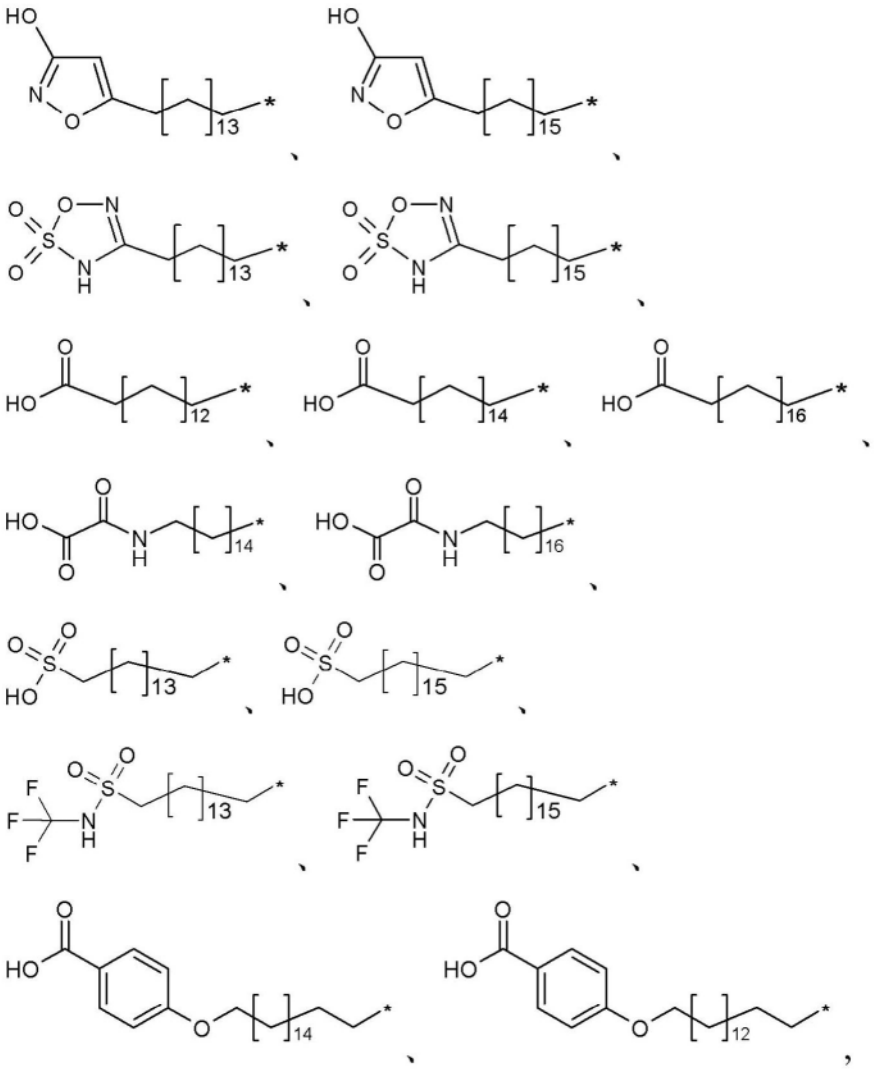
[0434] 与本发明的生长激素化合物连接的白蛋白结合残基(上述式(I)或式(II)的取代基A)是亲脂性残基,其与白蛋白非共价结合。通常,白蛋白结合残基在生理pH下带有负电荷,并且对人血清白蛋白的结合亲和力低于约10μM或甚至低于约1μM。

[0435] 在本发明的生长激素化合物的又一个实施方案中,白蛋白结合残基选自直链烷基、支链烷基、具有ω-羧酸基团或ω-羧酸等排体(isoster)的基团。通常,白蛋白结合残基具有6-40个碳原子。在又一个实施方案中,白蛋白结合残基具有8-26个碳原子。在又一个实施方案中,白蛋白结合残基具有8-20个碳原子。

[0436] 在又一个实施方案中,A具有14-26个碳原子并包含ω-羧酸基团。在又一个实施方案中,A具有14-26个碳原子和包含ω-羧酸等排体,例如四唑。

[0437] 在又一个实施方案中,A选自

[0438] 

[0439] 

[0440] 其中*表示通过W与B连接。

[0441] 优选以选择性方式将亲水间隔基(B)引入生长激素化合物(GH)的位置中以便能够控制:应将一个还是两个白蛋白结合残基(A)掺入生长激素化合物中。亲水间隔基(B)可与GH化合物的氨基酸侧链连接。这类氨基酸侧链可以是GH化合物的经化学修饰的氨基酸侧链。另一个这样的氨基酸侧链可以是GH化合物的酶促修饰的氨基酸侧链。优选使用转谷氨酰胺酶将亲水间隔基引入相当于SEQ ID NO:1的40位或141位的位置上的谷氨酰胺残基。选择性引入亲水间隔基的另一种方式是在生长激素化合物例如hGH(SEQ ID NO:1)的N端残基中。

[0442] 在式(I)的生长激素缀合物中,片段A-W-B可以是线性或支链的。在一个实施方案中,A-W-B不是线性肽。

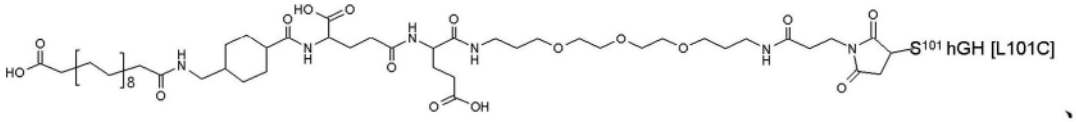
[0443] 在又一个实施方案中,白蛋白结合残基通过亲水间隔基在相当于SEQ ID NO:1的40位的位置上与谷氨酰胺残基连接。

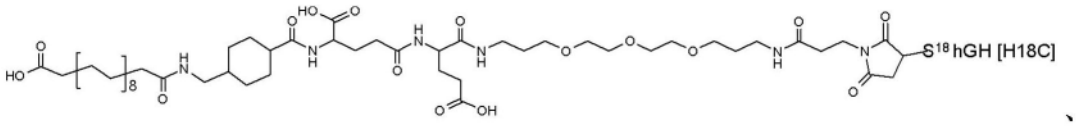
[0444] 在又一个实施方案中,白蛋白结合残基通过亲水间隔基在相当于SEQ ID NO:1的141位的位置上与谷氨酰胺残基连接。

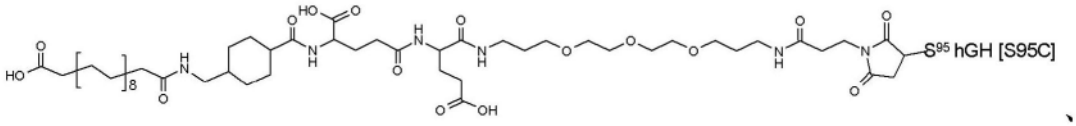
[0445] 在又一个实施方案中,白蛋白结合残基通过亲水间隔基与生长激素化合物例如hGH(SEQ ID NO:1)的N端残基连接。

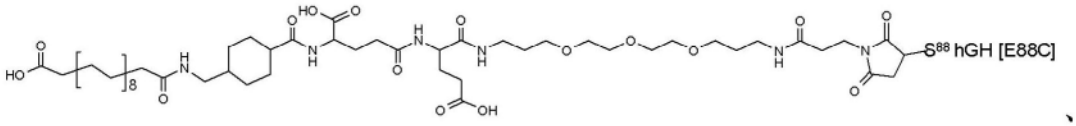
[0446] 在又一个实施方案中,白蛋白结合残基通过亲水间隔基与相当于生长激素化合物例如hGH(SEQ ID NO:1)的40位、141位的位置上的谷氨酰胺残基连接并与N端残基连接。

[0447] 本发明的生长激素缀合物选自

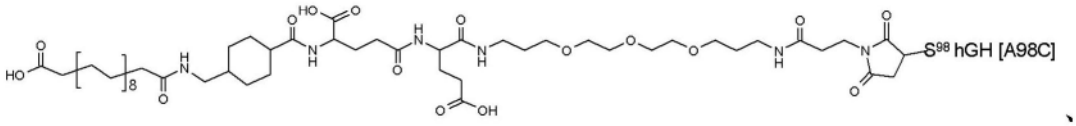


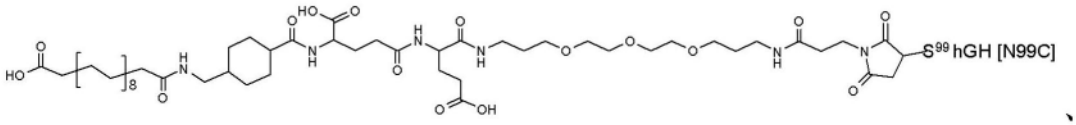


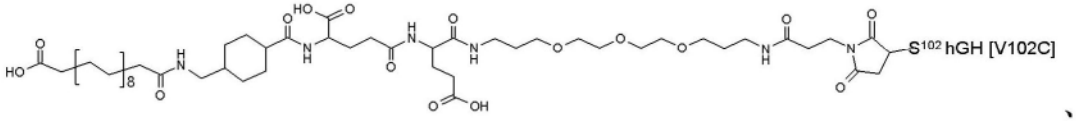


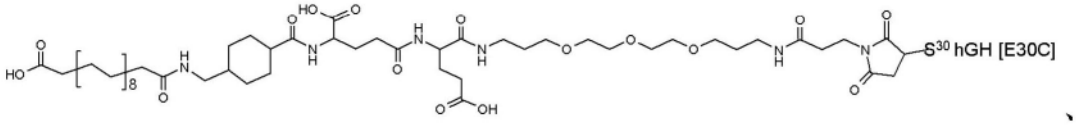


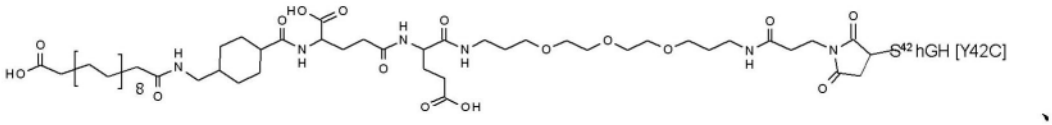
[0448]

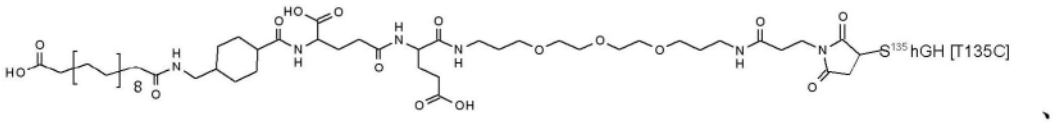


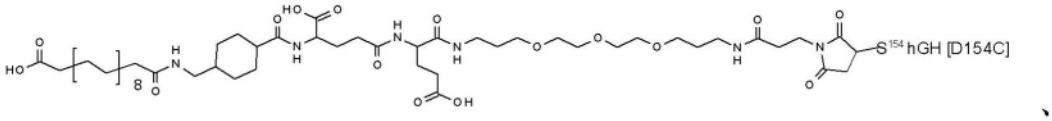


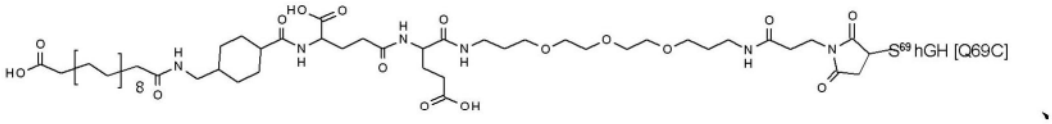


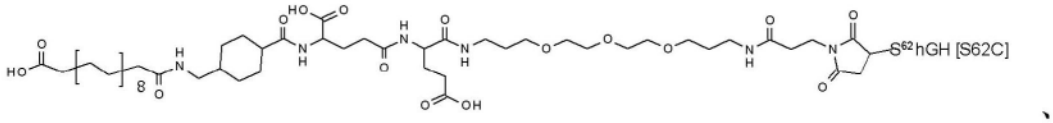



S42 hGH [Y42C]

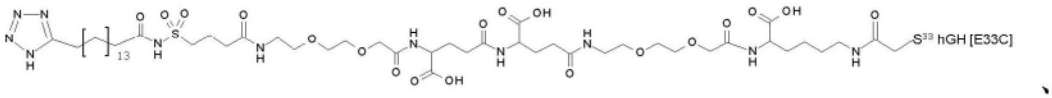

S135 hGH [T135C]

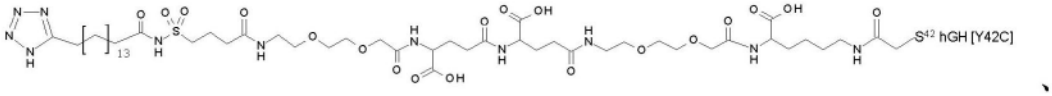

S154 hGH [D154C]

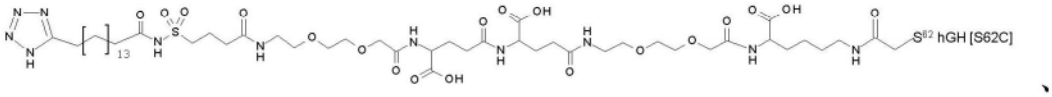

S69 hGH [Q69C]

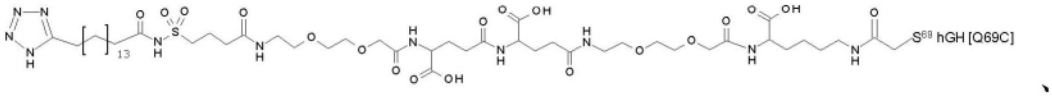

S62 hGH [S62C]

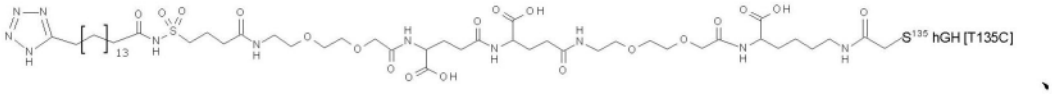
[0449]

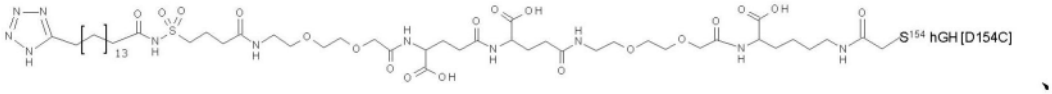

S33 hGH [E33C]

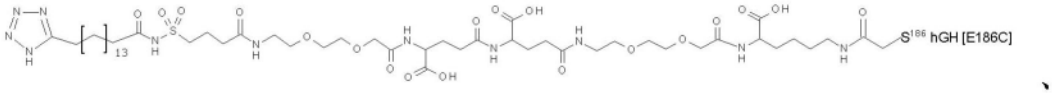

S42 hGH [Y42C]

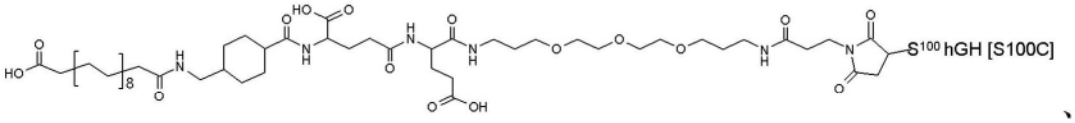

S82 hGH [S62C]

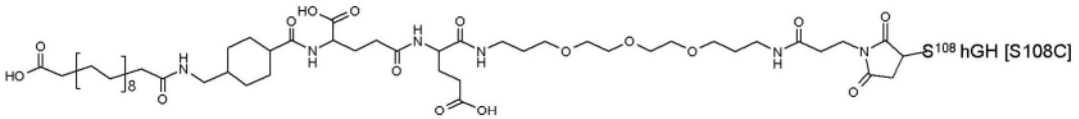

S69 hGH [Q69C]

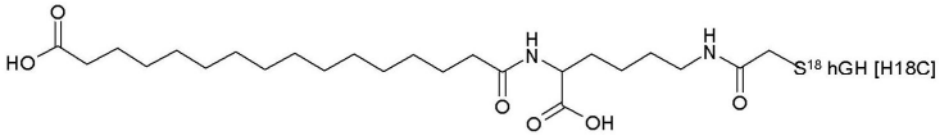

S135 hGH [T135C]

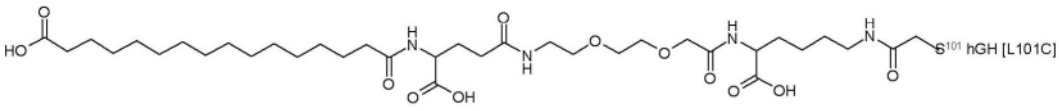

S154 hGH [D154C]

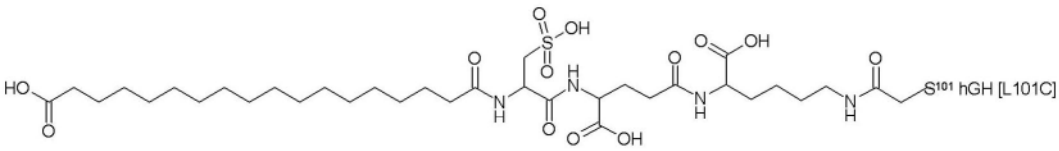

S186 hGH [E186C]

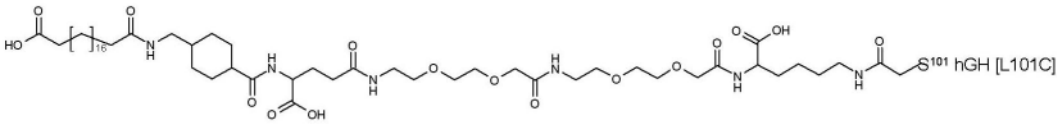

S100 hGH [S100C]


S108 hGH [S108C]

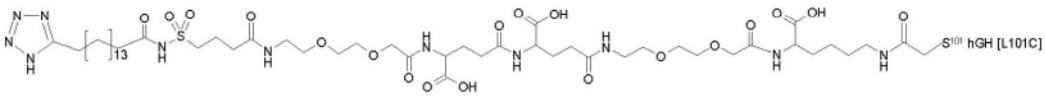

S18 hGH [H18C]

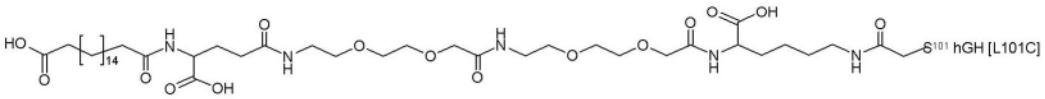

S101 hGH [L101C]

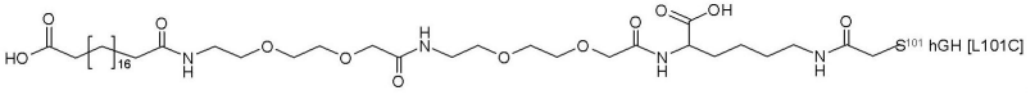

S101 hGH [L101C]

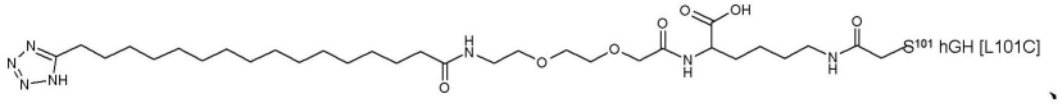

S101 hGH [L101C]

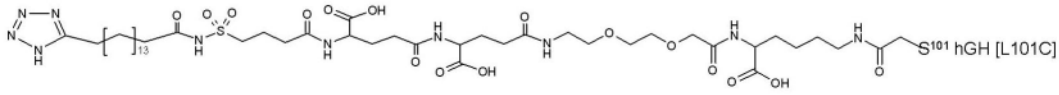
[0450]

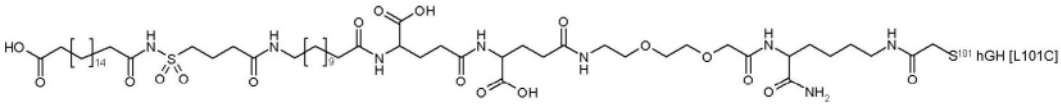

S101 hGH [L101C]

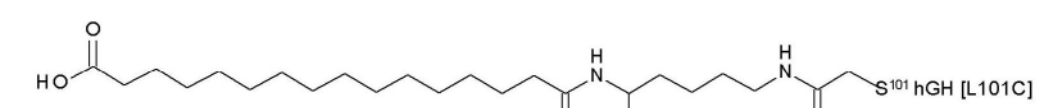

S101 hGH [L101C]


S101 hGH [L101C]

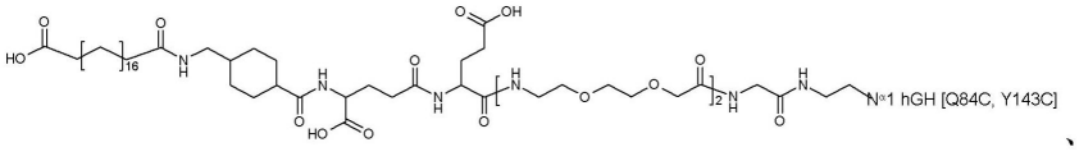

S101 hGH [L101C]

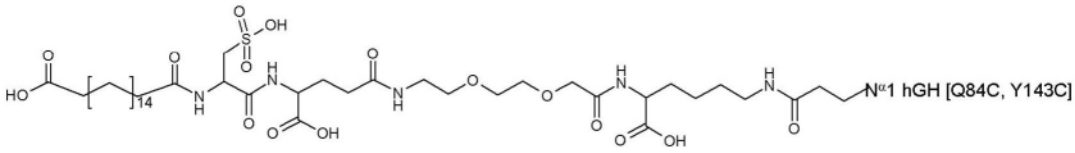

S101 hGH [L101C]

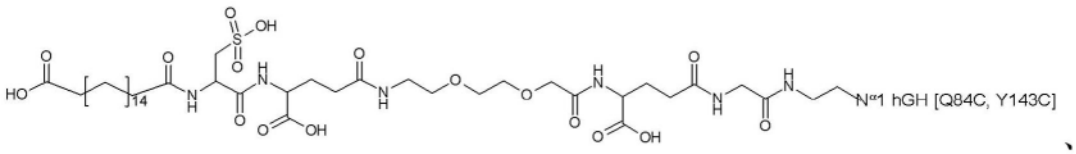

S101 hGH [L101C]

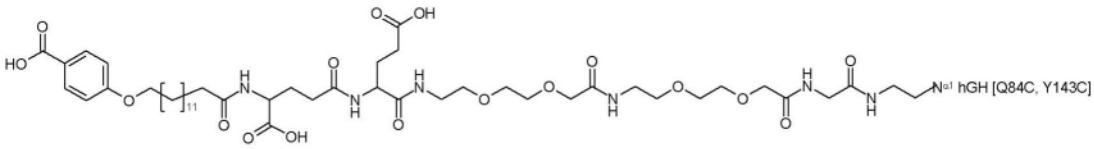

S101 hGH [L101C]

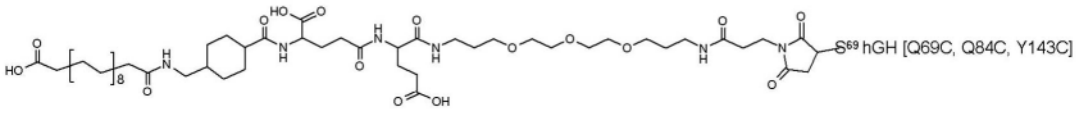

S101 hGH [L101C]


Nα1 hGH [Q84C, Y143C]

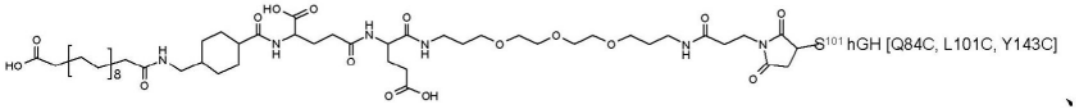

Nα1 hGH [Q84C, Y143C]

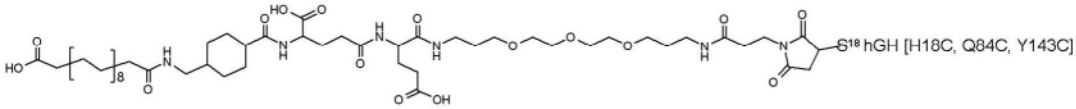

Nα1 hGH [Q84C, Y143C]

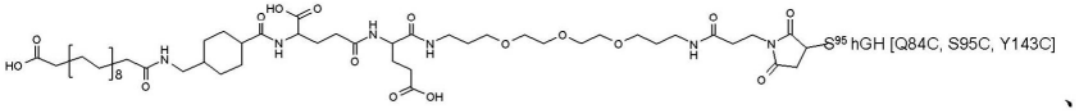

Nα1 hGH [Q84C, Y143C]

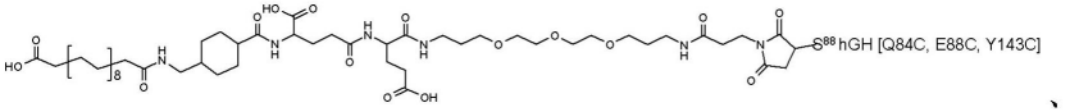

S69 hGH [Q69C, Q84C, Y143C]

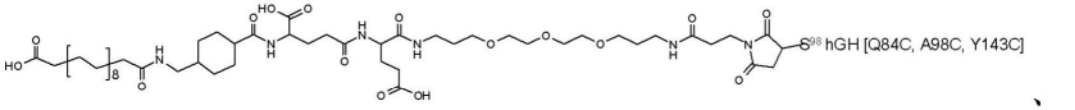
[0451]

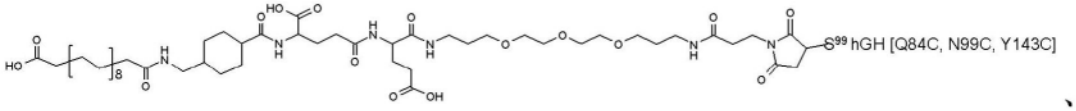

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]

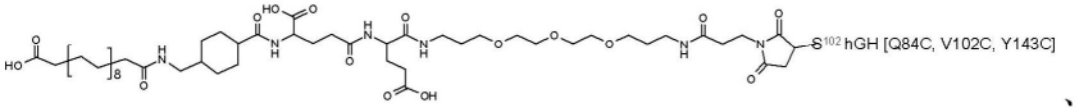

S18 hGH [H18C, Q84C, Y143C]

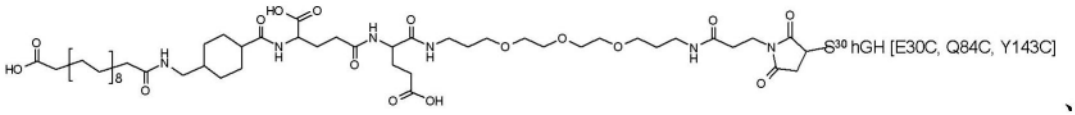

S95 hGH [Q84C, S95C, Y143C]

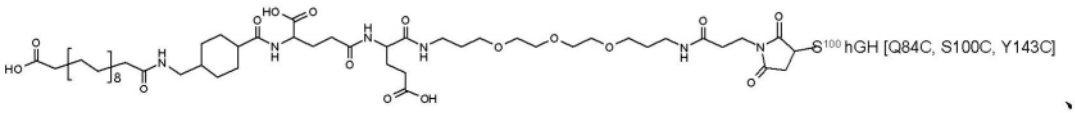

S88 hGH [Q84C, E88C, Y143C]

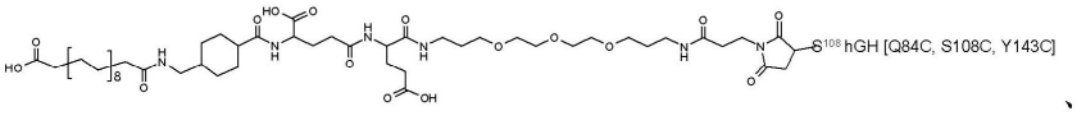

S98 hGH [Q84C, A98C, Y143C]

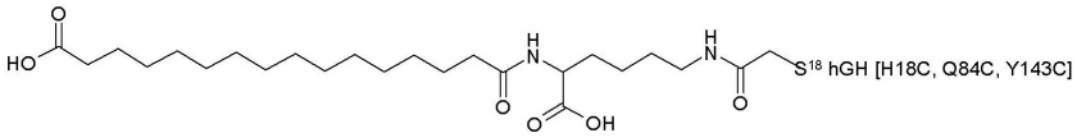

S99 hGH [Q84C, N99C, Y143C]

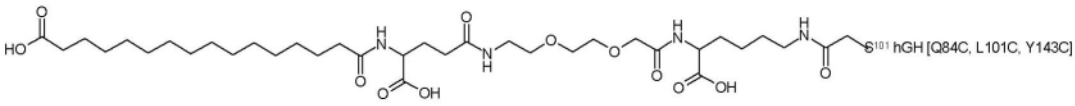

S102 hGH [Q84C, V102C, Y143C]

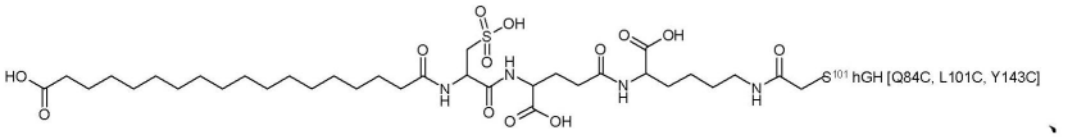

S30 hGH [E30C, Q84C, Y143C]


S100 hGH [Q84C, S100C, Y143C]

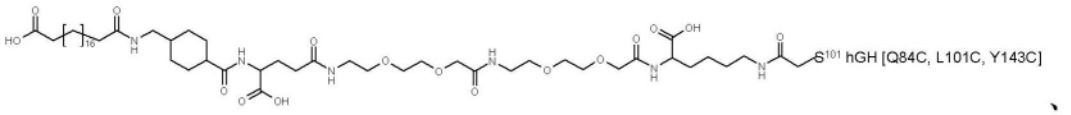

S108 hGH [Q84C, S108C, Y143C]

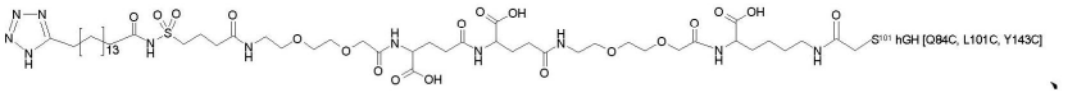

S18 hGH [H18C, Q84C, Y143C]

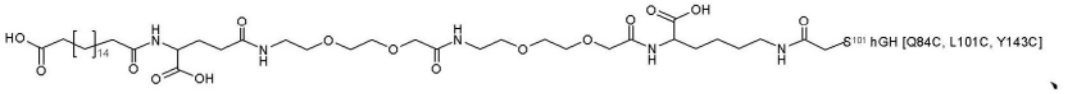

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]

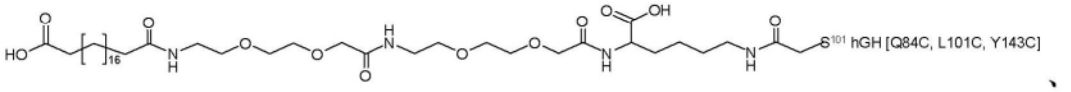

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]

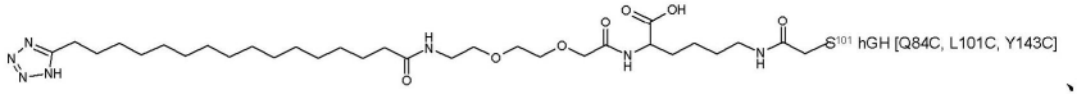
[0452]

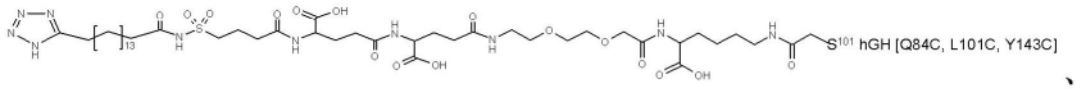

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]

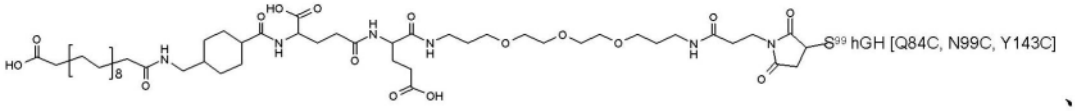

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]

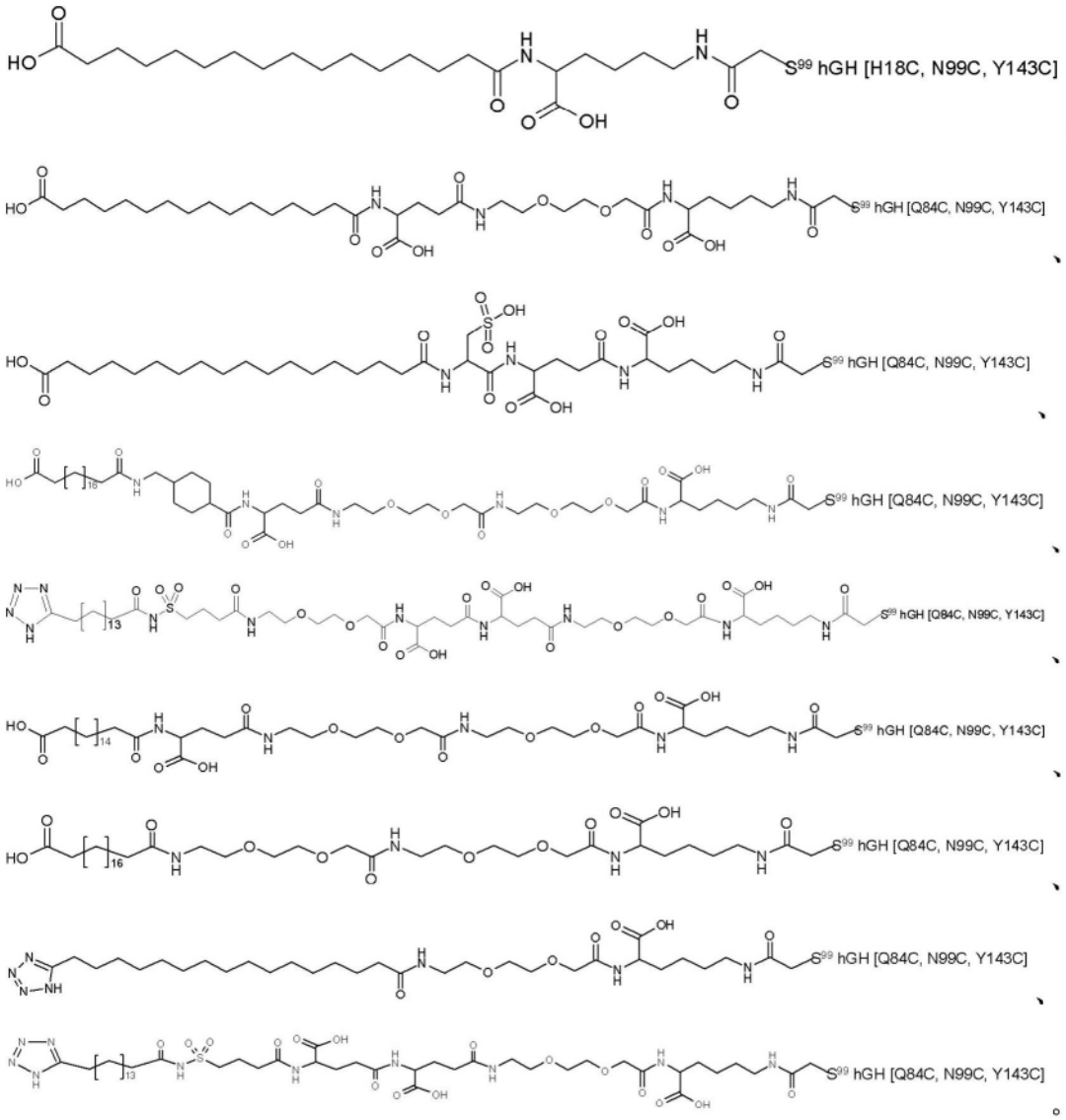

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S99 hGH [Q84C, N99C, Y143C]

[0453] 

[0454] 又一方面,本发明涉及生长激素变体,例如本文所述的生长激素化合物(GH)。生长激素变体可用作治疗剂或在生长激素缀合物的制备中用作中间体。生长激素化合物可通过本领域已知的或本文描述的重组方法产生。在一个实施方案中,生长激素变体是可溶解的。

[0455] 又一方面,本发明涉及包含本文所述生长激素变体的组合物。

[0456] 在一个实施方案中,组合物包含含有选自以下的单个Cys突变的生长激素变体:P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C。

[0457] 在本发明的一个实施方案中,组合物的生长激素变体在生长激素化合物的N端(AA 1-8)、螺旋1、环1、螺旋2、环2或螺旋3中具有单个Cys突变。

[0458] 在一个实施方案中,单个Cys突变位于N端,所述突变是例如P5C、S7C中的任一个。在一个实施方案中,单个Cys突变位于H1(相当于AA 9-35),例如D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C中的任一个。在一个实施方案中,单个Cys突变位于L1(相当于AA36-71),所述突变是例如K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55、S57C、P59C、S62C、E65C、Q69C的任一个或优选Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C的任一个。在一个实施方案中,单个Cys突变位于H2(AA 72-98),例如E88C、Q91C、S95C和A98C的任一个。在一个实施方案中,单个Cys突变位于

AA 99-127内。在一个实施方案中,单个Cys突变位于L2(AA 99-106),例如N99C、S100C、L101C、V102C和Y103C中的任一个。在一个实施方案中,单个Cys突变位于H3(AA 107-127),所述突变是例如hGH(SEQ ID NO:1)的D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C中的任一个或位于L3或H4(相当于AA128-154和AA155-184),所述突变是例如E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、V180C中的任一个;或者位于C端,所述突变是例如E186C、G187C和G190C中的任一个。如果单个Cys突变存在于hGH变体中,则该突变位于相应的氨基酸残基上。在甚至更多的实施方案中,单个Cys突变位于hGH中的AA 93-106或hGH变体的相应残基内。在其它特定的实施方案中,单个Cys突变位于L2内,例如在AA 99-106或AA 99-104或相应残基内。

[0459] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含含有单个Cys突变和额外二硫键的生长激素变体。在一个实施方案中,单个Cys突变是上述单个Cys突变中的任一个。在一个实施方案中,GH中的单个Cys突变选自hGH(SEQ ID NO:1)中的以下任一个:T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C和G190C,例如hGH(SEQ ID NO:1)中的以下任一个;P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C或相应的残基。在一个实施方案中,额外的二硫键选自以下胱氨酸突变对:R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、I73C/S132C、I73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C、F92C/T148C、R94C/D107C、V102C/A105C、L156C/F146C、L156C/T148C和/或V185C/S188C。在一个实施方案中,生长激素变体包含单个半胱氨酸和选自以下半胱氨酸突变对的额外二硫键:S57C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C和/或S85C/S144C。

[0460] 在一个实施方案中,生长激素变体包含L2中的单个半胱氨酸突变和额外二硫键,其将环区段例如来自氨基酸残基128-154(H3)与螺旋区段例如螺旋B或螺旋2(相当于AA72-98)连接。在一个实施方案中,生长激素变体包含选自以下突变的组合:A98C/Q84C/Y143C、A98C/S85C/Y143C、A98C/S85C/S144C、N99C/Q84C/Y143C、N99C/S85C/Y143C、N99C/S85C/S144C、S101C/Q84C/Y143C、S101C/S85C/Y143C、S101C/S85C/S144C、L101C/Q84C/Y143C、L101C/S85C/Y143C、L101C/S85C/S144C、C102C/Q84C/Y143C、C102C/S85C/Y143C和C102C/S85C/S144C。在一个实施方案中,生长激素变体包含选自以下突变的组合:A98C/Q84C/Y143C、N99C/Q84C/Y143C、S101C/Q84C/Y143C、L101C/Q84C/Y143C和C102C/Q84C/Y143C。在一个实施方案中,生长激素变体包含突变L101C、Q84C和Y143C。

[0461] 又一方面,本发明涉及用于治疗的包含生长激素化合物(GH)的生长激素缀合物或其药学上接受的盐,所述生长激素化合物(GH)通过亲水间隔基与白蛋白结合残基连接。此外,在本发明的生长激素缀合物中,GH、白蛋白结合残基和亲水间隔基选自上述实施方案的任一个,具体地讲,生长激素缀合物具有式(I)或式(II)。

[0462] 又一方面,本发明涉及药物组合物,其包含生长激素缀合物或任选与药学上可接受的赋形剂组合的药学上可接受的盐,所述生长激素缀合物包含通过亲水间隔基与白蛋白结合残基连接的生长激素化合物(GH)。

[0463] 本领域所知术语“同一性”是指两个或更多个蛋白质序列间的关系,这通过比较序列来确定。本领域中,“同一性”还意指蛋白质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”测量具有两个或更多个由具体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)的序列之间较小者间的相同匹配的百分比。可以通过已知方法容易地计算出相关蛋白质的同一性。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.48,1073(1988)。

[0464] 设计了确定同一性的优选方法以得到所测试序列之间的最大匹配。确定同一性的方法描述于可公开获取的计算机程序中。确定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.12,387(1984);Genetics Computer Group,University of Wisconsin,Madison,Wis.)、BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul等,J.Mol.Biol.215,403-410(1990))。BLASTX程序可公开获自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算法也可用于确定同一性。

[0465] 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,对待确定序列同一性百分比的两个蛋白质进行比对(“匹配跨度(matched span)”,由算法确定)。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PAM 250或BLOSUM 62)与算法结合使用。算法还利用了标准比较矩阵(对于PAM 250比较矩阵参见Dayhoff等,Atlas of Protein Sequence and Structure,第5卷,补充材料3,(1978);对于BLOSUM 62比较矩阵参见Henikoff等,Proc.Natl.Acad.Sci USA,89,10915-10919,(1992))。

[0466] 蛋白质序列比较的优选参数包括下列参数:

[0467] 算法:Needleman等,J.Mol.Biol.48,443-453(1970);比较矩阵:Henikoff等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89,10915-10919,(1992)的BLOSUM 62;空位罚分:12,空位长度罚分(Gap Length Penalty):4,相似性阈值:0。

[0468] 具有上述参数的GAP程序是有用的。运用GAP算法,上述参数对于蛋白质比较是默认参数(连同末端缺口无罚分)。

[0469] 与相应的未缀合的生长激素(亦称为母体化合物)相比,本发明的化合物具有改进的药理学性质。这类药理学性质的实例包括功能性体内半衰期、免疫原性、肾脏过滤、蛋白酶保护和白蛋白结合。

[0470] 术语“功能性体内半衰期”以其标准意义使用,即GH或GH缀合物的50%生物活性仍然存在于机体/靶器官中的时间,或GH或GH缀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衰期的备选方法,可测定“体内血浆半衰期”,即在被清除前50%的GH或GH缀合物在血浆或血流中循环的时间。血浆半衰期的测定通常比测定功能性半衰期更简单,血浆半衰期的大小常常是功能性体内半衰期大小的良好指示物。血浆半衰期的替代术语包括血清半衰期、循环性半衰期、循环半衰期、血清清除率、血浆清除率和清除半衰期。

[0471] 与功能性体内半衰期或血浆半衰期联用的术语“增加”用来说明GH缀合物的相关半衰期与母体GH的相比呈统计显著性增加,这通过在相当的条件下测定。例如相关半衰期可增加至少约25%、例如至少约50%、例如至少约100%、150%、200%、250%或500%。在一个实施方案中,与母体GH的半衰期相比,本发明的化合物增加半衰期至少约5小时、优选至少约24小时、更优选至少约72小时、最优选至少约7天。

[0472] 体内血浆半衰期的测量可按照文献所述以多种方式进行。体内血浆半衰期的增加可量化为清除率(CL)降低或平均滞留时间(MRT)增加。认为如下本发明缀合的GH具有增加的体内血浆半衰期,即如在合适测定中所测定,其CL下降至小于母体GH的CL的70%,例如小于50%、例如小于20%、例如小于10%。认为如下本发明缀合的GH具有增加的体内血浆半衰期,即在合适测定中其MRT增加到多于母体GH MRT的130%,例如多于150%,例如多于200%,例如多于500%。可在标准药代动力学研究中使用合适的试验动物评估清除率和平均滞留时间。为给定蛋白质选择合适的试验动物在本领域技术人员的能力范围内。当然在人中的试验代表最终测试。合适的本文动物包括标准Sprague-Dawley雄性大鼠、小鼠和食蟹猴(cynomolgus monkey)。通常以单次皮下推注来注射小鼠和大鼠,而可以单次皮下推注或以单次静脉剂量来注射猴子。注射量视试验动物而定。随后酌情经一到五天来采取血液样品用于评估CL和MRT。通过ELISA技术适宜地分析血液样品。

[0473] 术语化合物的“免疫原性”是指当将化合物给予人时引起有害免疫反应(不论是体液的、细胞的还是二者)的能力。在任何人亚群中,可能有对特定给予的蛋白质表现出敏感性的个体。可通过用本领域已知常规方法量化敏感个体中存在的生长激素抗体和/或生长激素响应性T-细胞来测定免疫原性。在一个实施方案中,相对于母体GH对敏感个体的免疫原性,本发明缀合的GH在敏感个体中的免疫原性减少至少约10%,优选至少约25%,更优选至少约40%和最优选至少约50%。本文所用术语“蛋白酶保护”或“蛋白酶保护的”,意欲表示本发明缀合的GH比母体GH更能抵抗血浆肽酶或蛋白酶。已知存在于血浆中的蛋白酶和肽酶参与循环蛋白质的降解,所述循环蛋白质为例如循环肽激素,例如生长激素。所述蛋白酶保护可通过本文所述实施例A的方法测量。

[0474] 生长激素可对例如凝血酶、纤维蛋白溶酶、枯草杆菌蛋白酶和胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白质酶引起的降解易感。测定这些蛋白酶降解的试验阐述于J.Biotech.,65,183,(1998)中。在一个实施方案中,GH缀合物的水解速率小于母体GH的70%,例如小于40%,例如小于10%。

[0475] 哺乳动物物种循环血液中最丰富的蛋白质组分是血清白蛋白,其正常以每100毫

升全血大约3至4.5克的浓度存在。血清白蛋白是大约65,000道尔顿的血液蛋白质,其在循环系统中具有若干重要功能。其作为在血液中发现的多种有机分子的转运蛋白起作用,作为经由血液的不同代谢物例如脂肪酸和胆红素的主要转运蛋白起作用,并由于其丰富性,作为循环血液的渗透调节剂起作用。血清白蛋白半衰期超过一周,增加蛋白质血浆半衰期的一种方法是让所述蛋白质与结合血清白蛋白的基团缀合。可如J.Med.Chem.,43,1986,(2000)所述来测定白蛋白结合性质,所述文献通过引用并入本文。

[0476] 式(I)或(II)的生长激素缀合物具有生长激素活性,并因此可用于从循环生长激素量的增加获益的疾病或病态的治疗。具体而言,本发明提供用于治疗以下的方法:生长激素缺乏(GHD);特纳综合征;普-韦综合征(Prader-Willi syndrome,PWS);努南综合征;唐氏综合征;慢性肾脏疾病、幼年型类风湿关节炎、囊性纤维化、接受HAART治疗的儿童HIV感染(HIV/HALS儿童);小于胎龄(SGA)出生的矮小儿童(shorr 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,所述长骨为例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨(matacarpea)、跖骨(matatarsea)和指骨(digit);海绵骨例如头骨(scuvl)、手腕骨(base of hand)和脚底骨(base of food)的骨折;例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者;进行或经历牵拉骨生成技术(distraction oteogenesis)的患者;髋关节置换或关节盘置换(discus replacement)、关节盘修复、脊柱融合或例如在膝、髋、肩、肘、腕或颚中的假体固定后的患者;其中已固定骨接合材料(例如钉、螺钉和板)的患者;骨折不愈合或畸形愈合的患者;例如胫骨或第一脚趾的骨解剖(osteatomsia)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(chronic abstractive pulmonal disease);APCD中的HIV;APCD老年人(elderly with APCD);APCD中的慢性肝病、APCD中的疲劳综合征;克罗恩病;肝功能受损;具有HIV感染的男性;短肠综合征;向心性肥胖;HIV相关脂肪营养不良综合征(HALS);男性不育症;大选择性手术、酒精/药物解毒或神经创伤后的患者;老化;虚弱的老年人;骨关节炎;创伤性损伤的软骨;勃起功能障碍;纤维肌痛;记忆障碍;抑郁;外伤性脑损伤;蛛网膜下腔出血;极低出生体重;代谢综合征;糖皮质激素性肌病;或糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症,所述方法包括给予有需要的患者治疗有效量的式(I)或(II)的生长激素缀合物。

[0477] 又一方面,本发明提供用于加速肌肉组织、神经组织或伤口愈合;加快或改善血液流向受损组织;或降低受损组织的感染率的方法,所述方法包括给予有需要的患者治疗有效量的式(I)或式(II)的生长激素缀合物。

[0478] 在再一实施方案中,本发明涉及式(I)或(II)生长激素缀合物在制备疾病用药中的用途,所述疾病自生长激素血浆水平的提高而受益,例如上述疾病。

[0479] 典型的胃肠外剂量介于每次给予10^{-9}mg/kg-约100mg/kg体重。典型的给药剂量为每次给予约0.0000001-约10mg/kg体重。准确剂量将视以下因素而定,例如适应症、药剂、给药频率和方式、待治疗受试者的性别、年龄和一般情况、待治疗的疾病或病况的性质和严重性、期需的治疗效果和对本领域技术人员显而易见的其它因素。

[0480] 典型的给药频率为每天两次、每天一次、两天一次、每周两次、每周一次或甚至更

长的给药间隔。由于本发明融合蛋白的长半衰期,长给药间隔的给药方案是本发明的特别实施方案,所述长给药间隔为例如每周两次、每周一次或甚至更长的给药间隔。

[0481] 许多疾病在治疗中使用同时给予或序贯给予的不止一种药物治疗。因此,将式(I)或(II)生长激素缀合物与一种或多种其它治疗活性化合物联合用于治疗上述疾病之一的治疗方法中在本发明范围内,所述其它治疗活性化合物通常用于治疗所述疾病。依次类推,亦在本发明范围内的是,将式(I)或(Ⅱ)生长激素缀合物连同通常用于治疗上述疾病之一的其它治疗活性化合物用于制备用于所述疾病的药物中。

[0482] 通用方法

[0483] 酶缀合:

[0484] 在本发明的生长激素缀合物的制备中,通常在制备式(I)的A-W-B-GH缀合物时建立的至少一个共价键通过使用如下面的实施例中说明的酶来制备。这类酶可例如选自转谷氨酰胺酶、丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶。通常,所述酶是转谷氨酰胺酶。这类转谷氨酰胺酶可例如选自微生物转谷氨酰胺酶、组织转谷氨酰胺酶和因子XIII及其变体。在另一个实施方案中,所述酶是半胱氨酸蛋白酶。本发明的生长激素缀合物可用许多不同的方法制备,非限制性实例显示如下。

[0485] 本发明还提供用于制备式(I)的A-W-B-GH缀合物的方法。

[0486] 转谷氨酰胺酶

[0487] 如上所述,在制备本发明的A-W-B-GH缀合物时建立的至少一个共价键可通过使用转谷氨酰胺酶来制备。转谷氨酰胺酶可包括自例如以下菌种分离的微生物转谷氨酰胺酶:链霉菌属(Streptomyces)菌种;茂原链霉菌、肉桂链霉菌、灰肉链霉菌(US5156956,通过引用结合到本文)、浅紫灰链霉菌(US5252469,通过引用结合到本文)和拉达卡链霉菌(JP2003/199569,通过引用结合到本文)。已自枯草芽孢杆菌(公开于US5731183,其通过引用结合到本文中)和各种粘菌中分离出其它有用的微生物转谷氨酰胺酶。有用的微生物转谷氨酰胺酶的其它实例是公开于WO1996/06931(例如得自Bacilus lydicus的转谷氨酰胺酶)和WO1996/22366(两份文献通过引用结合到本文中)的实例。有用的非微生物转谷氨酰胺酶包括豚鼠肝转谷氨酰胺酶及得自各种海产来源像扁鱼真鲷(公开于EP0555649,其通过引用结合到本文中)和日本牡蛎长牡蛎(公开于US5736356,其通过引用结合到本文中)的转谷氨酰胺酶。也可使用其功能性类似物和衍生物。

[0488] 通常,用于本发明方法的TGase是微生物转谷氨酰胺酶。在一个实施方案中,TGase来自茂原链霉菌或其变体,例如参见WO2007/020290和WO2008/020075。在另一个实施方案中,TGase来自拉达卡链霉菌或其变体,例如参见WO2008/020075。

[0489] 可通过TGase介导的修饰,根据所用底物,在GH化合物的序列中的特定赖氨酸(Lys)或谷氨酰胺(Gln)位置处导致选择性变化,来实现本发明的GH与A-W-B缀合。使用胺作为底物将导致谷氨酰胺被修饰,而使用伯酰胺将导致赖氨酸被修饰。hGH(SEQ ID NO:1)在38、41、70、115、140、145、158、168和172位具有9个赖氨酸残基,在22、29、40、46、49、68、69、84、91、122、137、141和181位具有13个谷氨酰胺残基,但是并非所有这些都可容易用于修饰,而且也不都适于修饰,因为这将导致与生长激素结合蛋白的结合效力降低,因此导致生物活性降低。hGH及其结合蛋白(pdb:3HHR)之间的X射线蛋白质晶体结构显示,至少4个赖氨酸(38、41、168和172)参与与结合蛋白结合,可能仅1个谷氨酰胺(Gln 46)参与结合。这就赋

予谷氨酰胺更大的吸收力以作为用于选择性引入白蛋白结合剂接头的靶标。这些结构考量得到N.Chêne等(载于Reprod.Nutr.Develop.29,1-25(1989))概述的研究结果的进一步支持,其中得出结论,发现影响赖氨酸的化学修饰对体内生物活性和对与GH肝受体的结合能力具有负面作用。

[0490] 化学法I

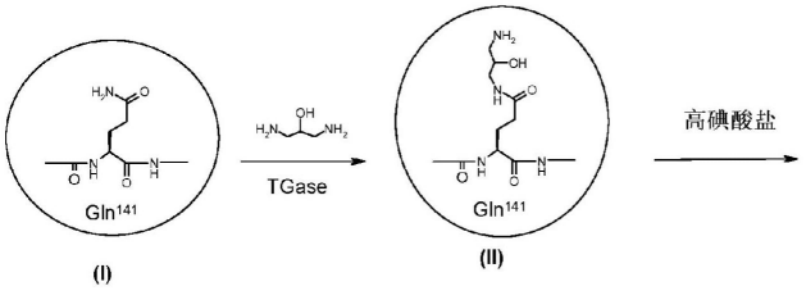
[0491] 一方面,本发明涉及式(I)生长激素缀合物的制备,其中采用TGase催化的化学法,用改性基团(property-modifying group)处理GH化合物。最初,使用氨基醇,通过2步反应置入醛或酮官能团,氨基醇随后用高碘酸盐处理通过氧化裂解产生醛或酮官能团。仅用于说明的氨基醇的非限制性实例包括1,3-二氨基-2-丙醇和1-氨基-2,3-二羟基丙烷。

[0492] 又一方面,本发明涉及式(I)的生长激素缀合物的制备,其包括用改性基团衍生的苯胺或杂芳基胺处理衍生自GH化合物的醛或酮,得到胺(III→IV)。

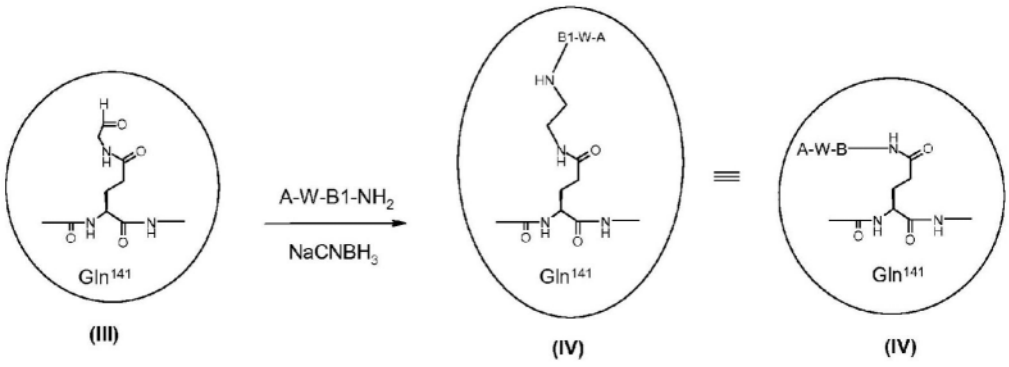
[0493] 在一个实施方案中,自GH化合物衍生的醛用改性基团衍生的苯胺或杂芳基胺处理。

[0494] 术语“GH化合物衍生的醛(或酮)”或“衍生自GH化合物的醛或酮”意欲表示醛或酮官能团已经与其共价连接的GH化合物,或其上已经产生醛或酮官能团的GH化合物。下面说明的GH化合物衍生的醛(例如化合物(III))的制备是本领域技术人员众所周知的,并且可采用这些已知方法的任一种制备用于实现本文公开的本发明所需的GH化合物衍生的醛(III)。

[0495] 在一个实施方案中,如下所示制备缀合物A-W-B-GH(IV):



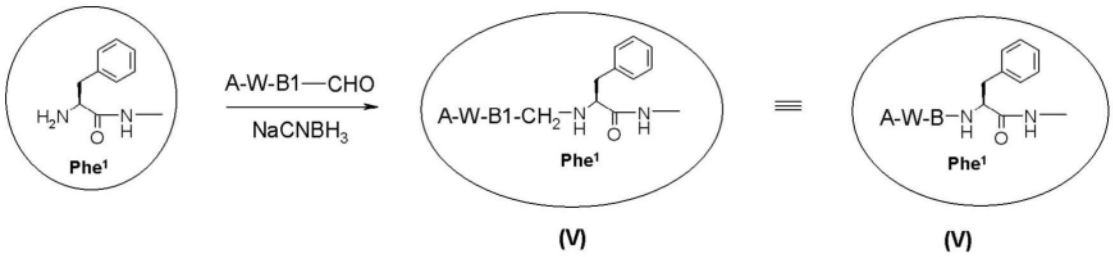
[0496]



[0497] TGase介导的与GH(I)的酶促反应,导致141位和/或40位的Gln被修饰,得到(II)。用高碘酸盐处理修饰的GH(II)以裂解氨基醇,得到GH衍生的醛(III)。通过还原烷基化而产生GH醛(III)与A-W-B1-NH_2的缀合(III→IV)。本文例示的还原烷基化是本领域公认的,导致GH化合物(IV)在Gln(141)和/或40位被修饰。

[0498] 化学法II

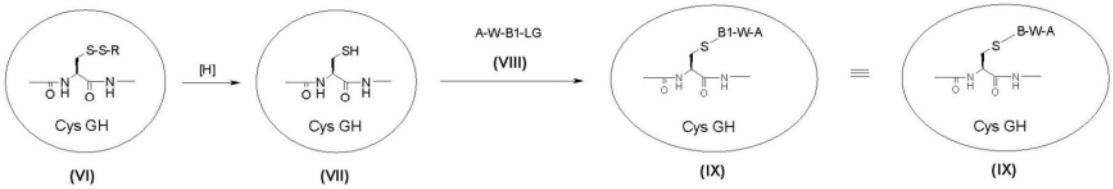
[0499] 在一个实施方案中,如下所示,采用GH的N端的还原胺化来制备缀合物A-W-B-GH:

[0500] 

[0501] GH与A-W-B1-CHO的缀合通过还原烷基化产生(GH→V)。以上例示的还原烷基化是本领域公认的,用于修饰GH的N端。

[0502] 化学法III

[0503] 在一个实施方案中,如下所示制备缀合物A-W-B-GH:

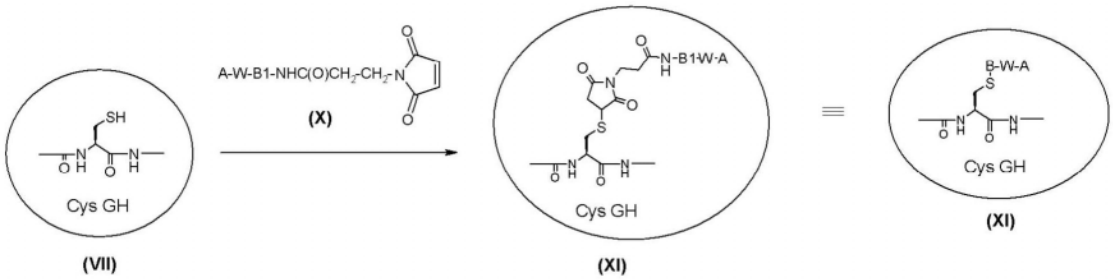
[0504] 

[0505] 其中半胱氨酸残基任选作为混合的二硫化物(VI)(GH-S-S-R)被保护,且R是小的有机部分。混合的二硫化物的非限制性实例可包括胱胺(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=-$CH_2CH(C(O)NH-CH_2C(O)OH)NH-C(O)CH_2CH_2CH(C(O)OH)NH_2$)之间的二硫化物。

[0506] 衍生化方法利用白蛋白结合接头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酰基或甲苯磺酸基。GH与A-W-B1-LG的缀合通过亲核取代而发生(VII→IX)。

[0507] 化学法IV

[0508] 在一个实施方案中,如下所示制备缀合物A-W-B-GH:

[0509] 

[0510] 可使从上述(VI)获得的脱保护的Cys GH化合物(VII)与马来酰亚胺(malimide)取代的白蛋白结合剂接头(X)反应,得到GH缀合物A-W-B1-NHC(O)CH_2CH_2-吡咯烷-2,5-二酮-3-GH(XI)。

[0511] 其中亲水间隔基B1具有下式

[0512] -X_1-X_2-X_3-X_4-

[0513] 其中

[0514] X_1为-W_1-[$(CHR^1)_{I1}$-W_2]$_{m1}$-{[$(CH_2)_{n1}$E1]$_{m2}$-[$(CHR^2)_{I2}$-W_3]$_{m3}$}$_{n2}$-,

[0515] X_2为-[$(CHR^3)_{I3}$-W_4]$_{m4}$-{[$(CH_2)_{n3}$E2]$_{m5}$-[$(CHR^4)_{I4}$-W_5]$_{m6}$}$_{n4}$-,

[0516] X_3为-[(CHR^5)$_{I5}$]$_{m7}$-，

[0517] X_4为价键，

[0518] I1、I2、I3、I4和I5独立选自0-16，

[0519] m1、m3、m4、m6和m7独立选自0-10，

[0520] m2和m5独立选自0-25，

[0521] n1、n2、n3和n4独立选自0-16，

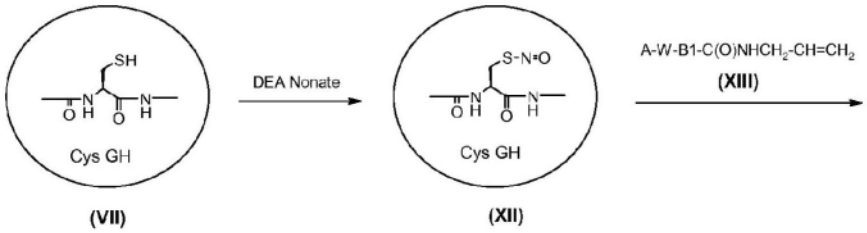
[0522] R^1、R^2、R^3、R^{4}和R^{5}独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)OH、-S(O)$_2$OH、-NH-C(=NH)-NH$_2$、C$_{1-6}$-烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)OH、-S(O)$_2$OH、-CN或-OH取代，

[0523] E1和E2独立选自-O-、-NR^6-、-N(COR^7)-或价键；其中R^{6}和R^{7}独立表示氢或C$_{1-6}$-烷基，

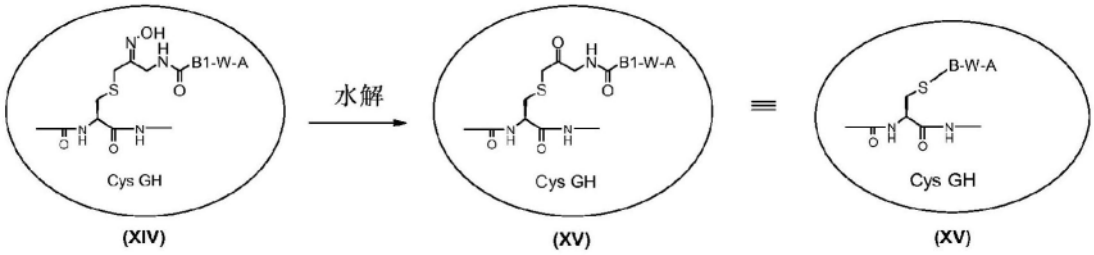
[0524] W$_1$-W$_5$独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH$_2$-、-CH$_2$NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH$_2$-、-CH$_2$C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-(CH$_2$)$_{s2}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或价键；其中s2为0或1。

[0525] 化学法V

[0526] 在一个实施方案中，如下所示制备缀合物A-W-B-GH：



[0527]



[0528] 可按WO2009/024791中所述，采用S-亚硝酰基化学法，使白蛋白结合剂与单个cys GH衍生物连接。

[0529] 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-亚硝基化。然后使亚硝基化的单个cys GH(XII)与烯丙基胺取代的白蛋白结合剂(XIII)反应，得到肟(XIV)，其在水解后，得到GH缀合物A-W-B1-C(O)NHCH$_2$C(O)CH$_2$-Cys GH(XV)

[0530] 其中亲水间隔基B1具有下式

[0531] -X$_1$-X$_2$-X$_3$-X$_4$-

[0532] 其中

[0533] X$_1$为-W$_1$-[(CHR^1)$_{I1}$-W$_2$]$_{m1}$-{[(CH$_2$)$_{n1}$E1]$_{m2}$-[(CHR^2)$_{I2}$-W$_3$]$_{m3}$}$_{n2}$-，

[0534] X$_2$为-[(CHR^3)$_{I3}$-W$_4$]$_{m4}$-{[(CH$_2$)$_{n3}$E2]$_{m5}$-[(CHR^4)$_{I4}$-W$_5$]$_{m6}$}$_{n4}$-，

[0535] X_3为-[(CHR^5)$_{I5}$]$_{m7}$-,

[0536] X_4为价键,

[0537] I1、I2、I3、I4和I5独立选自0-16,

[0538] m1、m3、m4、m6和m7独立选自0-10,

[0539] m2和m5独立选自0-25,

[0540] n1、n2、n3和n4独立选自0-16,

[0541] R^1、R^2、R^3、R^{4}和R^{5}独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)OH、-S(O)$_2$OH、-NH-C(=NH)-NH$_2$、C$_{1-6}$-烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH$_2$、-S(O)OH、-S(O)$_2$OH、-CN或-OH取代,

[0542] E1和E2独立选自-O-、-N(R^6)-、-N(C(O)R^7)-或价键;其中R^{6}和R^{7}独立表示氢或C$_{1-6}$-烷基,

[0543] W$_1$-W$_5$独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NHCH$_2$-、-CH$_2$NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH$_2$-、-CH$_2$C(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。

[0544] 通常认为与天然肽的密切关系对于治疗干预是优点,所述治疗干预包括给予该天然肽的变体或类似物,因为这使例如产生任何不想要的抗体的风险最小化。

[0545] 可通过使用羧肽酶Y(EC.3.4.16.5),在其C端修饰GH,合适的修饰底物参见WO2007/093594。B.Peschke等."C-Terminally PEGylated GH derivatives(C端聚乙二醇化GH衍生物)"Bioorg.Med.Chem.15,4382-4395,(2007)描述了两步法,其中C端丙氨酸与N$^{\varepsilon}$-(4-乙酰基苯酰基)赖氨酸进行酶促交换,接着与本发明的白蛋白结合剂衍生物反应。

[0546] 从上文可明显看出,本发明还涉及在制备缀合物A-W-B-GH中的中间体接头。可通过式(III)描述所述接头化合物

[0547] A-W-B1-U (III)

[0548] 其中A表示白蛋白结合残基,

[0549] B1表示亲水间隔基,

[0550] W是连接A和B1的化学基团,U表示缀合部分。

[0551] 根据上文,缀合部分将随所采用的缀合方法而变化,其最后在最终的hGH化合物(A-W-B-GH)中也可以是可见的。

[0552] 在化合物A-W-B1-U的其它实施方案中,A和W如上述实施方案中任一个中所定义的。

[0553] 如果采用本文上述方法如化学法IV,则化合物A-W-B1-U可进一步定义为这样的实施方案,其中U包含芳基、杂芳基、取代的马来酰亚胺或吡咯烷-2,5-二酮例如-NHC(O)CH2CH2-吡咯烷-2,5-二酮,或者由芳基、杂芳基、取代的马来酰亚胺或吡咯烷-2,5-二酮例如-NHC(O)CH2CH2-吡咯烷-2,5-二酮组成。

[0554] 在化合物A-W-B1-U的备选实施方案中,U包含D1-(CH$_2$)$_{I6}$-D2,其中D1和D2独立选自-O-、-N(R6)-、-NC(O)R7-或价键;其中R6和R7独立表示氢或C$_{1-6}$-烷基。

[0555] 同样地,采用本文上述的化学法III可采用接头化合物,其中U包含离去基团或由离去基团组成,离去基团例如Cl、Br、I、-OH、-OS(O)$_2$Me、-OS(O)$_2$CF$_3$或-OTs,或优选式(III)的化合物,其中离去基团为选自Cl、Br和I(优选Br)的卤素化合物。

[0556] 接头化合物(其应用于化学法V)的其它实施方案按照本发明式(III)所定义的,其中U包含烯丙基胺(H_2C=CH-CH2-NH_2)或由其组成,所述烯丙基胺例如-C(O)NHCH_2-CH=CH_2。

[0557] 如果采用上文描述的方法如化学法I,则化合物A-W-B1-U可进一步定义为这样的实施方案,其中U包含胺(-NH_2)或由胺(-NH_2)组成。

[0558] 在备选的实施方案中,U可包含醛(例如-CHO)或由其组成。

[0559] 化合物接着可与包括“U”能够与之缀合的受体基团的任何类型的治疗化合物缀合。在一个优选的实施方案中,治疗化合物是多肽。肽可天然地包括可起受体基团作用的AA残基,例如Gln残基、Phe残基和Cys残基。或者可将这类氨基酸残基引入多肽的合适位置。

[0560] 药物组合物

[0561] 另一个目的是提供包含本发明生长激素缀合物例如式(I)或(II)生长激素缀合物的药物组合物,所述缀合物以10^{-15}mg/mL-200mg/mL例如10^{-10}mg/mL-5mg/mL的浓度存在,其中所述组合物具有2.0-10.0的pH。组合物可进一步包含药物赋形剂(exhibient),例如缓冲系统、防腐剂、张度剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在本发明一个实施方案中,药物组合物为水性组合物,即包含水的组合物。所述组合物通常为溶液或悬液。在本发明另一实施方案中,药物组合物为水溶液。术语“水性组合物”定义为包含至少50%w/w水的组合物。同样地,术语“水溶液”定义为包含至少50%w/w水的溶液,术语“水性悬液”定义为包含至少50%w/w水的悬液。

[0562] 在另一实施方案中,药物组合物为冻干组合物,医生或患者在使用之前向其中添加溶剂和/或稀释剂。

[0563] 在另一实施方案中,药物组合物为无需任何预先溶解便可即时使用的干燥组合物(例如冻干的或喷雾干燥的)。

[0564] 另一方面本发明涉及包含生长激素缀合物的水溶液和缓冲剂的药物组合物,所述生长激素缀合物为例如式(I)或(II)生长激素缀合物,其中所述GH缀合物以0.1-100mg/mL或更高浓度存在,其中所述组合物具有约2.0-约10.0的pH。

[0565] 在本发明另一实施方案中,组合物的pH选自2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9和10.0。

[0566] 在本发明再一实施方案中,缓冲剂选自:乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、甘氨酰甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟基甲基)-氨基甲烷、N-二(羟乙基)甘氨酸、曲辛(tricine)、苹果酸、琥珀酸盐、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些特定缓冲剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。

[0567] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含药学上可接受的防腐剂。在本发明再一实施方案中,防腐剂选自苯酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧乙醇、对羟基苯甲酸丁酯、2-苯乙醇、苯甲醇、氯代丁醇和硫柳汞、溴硝丙二醇、苯甲酸、咪脲、氯己定、脱氢乙酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苄索氯铵、氯苯甘醚(chlorphenesine)(3对-氯苯氧丙烷-1,2-二醇)或其混合物。在本发明再一实施方案中,防腐剂以0.1mg/mL-20mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,防腐剂以0.1mg/mL-5mg/

mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,防腐剂以5mg/mL-10mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,防腐剂以10mg/mL-20mg/mL的浓度存在。这些特定防腐剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。药物组合物中防腐剂的使用为技术人员所熟知。为了方便,作出对Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2000的引用。

[0568] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含等渗剂。在本发明再一实施方案中,等渗剂选自盐(例如氯化钠)、糖或糖醇、氨基酸(例如L-甘氨酸、L-组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸)、糖醇(例如丙三醇(甘油)、1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、1,3-丁二醇)、聚乙二醇(例如PEG 400)或其混合物。可使用任何糖,例如单糖、二糖或多糖,或水溶性葡聚糖,包括例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、葡聚糖、普鲁兰、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素钠。在一个实施方案中,糖添加剂为蔗糖。糖醇被定义为具有至少一个-OH基团的C4-C8烃,包括例如甘露醇、山梨醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿拉伯糖醇。在一个实施方案中,糖醇添加剂为甘露醇。可单独地或联合使用上述糖或糖醇。对所用量没有固定的限制,只要糖或糖醇在液体制剂中可溶且对用本发明方法获得的稳定作用不产生不利作用即可。在一个实施方案中,糖或糖醇浓度为约1mg/mL-约150mg/mL。在本发明再一实施方案中,等渗剂以1mg/mL-50mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,等渗剂以1mg/mL-7mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,等渗剂以8mg/mL-24mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,等渗剂以25mg/mL-50mg/mL的浓度存在。这些特定的等渗剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。药物组合物中等渗剂的使用为技术人员所熟知。为了方便,作出对Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2000的引用。

[0569] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含螯合剂。在本发明再一实施方案中,螯合剂选自乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸和天冬氨酸的盐及其混合物。在本发明再一实施方案中,螯合剂以0.1mg/mL-5mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,螯合剂以0.1mg/mL-2mg/mL的浓度存在。在本发明再一实施方案中,螯合剂以2mg/mL-5mg/mL的浓度存在。这些特定的螯合剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。药物组合物中螯合剂的使用为技术人员所熟知。为了方便,作出对Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2000的引用。

[0570] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含稳定剂。药物组合物中稳定剂的使用为技术人员所熟知。为了方便,作出对Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2000的引用。

[0571] 更具体地,本发明组合物为稳定的液体药物组合物,其治疗活性成分包括在以液体药物组合物储存期间可能表现出聚集物形成的蛋白质。“聚集物形成”意指蛋白质分子之间的物理相互作用,其造成寡聚物的形成,该寡聚物可保持可溶性或从溶液中沉淀出来的可见的大聚集物。“储存期间”意指液体药物组合物或组合物在制备后没有立即给予受试者。相反,其在制备后以液体形式、冷冻状态或干燥形式包装储存,用于以后重构成液体形式或适于给予受试者的其它形式。“干燥形式”意指液体药物组合物或组合物通过冻干(即冷冻干燥;参见例如Williams和Polli,J.Parenteral Sci.Technol.38,48-59,(1984))、喷雾干燥(参见Masters(1991),载于Spray-Drying Handbook(第5版;Longman Scientific and Technical,Essez,U.K.),第491-676页;Broadhead等Drug Devel.Ind.Pharm.18,

1169-1206,(1992);和Mumenthaler等,Pharm.Res.11,12-20(1994))或风干(Carpenter和Crowe,Cryobiology 25,459-470,(1988);和Roser,Biopharm.4,47-53,(1991))来干燥。在液体药物组合物储存期间蛋白质聚集物形成可不利地影响该蛋白质的生物活性,造成药物组合物治疗功效损失。此外,聚集物形成可引起其它问题,例如当用输注系统给予含有蛋白质的药物组合物时管道、膜或泵的堵塞。

[0572] 本发明药物组合物可进一步包含一定量的氨基酸碱(amino acid base),其足以降低组合物储存期间蛋白质导致的聚集物形成。“氨基酸碱”意指氨基酸或氨基酸组合,其中任何给定氨基酸以其游离碱形式或以其盐形式存在。当使用氨基酸组合时,所有氨基酸可以以其游离碱形式存在,所有氨基酸可以以其盐形式存在,或一些可以以其游离碱形式存在而其它以其盐形式存在。在一个实施方案中,用于制备本发明组合物的氨基酸为携带带电侧链的氨基酸,例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。只要特定氨基酸或有机碱以其游离碱形式或其盐形式存在,特定氨基酸(甲硫氨酸、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸及其混合物)的任何立体异构体(即L或D异构体或其混合物)或这些立体异构体的组合或者甘氨酸或有机碱(例如但不限于咪唑),都可存在于本发明药物组合物中。在一个实施方案中,使用氨基酸的L-立体异构体。在一个实施方案中,使用L-立体异构体。本发明组合物也可用这些氨基酸的类似物配制。“氨基酸类似物”意指天然存在的氨基酸的衍生物,其导致减少本发明液体药物组合物储存期间蛋白质聚集物形成的所需作用。合适的精氨酸类似物包括例如氨基胍、鸟氨酸和N-单乙基L-精氨酸,合适的甲硫氨酸类似物包括乙硫氨酸和丁硫氨酸(buthionine),合适的半胱氨酸类似物包括S-甲基-L半胱氨酸。至于其它氨基酸,以其游离碱形式或其盐形式将氨基酸类似物掺入到组合物中。在本发明再一实施方案中,以足以防止或延缓蛋白质聚集的浓度使用氨基酸或氨基酸类似物。

[0573] 在本发明再一实施方案中,当作为治疗剂起作用的蛋白质为包含至少一个对氧化易感的甲硫氨酸残基的蛋白质时,可添加甲硫氨酸(或其它含硫氨基酸或氨基酸类似物)以抑制将甲硫氨酸残基氧化为甲硫氨酸亚砜。“抑制”意指随着时间的推移甲硫氨酸氧化物质的积聚最小化。抑制甲硫氨酸氧化导致蛋白质以其适合的分子形式得到更大的保留。可使用甲硫氨酸的任何立体异构体(L或D异构体)或其任何组合。添加的量应为足以抑制甲硫氨酸残基氧化的量,使得甲硫氨酸亚砜的量可被监管机构接受。通常这意味着组合物含不多于约10%-约30%甲硫氨酸亚砜。通常这可通过添加甲硫氨酸使得添加的甲硫氨酸与甲硫氨酸残基的比率范围为约1:1-约1000:1例如10:1-约100:1来实现。

[0574] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含选自高分子量聚合物或低分子化合物的稳定剂。在本发明再一实施方案中,稳定剂选自聚乙二醇(例如PEG 3350)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基纤维素/羟基纤维素或其衍生物(例如HPC、HPC-SL、HPC-L和HPMC)、环糊精、含硫物质如单硫代甘油、巯基乙酸和2-甲硫基乙醇及不同的盐(例如氯化钠)。这些特定的稳定剂中的每一种构成本发明的备选实施方案。

[0575] 药物组合物也可包含另外的稳定剂,所述稳定剂进一步提高其中治疗活性蛋白质的稳定性。对于本发明而言特别有兴趣的稳定剂包括但不限于:甲硫氨酸和EDTA,它们保护蛋白质对抗甲硫氨酸氧化;非离子表面活性剂,其保护蛋白质对抗与冻融或机械剪切相关的聚集。

[0576] 在本发明再一实施方案中,组合物进一步包含表面活性剂。在本发明再一实施方

案中,表面活性剂选自:洗涤剂、乙氧基化蓖麻油、聚乙二醇化(polyglycolyzed)甘油酯、乙酰化单甘油酯、山梨糖醇酐脂肪酸酯、聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物(例如泊洛沙姆例如Pluronic®F68、泊洛沙姆188和407、Triton X-100)、聚氧乙烯化山梨糖醇酐脂肪酸酯、聚氧乙烯和聚乙烯衍生物例如烷基化和烷氧基化衍生物(吐温例如吐温-20、吐温-40、吐温-80和Brij-35)、单甘油酯或其乙氧基化衍生物、二甘油酯或其聚氧乙烯衍生物、醇类、甘油、凝集素类和磷脂类(例如磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、双磷脂酰甘油和鞘磷脂)、磷脂衍生物(例如二棕榈酰磷脂酸)和溶血磷脂衍生物(例如棕榈酰溶血磷脂酰-L-丝氨酸和乙醇胺、胆碱、丝氨酸或苏氨酸的1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酯)及溶血磷脂酰胆碱和磷脂酰胆碱的烷基、烷氧基(烷基酯)、烷氧基(烷基醚)衍生物,例如溶血磷脂胆碱的月桂酰和肉豆蔻酰衍生物、二棕榈酰磷脂酰胆碱以及极性头基团(即胆碱类、乙醇胺类、磷脂酸、丝氨酸类、苏氨酸类、甘油、肌醇)的修饰物,和带正电的DODAC、DOTMA、DCP、BISHOP、溶血磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰苏氨酸以及甘油磷酸脂类(例如脑磷脂)、甘油糖脂类(例如吡喃型半乳糖苷(galactopyransoide))、鞘糖脂类(例如神经酰胺、神经节苷脂)、十二烷基磷酸胆碱、鸡卵溶血卵磷脂、梭链孢酸衍生物(例如牛磺二氢梭链孢酸钠等)、长链脂肪酸及其C_6-C_{12}盐(例如油酸和辛酸)、酰基肉毒碱类及衍生物、赖氨酸、精氨酸或组氨酸的N^{α}-酰化衍生物、或者赖氨酸或精氨酸的侧链酰化衍生物、包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸与中性或酸性氨基酸的任何组合的二肽的N^{α}-酰化衍生物、包括一个中性氨基酸与两个带电氨基酸的任何组合的三肽的N^{α}-酰化衍生物、DSS(多库酯钠,CAS登记号[577-11-7])、多库酯钙,CAS登记号[128-49-4])、多库酯钾,CAS登记号[7491-09-0])、SDS(十二烷基硫酸钠或月桂基硫酸钠)、辛酸钠、胆酸或其衍生物、胆汁酸及其盐、甘氨酸或牛磺酸缀合物、熊脱氧胆酸、胆酸钠、脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘氨胆酸钠、N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵基-1-丙磺酸盐、阴离子(烷基-芳基-磺酸盐类)一价表面活性剂、两性离子表面活性剂(例如N-烷基-N,N-二甲基铵基-1-丙磺酸盐、3-氯酰氨基-1-丙基二甲基铵基-1-丙磺酸盐、阳离子表面活性剂(季铵碱)(例如溴化十六烷基三甲铵、氯化十六烷基吡啶鎓)、非离子型表面活性剂(例如十二烷基β-D-吡喃葡萄糖苷)、poloxamine(例如Tetronic′s),其为衍生自依次将环氧丙烷和环氧乙烷加成至乙二胺的四官能嵌段共聚物,或者所述表面活性剂可选自咪唑啉衍生物或其混合物。这些特定的表面活性剂中的每一种构成本发明备选实施方案。

[0577] 药物组合物中表面活性剂的使用为技术人员所熟知。为了方便,作出对Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2000的引用。

[0578] 可能的是,在本发明药物组合物中可存在其它成分。所述另外的成分可包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张度改性剂、螯合剂、金属离子、油性载体、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶或蛋白质)和两性离子(例如氨基酸,例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。所述另外的成分当然应该对本发明药物组合物的总体稳定性没有不利作用。

[0579] 可在若干位点将包含本发明生长激素缀合物的药物组合物给予需要这类治疗的患者,所述位点为例如在局部位点,例如皮肤和粘膜位点;在旁路吸收位点,例如在动脉中、静脉中、心脏中给予;和参与吸收的位点,例如在皮肤、皮下、肌肉内或腹内给予。

[0580] 本发明药物组合物的给予可通过数种给药途径给予需要这种治疗的患者,所述给药途径为例如舌部给药、舌下给药、含服给药、口腔内给药、口服给药、胃肠内给药、鼻部给

药、肺部给药例如通过细支气管和肺泡或其组合、表皮给药、皮肤给药、透皮给药、阴道给药、直肠给药、眼部给药例如通过结膜、输尿管给药和经胃肠外给药。

[0581] 本发明的组合物可以以若干剂型给予,例如作为溶液剂、混悬剂、乳剂、微乳剂、复合型乳剂、泡沫剂、药膏、糊剂、硬膏、软膏、片剂、包衣片剂、冲洗剂、胶囊例如硬胶囊和软胶囊、栓剂、直肠用胶囊、滴剂、凝胶剂、喷雾剂、散剂、气雾剂、吸入剂、滴眼剂、眼用软膏、眼用冲洗剂、阴道栓剂、阴道环、阴道软膏、注射液、原位转化溶液剂例如原位胶凝剂、原位沉降剂、原位沉淀剂、原位结晶剂、输液剂和埋植剂。

[0582] 为了进一步提高生长激素缀合物的稳定性、增加生物利用度、增加溶解性、降低不良作用、实现本领域技术人员熟知的按时疗法(chronotherapy)和增加患者依从性或其任何组合,可让本发明组合物进一步例如通过共价、疏水和静电互相作用与药物载体、药物递送系统和改良药物递送系统复合或连接。载体、药物递送系统和改良药物递送系统的实例包括但不限于:聚合物例如纤维素及衍生物、多糖例如葡聚糖及衍生物、淀粉及衍生物、聚(乙烯醇)、丙烯酸酯聚合物和甲基丙烯酸酯聚合物、聚乳酸和聚乙醇酸及其嵌段共聚物、聚乙二醇、载体蛋白例如白蛋白、凝胶例如热胶凝体系,例如本领域技术人员熟知的嵌段共聚物体系、胶束、脂质体、微球、纳米颗粒、液晶及其分散体、脂质-水体系中相特性领域的技术人员熟知的L2相及其分散体、聚合胶束、复合型乳剂、自乳化、自微乳化、环糊精及其衍生物,以及树枝状高分子(dendrimer)。

[0583] 本发明组合物可用于固体、半固体、粉末和溶液组合物中,用于肺部给予生长激素缀合物,肺部给予使用例如定量吸入器、干粉吸入器和雾化器,所有装置都为本领域技术人员所熟知。

[0584] 本发明组合物尤其可用于控释、持续释放、延释、阻释和缓释药物递送系统组合物中。更具体地但不限于,组合物可用于本领域技术人员所熟知的胃肠外控释和持续释放系统(二种系统都导致给药次数减少许多倍)组合物中。甚至更优选皮下给予的控释和持续释放系统。在不限制本发明范围下,有用的控释系统和组合物的实例为水凝胶、油凝胶、液晶、聚合胶束、微球、纳米粒。

[0585] 制备可用于本发明组合物的控释系统的方法包括但不限于:结晶、冷凝、共结晶、沉淀、共沉淀、乳化、分散、高压匀浆化、包囊化、喷雾干燥、微胶囊化、凝聚、相分离、溶剂蒸发以制备微球、挤压和超临界流体法。对以下文献作出整体参考:药物控释手册(Handbook of Pharmaceutical Controlled Release)(Wise,D.L.,编辑,Marcel Dekker,New York,2000)及药物和药物科学(Drug and the Pharmaceutical Sciences),第99卷:蛋白质组合物和递送(Protein Composition and Delivery)(MacNally,E.J.,编辑,Marcel Dekker,New York,2000)。

[0586] 胃肠外给药可通过注射器、任选笔型(pen-like)注射器经皮下注射、肌内注射、腹膜内注射或静脉注射来进行。或者,胃肠外给药可以依靠输注泵进行。另一个选择为可为溶液剂或混悬剂的组合物,用于以鼻用喷雾或肺部喷雾形式给予生长激素缀合物。作为又一个选择,含有本发明生长激素缀合物的药物组合物还可以适合于透皮给药,例如通过无针注射或贴剂(任选离子电渗贴剂)来进行;或跨粘膜给药例如含服给药。

[0587] 术语“稳定化组合物”是指物理稳定性增加、化学稳定性增加或物理和化学稳定性增加的组合物。

[0588] 本文所用关于蛋白组合物的术语“物理稳定性”是指由于蛋白暴露至热-机械应力和/或与失稳的界面和表面(例如疏水表面和界面)的相互作用,所述蛋白形成蛋白的生物失活和/或不溶性聚集体的趋势。在将装于合适的容器(例如药筒或小瓶)中的组合物于不同温度下暴露于机械/物理应力(例如搅拌)中达各种时期后,通过目视检查和/或浊度测定评估水性蛋白组合物的物理稳定性。组合物的目视检查在黑暗背景下于聚焦强光中进行。组合物的浊度通过将浊度分级为例如0至3等级的目视评分来表征(未呈现混浊的组合物对应于目视评分0,而在日光中呈现可视混浊的组合物对应于目视评分3)。当其在日光中呈现可视混浊时,将组合物分类为关于蛋白聚集的物理不稳定。或者,可通过技术人员熟知的简易浊度测量来评估组合物的浊度。水性蛋白组合物的物理稳定性还可通过使用蛋白构象状态的光谱剂或光谱探测物来评估。所述探测物优选为优先结合至蛋白的非天然构象异构体的小分子。蛋白结构的小分子光谱探测物的一个实例为硫磺素T(Thioflavin T)。硫磺素T为已广泛用于检测淀粉状原纤维的荧光染料。在存在原纤维以及也可能的其它蛋白构型下,硫磺素T当结合至原纤维蛋白形式时在约450nm下产生新的激发最大值并在约482nm下发射增强。未接合的硫磺素T在所述波长下基本无荧光。

[0589] 其它小分子可用作蛋白结构从天然状态向非天然状态变化的探测物。例如优先结合至蛋白的外露疏水补丁(hydrophobic patch)的“疏水补丁”探测物。所述疏水补丁通常埋藏于处于其天然状态的蛋白三级结构之内,但随着蛋白开始解折叠或变性而暴露。这些小分子光谱探测物的实例为芳族疏水染料,例如蒽(antrhacene)、吖啶、菲咯啉等。其它光谱探测物为金属-氨基酸络合物,例如疏水氨基酸(例如苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸)的钴金属络合物等。

[0590] 本文所用关于蛋白组合物的术语“化学稳定性”是指蛋白结构的化学共价变化,所述变化导致形成与天然蛋白结构相比具有潜在较小生物效力和/或潜在增加的免疫原性的化学降解产物。根据天然蛋白的类型和性质以及所述蛋白所暴露的环境,可形成各种化学降解产物。如本领域技术人员所熟知,几乎不可能完全避免化学降解的消除,并且在储存和使用蛋白组合物期间常常见到化学降解产物的量不断增加。多数蛋白容易发生脱酰胺作用,其中谷氨酰胺酰或天冬酰胺酰残基的侧链酰胺基被水解而形成游离羧酸的过程。其它降解途径涉及高分子量转化产物的形成,其中两个或更多个蛋白分子通过转酰胺基作用和/或二硫化物相互作用相互共价结合,导致形成共价结合的二聚体、寡聚体和多聚体降解产物(Stability of Protein Pharmaceuticals,Ahern.T.J.和Manning M.C.,Plenum Press,New York 1992)。可提及作为化学降解另一种变体的氧化(例如甲硫氨酸残基的氧化)。可通过在暴露至不同环境条件(可通常通过例如增加温度来加速降解产物的形成)下之后的各个时间点测量化学降解产物的量,来评估蛋白组合物的化学稳定性。通常通过利用各种色谱技术(例如SEC-HPLC和/或RP-HPLC)根据分子大小和/或电荷将降解产物分离来测定各种降解产物的量。

[0591] 因此,如上文所概述,“稳定化组合物”是指物理稳定性增加、化学稳定性增加或物理和化学稳定性增加的组合物。总之,组合物在使用和储存(依照推荐的使用和储存条件)期间必须稳定直至达到失效期。

[0592] 在本发明的一个实施方案中,包含式(I)或(II)生长激素缀合物的药物组合物对于超过6周的使用和超过3年的储存为稳定的。

[0593] 在本发明另一实施方案中,包含式(I)或(II)生长激素缀合物的药物组合物对于超过4周的使用和超过3年的储存为稳定的。

[0594] 在本发明再一实施方案中,包含式(I)或(II)生长激素缀合物的药物组合物对于超过4周的使用和超过2年的储存为稳定的。

[0595] 在本发明又一实施方案中,包含式(I)或(II)生长激素缀合物的药物组合物对于超过2周的使用和超过2年的储存为稳定的。

[0596] 本文引用的包括出版物、专利申请和专利在内的所有参考文献在此通过引用结合中,其引用程度如同每一参考文献单独和明确地指出通过引用结合且在本文中以其整体提出一样。

[0597] 所有标题和小标题仅为了方便而在本文中使用,不应该理解为以任何方式限制本发明。

[0598] 除非本文另外指出或另外明显地与上下文矛盾,否则呈其所有可能变化的上述要素的任何组合都包括在本发明中。

[0599] 除非本文另外指出或另外明显地与上下文矛盾,否则在阐述本发明的情形中所用的术语“一个”和“一种”和“该”和相似对象,应理解为包括单数和复数两者。

[0600] 除非本文另外指出,否则本文对数值范围的陈述仅意欲作为单独提及落在该范围内的每一单独值的速记方法,且如同本文单独列举每一单独值一样将每一单独值包括在本说明书中。除非另外指出,否则本文提供的所有准确值代表对应的大约值(例如,合适时,可以认为关于特定因子或测量提供的所有准确例示性数值,亦提供了由“约”修饰的对应的大约测量)。

[0601] 除非本文另外指出或另外明显地与上下文矛盾,否则可以以任何合适次序实施本文所述的所有方法。

[0602] 除非另外指出,否则本文提供的任何和所有实例或例示性语言(例如“例如”)的使用,仅意欲更好地阐明本发明,并不构成对本发明范围的限制。除非同样明确指出,否则本说明书中的语言都不应被理解为表示任何要素对实施本发明是必不可少的。

[0603] 本文引用和并入专利文献,只是为了方便,并不反映关于所述专利文献的有效性、专利性和/或可执行性的任何看法。

[0604] 下面提供描述本发明的实施方案的非穷尽性列表。

[0605] 实施方案列表

[0606] 实施方案1:一种包含生长激素化合物(GH)的生长激素缀合物或其药学上接受的盐,所述生长激素化合物(GH)具有

[0607] a)单个Cys突变,

[0608] b)额外的二硫键,或者

[0609] c)单个Cys突变和额外的二硫键,

[0610] 其中白蛋白结合残基通过亲水间隔基与所述GH连接。

[0611] 2.实施方案1的缀合物,其中GH表示包含与人生长激素(hGH)的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)有至少80%同一性,例如与hGH有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列的生长激素化合物,或者GH为hGH(SEQ ID NO:1)。

[0612] 3.实施方案1的缀合物,其中GH或GH缀合物具有hGH生长激素活性的至少80%。

[0613] 4.实施方案1-3中任一个的缀合物,其中白蛋白结合残基通过亲水间隔基与具有单个Cys突变的GH连接。

[0614] 5.实施方案4的缀合物,其中单个Cys突变位于选自GH的N端、H1、H2、L2或H3的任一个区域。

[0615] 6.实施方案5的缀合物,其中GH具有选自以下任一个的单个Cys突变:T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C。

[0616] 7.实施方案1-3中任一个的缀合物,其中自蛋白结合残基通过亲水间隔基与具有额外二硫键的GH连接。

[0617] 8.实施方案7的缀合物,其中额外的二硫键处于环区段和螺旋区段之间或在环区段之内或在环区段之间或在螺旋区段之间。

[0618] 9.实施方案7-8中任一个的缀合物,其中GH包含额外的二硫键,其中至少一个半胱氨酸存在于环区段,例如来自氨基酸残基128-154(L3)中。

[0619] 10.实施方案7-9中任一个的缀合物,其中GH包含额外的二硫键,其中额外的二硫键将环区段与螺旋区段例如螺旋B或H2连接。

[0620] 11.实施方案7-10中任一个的缀合物,其中额外的二硫键将L3与H2连接。

[0621] 12.实施方案7-11中任一个的缀合物,其中额外的二硫键介于相当于hGH(SEQ ID NO:1)的以下位置中的至少一个氨基酸对之间:R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、I73C/S132C、I73C/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,例如Q84C/Y143C。

[0622] 13.实施方案1-3中任一个的缀合物,其中白蛋白结合残基通过亲水间隔基与具有单个Cys突变和额外二硫键的GH连接。

[0623] 14.实施方案13的缀合物,其中GH具有选自以下任一个的单个Cys突变:T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C。

[0624] 15.实施方案13-14中任一个的缀合物,其中额外的二硫键在环区段和螺旋区段之间或在环区段之内或在环区段之间或在螺旋区段之间。

[0625] 16.实施方案13-15中任一个的缀合物,其中GH包含额外的二硫键,其中至少一个半胱氨酸存在于环区段,例如来自氨基酸残基128-154(L3)中。

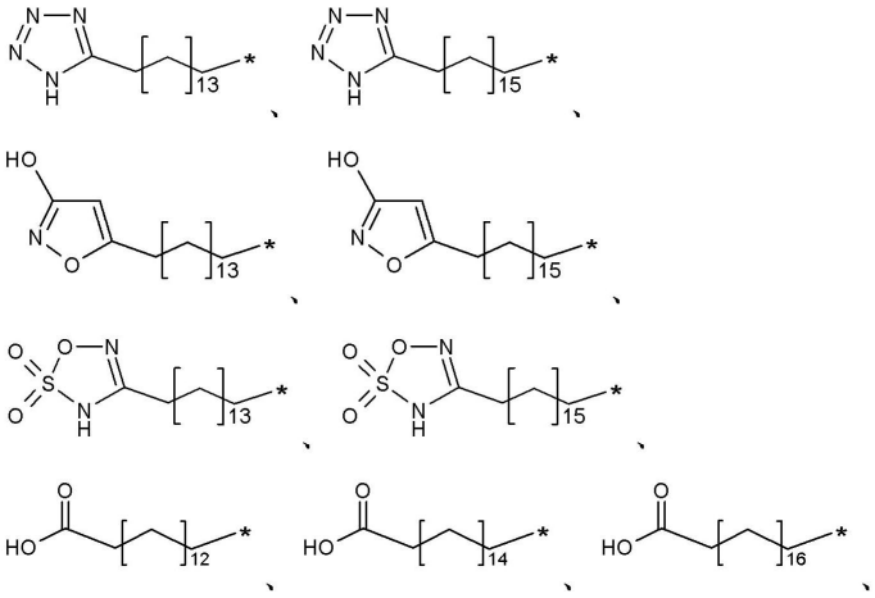
[0626] 17.实施方案13-16中任一个的缀合物,其中GH包含额外的二硫键,其中额外的二硫键将环区段与螺旋区段例如螺旋B或H2连接。

[0627] 18.实施方案13-17中任一个的缀合物,其中额外的二硫键将环区段例如来自氨基酸残基128-154(L3)与螺旋B或H2连接。

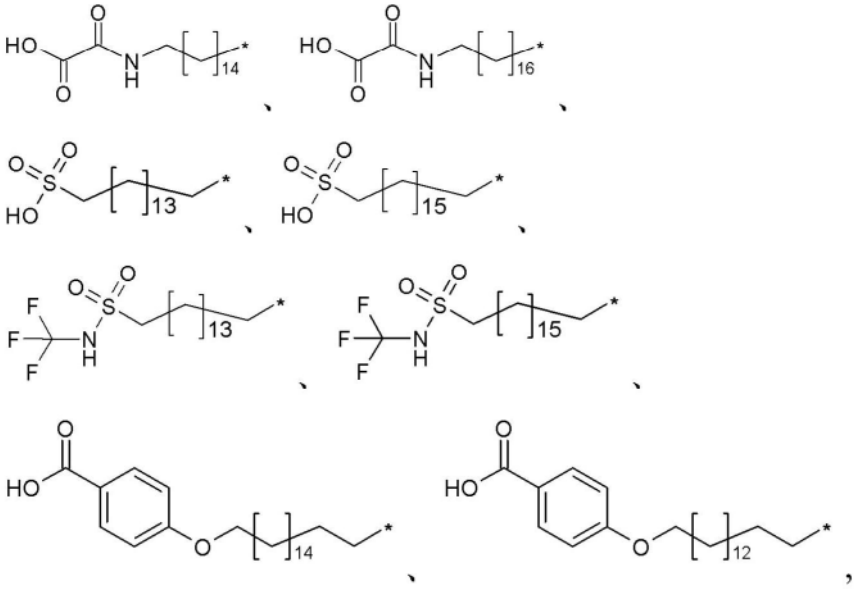
[0628] 19.实施方案13-18中任一个的缀合物,其中额外的二硫键介于相当于hGH(SEQ ID NO:1)的以下位置中的至少一个氨基酸对之间:R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、

D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、I73C/S132C、I73C/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,例如Q84C/Y143C。

[0629] 20.实施方案1-19中任一个的缀合物,其中白蛋白结合残基选自



[0630]



[0631] 其中*表示通过化学基团与亲水间隔基的连接,所述化学基团连接白蛋白结合残基和亲水间隔基。

[0632] 21.实施方案1-20中任一个的缀合物,其中连接白蛋白结合残基和亲水间隔基的化学基团具有下式

[0633] $-W_7-Y-$,

[0634] 其中

[0635] Y为-$(CH_2)_{I7}$-C_{3-10}-环烷基-W_8-或价键，

[0636] I7为0-6，

[0637] W_7选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS$(O)_2$-、-S$(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s3}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或价键；其中s3为0或1，

[0638] W_8选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS$(O)_2$-、-S$(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s4}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或价键；其中s4为0或1。

[0639] 22.实施方案1-21中任一个的缀合物，其中亲水间隔基具有下式

[0640] -X_1-X_2-X_3-X_4-

[0641] 其中

[0642] X_1为-W_1-[$(CHR^1)_{I1}$-W_2]$_{m1}$-{[$(CH_2)_{n1}$E1]$_{m2}$-[$(CHR^2)_{I2}$-W_3]$_{m3}$}$_{n2}$-，

[0643] X_2为-[$(CHR^3)_{I3}$-W_4]$_{m4}$-{[$(CH_2)_{n3}$E2]$_{m5}$-[$(CHR^4)_{I4}$-W_5]$_{m6}$}$_{n4}$-，

[0644] X_3为-[$(CHR^5)_{I5}$-W_6]$_{m7}$-，

[0645] X_4为F-D1-$(CH_2)_{I6}$-D2-，

[0646] I1、I2、I3、I4、I5和I6独立选自0-16，

[0647] m1、m3、m4、m6和m7独立选自0-10，

[0648] m2和m5独立选自0-25，

[0649] n1、n2、n3和n4独立选自0-16，

[0650] F为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键，其中芳基和杂芳基任选被卤素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S$(O)_2$OH或C_{1-6}-烷基取代，

[0651] R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-S$(O)_2$OH、-NH-C(=NH)-NH_2、C_{1-6}-烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-S$(O)_2$OH、-CN或-OH取代，

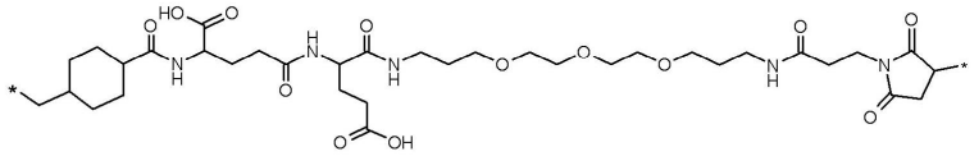
[0652] D1、D2、E1和E2独立选自-O-、-N(R^6)-、-N(C(O)R^7)-或价键；其中R^6和R^7独立表示氢或C_{1-6}-烷基，

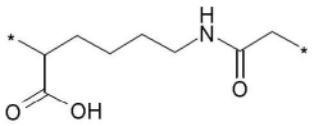
[0653] W_1-W_5独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS$(O)_2$-、-S$(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s2}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或价键；其中s2为0或1，

[0654] W_6选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS$(O)_2$-、-S$(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s1}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O)C_{1-6}-烷基、-C(O)NHC_{1-6}-烷基或价键；其中s1为0或1，C_{1-6}-烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH取代；其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

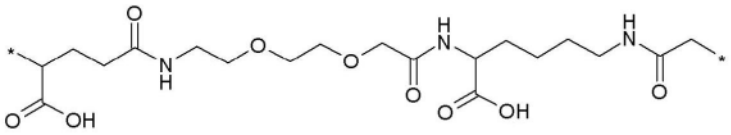
[0655] 23.实施方案1-22中任一个的缀合物，其中X_4为价键，W_6选自吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH，其中(*)表示CH的碳原子与GH的连接点。

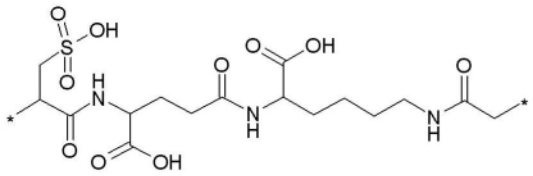
[0656] 24.实施方案22的缀合物，其中亲水间隔基选自

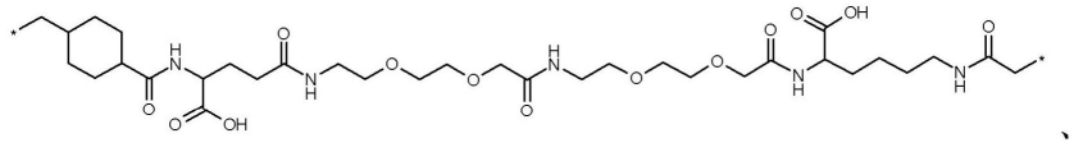


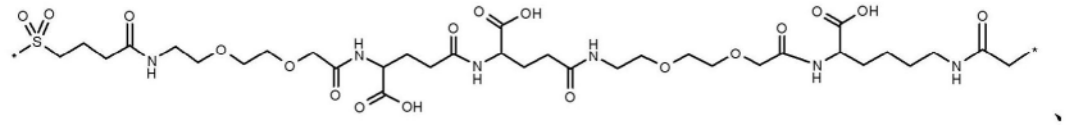


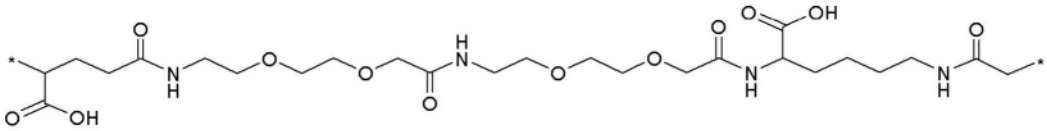
[0657]

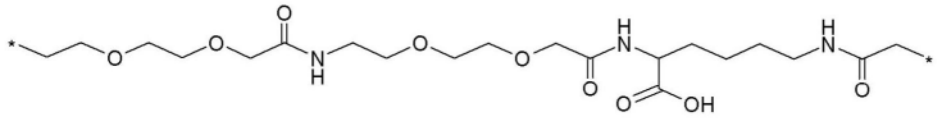


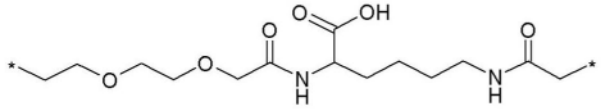




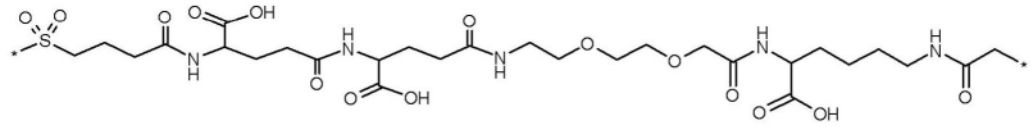


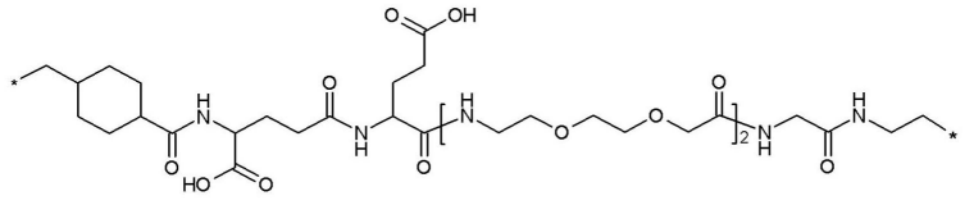


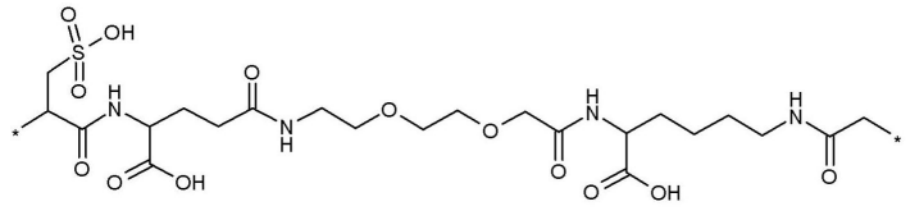


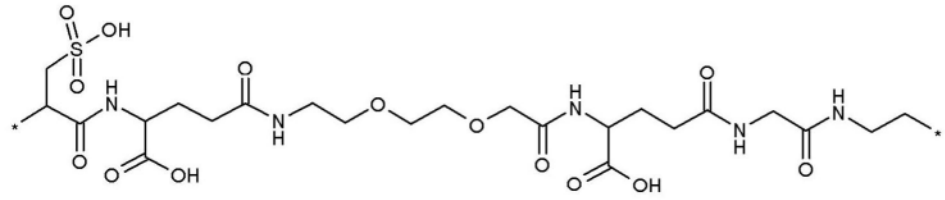


[0658]









[0659] 25.一种生长激素缀合物及其药学上可接受的盐,其中所述生长激素缀合物具有下式(I):

[0660] A-W-B-GH (I)

[0661] 其中

[0662] GH表示具有单个Cys突变的生长激素化合物,

[0663] B表示与Cys突变的硫残基连接的亲水间隔基，

[0664] W是连接A和B的化学基团，和

[0665] A表示白蛋白结合残基。

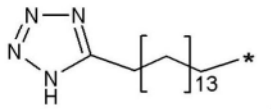
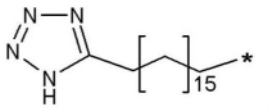
[0666] 26.实施方案25的缀合物，其中GH表示包含与人生长激素(hGH)的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)有至少80％同一性，例如与hGH有至少80％、至少85％、至少90％或至少95％同一性的氨基酸序列的生长激素化合物，或GH为hGH(SEQ ID NO:1)。

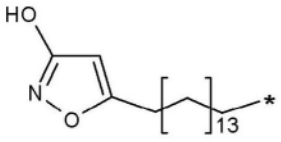
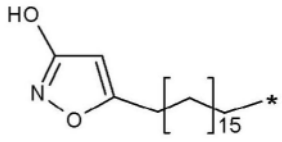
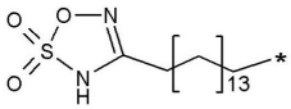
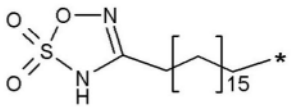
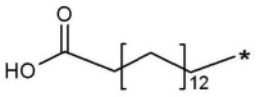
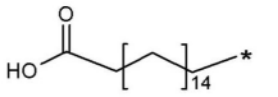
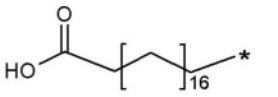
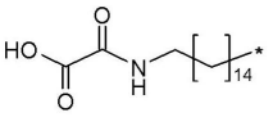
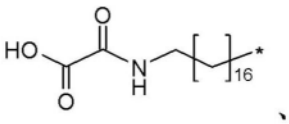
[0667] 27.实施方案25的缀合物，其中GH或GH缀合物具有hGH生长激素活性的至少80％。

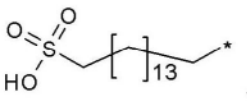
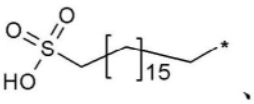
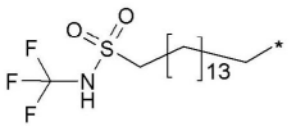
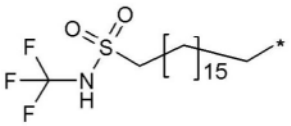
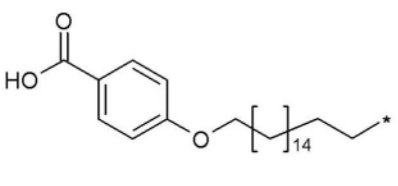
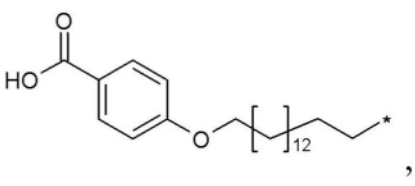
[0668] 28.实施方案25-27中任一个的缀合物，其中单个Cys突变位于选自GH的N端、H1、H2、L2或H3的任一个区域。

[0669] 29.实施方案25-28中任一个的缀合物，其中GH具有选自以下任一个的单个Cys突变：T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C。

[0670] 30.实施方案25-29中任一个的缀合物，其中A选自


、

、

[0671]

、

、

、

、

、

、

、

、

、

[0672]

、

、

、

、

、

，

[0673] 其中*表示通过W与B连接。

[0674] 31.实施方案25-30中任一个的缀合物,其中W具有下式

[0675] $-W_7-Y-$,

[0676] 其中

[0677] Y为$-(CH_2)_{I7}-C_{3-10}$-环烷基$-W_8-$或价键,

[0678] I7为0-6,

[0679] W_7选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)$NHS(0)_2$-、-$S(0)_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)O-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s3}$-、-C(0)-、-C(0)O-、-OC(0)-或价键;其中s3为0或1,

[0680] W_8选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)$NHS(0)_2$-、-$S(0)_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)O-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s4}$-、-C(0)-、-C(0)O-、-OC(0)-或价键;其中s4为0或1。

[0681] 32.实施方案25-31中任一个的缀合物,其中B具有下式

[0682] $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0683] 其中

[0684] X_1为$-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

[0685] X_2为$-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

[0686] X_3为$-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$,

[0687] X_4为F-D1-$(CH_2)_{I6}$-D2-,

[0688] I1、I2、I3、I4、I5和I6独立选自0-16,

[0689] m1、m3、m4、m6和m7独立选自0-10,

[0690] m2和m5独立选自0-25,

[0691] n1、n2、n3和n4独立选自0-16,

[0692] F为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键,其中芳基和杂芳基任选被卤素、-CN、-OH、-C(0)OH、-C(0)NH_2、-$S(0)_2$OH或C_{1-6}-烷基取代,

[0693] R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(0)OH、-C(0)NH_2、-S(0)OH、-$S(0)_2$OH、-NH-C(=NH)-NH_2、C_{1-6}-烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(0)OH、-C(0)NH_2、-S(0)OH、-$S(0)_2$OH、-CN或-OH取代,

[0694] D1、D2、E1和E2独立选自-O-、-N(R^6)-、-N(C(0)R^7)-或价键;其中R^6和R^7独立表示氢或C_{1-6}-烷基,

[0695] W_1-W_5独立选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)$NHS(0)_2$-、-$S(0)_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)O-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s2}$-、-C(0)-、-C(0)O-、-OC(0)-或价键;其中s2为0或1,W_6选自-C(0)NH-、-NHC(0)-、-C(0)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(0)-、-C(0)$NHS(0)_2$-、-$S(0)_2$NHC(0)-、-OC(0)NH-、-NHC(0)O-、-C(0)CH_2-、-CH_2C(0)-、-C(0)CH=CH-、-CH=CHC(0)-、-$(CH_2)_{s1}$-、-C(0)-、-C(0)O-、-OC(0)-、-NHC(0)C_{1-6}-烷基、-C(0)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中s1为0或1,并且C_{1-6}-烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(0)CH*CH_2COOH或-NHC(0)CH_2CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0696] 33.实施方案25-32中任一个的缀合物,其中

[0697] I1、I2、I3、I4、I5和I6独立地为0-6,

[0698] m1、m3、m4、m6和m7独立地为0-6,

[0699] m2和m5独立地为0-10,和

[0700] n1、n2、n3和n4独立地为0-10。

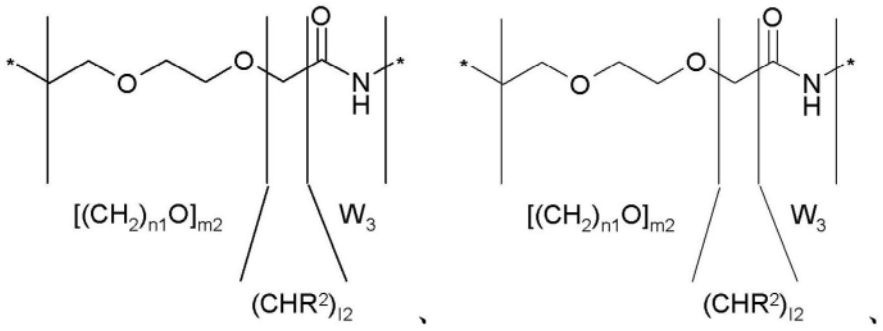
[0701] 34.实施方案25-33中任一个的缀合物,其中D1和D2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

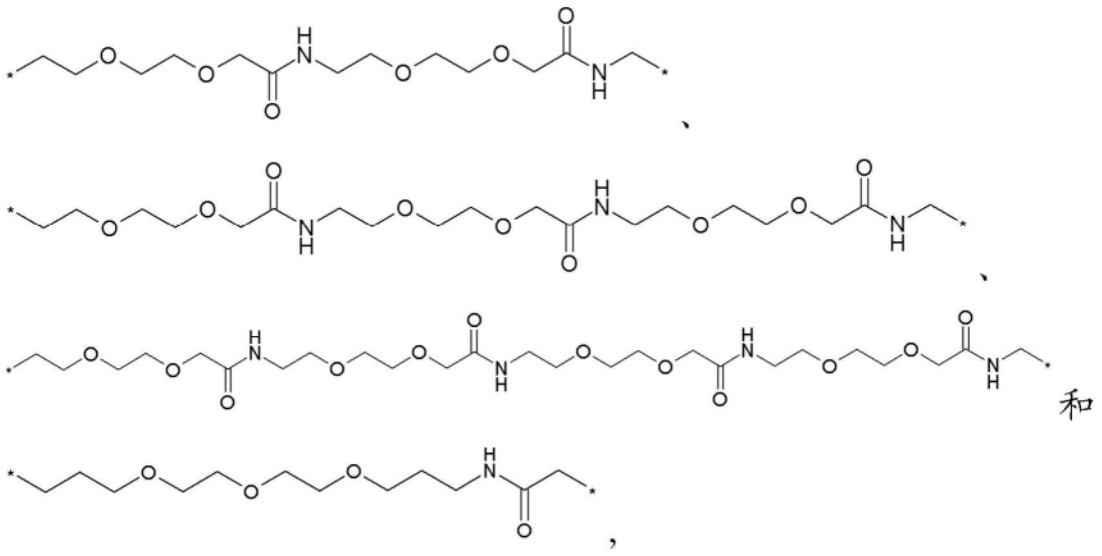
[0702] 35.实施方案25-34中任一个的缀合物,其中E1和E2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

[0703] 36.实施方案25-35中任一个的缀合物,其中W_1-W_8独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-、-NHC(O)C_{1-6}-烷基、-C(O)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0704] 37.实施方案25-36中任一个的缀合物,其中R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH_2或-S(O)$_2$OH取代。

[0705] 38.实施方案25-37中任一个的缀合物,其中-{[$(CH_2)_{n1}$E1]$_{m2}$-[$(CHR^2)_{I2}$-W_3]$_{m3}$}$_{n2}$-和-{[$(CH_2)_{n3}$E2]$_{m5}$-[$(CHR^4)_{I4}$-W_5]$_{m6}$}$_{n4}$-(其中E1和E2为-O-)选自

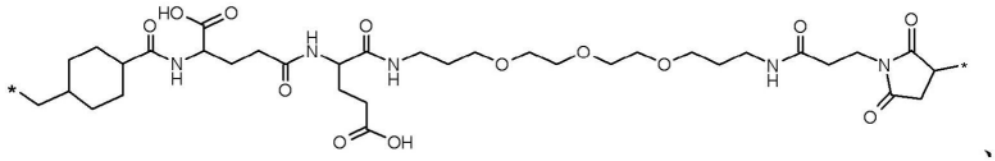
[0706] 

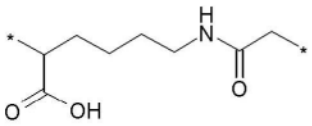
[0707] 

[0708] 其中*意欲表示连接点,即开放键。

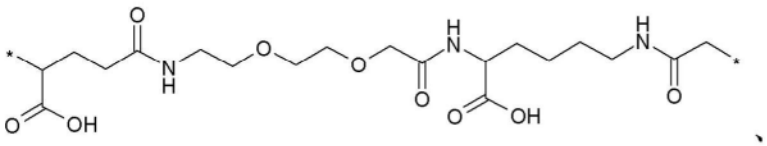
[0709] 39.实施方案25-38中任一个的缀合物,其中X_4为价键,W_6选自吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH,其中(*)表示CH的碳原子与GH的连接点。

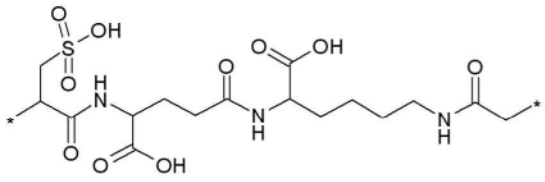
[0710] 40.实施方案25-39中任一个的缀合物,其中B选自

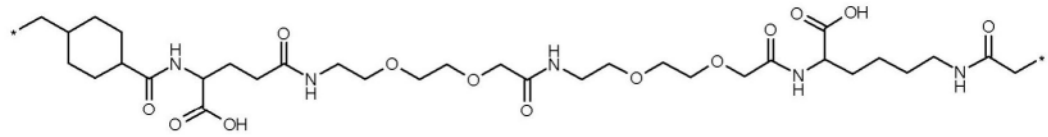


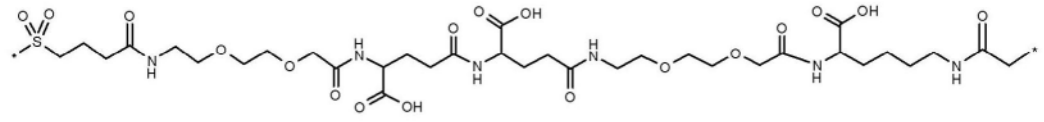


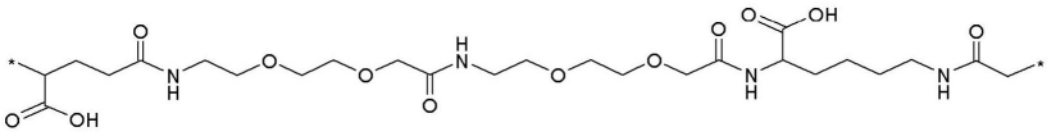
[0711]

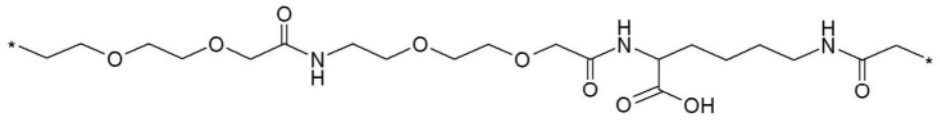


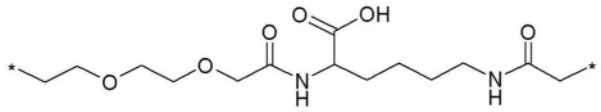




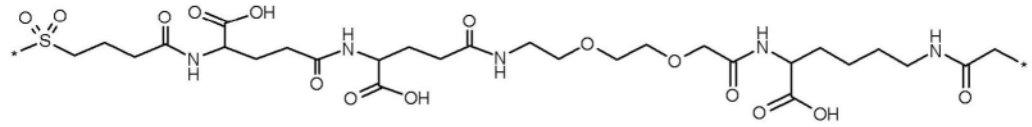


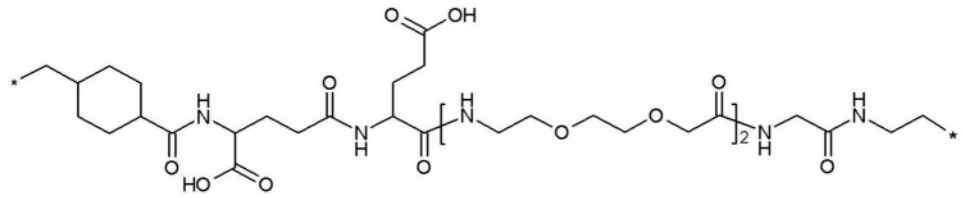


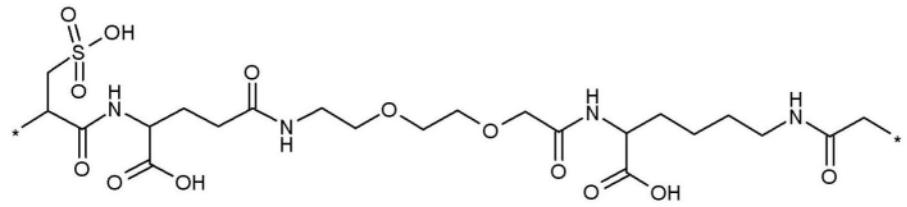


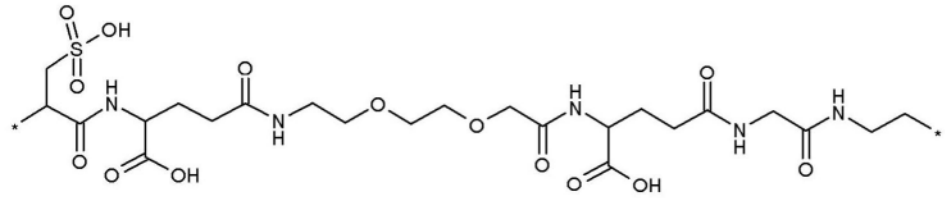


[0712]



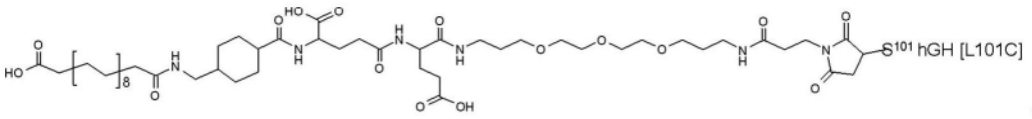


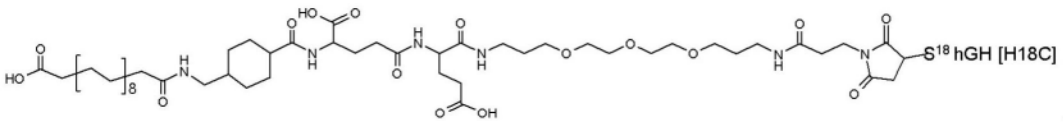


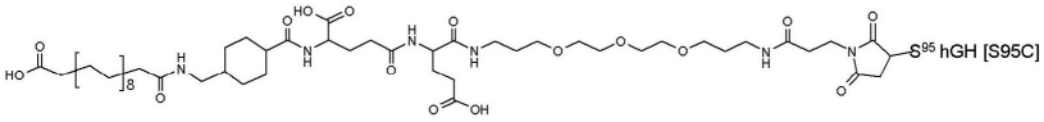


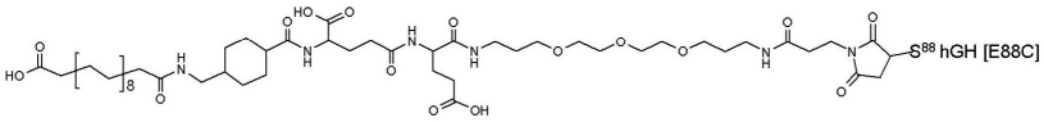
[0713] 41.实施方案25-40中任一个的缀合物,其中所述化合物选自

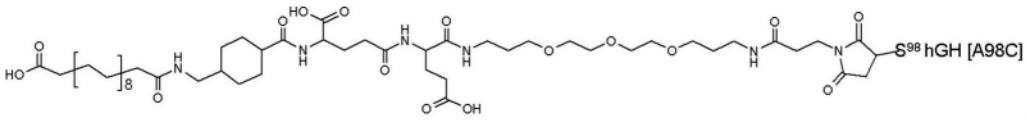
[0714]

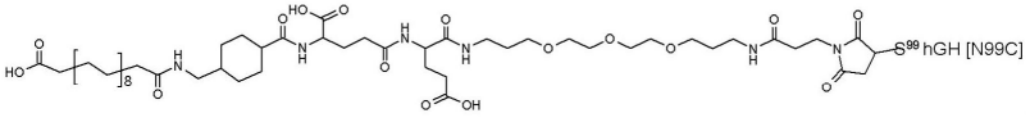


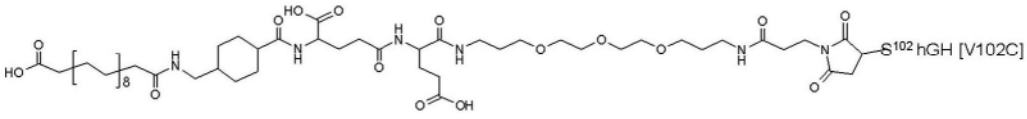

S18 hGH [H18C]


S95 hGH [S95C]

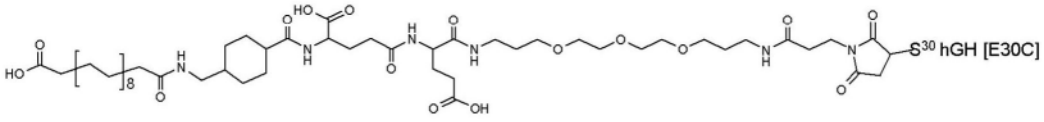

S88 hGH [E88C]

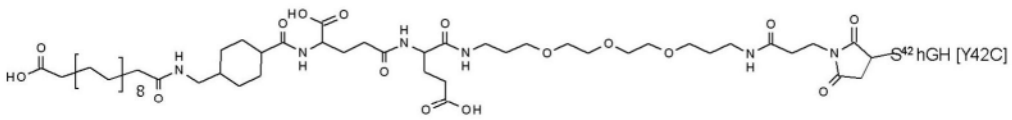

S98 hGH [A98C]

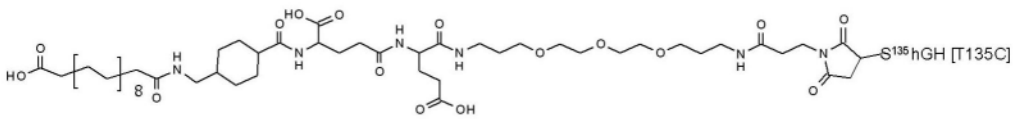

S99 hGH [N99C]

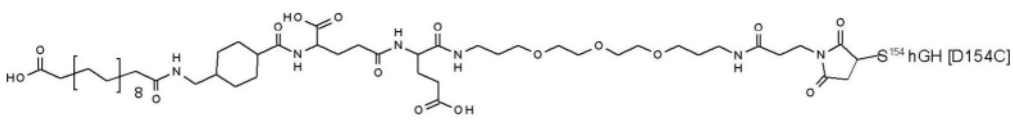

S102 hGH [V102C]

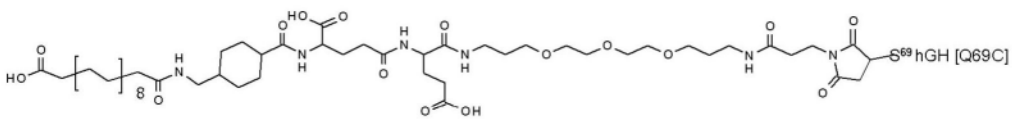
[0715]

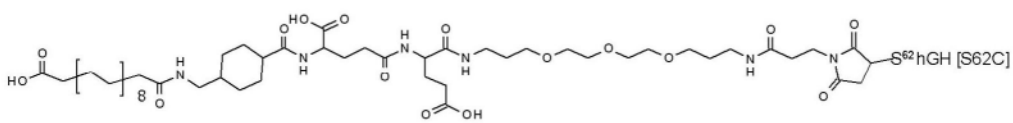

S30 hGH [E30C]

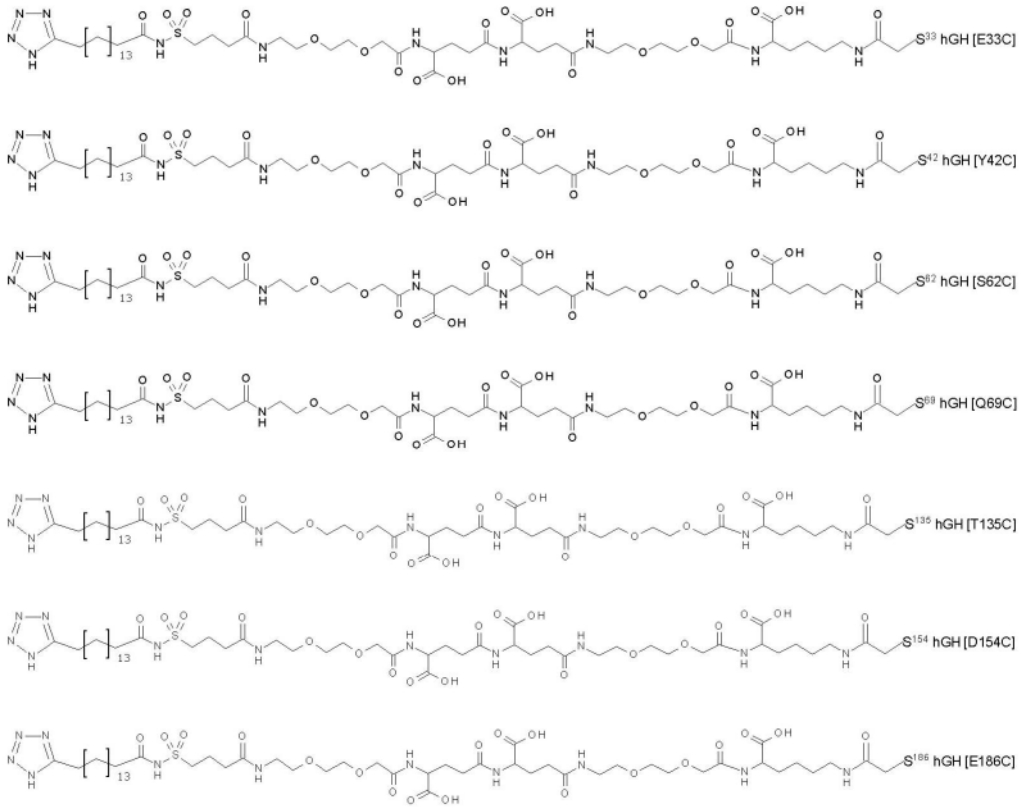

S42 hGH [Y42C]


S135 hGH [T135C]

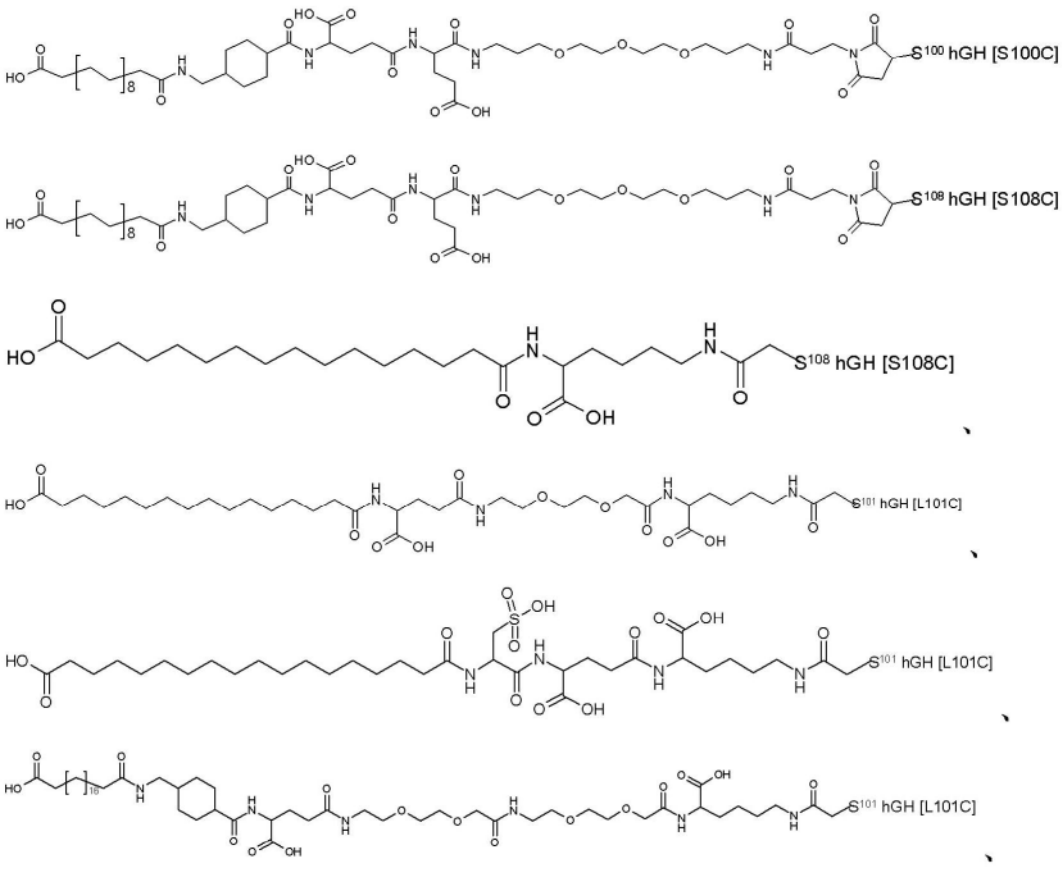

S154 hGH [D154C]

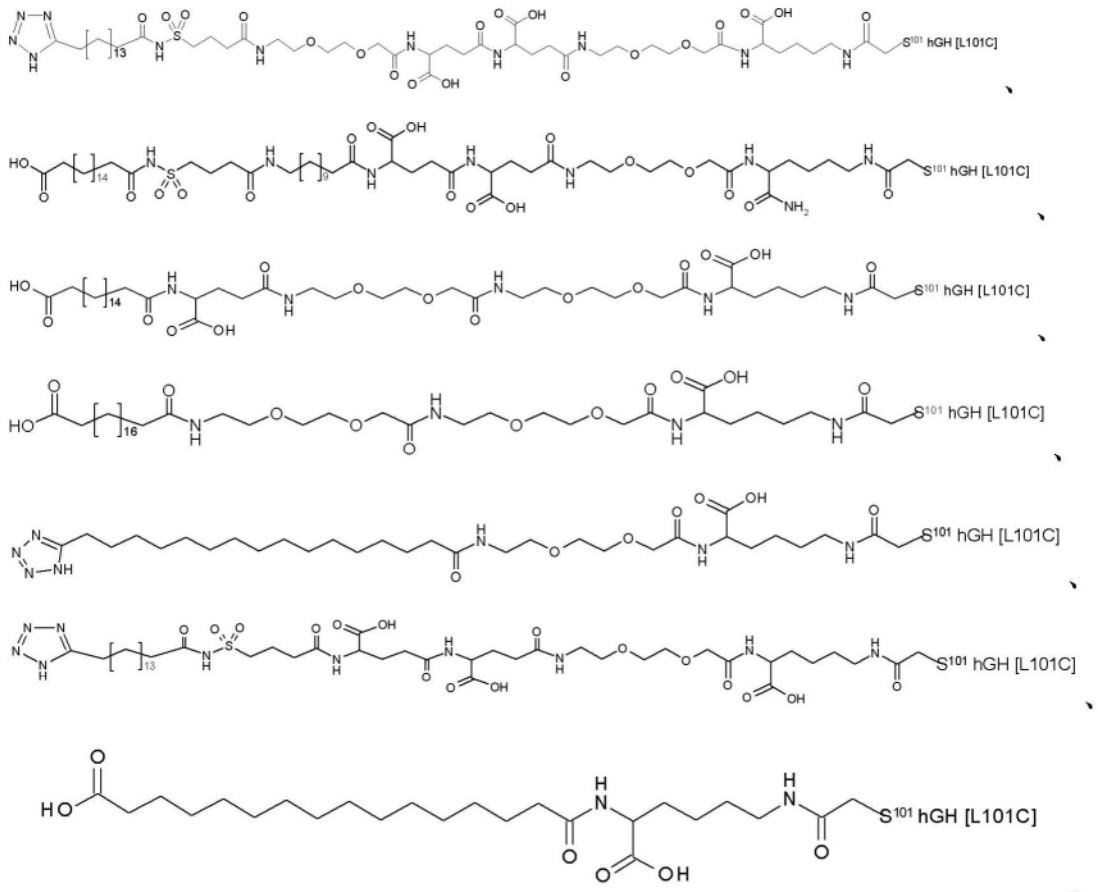

S69 hGH [Q69C]


S62 hGH [S62C]


S33 hGH [E33C]
S42 hGH [Y42C]
S62 hGH [S62C]
S69 hGH [Q69C]
S135 hGH [T135C]
S154 hGH [D154C]
S186 hGH [E186C]

[0716]


S100 hGH [S100C]
S108 hGH [S108C]
S108 hGH [S108C]
S101 hGH [L101C]
S101 hGH [L101C]
S101 hGH [L101C]

[0717] 

[0718] 42.一种生长激素缀合物及其药学上可接受的盐,其中所述生长激素缀合物具有下式(I):

[0719] A-W-B-GH (I)

[0720] 其中

[0721] GH表示具有额外二硫键的生长激素化合物,

[0722] B表示亲水间隔基,

[0723] W是连接A和B的化学基团,和

[0724] A表示白蛋白结合残基。

[0725] 43.实施方案42的缀合物,其中GH表示包含与人生长激素(hGH)的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)有至少80%同一性、例如与hGH有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列的生长激素化合物,或GH为hGH(SEQ ID NO:1)。

[0726] 44.实施方案42的缀合物,其中GH或GH缀合物具有hGH生长激素活性的至少80%。

[0727] 45.实施方案44的缀合物,其中所述活性在体外BAF测定法(测定法I)中测量。

[0728] 46.实施方案42-45中任一个的缀合物,其中GH包含额外的二硫键,其在环区段和螺旋区段之间或在环区段之内或在环区段之间或在螺旋区段之间。

[0729] 47.实施方案42-46中任一个的缀合物,其中GH包含额外的二硫键,其中至少一个半胱氨酸存在于环区段,例如来自氨基酸残基128-154(L3)中。

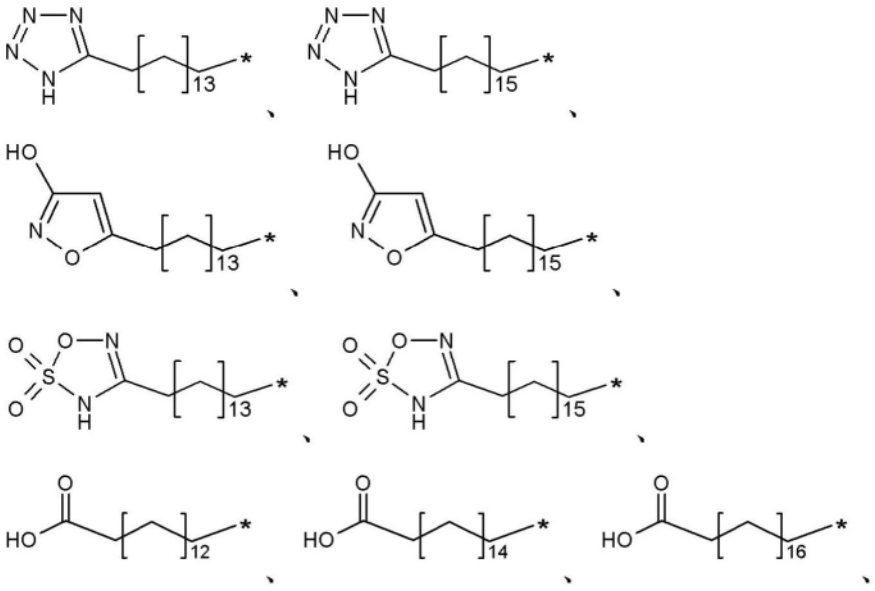
[0730] 48.实施方案42-47中任一个的缀合物,其中GH包含额外的二硫键,其中额外的二硫键将环区段与螺旋区段例如螺旋B或螺旋2连接

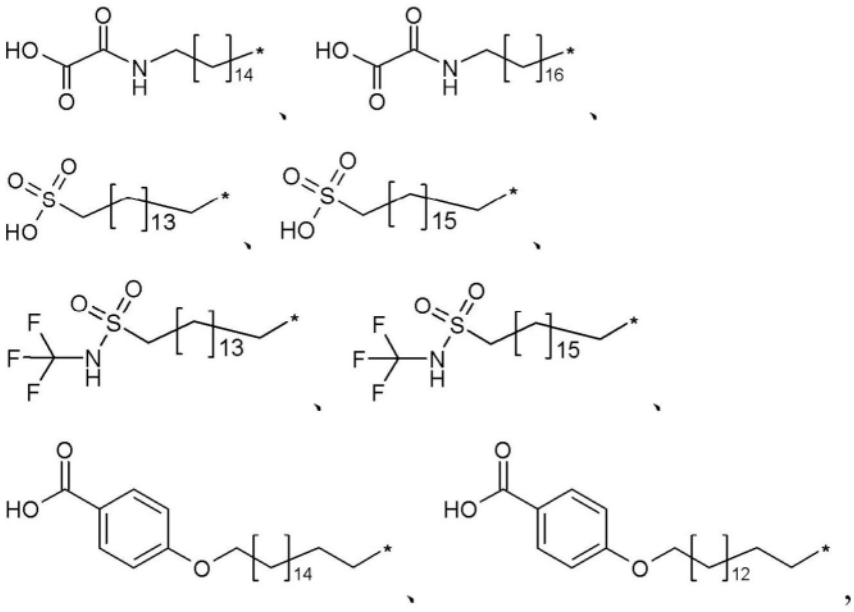
[0731] 49.实施方案42-48中任一个的缀合物,其中GH包含额外的二硫键,其中额外的二

硫键将L3(128-154)与螺旋B或螺旋2连接。

[0732] 50.实施方案42-49中任一个的缀合物,其中额外的二硫键介于相当于hGH(SEQ ID NO:1)的以下位置中的至少一个氨基酸对之间:R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、I73C/S132C、I73C/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,例如Q84C/Y143C。

[0733] 51.实施方案42-50中任一个的缀合物,其中A选自

[0734] 

[0735] 

[0736] 其中*表示通过W与B连接。

[0737] 52.实施方案42-51中任一个的缀合物,其中W具有下式

[0738] $-W_7-Y-$,

[0739] 其中

[0740] Y为-$(CH_2)_{I7}$-C_{3-10}-环烷基-W_8-或价键，

[0741] I7为0-6，

[0742] W_7选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s3}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或价键；其中s3为0或1，

[0743] W_8选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s4}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或价键；其中s4为0或1。

[0744] 53.实施方案42-52中任一个的缀合物，其中B具有下式

[0745] -X_1-X_2-X_3-X_4-

[0746] 其中

[0747] X_1为-W_1-[$(CHR^1)_{I1}$-W_2]$_{m1}$-{[$(CH_2)_{n1}$E1]$_{m2}$-[$(CHR^2)_{I2}$-W_3]$_{m3}$}$_{n2}$-，

[0748] X_2为-[$(CHR^3)_{I3}$-W_4]$_{m4}$-{[$(CH_2)_{n3}$E2]$_{m5}$-[$(CHR^4)_{I4}$-W_5]$_{m6}$}$_{n4}$-，

[0749] X_3为-[$(CHR^5)_{I5}$-W_6]$_{m7}$-，

[0750] X_4为F-D1-$(CH_2)_{I6}$-D2-，

[0751] I1、I2、I3、14、I5和I6独立选自0-16，

[0752] m1、m3、m4、m6和m7独立选自0-10，

[0753] m2和m5独立选自0-25，

[0754] n1、n2、n3和n4独立选自0-16，

[0755] F为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键，其中芳基和杂芳基任选被卤素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-$S(O)_2$OH或C_{1-6}-烷基取代，

[0756] R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-$S(O)_2$OH、-NH-C(=NH)-NH_2、C_{1-6}-烷基、芳基或杂芳基；其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-$S(O)_2$OH、-CN或-OH取代，

[0757] D1、D2、E1和E2独立选自-O-、-N(R^6)-、-N(C(O)R^7)-或价键；其中R^6和R^7独立表示氢或C_{1-6}-烷基，

[0758] W_1-W_5独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(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，

[0759] W_6选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s1}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O)C_{1-6}-烷基、-C(O)NHC_{1-6}-烷基或价键；其中s1为0或1，C_{1-6}-烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH取代；其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0760] 54.实施方案42-53中任一个的缀合物，其中

[0761] I1、I2、I3、I4、I5和I6独立地为0-6，

[0762] m1、m3、m4、m6和m7独立地为0-6，

[0763] m2和m5独立地为0-10，和

[0764] n1、n2、n3和n4独立地为0-10。

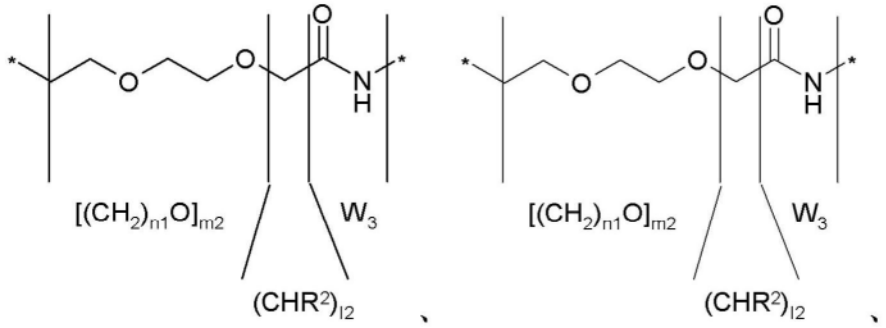
[0765] 55.实施方案42-54中任一个的缀合物,其中D1和D2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

[0766] 56.实施方案42-55中任一个的缀合物,其中E1和E2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

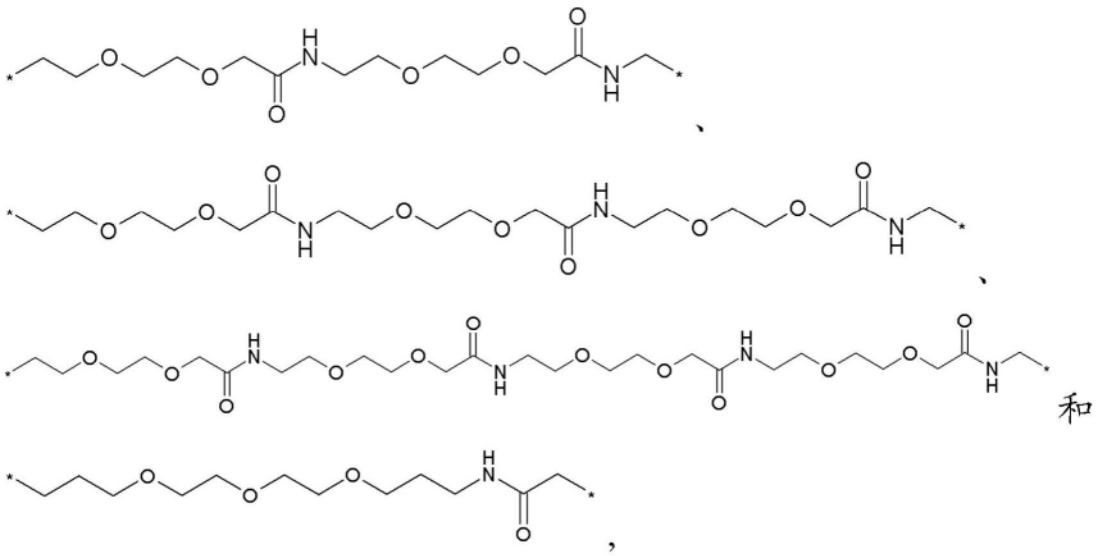
[0767] 57.实施方案42-56中任一个的缀合物,其中W_1-W_8独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-、-NHC(O)C_{1-6}-烷基或-C(O)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0768] 58.实施方案42-57中任一个的缀合物,其中R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH_2或-S(O)$_2$OH取代。

[0769] 59.实施方案42-58中任一个的缀合物,其中-{[$(CH_2)_{n1}$E1]$_{m2}$-[$(CHR^2)_{I2}$-W_3]$_{m3}$}$_{n2}$-和-{[$(CH_2)_{n3}$E2]$_{m5}$-[$(CHR^4)_{I4}$-W_5]$_{m6}$}$_{n4}$-(其中E1和E2为-O-)选自

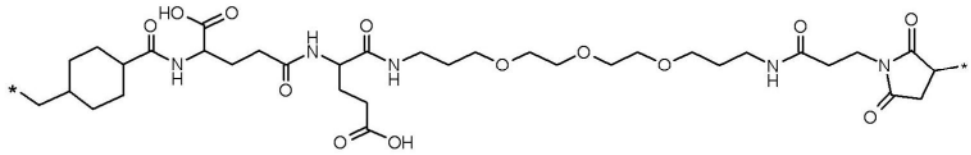


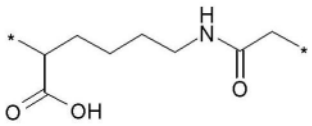
[0770]



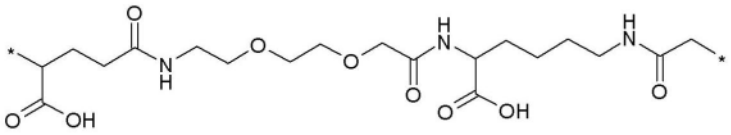
[0771] 其中*意欲表示连接点,即开放键。

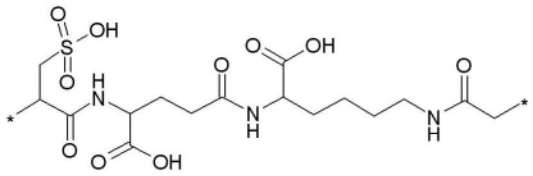
[0772] 60.实施方案42-59中任一个的缀合物,其中B选自

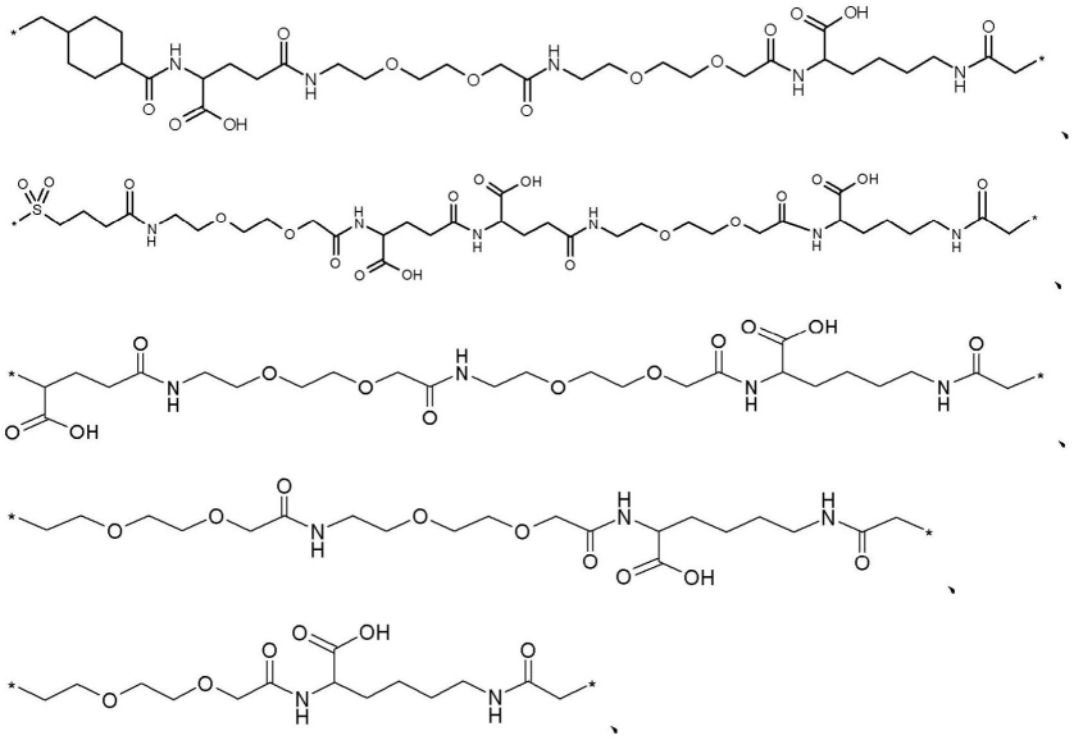




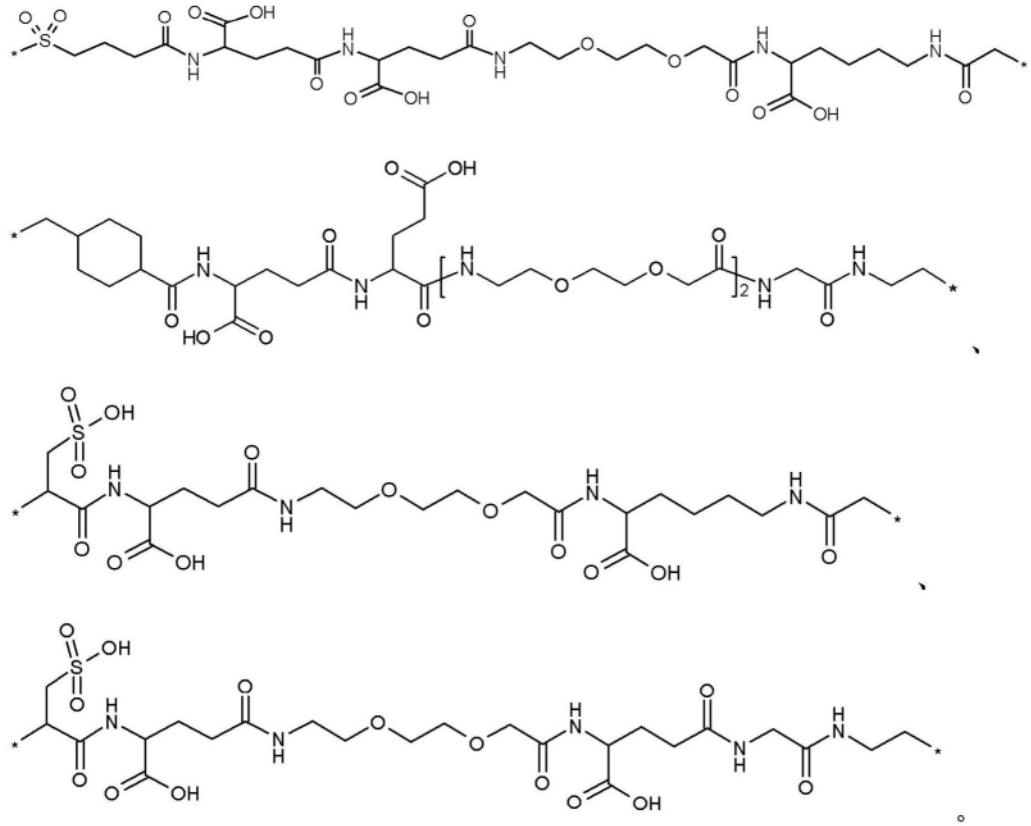
[0773]





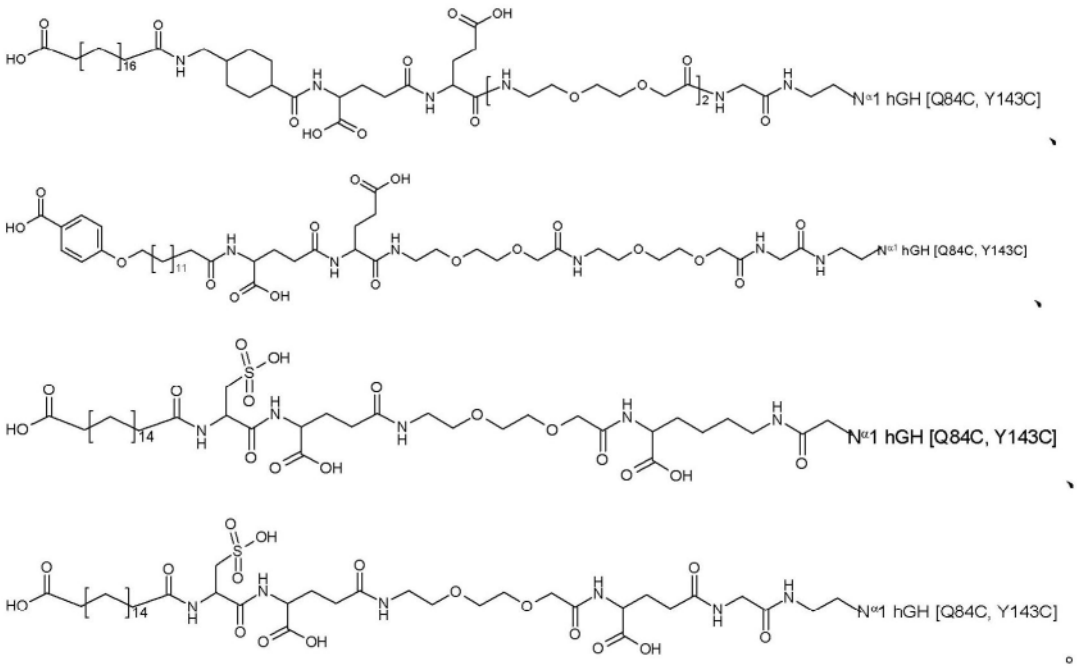


[0774]



[0775] 61.实施方案42-60中任一个的缀合物,其中A通过B与相当于hGH SEQ ID NO:1的40位、141位的位置上的谷氨酰胺残基或者与生长激素化合物的N端残基连接。

[0776] 62.实施方案42-61中任一个的缀合物,其中所述化合物选自

[0777] 

[0778] 63.一种生长激素缀合物及其药学上可接受的盐,其中所述生长激素缀合物具有下式(I):

[0779] A-W-B-GH (I)

[0780] 其中

[0781] GH表示具有单个Cys突变和额外二硫键的生长激素化合物,

[0782] B表示与Cys突变的硫残基连接的亲水间隔基,

[0783] W是连接A和B的化学基团,和

[0784] A表示白蛋白结合残基。

[0785] 64.实施方案63的缀合物,其中GH表示包含与人生长激素(hGH)的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)有至少80%同一性、例如与hGH有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列的生长激素化合物,或GH为hGH(SEQ ID NO:1)。

[0786] 65.实施方案64的缀合物,其中GH或GH缀合物具有hGH生长激素活性的至少80%。

[0787] 66.实施方案63-65中任一个的缀合物,其中单个Cys突变位于选自GH的N端、H1、H2、L2或H3的任一个区域。

[0788] 67.实施方案63-66中任一个的缀合物,其中GH具有选自以下任一个的单个Cys突变;T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C和G190C,例如以下的任一个:T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C。

[0789] 68.实施方案63-67中任一个的缀合物,其中额外的二硫键在环区段和螺旋区段之间或在环区段之内或在环区段之间或在螺旋区段之间。

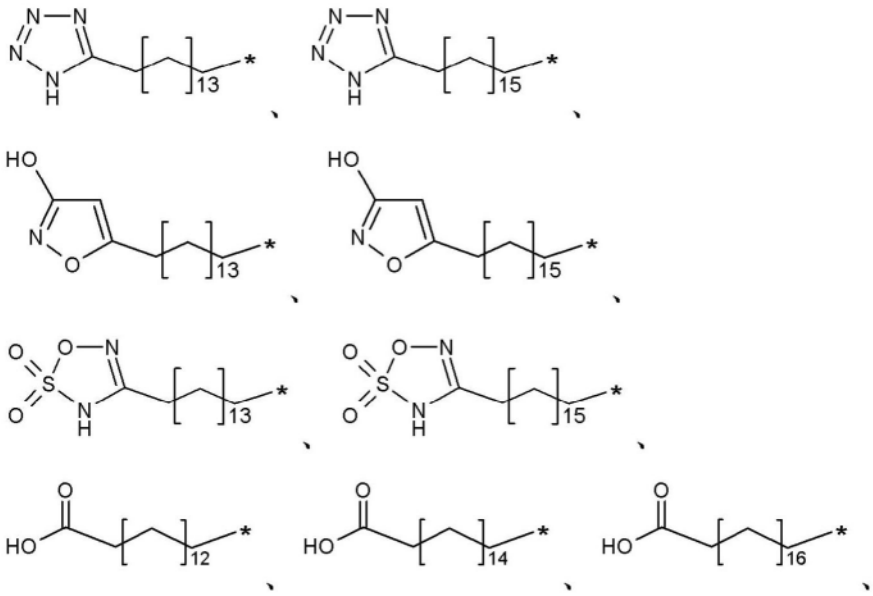
[0790] 69.实施方案63-68中任一个的缀合物,其中GH包含额外的二硫键,其中至少一个半胱氨酸存在于环区段,例如来自氨基酸残基128-154(L3)中。

[0791] 70.实施方案63-69中任一个的缀合物,其中额外的二硫键将环区段与螺旋区段例如H2连接。

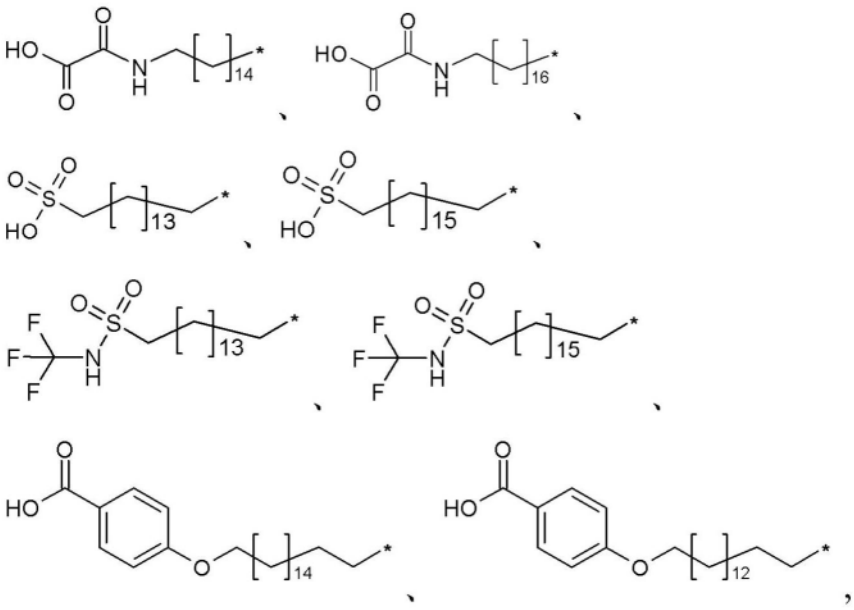
[0792] 71.实施方案63-70中任一个的缀合物,其中额外的二硫键将L3与螺旋H2连接。

[0793] 72.实施方案63-71中任一个的缀合物,其中额外的二硫键介于相当于hGH(SEQ ID NO:1)的以下位置中的至少一个氨基酸对之间:R16C/L117C、A17C/E174C、H21C/M170C、D26C/V102C、D26C/Y103C、N47C/T50C、Q49C/G161C、F54C/Y143C、F54C/S144C、F54C/F146C、S55C/Y143C、S57C/Y143C、I58C/Q141C、I58C/Y143C、I58C/S144C、P59C/Q137C、P61C/E66C、P61C/T67C、S71C/S132C、I73C/S132C、I73C/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,例如Q84C/Y143C。

[0794] 73.实施方案63-72中任一个的缀合物,其中A选自



[0795]



[0796] 其中*表示通过W与B连接。

[0797] 74.实施方案63-73中任一个的缀合物,其中W具有下式

[0798] $-W_7-Y-$,

[0799] 其中

[0800] Y为$-(CH_2)_{I7}-C_{3-10}$-环烷基$-W_8-$或价键,

[0801] I7为0-6,

[0802] W_7选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s3}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或价键;其中s3为0或1,

[0803] W_8选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s4}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-或价键;其中s4为0或1。

[0804] 75.实施方案63-74中任一个的缀合物,其中B具有下式

[0805] $-X_1-X_2-X_3-X_4-$

[0806] 其中

[0807] X_1为$-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

[0808] X_2为$-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

[0809] X_3为$-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$,

[0810] X_4为F-D1-$(CH_2)_{I6}$-D2-,

[0811] I1、I2、I3、I4、I5和I6独立选自0-16,

[0812] m1、m3、m4、m6和m7独立选自0-10,

[0813] m2和m5独立选自0-25,

[0814] n1、n2、n3和n4独立选自0-16,

[0815] F为芳基、杂芳基、吡咯烷-2,5-二酮或价键,其中芳基和杂芳基任选被卤素、-CN、-OH、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-$S(O)_2$OH或C_{1-6}-烷基取代,

[0816] R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-$S(O)_2$OH、-NH-C(=NH)-NH_2、C_{1-6}-烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-$S(O)_2$OH、-CN或-OH取代,

[0817] D1、D2、E1和E2独立选自-O-、-N(R^6)-、-N(C(O)R^7)-或价键;其中R^6和R^7独立表示氢或C_{1-6}-烷基,

[0818] W_1-W_5独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(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,

[0819] W_6选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)$NHS(O)_2$-、-$S(O)_2$NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)CH_2-、-CH_2C(O)-、-C(O)CH=CH-、-CH=CHC(O)-、-$(CH_2)_{s1}$-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-NHC(O)C_{1-6}-烷基、-C(O)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中s1为0或1,并且C_{1-6}-烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0820] 76.实施方案63-75中任一个的缀合物,其中

[0821] I1、I2、I3、I4、I5和I6独立地为0-6,

[0822] m1、m3、m4、m6和m7独立地为0-6,

[0823] m2和m5独立地为0-10,和

[0824] n1、n2、n3和n4独立地为0-10。

[0825] 77.实施方案63-75中任一个的缀合物,其中D1和D2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

[0826] 78.实施方案63-77中任一个的缀合物,其中E1和E2独立选自-O-或-N(R^6)-或价键。

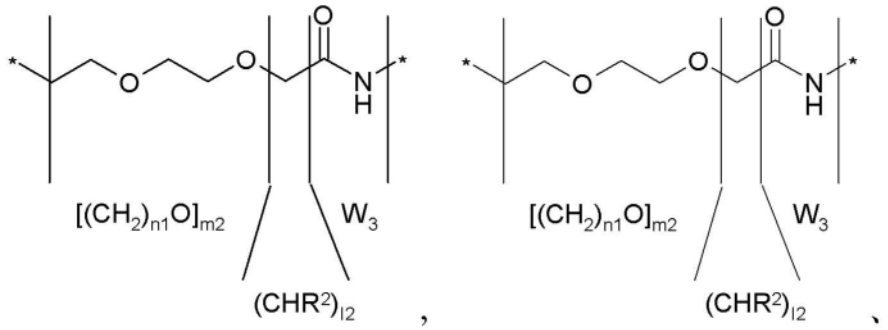
[0827] 79.实施方案63-78中任一个的缀合物,其中W_1-W_8独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS(O)$_2$-、-S(O)$_2$NHC(O)-、-NHC(O)C_{1-6}-烷基或-C(O)NHC_{1-6}-烷基或价键;其中烷基任选被氧代基、吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH取代;其中(*)表示CH的碳原子与X_4的连接点。

[0828] 80.实施方案63-79中任一个的缀合物,其中R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)$_2$OH或C_{1-6}-烷基;其中烷基任选被-C(O)OH、-C(O)NH_2或-S(O)$_2$OH取代。

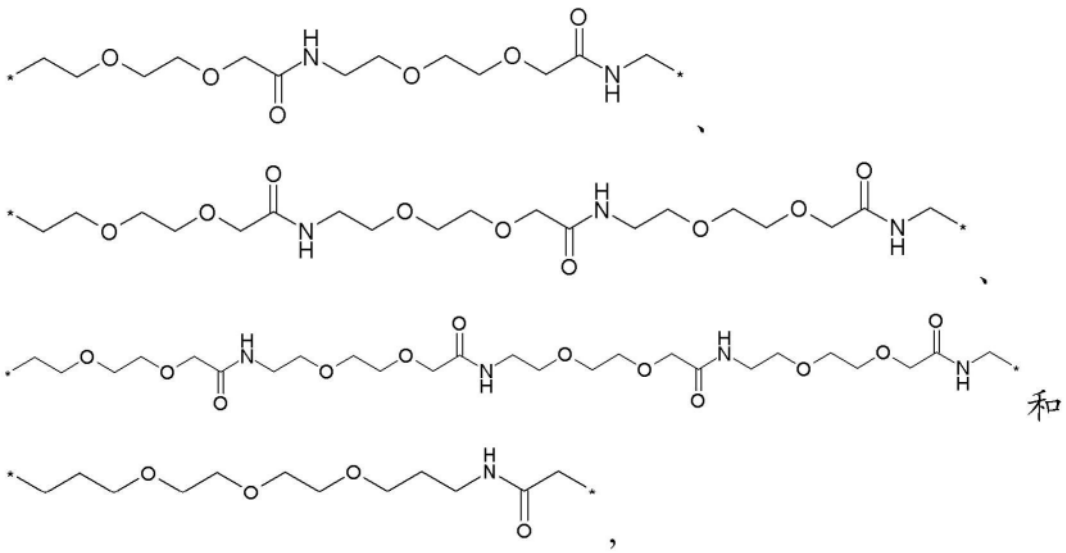
[0829] 81.实施方案63-80中任一个的缀合物,其中

[0830] -{[$(CH_2)_{n1}$E1]$_{m2}$-[$(CHR^2)_{I2}$-W_3]$_{m3}$}$_{n2}$-和

[0831] -{[$(CH_2)_{n3}$E2]$_{m5}$-[$(CHR^4)_{I4}$-W_5]$_{m6}$}$_{n4}$-(其中E1和E2为-O-)选自



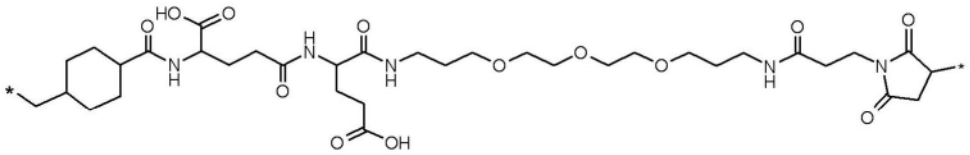
[0832]

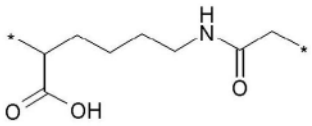


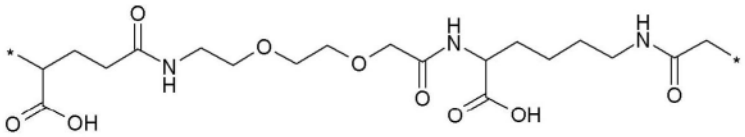
[0833] 其中*意欲表示连接点,即开放键。

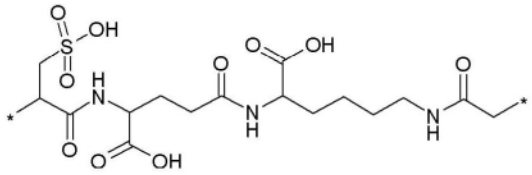
[0834] 82.实施方案63-81中任一个的缀合物,其中X_4为价键,W_6选自吡咯烷-2,5-二酮、-NHC(O)CH*CH_2COOH或-NHC(O)CH_2CH*COOH,其中(*)表示CH的碳原子与GH的连接点。

[0835] 83.实施方案63-82中任一个的缀合物,其中B选自

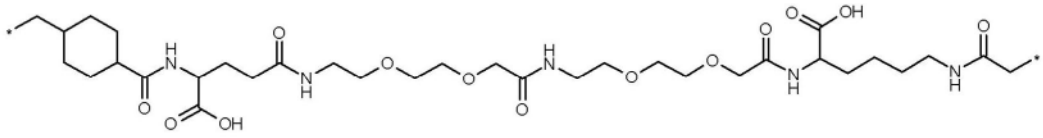


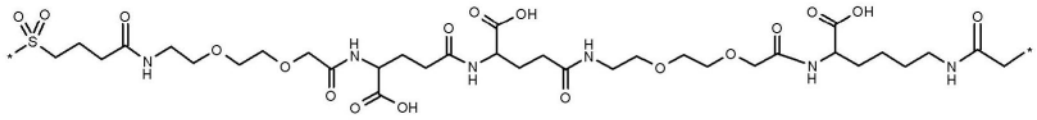


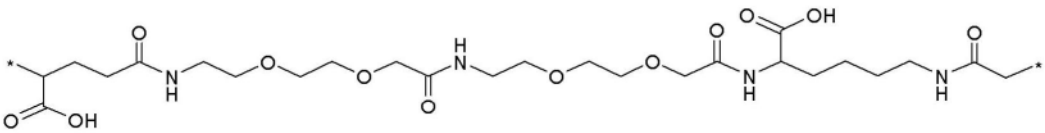


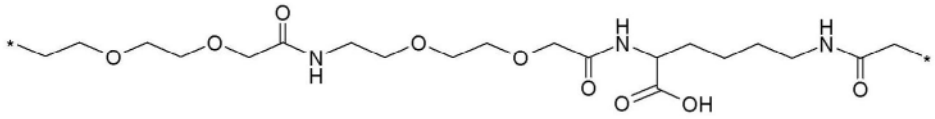


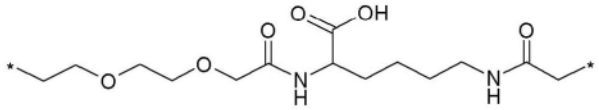
[0836]

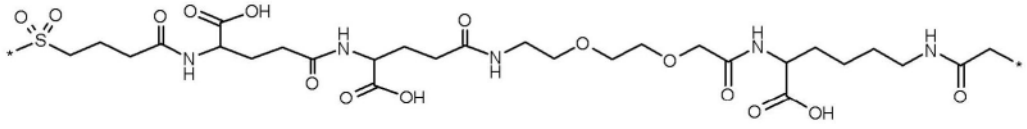


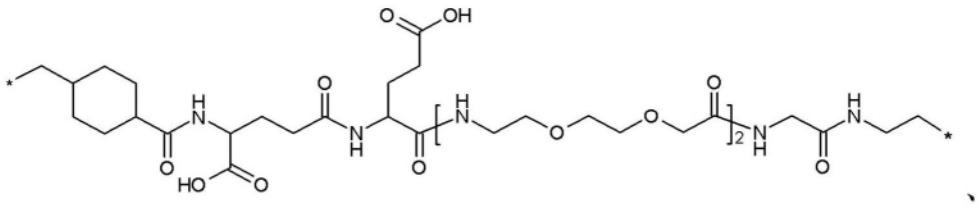




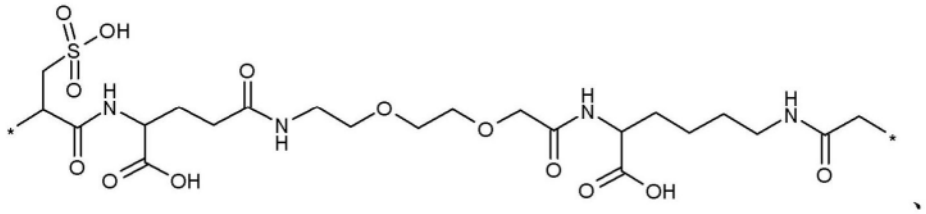


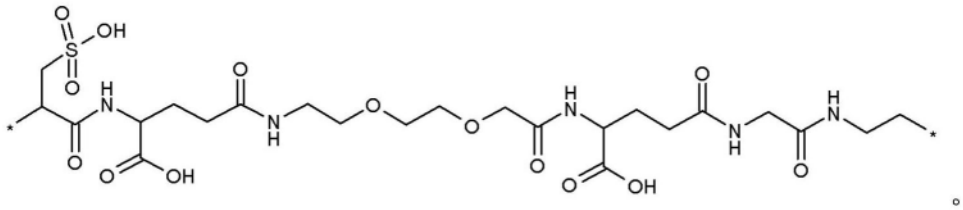






[0837]

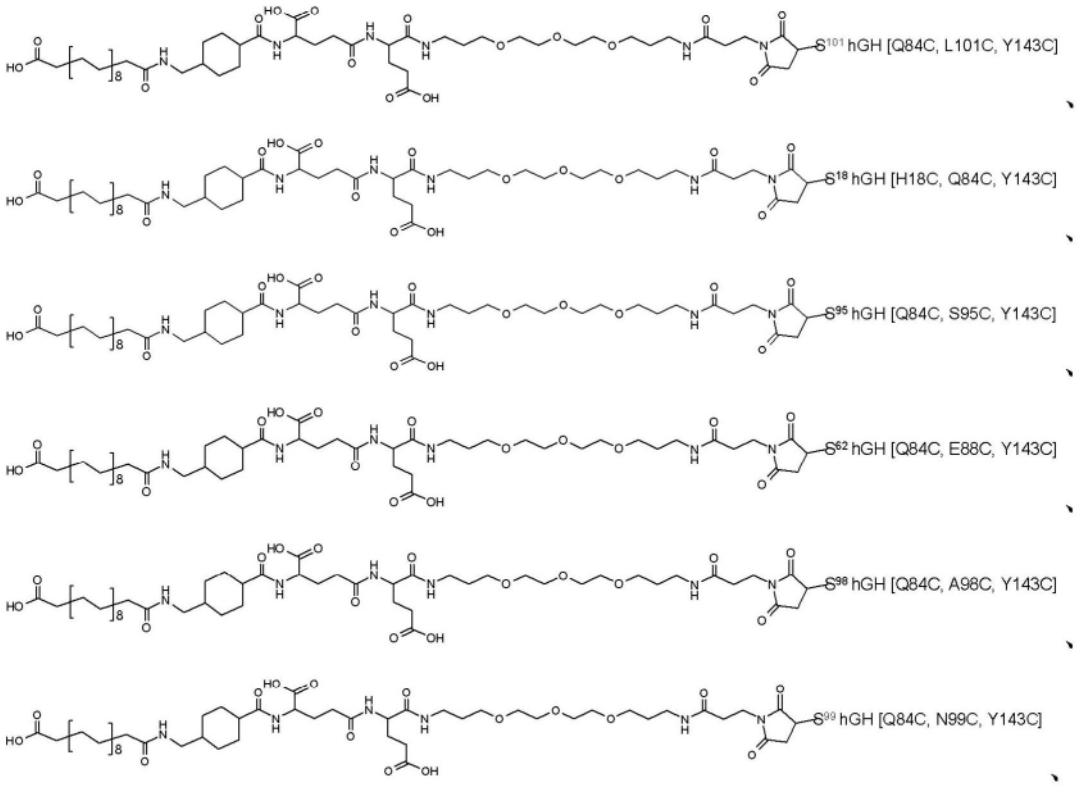


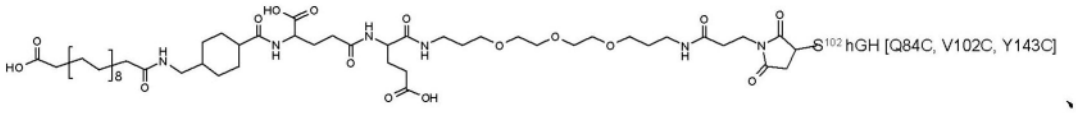


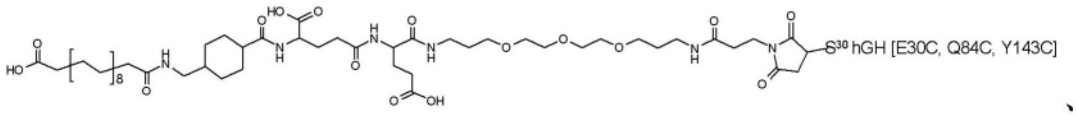
[0838] 84.实施方案1-83中任一个的缀合物,其中一个白蛋白结合残基(A)通过亲水间隔基(B)与所述GH连接。

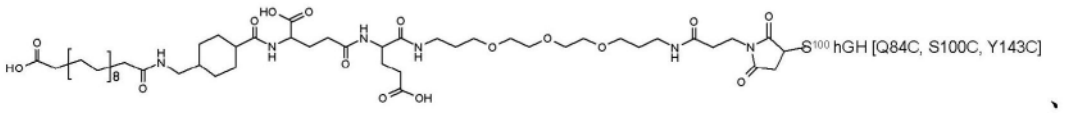
[0839] 85.实施方案63-84中任一个的缀合物,其中所述化合物选自

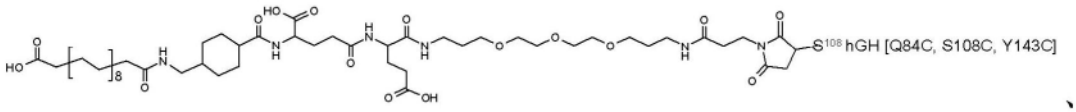
[0840]

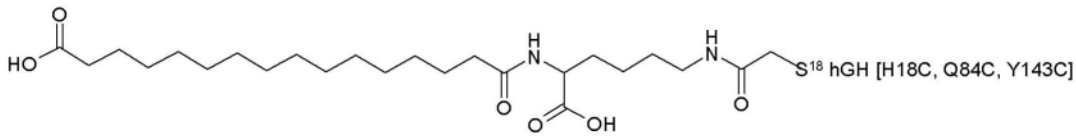


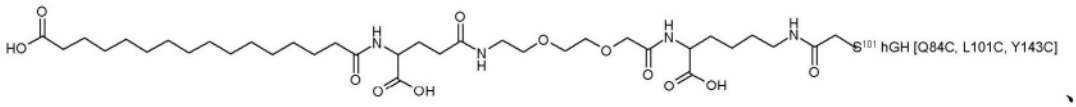

S102 hGH [Q84C, V102C, Y143C]


S30 hGH [E30C, Q84C, Y143C]

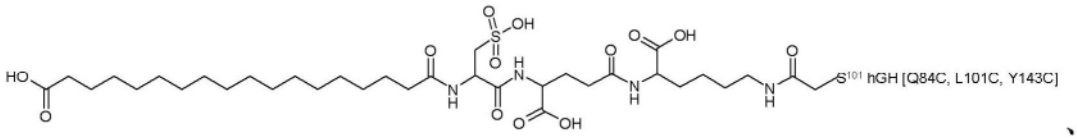

S100 hGH [Q84C, S100C, Y143C]

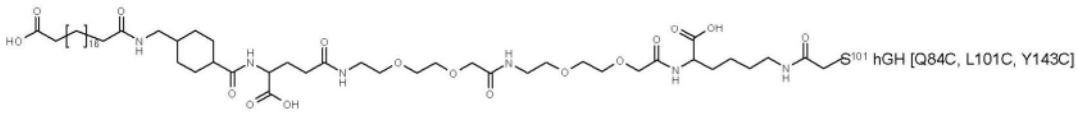

S108 hGH [Q84C, S108C, Y143C]

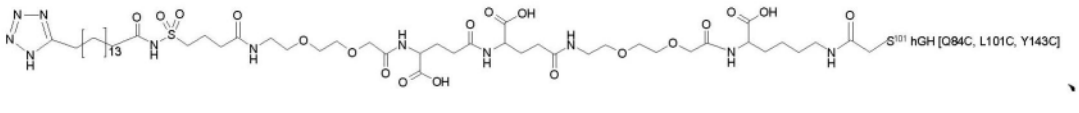

S18 hGH [H18C, Q84C, Y143C]

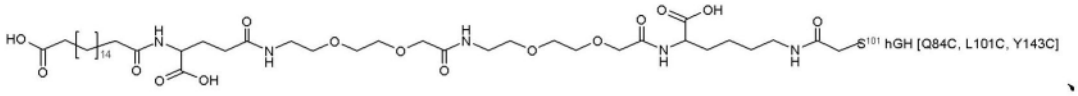

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]

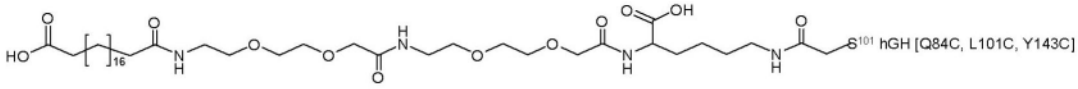
[0841]

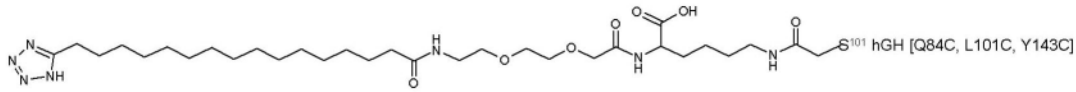

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]

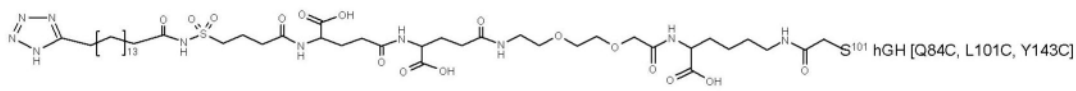

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]

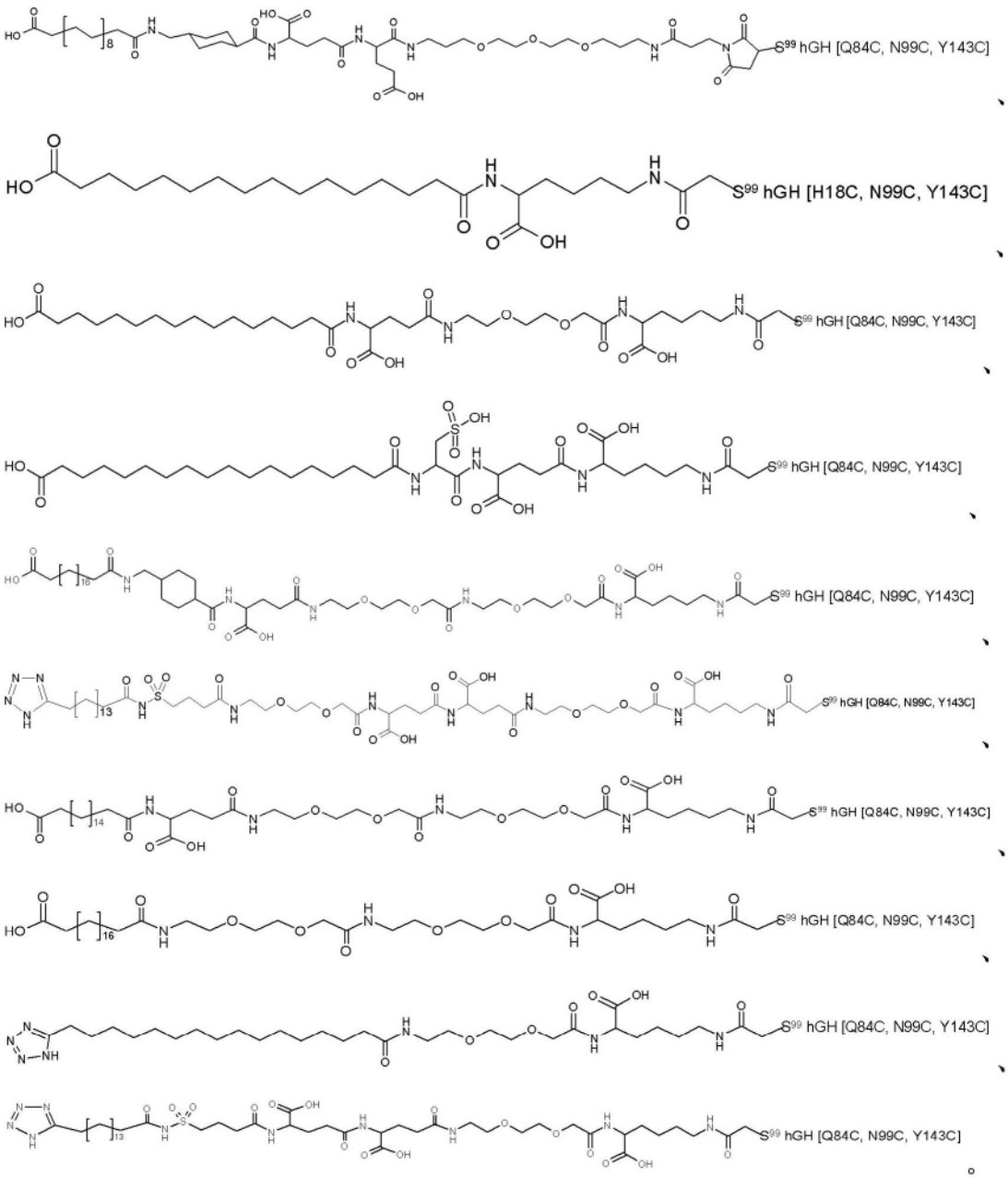

S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]


S101 hGH [Q84C, L101C, Y143C]



[0842]

[0843] 86.实施方案1-85中任一个的缀合物,其中亲水间隔基的mLogP＜0。

[0844] 87.实施方案1-86中任一个的缀合物,其中所述亲水间隔基的摩尔量在80D-1500D的范围内或在300D-1100D的范围内。

[0845] 88.实施方案1-87中任一个的缀合物,其中所述白蛋白结合残基是亲脂性残基。

[0846] 89.实施方案1-88中任一个的缀合物,其中所述白蛋白结合残基与白蛋白非共价结合。

[0847] 90.实施方案1-89中任一个的缀合物,其中所述白蛋白结合残基在生理pH下带有负电荷。

[0848] 91.实施方案1-90中任一个的缀合物,其中所述白蛋白结合残基对于人血清白蛋白的结合亲和力低于约10μM或低于约1μM。

[0849] 92.实施方案1-91中任一个的缀合物,其中所述白蛋白结合残基选自直链烷基、支链烷基、具有ω-羧酸基团或ω-羧酸等排体的基团。

[0850] 93.实施方案1-92中任一个的缀合物,其中所述白蛋白结合残基具有6-40个碳原子、8-26个碳原子或8-20个碳原子。

[0851] 94.实施方案1-93中任一个的缀合物,其中所述白蛋白结合残基是肽,例如包含小于40个氨基酸残基的肽。

[0852] 95.实施方案1-94中任一个的缀合物,其中2个白蛋白结合残基(A)通过亲水间隔基(B)与所述GH连接。

[0853] 96.用于治疗的实施方案1-95中任一个的缀合物。

[0854] 97.一种药物组合物,其包含任选与药学上可接受的赋形剂组合的实施方案1-95中任一个的缀合物。

[0855] 98.实施方案97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、皮肤、透皮和胃肠外将所述组合物给予患者。

[0856] 99.一种治疗生长激素缺乏(GHD)的方法,所述方法包括将治疗有效量的实施方案1-95中任一个的缀合物给予有此需要的患者。

[0857] 100.一种治疗以下疾病的方法:特纳综合征;普-韦综合征(PWS);努南综合征;唐氏综合征;慢性肾脏疾病、幼年型类风湿关节炎、囊性纤维化、接受HAART治疗的儿童HIV感染(HIV/HALS儿童);小于胎龄(SGA)出生的矮小儿童;非SGA的以极低出生体重(VLBW)出生的儿童的身材矮小症;骨骼发育不良;软骨发育不良;软骨发育不全;特发性身材矮小症(ISS);成人GHD;长骨骨折,所述长骨为例如胫骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨、跖骨和指骨;海绵骨例如头骨、手腕骨和脚底骨的骨折;例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者;进行或经历牵拉骨生成技术的患者;髋关节置换或关节盘置换、关节盘修复、脊柱融合或例如在膝、髋、肩、肘、腕或颚中的假体固定后的患者;其中已固定骨接合材料(例如钉、螺钉和板)的患者;骨折不愈合或畸形愈合的患者;例如胫骨或第一脚趾的骨解剖后的患者;移植物植入后的患者;创伤或关节炎引起的膝关节软骨退化;特纳综合征患者中的骨质疏松症;男性骨质疏松症;长期透析的成年患者(APCD);APCD中营养不良相关的心血管疾病;APCD中的恶病质逆转;APCD中的癌症;APCD中的慢性阻塞性肺病;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;具有HIV感染的男性;短肠综合征;向心性肥胖;HIV相关脂肪营养不良综合征(HALS);男性不育症;大选择性手术、酒精/药物解毒或神经创伤后的患者;老化;虚弱的老年人;骨关节炎;创伤性损伤的软骨;勃起功能障碍;纤维肌痛;记忆障碍;抑郁;外伤性脑损伤;蛛网膜下腔出血;极低出生体重;代谢综合征;糖皮质激素性肌病;或糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症;加快肌肉组织、神经组织或伤口的愈合;加快或改善血液流向受损组织或降低受损组织的感染率,所述方法包括将治疗有效量的实施方案1-95中任一个的缀合物给予有此需要的患者。

[0858] 101.实施方案1-95中任一个的缀合物在制备用于治疗生长激素缺乏(GHD)的药物中的用途。

[0859] 102.实施方案1-95中任一个的缀合物在制备用于治疗以下疾病的药物中的用途:特纳综合征;普-韦综合征(PWS);努南综合征;唐氏综合征;慢性肾脏疾病、幼年型类风湿关节炎、囊性纤维化、接受HAART治疗的儿童HIV感染(HIV/HALS儿童);小于胎龄(SGA)出生的矮小儿童;非SGA的以极低出生体重(VLBW)出生的儿童的身材矮小症;骨骼发育不良;软骨发育不良;软骨发育不全;特发性身材矮小症(ISS);成人GHD;长骨骨折,所述长骨为例如胫

骨、腓骨、股骨、肱骨、桡骨、尺骨、锁骨、掌骨、跖骨和指骨;海绵骨例如头骨、手腕骨和脚底骨的骨折;例如手、膝或肩中的腱或韧带手术后的患者;进行或经历牵拉骨生成技术的患者;髋关节置换或关节盘置换、关节盘修复、脊柱融合或例如在膝、髋、肩、肘、腕或颚中的假体固定后的患者;其中已固定骨接合材料(例如钉、螺钉和板)的患者;骨折不愈合或畸形愈合的患者;例如胫骨或第一脚趾的骨解剖后的患者;移植物植入后的患者;创伤或关节炎引起的膝关节软骨退化;特纳综合征患者中的骨质疏松症;男性骨质疏松症;长期透析的成年患者(APCD);APCD中营养不良相关的心血管疾病;APCD中的恶病质逆转;APCD中的癌症;APCD中的慢性阻塞性肺病;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;具有HIV感染的男性;短肠综合征;向心性肥胖;HIV相关脂肪营养不良综合征(HALS);男性不育症;大选择性手术、酒精/药物解毒或神经创伤后的患者;老化;虚弱的老年人;骨关节炎;创伤性损伤的软骨;勃起功能障碍;纤维肌痛;记忆障碍;抑郁;外伤性脑损伤;蛛网膜下腔出血;极低出生体重;代谢综合征;糖皮质激素性肌病;或糖皮质激素治疗导致的儿童身材矮小症;加快肌肉组织、神经组织或伤口的愈合;加快或改善血液流向受损组织或降低受损组织的感染率。

[0860] 103.一种下式(III)的化合物

[0861] A-W-B1-U (III)

[0862] 其中A表示白蛋白结合残基,

[0863] B1表示亲水间隔基,

[0864] W是连接A和B1的化学基团,U表示缀合部分。

[0865] 104.实施方案103的化合物,其中A和W如上述实施方案任一个所定义的。

[0866] 105.实施方案103或实施方案104的化合物,其中U包含芳基、杂芳基、取代的马来酰亚胺或吡咯烷-2,5-二酮,例如-NHC(O)CH_2CH_2-吡咯烷-2,5-二酮或由芳基、杂芳基、取代的马来酰亚胺或吡咯烷-2,5-二酮,例如-NHC(O)CH_2CH_2-吡咯烷-2,5-二酮组成。

[0867] 106.实施方案103或实施方案104的化合物,其中U包含D1-$(CH_2)_{I6}$-D2,其中D1和D2独立选自-O-、-N(R6)-、-NC(O)R7-或价键;其中R6和R7独立表示氢或C_{1-6}-烷基。

[0868] 107.实施方案103或实施方案104的化合物,其中U包含离去基团或由离去基团组成,离去基团例如Cl、Br、I、-OH、-OS(O)$_2$Me、-OS(O)$_2$$CF_3$、-Ots。

[0869] 108.实施方案107的化合物,其中离去基团是选自Cl、Br和I(优选Br)的卤素化合物。

[0870] 109.实施方案103或实施方案104的化合物,其中U包含烯丙基胺(H_2C=CH-CH_2-NH_2)或由其组成,所述烯丙基胺例如-C(O)NHCH_2-CH=CH2。

[0871] 110.实施方案103或实施方案104的化合物,其中U包含胺(例如-NH2)或由其组成。

[0872] 111.实施方案103-110中任一个的化合物,其中治疗化合物是多肽。

[0873] 112.实施方案103-110中任一个的化合物,其中治疗化合物是具有单个游离胱氨酸的多肽。

[0874] 113.实施方案103或实施方案104的化合物,其中U包含醛例如-CHO或由醛例如-CHO组成。

[0875] 114.实施方案103-113中任一项的化合物,其中亲水间隔基B1具有下式

[0876] -X_1-X_2-X_3-X_4-

[0877] 其中

[0878] X_1为-W_1-[$(CHR^1)_{I1}$-W_2]$_{m1}$-{[$(CH_2)_{n1}$E1]$_{m2}$-[$(CHR^2)_{I2}$-W_3]$_{m3}$}$_{n2}$-,

[0879] X_2为-[$(CHR^3)_{I3}$-W_4]$_{m4}$-{[$(CH_2)_{n3}$E2]$_{m5}$-[$(CHR^4)_{I4}$-W_5]$_{m6}$}$_{n4}$-,

[0880] X_3为-[$(CHR^5)_{I5}$]$_{m7}$-,

[0881] X_4为价键,

[0882] I1、I2、I3、I4和15独立选自0-16,

[0883] m1、m3、m4、m6和m7独立选自0-10,

[0884] m2和m5独立选自0-25,

[0885] n1、n2、n3和n4独立选自0-16,

[0886] R^1、R^2、R^3、R^4和R^5独立选自氢、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-S$(O)_2$OH、-NH-C(=NH)-NH_2、C_{1-6}-烷基、芳基或杂芳基;其中烷基、芳基和杂芳基任选被卤素、-C(O)OH、-C(O)NH_2、-S(O)OH、-S$(O)_2$OH、-CN或-OH取代,

[0887] E1和E2独立选自-O-、-N(R^6)-、-N(C(O)R^7)-或价键;其中R^6和R^7独立表示氢或C_{1-6}-烷基,

[0888] W_1-W_5独立选自-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)$NHCH_2$-、-CH_2NHC(O)-、-C(O)NHS$(O)_2$-、-S$(O)_2$NHC(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。

[0889] 除非另外指出或明显与上下文矛盾,否则使用关于一个或多个要素的术语(例如“包含”、“具有”、“包括”或“含有”)的本发明任何方面或实施方案的本文描述,旨在为“由”或“基本上由”具体一个或多个要素“组成”或者“基本包含”所述要素的本发明类似方面或实施方案提供支持(例如除非另外说明或明显与上下文矛盾,否则在本文描述为包含特定要素的组合物应理解为还描述了由该要素组成的组合物)。

[0890] 本发明包括在本文提出的方面或权利要求中所述主题的适用法律所允许的最大程度的所有修改及等同物。

[0891] 本发明进一步由以下实施例阐明,然而,该实施例不应理解为限制保护范围。前述说明和以下实施例中公开的特征单独或以其任意组合都可为用于以其多种形式实现本发明的素材。

实施例

[0892] 缩略语:

[0893] amu=原子质量单位

[0894] CV=柱体积

[0895] hr(s)=小时

[0896] Hz=赫兹

[0897] L=升

[0898] M=摩尔

[0899] mbar=毫巴

[0900] mg=毫克

[0901] min.=分钟

[0902] mL＝毫升

[0903] mM＝毫摩尔

[0904] mm＝毫米

[0905] mmol＝毫摩尔

[0906] nmol＝纳摩尔

[0907] mol＝摩尔

[0908] μL＝微升

[0909] N＝标准

[0910] nm＝纳米

[0911] sec＝秒钟

[0912] ppm＝百万分之几

[0913] ESI＝电喷雾电离

[0914] i.v.＝静脉内

[0915] m/z＝质荷比

[0916] MS＝质谱法

[0917] HPLC＝高压液相色谱法

[0918] RP＝反相

[0919] HPLC-MS＝高压液相色谱法-质谱法

[0920] NMR＝核磁共振波谱法

[0921] p.o.＝经口服

[0922] rt或RT＝室温

[0923] s.c.＝皮下

[0924] tr＝保留时间

[0925] Boc＝叔丁氧羰基

[0926] O-t-Bu＝叔丁酯

[0927] t-Bu＝叔丁基

[0928] Boc-4-ABZ-OH＝4-叔丁氧羰基氨基-苯甲酸

[0929] DCM＝二氯甲烷,CH_2Cl_2,亚甲基氯

[0930] DIC＝二异丙基碳二亚胺

[0931] DIPEA＝N,N-二异丙基乙胺

[0932] DMF＝N,N-二甲基甲酰胺

[0933] DMSO＝二甲亚砜

[0934] DTT＝二硫苏糖醇

[0935] EDAC＝1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐

[0936] Et_2O＝乙醚

[0937] EtOAc＝乙酸乙酯

[0938] Fmoc＝9H-芴-9-基甲氧基羰基

[0939] Fmoc-Glu-O-t-Bu＝N-Fmoc-谷氨酸-1-叔丁酯

[0940] 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

[0941] Fmoc-OEG-OH＝(2[2-(Fmoc-氨基)乙氧基]乙氧基)乙酸

[0942] OEG＝(2[2-(氨基)乙氧基]乙氧基)乙酰基

[0943] Fmoc-Thx-OH＝N-Fmoc-反式-4-氨基甲基环己烷甲酸

[0944] H_2O＝水

[0945] HOBt＝1-羟基苯并三唑

[0946] MeCN＝乙腈

[0947] MeOH＝甲醇

[0948] MTP＝3-甲基-硫代-1-丙醇

[0949] NaCl＝氯化钠

[0950] NaOH＝氢氧化钠

[0951] NMP＝N-甲基吡咯烷-2-酮

[0952] OEG＝(2[2-(氨基)乙氧基]乙氧基)乙酸

[0953] TFA＝三氟乙酸

[0954] THF＝四氢呋喃

[0955] TIS＝三异丙基甲硅烷

[0956] $CDCl_3$＝氘氯仿

[0957] CD_3OD＝四氘代甲醇

[0958] DMSO-d_6＝六氘代二甲亚砜

[0959] TNBS＝三硝基苯磺酸

[0960] TSTU＝O-(N-琥珀酰亚胺基)-1,1,3,3-四甲基四氟硼酸铀

[0961] 实施例还利用下列通用方法：

[0962] 制备hGH化合物的通用方法。

[0963] 将编码生长激素化合物的基因重组插入质粒载体中。合适大肠杆菌(E.coli)菌株随后使用质粒载体转化。可与N端甲硫氨酸一起或作为MEAE融合物(随后自其中切割MEAE序列)表达hGH或GH变体。

[0964] 在25％甘油中制备细胞原液,并保存在-80℃下。将甘油原液菌株接种到LB板,随后在37℃下孵育过夜。将各板的内容物用LB培养基洗涤,并稀释至500mL LB培养基中用于表达。在以220rpm振荡的同时,将培养物在37℃下孵育,直到达到OD_{600} 0.6。使用0.2mM IPTG在25℃下进行随后的诱导6小时。最终通过离心收获细胞。

[0965] 随后将细胞悬浮于含有0.05％吐温20、2.5mM EDTA、10mM半胱胺和4M脲的10mM Tris-HCl(pH＝9.0)中,使用细胞破碎仪于30kPSI破碎。通过离心收集上清液,随后进行色谱纯化。

[0966] 纯化采用离子交换色谱法和疏水相互作用进行,随后使用自CHO细胞表达的人二肽基肽酶I(hDPPI)除去肽标签。通过等电点沉淀(isoprecipitation)和离子交换色谱法实现最终的纯化。还可通过采用(但不限于)本领域技术人员已知的离子交换色谱法、疏水作用色谱法、亲和色谱法、尺寸排阻色谱法和基于膜的分离技术实现纯化。

[0967] 纯化的生长激素化合物的蛋白质化学表征。

[0968] 采用MALDI-MS分析完整的纯化蛋白质。所观测的质量对应于根据氨基酸序列推断

的理论质量。

[0969] 可通过肽作图法显示预期的二硫键连接,肽作图法用胰蛋白酶和AspN消化,接着在用DTT还原二硫键之前及之后对消化物进行MALDI-MS分析。

[0970] 用于测量蛋白酶降解GH和hGH化合物缀合物的速率的测定

[0971] 用相关蛋白酶(胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、弹性蛋白酶、因子VIIa、因子Xa、蛋白酶K、羧肽酶、DPPIV、中性肽链内切酶、粒酶B、脯氨酸-肽链内切酶、葡萄球菌肽酶I、嗜热菌蛋白酶、凝血酶、Arg-C蛋白酶、Asp-N肽链内切酶、胱天蛋白酶1-10、梭菌蛋白酶、肠激酶、谷氨酰基肽链内切酶、粒酶B、LysC、LysN、脯氨酸-肽链内切酶和葡萄球菌肽酶I或组织提取物)在合适缓冲液(例如PBS或碳酸氢铵)中于37℃消化目的化合物直到24小时。通过HPLC测定评估蛋白水解降解。

[0972] 蛋白水解消化:

[0973] 通过酶在37℃降解碳酸氢铵缓冲液中的1mg/mL的100μL测试化合物溶液直至24小时。在不同时间点取子样品,通过10倍稀释到1%TFA中酸化样品来终止蛋白水解反应。通过反相HPLC分析这些稀释的样品,以评估蛋白水解消化的程度。

[0974] HPLC方法:

[0975] 将10μL上述溶液注射入反相Vydac C4 2×150mm柱,经30min时间从0.1%TFA/水至含0.1%TFA的100%乙腈的线性梯度洗脱,流速0.2ml/min。在214nm处UV吸收检测峰。根据时间点t=T(A_T)的峰面积和t=0(A_0)时的峰面积,将时间点t=T时完整化合物的百分比(%)计算为(A_T/A_0)×100%。用GraphPad Prims软件5.01版本将完整化合物百分比(%)对时间作图。亦通过GraphPad Prism 软件按照单相衰减(one phase decay)计算半衰期($T_{1/2}$)。可使用的酶实例为弹性蛋白酶(Sigma,来自猪胰腺)和胰凝乳蛋白酶(Roche,测序级)。缓冲液实例为50mM碳酸氢铵,pH=8.5。

[0976] 毛细管电泳

[0977] 用Agilent Technologies 3DCE系统(Agilent Technologies)进行毛细管电泳。用Agilent Technologies 3DCE ChemStation进行数据获取和信号处理。毛细管为64.5cm(56.0cm有效长度)50μm内径的来自Agilent的"延长光路径毛细管(Extended Light Path Capillary)"。在200nm(16nm Bw,参考380nm和50nm Bw)处实施UV检测。运行电解液为磷酸缓冲液50mM pH 7(方法A)。将毛细管用0.1M NaOH调节3min,然后用Milli-Q水调节2min,用电解液调节3min。在每次运行后,用milli-Q水冲洗毛细管2min,然后用磷酸冲洗2min,用milli-Q水冲洗2min。流体力学注射在50毫巴下持续4.0秒完成。电压为+25kV。毛细管温度为30℃,运行时间为10.5min。

[0978] Maldi-Tof质谱

[0979] 用Autoflex Maldi-Tof仪器(Bruker)测定分子量。用α-氰基-4-羟基-肉桂酸作为基质制备样品。

[0980] RP-HPLC

[0981] 在Agilent 1100系统上用Vydac 218TP54 4.6mm x 250mm 5μm C-18二氧化硅柱(The Separations Group,Hesperia)实施RP-HPLC分析。通过UV在214nm、254nm、280nm和301nm处检测。用0.1%三氟乙酸/H_2O来平衡柱,通过0-90%乙腈对0.1%三氟乙酸/H_2O的合适梯度洗脱样品。

[0982] LC-MS

[0983] 在PE-Sciex API 100或150质谱仪上实施LC-MS分析,所述质谱仪配备有两个Perkin Elmer Series 200微型泵、Perkin Elmer Series 200自动进样器、Applied Biosystems 785A UV检测仪和Sedex 75蒸发性光(Evaporative Light)散射检测仪。以1.5ml/min在室温洗脱Waters Xterra 3.0mm x 50mm 5u C-18二氧化硅柱。其用5%MeCN/0.1%TFA/H_2O平衡,并用5%MeCN/0.1%TFA/H_2O洗脱1.0min,然后经7min用到90%MeCN/0.1%TFA/H_2O的线性梯度洗脱。通过在214nm处UV检测和蒸发性光散射来检测。将柱洗出液流分引入到PE-Sciex API 100质谱仪的离子喷雾界面。在运行期间每2秒扫描一次300-2000amu质量范围。

[0984] 蛋白质定量

[0985] 通过用NanoDrop ND-1000 UV-分光光度计测量280nm处的吸光度来估测蛋白质浓度。

[0986] 用于确定衍生位点的酶促肽作图法

[0987] 用Asp-N消化还原和烷基化的蛋白质来实施肽作图法。首先按照标准程序将蛋白质用DTT和碘乙酰胺处理。用HPLC纯化烷基化产物。随后用内切蛋白酶Asp-N(Boehringer)以1:100的酶:底物比率过夜消化烷基化的纯化产物。用C-18柱和标准TFA/MeCN缓冲系统HPLC分离消化物。将得到的肽图与未衍生的hGH的肽图比较,收集不同保留时间的流分,用Maldi-tof质谱进一步分析。

[0988] SDS page

[0989] 用NuPAGE 4%-12%Bis-Tris凝胶(Invitrogen NP0321BOX)实施SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳。银染(Invitrogen LC6100)或考马斯染色(Invitrogen LC6065)凝胶,其中如M.M.Kurfurst在Anal.Biochem.200(2),244-248,(1992)中所述还针对PEG用碘化钡进行相关染色。

[0990] 蛋白质色谱法

[0991] 在Äkta Explorer色谱系统和来自GE Health Care的柱上实施蛋白质色谱法。用Q-Sepharose HP 26/10柱进行阴离子交换。起始缓冲液为20mM三乙醇胺缓冲液pH 8.5,洗脱缓冲液为起始缓冲液+0.2M NaCl。通常用0-75%洗脱缓冲液的梯度经15个柱体积洗脱化合物。用HiPrep 26/10柱实施脱盐和缓冲液更换。

[0992] TNBS试验

[0993] 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,检查珠。强烈的橙色或红色珠表示阳性结果(即存在游离胺);黄色或微弱的橙色珠表示略微的阳性,无色珠为阴性。

[0994] LogP计算

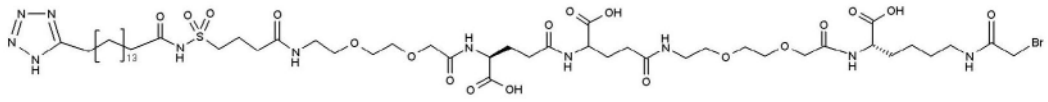
[0995] 白蛋白结合剂部分和/或亲水间隔基部分的LogP值可用公开算法计算为mLogP和/或cLogP(J.Am.Chem.Soc.,86(1964)5175-5180″A New Substituent Constant,∉,Derived from Partition Coefficients(来源于分配系数的新的取代常数∉";C.A.Lipinski等Advanced Drug Delivery Reviews,23(1997)3-25,″Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and

Development Settings(在药物发现及开发环境中估测溶解性及渗透性的实验和计算方法)";和I.Moriguchi,S.Hirono,I.Nakagome,H.Hirano,Chem.and Pharm.Bull.,42(1994)976-978"Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods(由若干方法计算的药物logP值的可靠性比较)"。本文中用来自clogP算法的Tripos(http://www.tripos.com)4.2版本的Sybyl 7.0及其相关片段数据库的22版本计算clogP-Pomona College logP(辛醇/水分配系数),所述22版本由BioByte Corp(http://www.biobyte.com/)提供。

[0996] 白蛋白结合剂的制备

[0997] 实施例1

[0998] 4-(1H-四唑-16-基-十六酰氨磺酰)丁酰-OEG-γ Glu-γ Glu-OEG-N^{ε}(C(O)CH_2Br)Lys-OH(I):

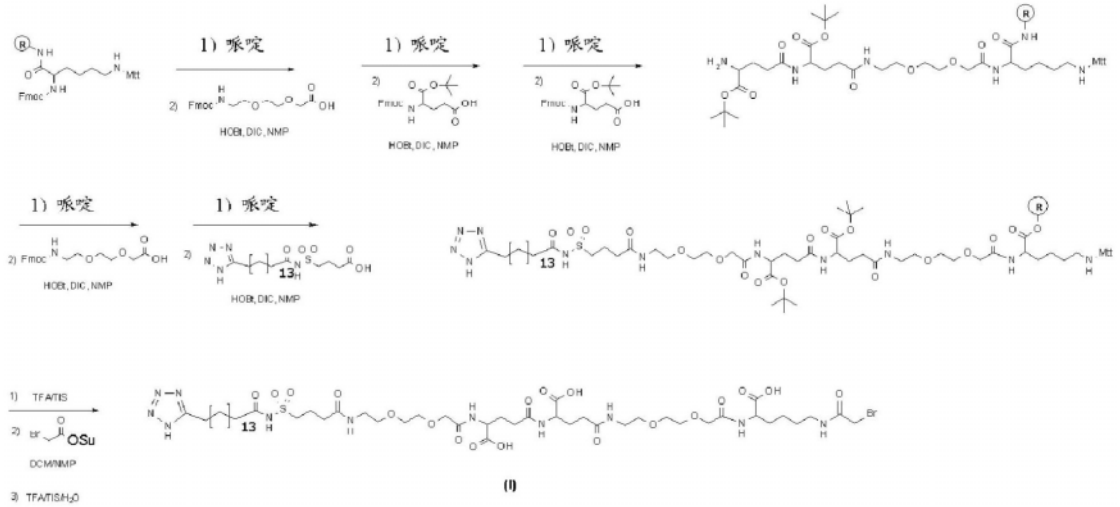
[0999] 

(I)

[1000] 按照流程1,采用标准Fmoc-肽化学法在ABI433合成仪上,以1mM规模在固体载体上合成化合物(I)。使用Fmoc-OEG-OH和Fmoc-Glu-OtBu保护的氨基酸,在Fmoc-Lys(MTT)-Wang树脂上装配肽。使用DCM/NMP中的DIC/NHS,2eq,手动将4-(16-1H-四唑-5-基-十六酰氨磺酰)丁酸偶联过夜,TNBS试验显示待完成的反应。然后,树脂以穿流布置(flowthrough arrangement)用50mL DCM/TFA/TIS/水(94:2:2:2)处理直到黄色消失,约20分钟,接着用DIPEA/DMF洗涤并中和。溴乙酸(4mM)/DCM/NMP(1:1)用1mM NHS和DIC的混合物活化,过滤,再将其与1mM DIPEA加入树脂中。1小时后,反应完成。树脂用80mL TFA/TIS/水(95:2.5:2.5)处理1小时。用N_2流蒸发,通过加入Et_2O而沉淀,用Et_2O洗涤并干燥。粗产物在制备型HPLC(2次运行)中纯化,用针对0.1%TFA/水的30-80%0.1TFA/MeCN的梯度。收集流分,与约50%MeCN一起冻干,得到化合物(I)。

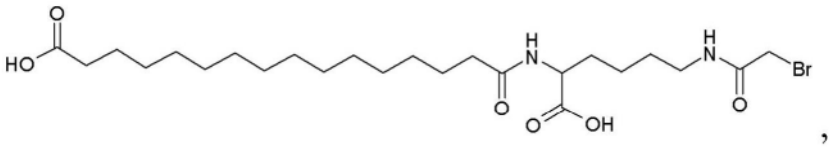
[1001] TOF-MS:质量1272.52(M+1)

[1002] 流程1

[1003] 

[1004] 实施例2

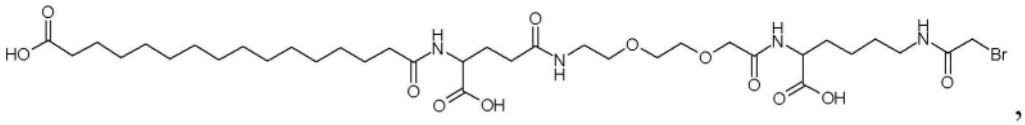
[1005] 按照上述实施例1中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1006] 

[1007] TOF-MS:质量536.52(M+1)

[1008] 实施例3

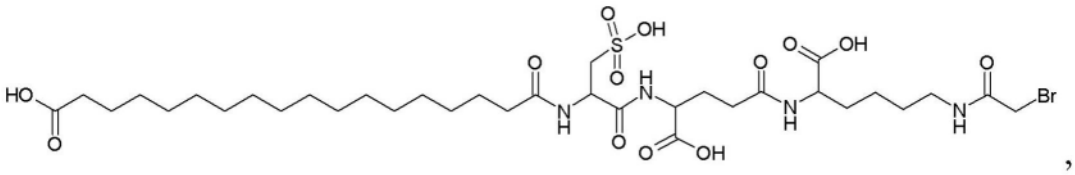
[1009] 按照上述实施例1中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1010] 

[1011] TOF-MS:质量810.80(M+1)

[1012] 实施例4

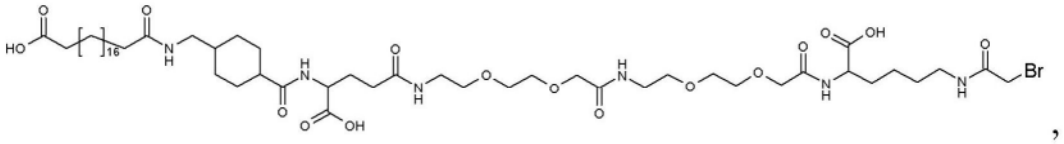
[1013] 按照上述实施例1中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1014] 

[1015] TOF-MS:质量844.84(M+1)

[1016] 实施例5

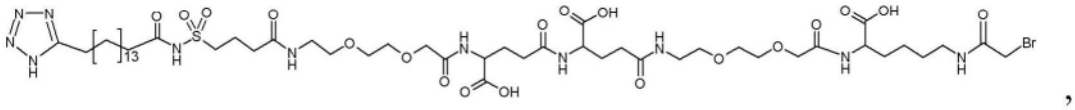
[1017] 按照上述实施例1中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1018] 

[1019] TOF-MS:质量1151.27(M+1)

[1020] 实施例6

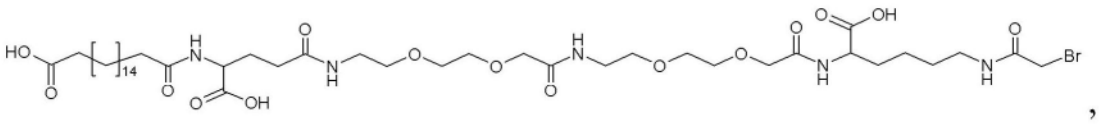
[1021] 按照上述实施例1中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1022] 

[1023] TOF-MS:质量1272.30(M+1)

[1024] 实施例7

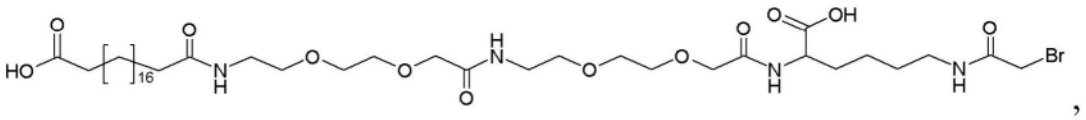
[1025] 按照上述实施例1中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1026] 

[1027] TOF-MS:质量984.01(M+1)

[1028] 实施例8

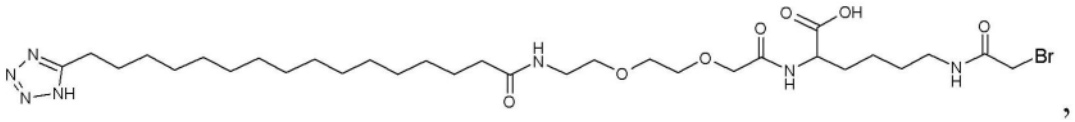
[1029] 按照上述实施例1中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1030] 

[1031] TOF-MS:质量882.95(M+1)

[1032] 实施例9

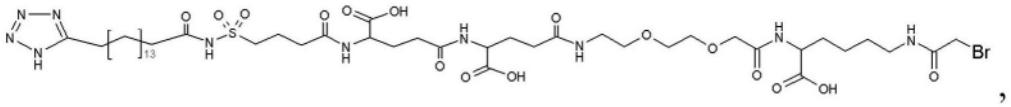
[1033] 按照上述实施例1中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1034] 

[1035] TOF-MS:质量782.74(M+1)

[1036] 实施例10

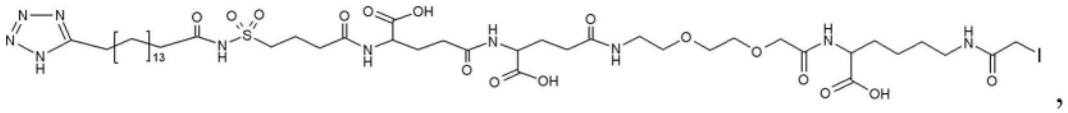
[1037] 按照上述实施例1中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1038] 

[1039] TOF-MS:质量1127.14(M+1)

[1040] 实施例11

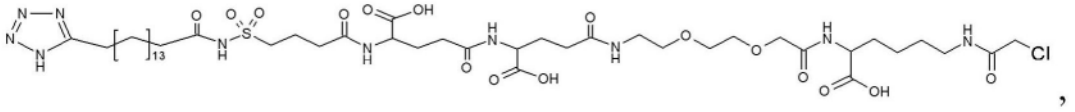
[1041] 按照上述实施例1中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH、碘乙酸和Wang树脂制备下列化合物。

[1042] 

[1043] TOF-MS:质量1174.14(M+1)

[1044] 实施例12

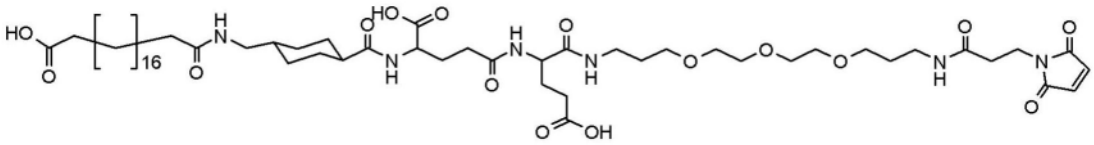
[1045] 按照上述实施例1中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH、氯乙酸和Wang树脂制备下列化合物。

[1046] 

[1047] TOF-MS:质量1061.89(M+1)

[1048] 实施例13

[1049] (19-羧基十九烷酰)-Thx-γ Glu-Glu-N-{3-[2-(2-{3-[3-马来酰亚胺基(malimido)-丙酰基氨基]丙氧基}乙氧基)乙氧基]丙基}酰胺(II)

[1050] 

(II)

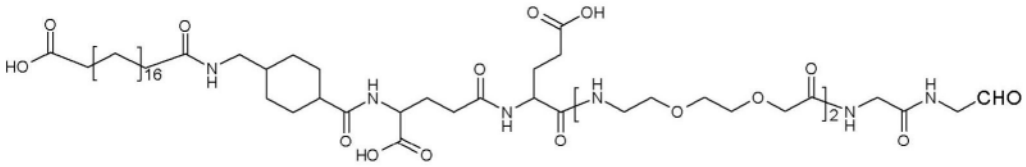
[1051] 使2-氯三苯甲基树脂(2.0g,2.6mmol)在DCM中溶胀0.5小时。加入4,7,10-三氧杂-1,13-二胺的DCM溶液(30mL)。将树脂在室温下搅拌1小时。树脂用DCM洗涤一次,然后加入DIPEA:MeOH:DCM(15mL:15mL:20mL)的溶液。将树脂振荡0.5小时,然后用DCM洗涤两次。然后如下通过标准肽化学法,依次进行Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Glu-OtBu和FmocThexOH偶联:将0.5M Fmoc-AA-OH/DIC/HOBt每种的NMP(11.7mL)溶液混合,2分钟后加到树脂中。将树脂在室温下振荡45分钟,然后用5xNMP和5xDCM洗涤。加入Ac_2O/DIPEA/NMP(1:1:5)的溶液,将树脂在室温下搅拌10分钟。洗涤树脂(5xNMP和5xDCM)。然后树脂用30%哌啶/NMP处理2x10分钟,最后用5xNMP和5xDCM洗涤。然后将肽加入含有0.125M HOAt(3eq)、0.125M DIC(3eq)和0.125M二甲基吡啶(3eq)的0.25M二十烷二酸(6eq)的溶液中。将树脂在室温下振荡2小时,接着用5xNMP和8xDCM洗涤。使用10%TFA-DCM,从树脂上切割产物,持续20分钟。滤出树脂后,再用10%TFA-DCM处理一次达20分钟。收集合并的滤液后,蒸发至干。

[1052] 将上述干燥产物溶于DMF(6mL),加入TSTU活化的3马来酰亚胺丙酸(通过使TSTU与3马来酰亚胺丙酸/DMF(2mL)反应45分钟预先制备)和DIPEA(200μL)。将混合物在室温下搅拌1小时。使反应混合物蒸发至干后,将残余物溶于95%TFA-MilliQ水中,在室温下搅拌20分钟。使混合物蒸发至干。向残余物中加入少量的水以沉淀固体。滤出沉淀后,从MeCN中重结晶。收集晶体,用Et_2O充分洗涤,得到化合物(II),为白色固体。

[1053] TOF-MS:质量1094.39(M+1)。

[1054] 实施例14

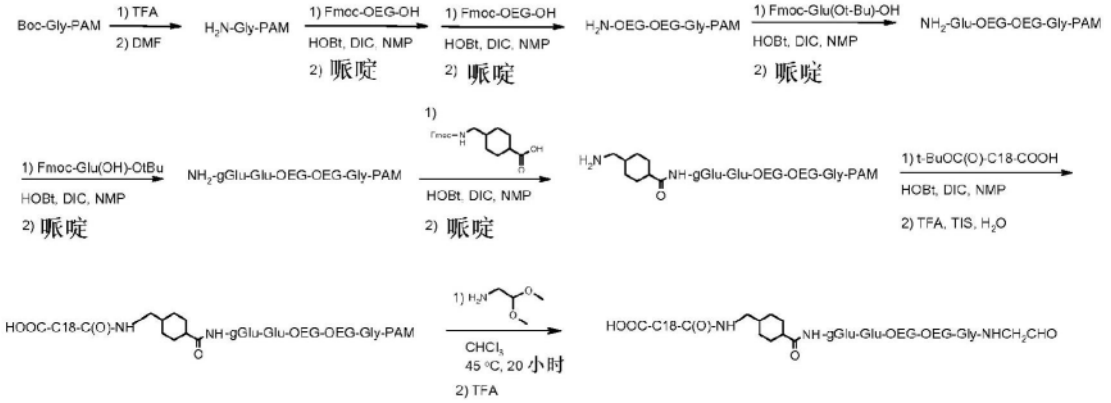
[1055] 按照上述实施例1中所述和下述流程2中描述的类似方法,使用Boc-Gly-PAM树脂为起始原料和一-叔丁基-二十烷酸、4-Boc-氨基苯甲酸、Fmoc-Thx-OH、Fmoc-OEG-OH、Fmoc-Glu(O-t-Bu)-OH、Fmoc-Glu(OH)-t-Bu保护的氨基酸制备下列化合物。在温和脱保护后,使用2,2-二甲氧基乙胺从树脂上切割肽产物,接着使用TFA进行脱缩醛反应,得到白蛋白结合剂(IV)。

[1056] 

(IV)

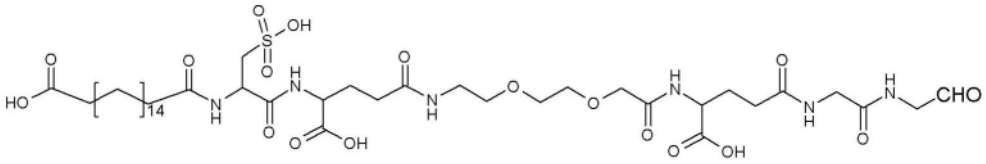
[1057] TOF-MS:质量1128.38(M+1)

[1058] 流程2:

[1059] 

[1060] 实施例15

[1061] 按照上述实施例14中所述类似方法,使用Boc-Gly-PAM树脂为起始原料和一-叔丁基-二十烷酸、4-Boc-氨基苯甲酸、Fmoc-Thx-OH、Fmoc-OEG-OH、Fmoc-Glu(O-t-Bu)-OH、Fmoc-Glu(OH)-t-Bu保护的氨基酸制备下列化合物。在温和脱保护后,使用2,2-二甲氧基乙胺从树脂上切割肽产物,接着使用TFA进行脱缩醛反应,得到白蛋白结合剂(V)。

[1062] 

(V)

[1063] TOF-MS:Rt＝15.2分钟,质量＝967.11(M+1)

[1064] 实施例16

[1065] 按照上述实施例14所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-Wang树脂为起始原料和一-叔丁基-十八烷二酸、Boc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-OEG-OH、Fmoc-Glu(O-t-Bu)-OH和氧化的Fmoc-Cys-OH保护的氨基酸制备化合物(VI)。使用2.5%TIS、2.5%H_2O/THF,从树脂上切割肽产物达3小时,并通过制备型HPLC纯化:

[1066] 柱:2cm C18

[1067] 洗脱液A:0.1%TFA i Milli-Q水

[1068] 洗脱液B:0.1%TFA i MeCN

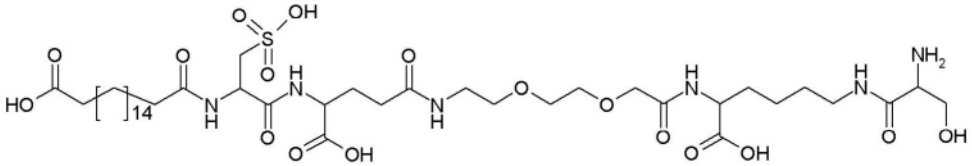
[1069] 起始%B:40%

[1070] 终止%B:75%

[1071] 梯度:5分钟用10%MeCN,5-10分钟直到起始%B(在51分钟内),5分钟用终止%B+10%MeCN约1小时

[1072] 流分通过LC-MS-TOF分析。

[1073] 收集所需流分,合并后冻干,得到化合物(VI)

[1074] 

(VI)

,

[1075] TOF-MS:Rt＝6.3分钟,质量＝955.1(M+1)

[1076] (VI)的氧化:

[1077] MTP-溶液:

[1078] 将3-甲基-硫代-1-丙醇(290mg)溶于4mL 25mM HEPES(pH＝7.00)

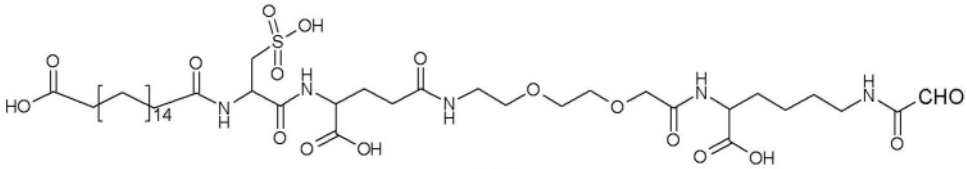
[1079] 高碘酸盐-溶液:

[1080] 将96mg $NaIO_4$溶于2mL Milli-Q水

[1081] 向化合物(VI)的Milli-Q水(1mL)溶液中加入MTP溶液(3.6mL)+高碘酸盐溶液(560μL),用一滴1N NaOH调节pH至9.5。

[1082] 反应烧瓶用锡纸覆盖,在室温下搅拌1小时。加入另一份高碘酸盐溶液(560μL),将反应混合物置于环境温度下4.5小时。使所得混合物流过两个NAP柱,以除去$NaIO_4$。柱用25mM HEPES(5x2.5mL)(pH＝7.0)预洗。

[1083] 将样品(2.5mL)加入各柱后,用3.5mL 25mM HEPES(pH＝7.00)洗脱,合并2x3.5mL共10.5mL,其含有酮-醛(VII),直接用于与GH类似物缀合。

[1084] 

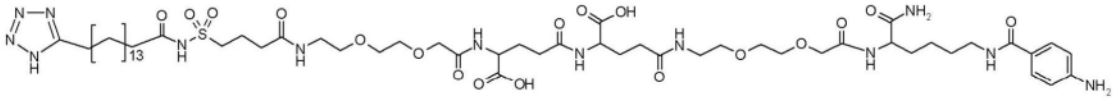
(VII)

,

[1085] TOF-MS:质量＝924.08(M+1)

[1086] 实施例17

[1087] 4-(1H-四唑-16-基-十六酰氨磺酰)丁酰-OEG-γ Glu-γ Glu-OEG-N^{ε}(4-氨基苯甲酰)Lys-NH_2(VIII):

[1088] 

(VIII)

(VIII)

[1089] 按照流程3,在固体载体上合成化合物(VIII)。将Fmoc保护的Rink-酰胺-树脂(2.2g,0.6mMol/g)称入烧瓶。树脂用NMP(3x30mL)溶胀2小时。将树脂与25％哌啶/NMP(30mL)一起振荡10分钟。将树脂沥干后,用25％哌啶/NMP(30mL)处理1小时,接着沥干后用NMP(6x30mL)洗涤。将Fmoc-Lys(Mtt)-OH和HOBt称入烧瓶中,溶于溴酚蓝/NMP(30mL,0.5mM)中。将该溶液加入上述沥干的树脂中,接着加入DIC。将反应物在环境温度下振荡21小时。将树脂沥干后,用NMP(6x30mL)洗涤,接着用DCM(3x30mL)洗涤。树脂用六氟异丙醇(20mL)处理10分钟。振荡10分钟。将树脂沥干,用DCM(3x30mL)洗涤。树脂再次用六氟异丙醇(20mL)处理10分钟后振荡10分钟。将树脂沥干,用DCM(3x30mL)洗涤,接着沥干后用NMP(3x30mL)洗涤。将4-(Boc-氨基)苯甲酸和HOBt称入烧瓶中,溶于溴酚蓝/NMP(30mL,0.5mM)中。将该溶液加入上述沥干的树脂中,接着加入DIC。将反应物在环境温度下振荡。将树脂沥干后,用NMP(6x30mL)洗涤。将树脂与25％哌啶/NMP(10mL)一起振荡10分钟。将树脂沥干,用25％哌啶/NMP(10mL)处理1小时,接着沥干后用NMP(6x15mL)洗涤。将Fmoc-OEG-OH和HOBt称入烧瓶,溶于溴酚蓝/NMP(15mL,0.5mM)中。将该溶液加入沥干树脂中,接着加入DIC。将反应物在环境

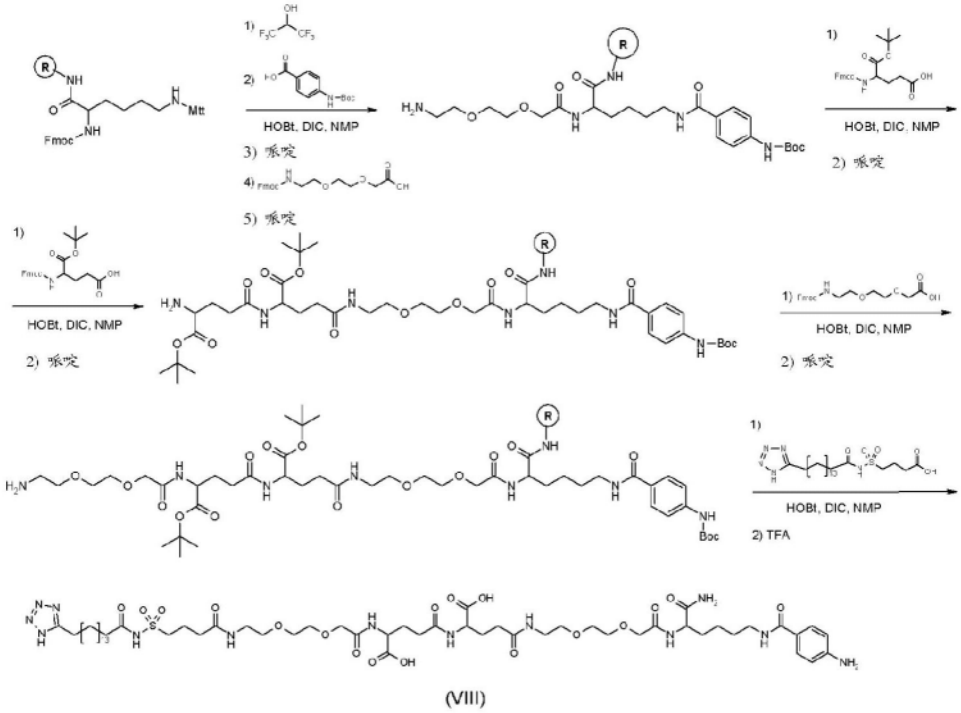
温度下振荡23小时。将树脂沥干后,用NMP(6x15mL)洗涤。将树脂与25%哌啶/NMP(10mL)一起振荡10分钟。将树脂沥干,用25%哌啶/NMP(10mL)处理1小时,接着沥干后用NMP(6x15mL)洗涤。将Fmoc-Glu-O-t-Bu和HOBt称入烧瓶,溶于溴酚蓝/NMP(15mL,0.5mM)中。将该溶液加入沥干树脂中,接着加入DIC。将反应物在环境温度下振荡18小时。将树脂沥干,用NMP(6x15mL)洗涤。将树脂与25%哌啶/NMP(10mL)一起振荡10分钟。将树脂沥干后,用25%哌啶/NMP(10mL)处理1小时,接着沥干后用NMP(6x15mL)洗涤。将Fmoc-Glu-O-t-Bu和HOBt称入烧瓶,溶于15ml 0.5mM溴酚蓝/NMP中。将该溶液加入沥干树脂中,接着加入DIC。将反应物在环境温度下振荡18小时。将树脂沥干,用NMP(6x15mL)洗涤。将树脂与25%哌啶/NMP(10mL)一起振荡10分钟。将树脂沥干,用25%哌啶/NMP(10mL)处理1小时,接着沥干后,用NMP(6x15mL)洗涤。将Fmoc-OEG-OH和HOBt称入烧瓶,溶于溴酚蓝/NMP(15mL,0.5mM)中。将该溶液加入沥干树脂中,接着加入DIC。将反应物在环境温度下振荡。将树脂沥干后,用NMP(6x15mL)洗涤。将树脂与25%哌啶/NMP(10mL)一起振荡10分钟。将树脂沥干,用25%哌啶/NMP(10mL)处理1小时,接着沥干后,用NMP(6x15mL)洗涤。

[1090] 将4-(16-1H-四唑-5-基-十六酰氨磺酰)丁酸和HOBt称入烧瓶,溶于溴酚蓝/NMP(15mL,0.5mM)中。将该溶液加入沥干树脂中,接着加入DIC。将反应物在环境温度下振荡21小时。将树脂沥干,用NMP(6x15mL)洗涤,接着沥干后,用DCM(6x15mL)洗涤。树脂用95%TFA/水(10mL)+DCM(0.25mL)和TIS(0.25mL)的混合物裂解。将树脂在环境温度下振荡2小时后,滤入冰冷的Et_2O(75mL)中。所得沉淀通过离心分离,接着用Et20(3x)洗涤后,真空干燥48小时,得到粗制的300mg化合物(VIII)。

[1091] 粗制化合物(VIII)用prep-HPLC(GILSON),30->80%MeCN纯化。将合并的流分蒸发至干,将残余物溶于H_2O/MeCN 1:1后,冻干过夜,得到170mg化合物(VIII)。

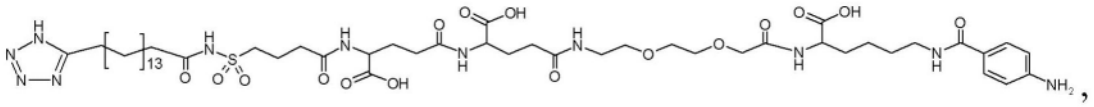
[1092] TOF-MS:Rt=4.7分钟,质量1268.71(M+1)

[1093] 流程3

[1094] 

[1095] 实施例18

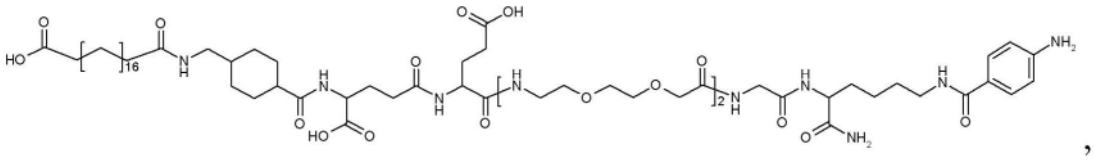
[1096] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用Fmoc-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1097] 

[1098] TOF-MS:质量1124.33(M+1)

[1099] 实施例19

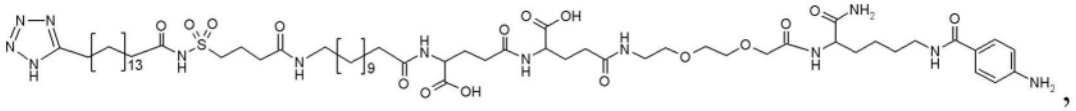
[1100] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂(Rink amid resin)制备下列化合物。

[1101] 

[1102] TOF-MS:质量1333.64(M+1)

[1103] 实施例20

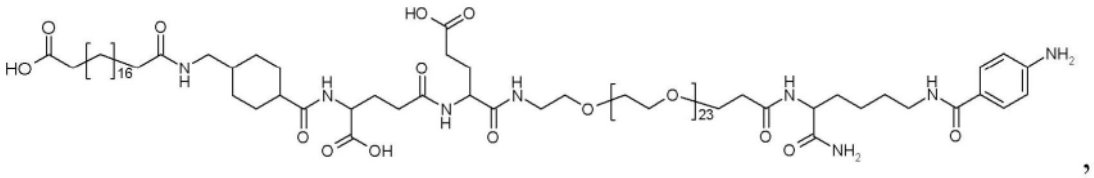
[1104] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1105] 

[1106] TOF-MS:质量1320.67(M+1)

[1107] 实施例21

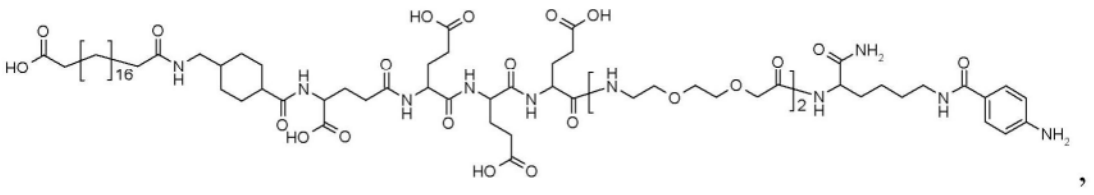
[1108] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1109] 

[1110] TOF-MS:质量2114.64(M+1)

[1111] 实施例22

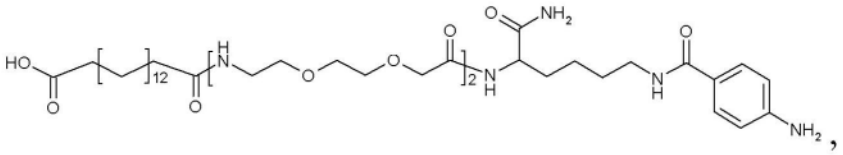
[1112] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1113] 

[1114] TOF-MS:质量1534.82(M+1)

[1115] 实施例23

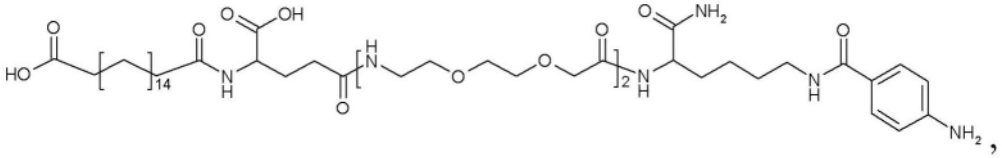
[1116] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1117] 

[1118] TOF-MS:质量823.05(M+1)

[1119] 实施例24

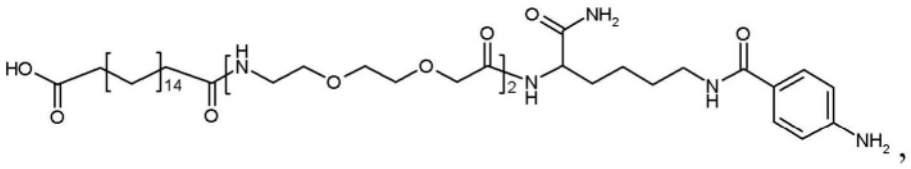
[1120] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1121] 

[1122] TOF-MS:质量980.22(M+1)

[1123] 实施例25

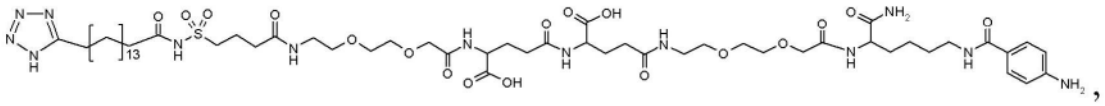
[1124] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1125] 

[1126] TOF-MS:质量851.10(M+1)

[1127] 实施例26

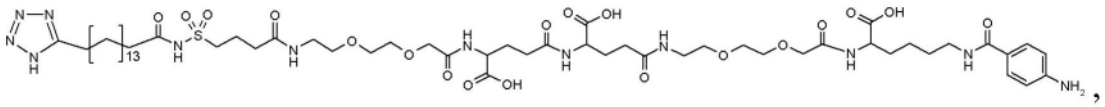
[1128] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1129] 

[1130] TOF-MS:质量1258.51(M+1)

[1131] 实施例27

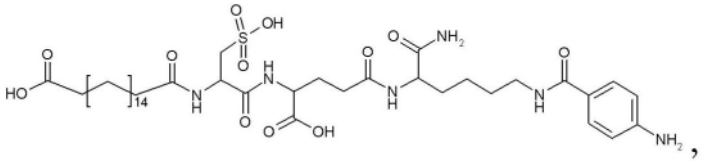
[1132] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Wang树脂制备下列化合物。

[1133] 

[1134] TOF-MS:质量1269.49(M+1)

[1135] 实施例28

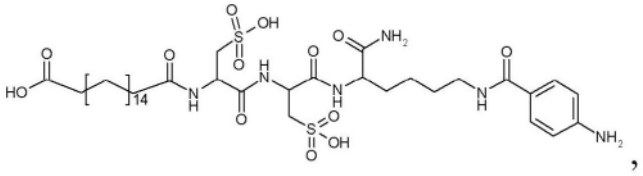
[1136] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1137] 

[1138] TOF-MS:质量841.04(M+1)

[1139] 实施例29

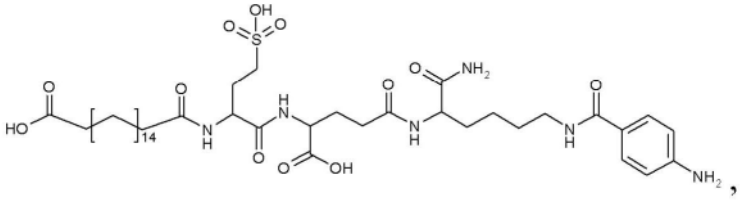
[1140] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1141] 

[1142] TOF-MS:质量863.07(M+1)

[1143] 实施例30

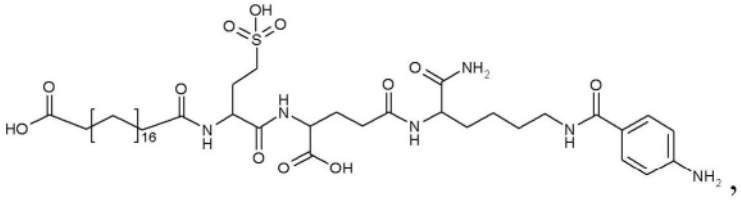
[1144] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1145] 

[1146] TOF-MS:质量855.07(M+1)

[1147] 实施例31

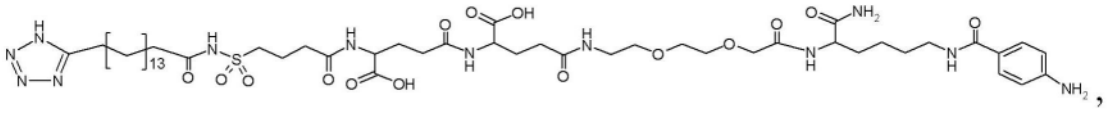
[1148] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1149] 

[1150] TOF-MS:质量883.12(M+1)

[1151] 实施例32

[1152] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

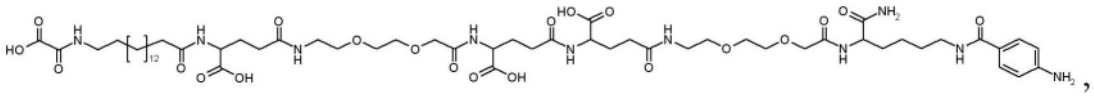
[1153] 

[1154] TOF-MS:质量1123.35(M+1)

[1155] 实施例33

[1156] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备

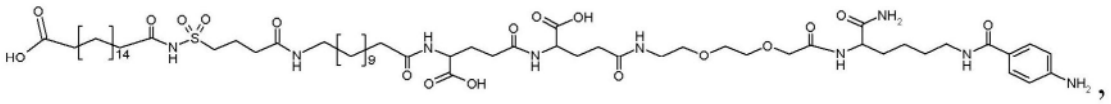
下列化合物。

[1157] 

[1158] TOF-MS:Rt＝4.7分钟,质量1267.45(M+1)

[1159] 实施例34

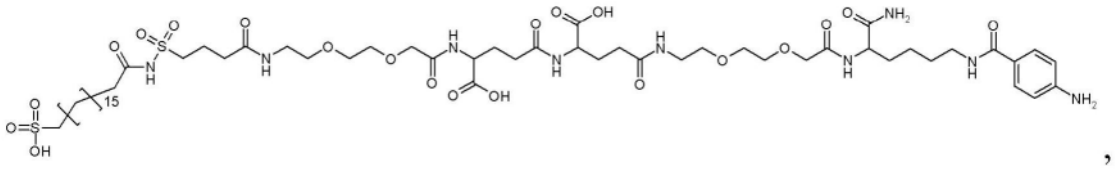
[1160] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1161] 

[1162] TOF-MS:质量1310.67(M+1)

[1163] 实施例35

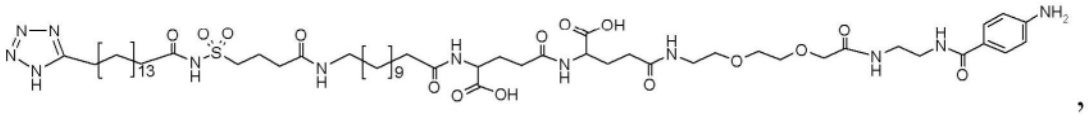
[1164] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1165] 

[1166] TOF-MS:质量1308.58(M+1)

[1167] 实施例36

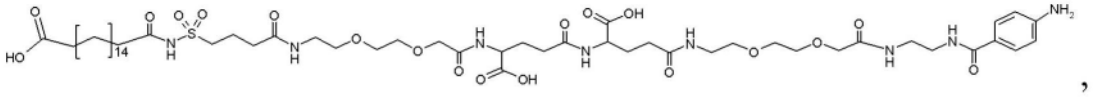
[1168] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Glu(ODmab)-OH和2-氯三苯甲基氯树脂制备下列化合物。

[1169] 

[1170] TOF-MS:质量1235.56(M+1)

[1171] 实施例37

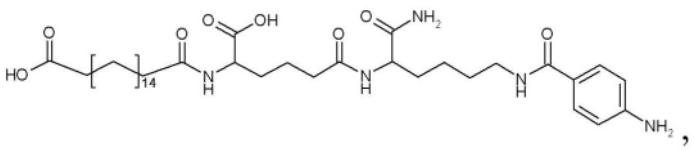
[1172] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用Fmoc-Glu(ODmab)-OH和2-氯三苯甲基氯树脂制备下列化合物。

[1173] 

[1174] TOF-MS:质量1173.40(M+1)

[1175] 实施例38

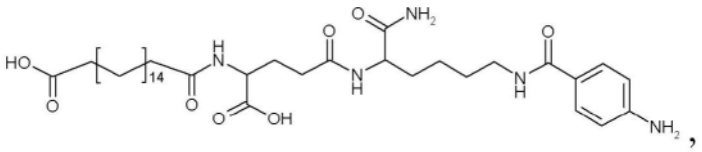
[1176] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1177] 

[1178] TOF-MS:质量703.93(M+1)

[1179] 实施例39

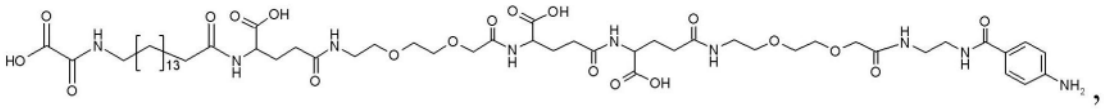
[1180] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Lys(Mtt)-OH和Rink酰胺树脂制备下列化合物。

[1181] 

[1182] TOF-MS:质量689.90(M+1)

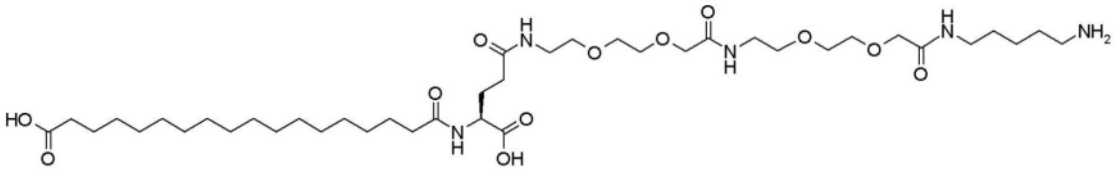
[1183] 实施例40

[1184] 按照上述实施例17中所述类似方法,使用FMOC-Glu(ODmab)-OH和2-氯三苯甲基氯树脂制备下列化合物。

[1185] 

[1186] TOF-MS:质量1182.34(M+1)

[1187] 实施例4117-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(5-氨基戊基氨甲酰基)甲氧基]乙氧基}乙基氨甲酰基)-甲氧基]乙氧基}乙基氨甲酰基)-1-羧基-丙基氨甲酰基]-十七烷酸:

[1188] 

[1189] 将N-叔丁氧羰基尸胺(24.3mg;0.12mmol)加入17-((S)-1-羧基-3-{2-[2-({2-[2-(2,5-二氧代-吡咯烷-1-基氧基羰基甲氧基)-乙氧基]乙基氨甲酰基}甲氧基)乙氧基]乙基氨甲酰基}丙基氨甲酰基)-十七烷酸(100mg;0.12mmol)和DIPEA(46.68mg;0.36mmol)的THF(2.0ml)溶液中。将反应混合物在室温下搅拌过夜,然后真空浓缩。将残余物溶于水(5ml)和THF(2ml)的混合物中,通过制备型HPLC(RP18柱)纯化。合并含有Boc保护的偶联产物的流分后,使之干燥。将残余物溶于50%TFA-DCM(4ml),在室温下搅拌1小时,然后真空浓缩,得到54mg(55%)标题产物,为其三氟乙酸盐。

[1190] TOF-MS:质量815.5(M+1)

[1191] GH白蛋白结合剂化合物的制备:

[1192] 实施例42

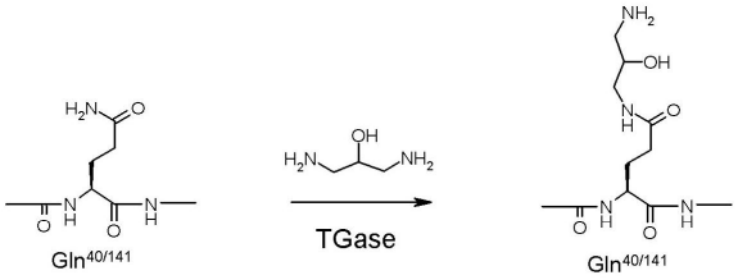
[1193] 先前已在WO2005/070468中描述了使用转谷氨酰胺酶将柄与GH连接,并可按照本发明用于白蛋白结合剂的连接。按照US5156956,所使用的TGase是得自茂原链轮丝菌的微生物转谷氨酰胺酶。在上述化学法I部分描述了通用方法。

[1194] 1.转氨基的和氧化的GH化合物(I)与白蛋白结合剂(II)的偶联

[1195] 制备下列溶液:

[1196] 缓冲液A:将三乙醇胺(119mg,0.8mmol)溶于水(40mL)中,调节pH至8.5。

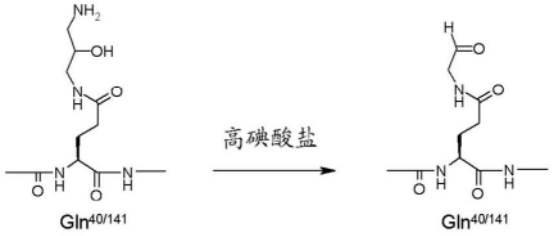
[1197] (A)hGH(III)与1,3-二氨基-2-丙醇的转氨基作用

[1198] 

III IV

[1199] 在下一步骤中,向转氨基的GH(III)中加入高碘酸盐。氧化通常在30分钟内在低温(例如4-10℃)下进行,任选避光进行。高碘酸盐可将GH中的甲硫氨酸残基氧化为其相应的甲硫氨酸亚砜残基。为了使这种氧化风险降到最低,在高碘酸盐氧化期间可加入小分子有机硫醚。合适有机硫醚是3-甲基硫丙-1-醇,但技术人员能够提出其它有机醚。

[1200] 转氨基的GH化合物(IV)的氧化:

[1201] 

IV I

[1202] 可进行缓冲液更换以得到有效还原氰基硼氢化钠所需要的酸溶液。通常,使用过量的A-W-B1-NH2胺,可随时间加入较少部分的氰基硼氢化钠。

[1203] 制备下列溶液:

[1204] 缓冲液A:将三乙醇胺(119mg,0.8mmol)溶于水(40mL)中,调节pH至8.5。

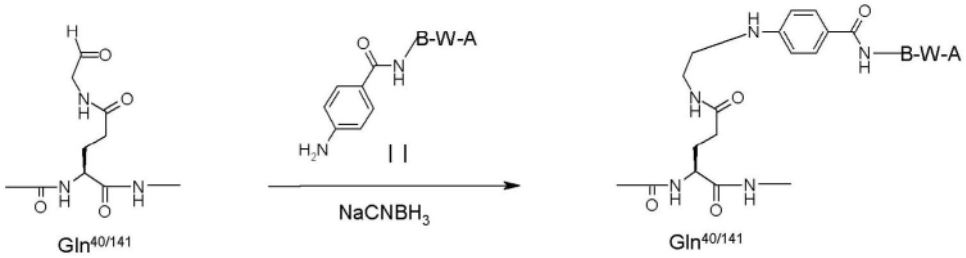
[1205] 缓冲液B:将3-甲基硫丙醇(725mg,7.1mmol)溶于缓冲液A(10mL)中。

[1206] 缓冲液C:将HEPES(5.96g)溶于水(1.0L)中,调节pH至7.0。

[1207] 高碘酸盐:将$NaIO_4$(48.1mg,0.225mmol)溶于水(1.0mL)中。

[1208] 向(IV)(10mg,0.5μmol)的溶液中加入缓冲液B(0.2mL),接着加入高碘酸盐溶液(0.03mL)。在冷孵育20分钟后,混合物用缓冲液C透析4次。使残余物浓缩至1mL。

[1209] (C)(I)与白蛋白结合剂(II)的还原胺化

[1210] 

I VI

[1211] 可以使用实施例17-40中描述的白蛋白结合剂(II)。

[1212] 将来自(B)(1mL,10mg,0.45μmol(I))的最终溶液与白蛋白结合剂(II)溶液(2mL,10mg,0.3μmol)在25mM HEPES缓冲液(pH 7.0)中混合,使所得混合物在室温下慢慢旋转1小时。1小时后,分批加入$NaCNBH_3$(100μL $NaCNBH_3$(20mg)的水(0.5mL)溶液)。将混合物避光置

于室温下18-24小时。

[1213] 可如下进行稍后的反应：

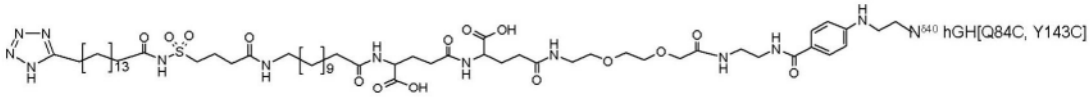
[1214] 向氧化的转氨基的GH溶液中加入白蛋白结合剂接头在AcOH(1.5mL)和50mM MES(0.5mL)的混合物(pH 6.00)中的溶液。将所得反应混合物在室温下轻轻振荡30分钟,此时加入$NaCNBH_3$溶液(15μL,(22mg $NaCNBH_3$溶于500μL Milli-Q水+AcOH(15μL)))。样品用锡纸覆盖,在室温下搅拌过夜

[1215] 可如下通过阴离子交换色谱法分离缀合物：

[1216] 采用Amicon Ultra15装置(Ultracel 10K管),以4000rpm/分钟离心3x8分钟,通过用纯水(3X)更换的缓冲液除去乙酸。然后采用Amicon Filter装置,对混合物进行缓冲液更换至20mM TEA(pH:8.50),用20mM TEA稀释至50mL的最终体积,然后加样至HiLoad Q Sepharose,26/10柱中。该柱最初用20mM TEA,pH 8.50(缓冲液A)洗涤,然后使用0-100％(B)梯度经20个CV,以2mL/分钟的流速,用20mM TEA、500mM NaCl,pH 8.50(缓冲液B)洗脱。采用Amicon Ultra15装置(Ultracel 10K管),通过以4000rpm/分钟离心3x8分钟,对合并的流分进行5次缓冲液更换至10mM碳酸氢铵缓冲液/纯水。

[1217] 使用实施例18的白蛋白结合剂将产生下列化合物

[1218] 42.1

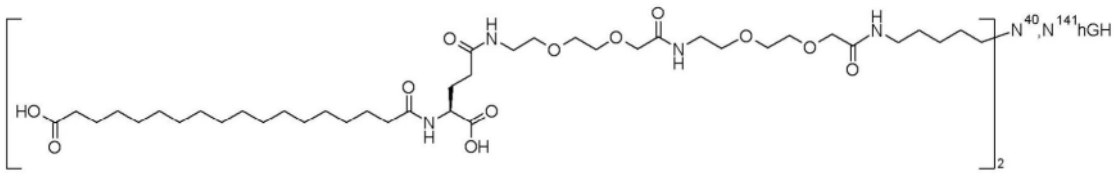
[1219] 

,

[1220] TOF-MS:质量23301.63

[1221] 使用实施例41的白蛋白结合剂制备下列化合物

[1222] 42.2

[1223] 

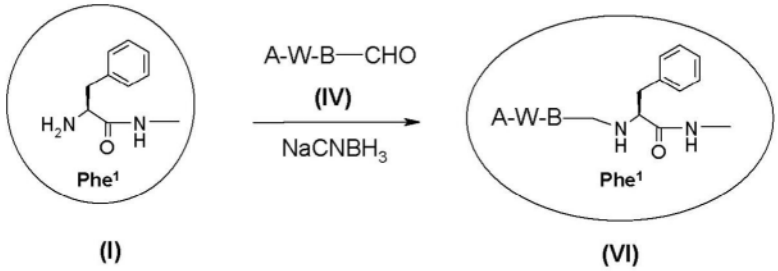
[1224] TOF-MS:质量23727.6245

[1225] 向hGH(1mg,45nmol)和17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(5-氨基戊基氨甲酰基)甲氧基]乙氧基}乙基氨甲酰基)甲氧基]乙氧基}乙基氨甲酰基)-1-羧基-丙基氨甲酰基]十七烷酸(2.10mg;2250nmol)的20mM三乙醇胺(1000ul;pH 8.5)溶液中加入TGase(0.12nmol;茂原链轮丝菌)。使反应混合物在25℃下孵育146小时,其中倍增时,得到上式的衍生化hGH类似物。

[1226] 实施例43

[1227] 1.N端具有白蛋白结合剂(IV)的GH化合物(I)的偶联

[1228] (A)(T)与白蛋白结合剂醛(TV)的还原烷基化

[1229] 

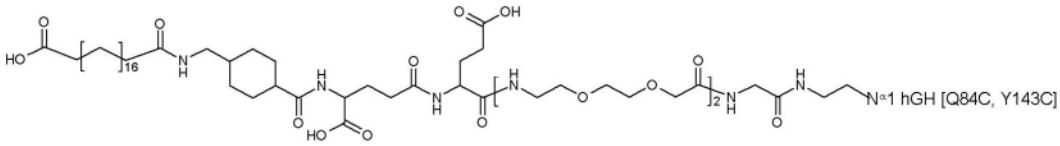
(I) (VI)

[1230] 如上所示的衍生化方法利用白蛋白结合接头A-W-B,其中B具有末端醛官能团。hGH与A-W-B-CHO的缀合通过还原烷基化(hGH→VI)产生。还原烷基化在本文中是示例性的,并且是本领域公认的,导致hGH化合物在N端位置被修饰。

[1231] 如实施例14中所述,得到白蛋白结合剂(IV)。

[1232] 2-(C_{20}二酸-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-甘氨酰胺(Glycin amid))-乙基-$N^{\alpha 1}$-hGH[Q84C,Y143C]的合成

[1233] 43.0

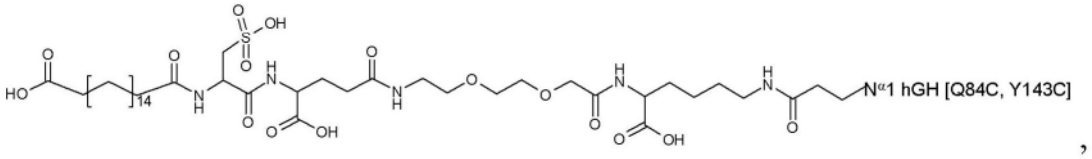
[1234] 

[1235] 将hGH[Q84C,Y143C](23mg)溶于Hepes缓冲液(2.3mL 0.25mM pH 7.0)中。将C_{20}二酸-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly-二甲基缩醛(2mg,参见上述实施例14)用TFA(50μL)处理6分钟后,真空蒸发至干。残余物用EtOH(200μL)汽提,真空蒸发至干。将残余物溶于DMF(100μL)后,加入hGH溶液中。形成沉淀,通过加入DMF(1mL)重新溶解。1小时后,分批加入$NaCNBH_3$(20mg,0.5mL MeCN中(230μL))的溶液,静置20小时。反应物通过加入AcOH(2mL)猝灭,用水稀释至20mL的总体积,然后在C18柱上,用0.1%TFA/MeCN的从40-80%针对0.1%TFA/水的梯度,在制备型HPLC中纯化。收集最后的洗脱峰,用水自70%MeCN稀释到10%,然后冻干,得到4.51mg 2-(C_{20}二酸-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-甘氨酰胺)-乙基-$N^{\alpha 1}$-hGH[Q84C,Y143C]。

[1236] TOF-MS:Rt=15.25分钟,质量=23150

[1237] 按照上述类似方法,使用实施例16的白蛋白结合剂制备下列化合物。

[1238] 43.1

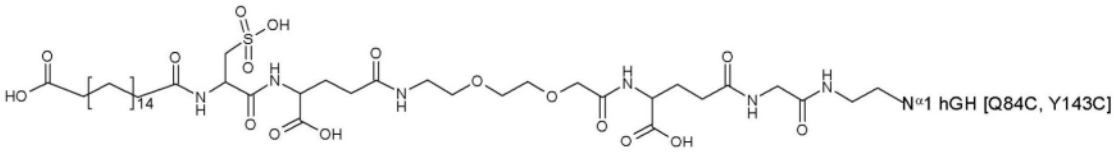
[1239] 

,

[1240] TOF-MS:Rt=15.2分钟,质量=23033

[1241] 按照上述类似方法,使用实施例15的白蛋白结合剂制备下列化合物。

[1242] 43.2

[1243] 

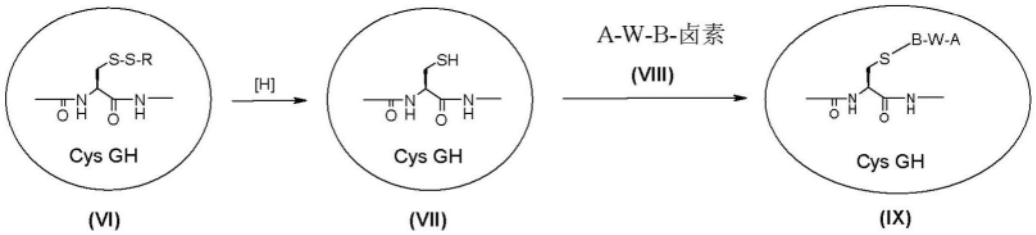
[1244] TOF-MS:Rt＝15分钟,质量＝22989.1

[1245] 实施例44

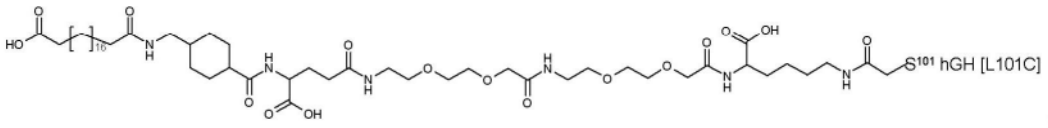
[1246] 1.具有内部游离的单个cys的GH化合物(VII)与白蛋白结合剂(VIII)的偶联

[1247] 1)通过将二硫化物(VI)用合适的选择性还原剂还原来释放游离的Cys GH(VII):

[1248] 2)用卤素活化的白蛋白结合剂(VIII)将游离Cys GH(VII)烷基化,得到Cys缀合的GH化合物(IX)

[1249] 

[1250] 44.1

[1251] 

,

[1252] 2-(C_{20}二酸-Trx-γGlu-OEG-OEG-δLys)-羰基亚甲基-S^{101}-hGH[L101C]hGH[L101C](VII)的制备:

[1253] 在如上得到的hGH[L101C]中,其游离半胱氨酸的部分用谷胱甘肽和胱胺封闭。在含有GSH和GSSG的平衡缓冲液中,使用谷氧还蛋白II(Grx2),以酶促法进行解封闭。通过在Sephadex G25柱上进行缓冲液更换,将解封闭的hGH[L101C]与低分子量GSH/GSSG分开。

[1254] 白蛋白结合剂(VIII)与hGH[L101C](VII)的缀合:

[1255] 将实施例5的白蛋白结合剂(78mg,5eq)溶于具有5%羟丙基-β-环糊精的170mL HEPES/EDTA缓冲液中,加入MTP(2.1mL,1%)和0.5M NaCl(6.34g)。

[1256] 向该混合物中加入浓缩的hGH[L101C](1eq,46mL),混合物置于室温下过夜。过夜后溶液变得混浊。因为HPLC显示未反应的起始原料,因此再加入5eq.实施例5的白蛋白结合剂(其溶于最少的NMP中)。将所得混合物再在室温下搅拌16小时。

[1257] 纯化:

[1258] 所用缓冲液:

[1259] 缓冲液A.

[1260] 20mM三乙醇胺(TEA)+10%乙二醇

[1261] 5.96g三乙醇胺

[1262] 200mL乙二醇

[1263] MQ水加至2L

[1264] 用1N HCl调节pH至8.5

[1265] 缓冲液B:

[1266] 20mM三乙醇胺(TEA)+1.0M NaCl+10%乙二醇

[1267] 5.96g三乙醇胺

[1268] 116.88g NaCl

[1269] 200mL乙二醇

[1270] MQ水加至2L

[1271] 用1N HCl调节pH至8.5

[1272] 在Sephadex柱中经过3次运行,将反应缓冲液更换为具有乙二醇的TEA-缓冲液A。

[1273] 柱:50/30 Sephadex G25 fine

[1274] 缓冲液A:

[1275] 流速:10mL/分钟

[1276] 温度:RT(在12℃下收集流分)

[1277] 流分:30mL/流分

[1278] 收集所需流分,合并,然后在Q Sepharose柱中纯化:

[1279] 柱:26/10 Q Sepharose HP

[1280] 缓冲液A:

[1281] 缓冲液B:

[1282] 梯度1:0-10%缓冲液B经1个CV

[1283] 梯度2:10-40%缓冲液B经20个CV

[1284] 梯度3:40-100%缓冲液B经1个CV

[1285] 流速:8mL/分钟

[1286] 温度:RT(在室温下收集流分)

[1287] 流分:5mL/流分

[1288] 收集所需流分,合并,在Sephadex G25柱中进行缓冲液更换至10mM碳酸氢铵(pH 8.0):

[1289] 柱:50/30 Sephadex G25 fine

[1290] 缓冲液A:10mM碳酸氢铵(pH 8.0)

[1291] 流速:10mL/分钟

[1292] 温度:RT(在12℃下收集流分)

[1293] 流分:30mL/流分

[1294] 合并5个流分后冻干。

[1295] 通过MS分析合并物,观察到大量二聚体(MS 44491.7)。

[1296] 将冻干的小瓶溶于缓冲液A后,在新的Q Sepharose柱中再纯化:

[1297] 柱:26/10 Q Sepharose HP

[1298] 缓冲液A:

[1299] 缓冲液B:

[1300] 梯度1:0-10%缓冲液B经1个CV

[1301] 梯度2:10-40%缓冲液B经20个CV

[1302] 梯度3:40-100%缓冲液B经1个CV

[1303] 流速:8mL/分钟

[1304] 温度:RT(在室温下收集流分)

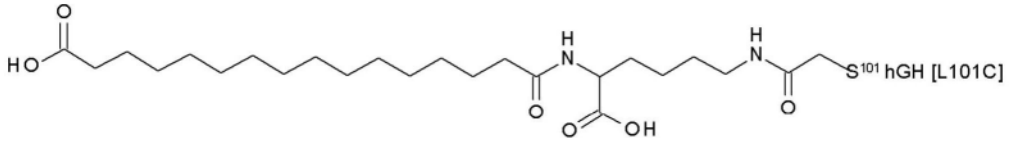
[1305] 流分:5mL/流分

[1306] 合并流分,通过进行超滤脱盐/缓冲液更换至10mM碳酸氢铵。将合并物浓缩至25mL,通过RP-HPLC和MS-TOF定量:

[1307] TOF-MS:Rt＝16.15分钟,质量＝23315.96

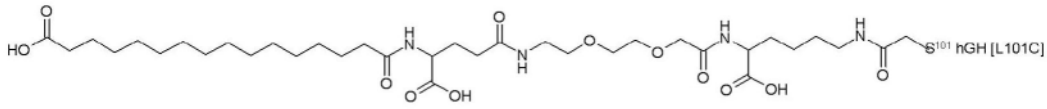
[1308] 采用相同方法制备下列化合物。

[1309] 44.2

[1310] 

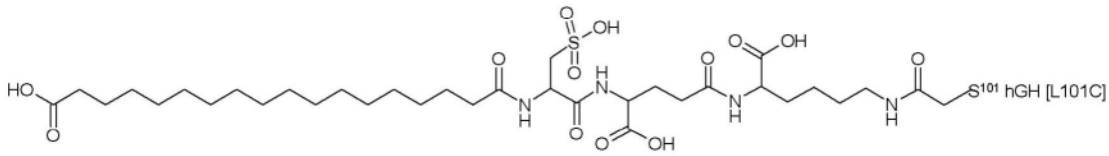
[1311] TOF-MS:Rt＝15,24分钟,质量＝22676.8

[1312] 44.3

[1313] 

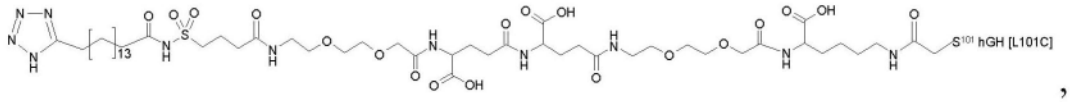
[1314] TOF-MS:Rt＝10.5分钟,质量＝22975.1

[1315] 44.4

[1316] 

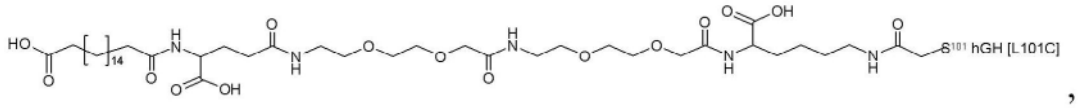
[1317] TOF-MS:Rt＝15.5分钟,质量＝23009

[1318] 44.5

[1319] 

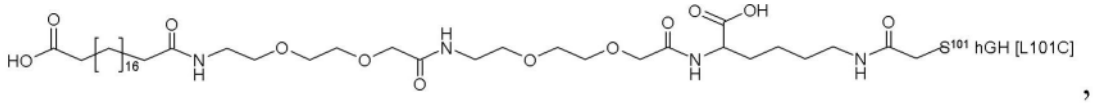
[1320] TOF-MS:Rt＝14.0分钟,质量＝23305,5

[1321] 44.6

[1322] 

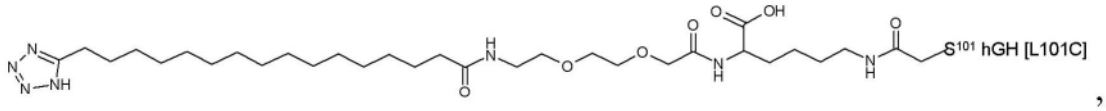
[1323] TOF-MS:Rt＝15.27分钟,质量＝23148

[1324] 44.7

[1325] 

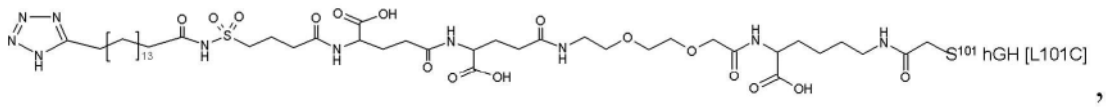
[1326] TOF-MS:Rt＝16.40分钟,质量＝23048

[1327] 44.8

[1328] 

[1329] TOF-MS:Rt＝15.3分钟,质量＝22884.4

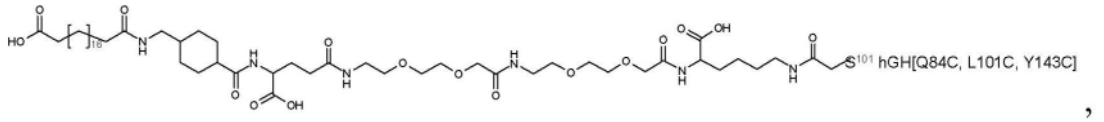
[1330] 44.9

[1331] 

,

[1332] TOF-MS:Rt＝14.6分钟,质量＝23291.4

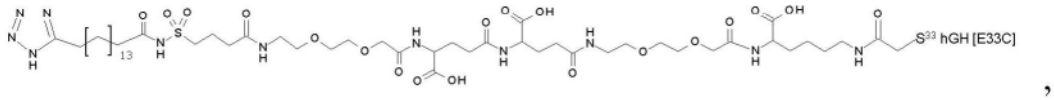
[1333] 44.10

[1334] 

,

[1335] TOF-MS:Rt＝15.05分钟,质量＝23097.76

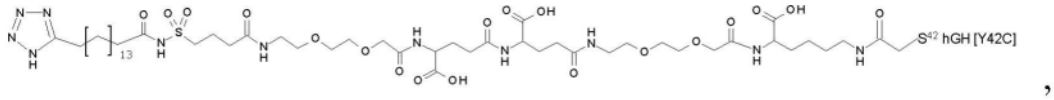
[1336] 44.11

[1337] 

,

[1338] TOF-MS:Rt＝14.2分钟,质量＝23420.83

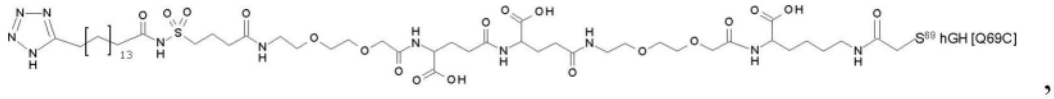
[1339] 44.12

[1340] 

,

[1341] TOF-MS:Rt＝15.7分钟,质量＝23289.6

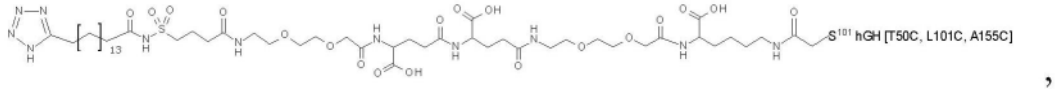
[1342] 44.13

[1343] 

,

[1344] TOF-MS:Rt＝17.0分钟,质量＝23324.55

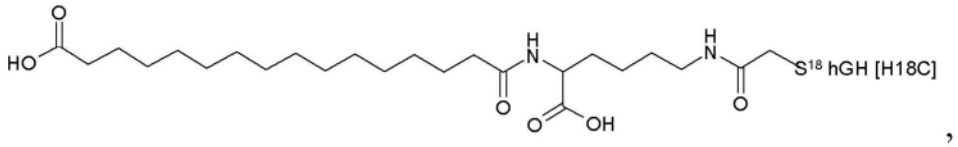
[1345] 44.15

[1346] 

,

[1347] TOF-MS:Rt＝12.85分钟,质量＝23337.5

[1348] 44.16

[1349] 

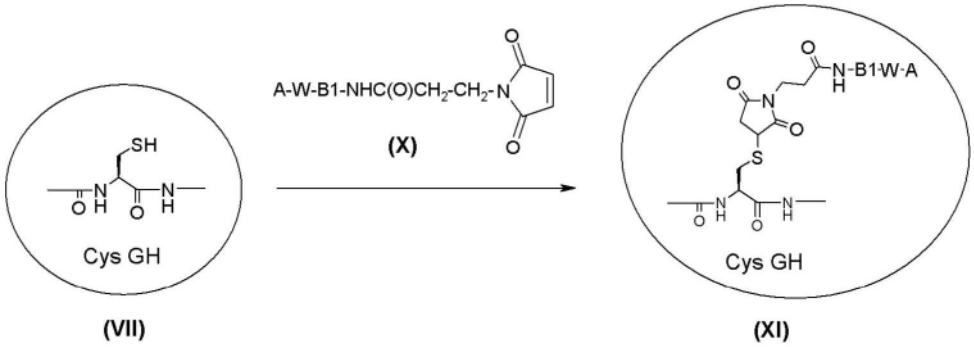
,

[1350] TOF-MS:Rt＝15,24分钟,质量＝22676.8

[1351] 实施例45

[1352] 1.具有内部游离单个cys的GH化合物(VII)与白蛋白结合剂(X)的偶联

[1353] 1)游离Cys GH(VII)与马来酰亚胺取代的白蛋白结合剂(X)的烷基化,得到Cys缀合的GH化合物(XI)

[1354] 

(VII) (XI)

[1355] 可使如上所述在实施例44中得到的脱保护的Cys GH化合物(VII)与马来酰亚胺取代的白蛋白结合剂接头(X)反应,得到GH缀合物A-W-B1-NHC(O)CH_2CH_2-吡咯烷-2,5-二酮-3-hGH(XI),其中B1如上述化学法IV中描述所定义的。

[1356] 马来酰亚胺官能化白蛋白结合剂(X)与hGH L101C缀合

[1357] 步骤(a)半胱氨酸残基的解封闭

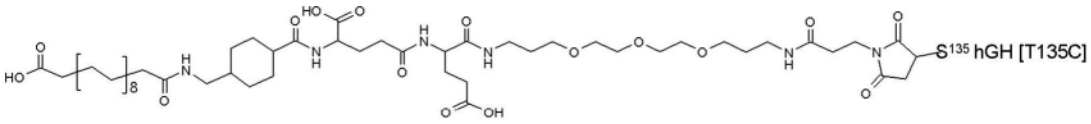
[1358] 在含有GSH和GSSG的平衡缓冲液中,使用谷氧还蛋白II(Grx2),对谷胱甘肽/半胱胺封闭的Cys hGH(VI)进行酶促解封闭。通过在Sephadex G25柱上的缓冲液更换,将解封闭的Cys hGH(VII)与低分子量GSH/GSSG分开。

[1359] 步骤(b)与马来酰亚胺官能化白蛋白结合剂(X)的偶联

[1360] 将马来酰亚胺官能化白蛋白结合剂(X)溶于含有5%羟丙基-β-环糊精的缓冲液。然后将溶液加入解封闭的Cys hGH(VII)中,并使之在室温反应过夜。

[1361] 使用氯化钠的梯度,在缀合之后,将缀合的蛋白质在含有10%乙二醇的20mM三乙醇胺缓冲液(pH 8.5)中的Q Sepharose HiLoad柱上纯化。合并收集的流分,使用G25柱转移至10mM碳酸氢铵后冻干。

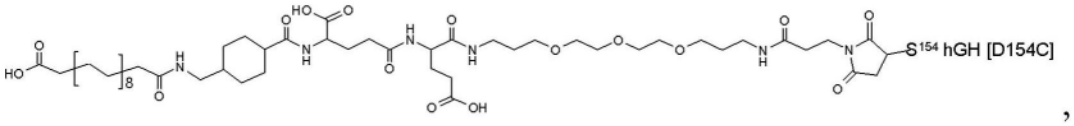
[1362] 45.1

[1363] 

,

[1364] TOF-MS:Rt=16.0分钟,质量=23352

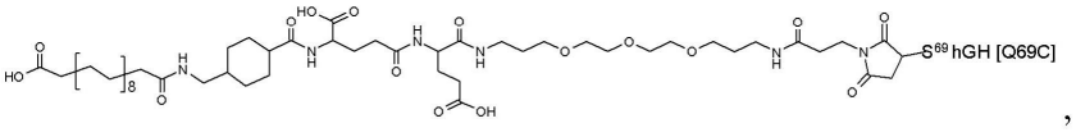
[1365] 45.2

[1366] 

,

[1367] TOF-MS:Rt=15.98分钟,质量=23338

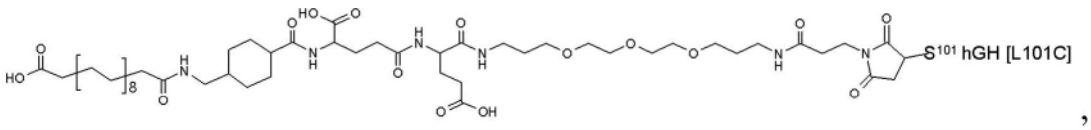
[1368] 45.3

[1369] 

,

[1370] TOF-MS:Rt=16.62分钟,质量=23324.6

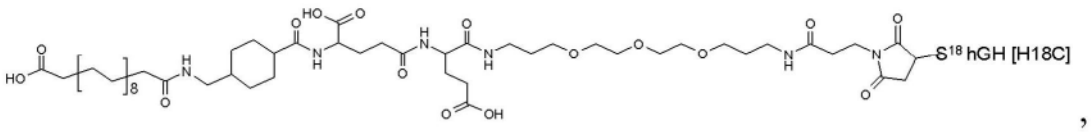
[1371] 45.4

[1372] 

,

[1373] TOF-MS:Rt＝16.20分钟,质量＝23339.7

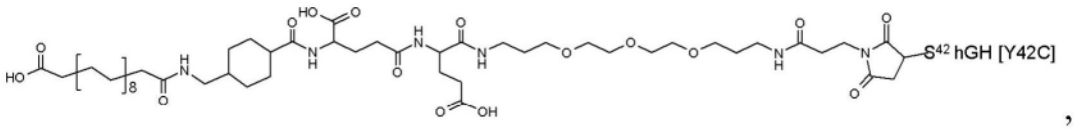
[1374] 45.5

[1375] 

,

[1376] TOF-MS:Rt＝15.72分钟,质量＝23316.35

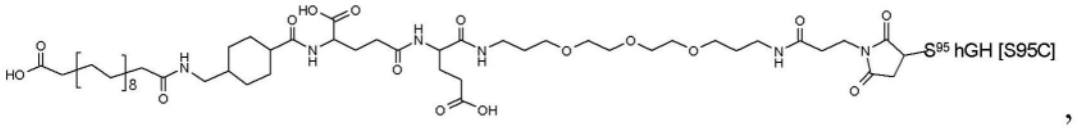
[1377] 45.6

[1378] 

,

[1379] TOF-MS:Rt＝17.2分钟,质量＝23365.9

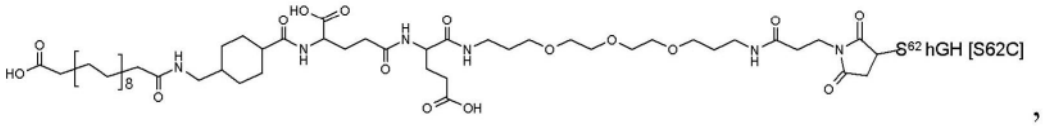
[1380] 45.7

[1381] 

,

[1382] TOF-MS:Rt＝17.2分钟,质量＝23366

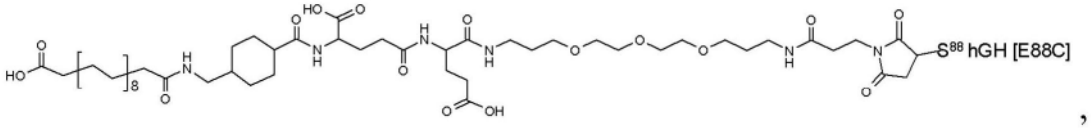
[1383] 45.8

[1384] 

,

[1385] TOF-MS:Rt＝16.5分钟,质量＝23366

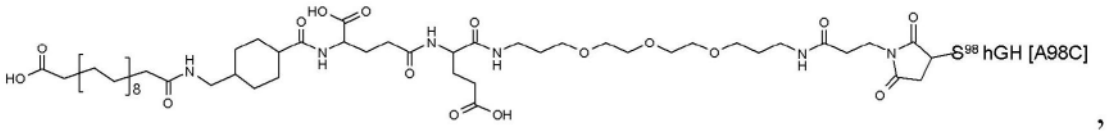
[1386] 45.9

[1387] 

,

[1388] TOF-MS:Rt＝16.8分钟,质量＝23323.8

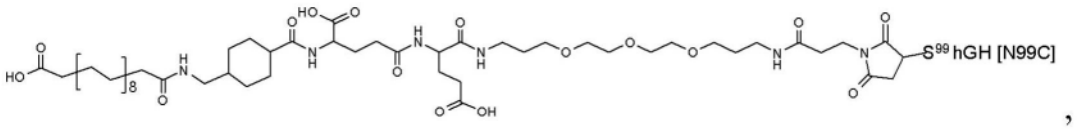
[1389] 45.10

[1390] 

,

[1391] TOF-MS:Rt＝17.1分钟,质量＝23382

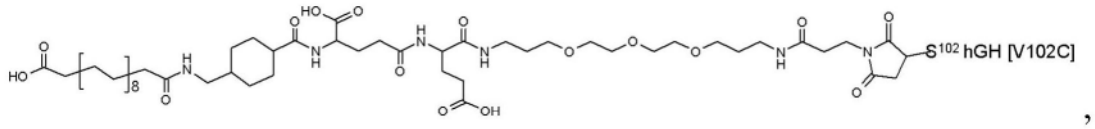
[1392] 45.11

[1393] 

,

[1394] TOF-MS:Rt＝17.2分钟,质量＝23338.8

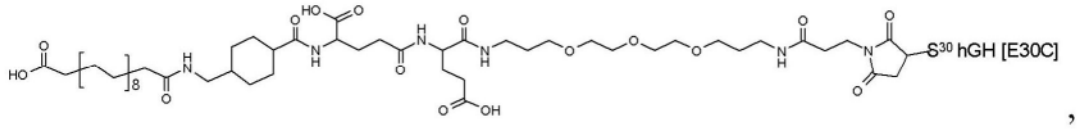
[1395] 45.12

[1396] 

,

[1397] TOF-MS:Rt＝17分钟,质量＝23353.9

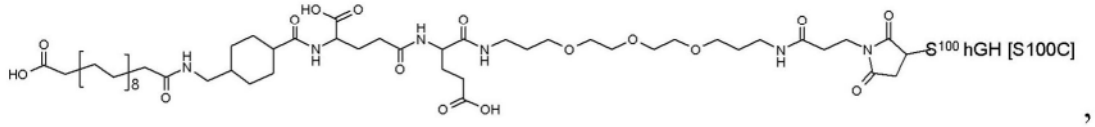
[1398] 45.13

[1399] 

,

[1400] TOF-MS:Rt＝15.65分钟,质量＝23323.7

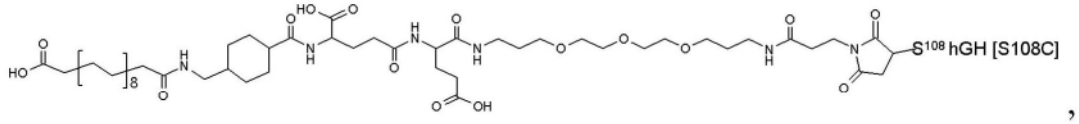
[1401] 45.14

[1402] 

,

[1403] TOF-MS:Rt＝16.5分钟,质量＝23365.8

[1404] 45.15

[1405] 

,

[1406] TOF-MS:Rt＝17.2分钟,质量＝23365.9

[1407] 实施例46

[1408] 测定生长激素活性的测定法(I)BAF-3GHR测定法

[1409] BAF-3细胞(源自骨髓的鼠前B淋巴样细胞系)的生长和存活最初是IL-3依赖性的。IL-3活化JAK-2和STAT,其为在刺激时GH所活化的相同介导物。在转染人生长激素受体后,使细胞系转变成生长激素依赖性细胞系。该克隆可用来评价不同的生长激素样品对BAF-3GHR存活的作用。

[1410] 在饥饿培养基(不含生长激素的培养基)中于37℃、5％CO_2培养BAF-3GHR细胞24小时。

[1411] 洗涤细胞,重新悬浮于饥饿培养基中,并接种至板上。将10μL不同浓度的生长激素化合物或人生长激素或对照加入细胞中,且将板于37℃、5％CO_2孵育68小时。

[1412] 将AlamarBlue®加入各孔中,然后再将细胞孵育4小时。AlamarBlue®是氧化还原指示剂,被细胞代谢固有的反应还原,因此提供活细胞数的间接量度。

[1413] 最后,细胞的代谢活性是荧光读板仪中的量度。样品中的吸光度以未用生长激素化合物刺激的细胞或对照的％表示,可从浓度-反应曲线计算活性(刺激50％细胞的化合物的量)。

[1414] 在BAF-3hGH受体测定法中化合物45.4的体外效力见下表1。

[1415] 按照通用方法所述,通过将化合物与胰凝乳蛋白酶或弹性蛋白酶一起孵育4小时,来测定化合物45.5的蛋白酶稳定性。测量完整GH化合物的百分比,表1中包括了所述结果。

[1416] 表1.与化合物45.4相关的数据

[1417]

化合物	EC50 (nM)	比率 (EC_{50} cmp/EC_{50} hGH)	n	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±0.012	1	6	40	25
45.4	0.09±0.043	3.5	6	75	65

[1418] 实施例47

[1419] 药代动力学

[1420] 在雄性Spraque Dawley大鼠中,在静脉内(i.v.)和皮下(s.c.)单剂量给药后,对实施例的化合物的药代动力学进行了研究。

[1421] 将试验化合物在由甘氨酸20mg/mL、甘露醇2mg/mL、$NaHCO_3$ 2.5mg/mL组成的稀释缓冲液中稀释至1mg/mL的终浓度,调节pH至8.2。

[1422] 在重为250g的雄性Spraque Dawley大鼠中研究试验化合物。用25G针以60nmol/kg体重的剂量,在尾静脉i.v.或在颈部s.c.单次注射给予试验化合物。

[1423] 对于各试验化合物,按照表2提供的下列方案进行采血。

[1424] 表2.各试验化合物的采血方案。

[1425]

		采样时间(小时)												
动物编号	RoA	给药前	0.08	0.25	0.5	1	2	4	6	8	18	24	48	72
1	s.c.							X	X	X		X	X	X
2								X	X	X		X	X	X
3				X	X	X	X							
4				X	X	X	X							
5			X								X			
6			X								X			
7	i.v.				X	X			X	X		X	X	X
8					X	X			X	X		X	X	X
9		X	X								X			
10		X	X								X			

[1426] 在各采样时间,使用25G针从尾静脉抽取0.25ml血液。将血液采入EDTA包被的试管中,在冰上保存,直到在4℃下以1200 x G离心10分钟。将血浆转移至Micronic管中,并保存在-20℃下直到分析。

[1427] 使用豚鼠抗hGH多克隆抗体作为捕捉器(catcher),生物素化的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。测定的检测极限为0.2nM.

[1428] 应用WinNonlin Professional(Pharsight Inc.,Mountain View,CA,USA),对各试验化合物的平均浓度-时间概况进行非房室药代动力学分析。计算终末半衰期($t_{1/2}$)和平均滞留时间(MRT)的药代动力学参数估计值。

[1429] 表3.Spraque Dawley大鼠中单剂量i.v.和s.c.给药后,实施例的GH化合物的半衰期($t_{1/2}$)和平均滞留时间(MRT)。

[1430]

化合物 (实施例#)	RoA	$T_{½}$ (h)	MRT (h)
43.0	i.v.	7.2	9.8
43.2	i.v.	4.4	7.4
44.1	i.v.	5.6	7.2
44.3	i.v.	1.3	0.9
44.4	i.v.	2.5	2.7
44.5	i.v.	4.1	6.8
44.6	i.v.	3.2	4.0
44.7	i.v.	3.8	6.0
44.9	i.v.	4.2	6.5
44.10	i.v	4.1	7.1
45.4	i.v.	8.6	9.8
45.4	s.c.	19.8	31.2
45.12	i.v.	5.8	6.8

[1431] 实施例45.4的生物利用度估计为48.3%。皮下给药后至最大血浆浓度的时间(tmax)为8.0小时。在i.v.和s.c给药后,Cmax分别为1670和151nM。在i.v.给药后零时,推算的血浆浓度为1710nM。

[1432] 实施例48

[1433] 如上所述测定一系列化合物的体外效力和半衰期。化合物的缀合物相同,但通过表4中所述经突变引入的备选半胱氨酸连接。

[1434] 表4.体外效力和半衰期($t_{1/2}$)。

[1435]

化合物	体外效力	$T_{½}$ (i.v.大鼠) (小时)	MRT (小时)	连接位点 (变体)
hGH	1.0 (def)	0.23		-
45.1		2.6	3.8	T135C
45.2		2.8	8.7	D154C
45.3		2.1	3.1	Q69C
45.4	2.9	6.3/8.6	7.8/9.8	L101C
45.5		4.1	4.5	L18C
45.6		4.1	5.5	Y42C
45.7		0.72	6.5	S95C
45.8		0.59	2.0	S62C
45.9		1.8	4.1	E88C
45.10	2.6	3.4	4.3	A98C
45.11	3.1	5.8	6.8	N99C
45.12	2.5	1.9	3.0	V102C

[1436]

45.13	16.5	1.9	2.6	E30C
45.14	4.4	1.5	2.0	S100C

[1437] 实施例49

[1438] 切除垂体的Sprague Dawley大鼠中的体内剂量反应研究

[1439] 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。

[1440] 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。

[1441] 使用5个剂量水平的化合物45.4(从1-150nmol/大鼠)进行剂量反应研究。

[1442] 在所有给药组中,切除垂体的Sprague Dawley大鼠中血浆IGF-1的基线水平为约80-100ng/mL。在第一天,在单剂量后,IGF-1水平快速增加到800-1000ng/mL,几乎不依赖于剂量。血浆IGF-1水平在随后的数天内,以剂量依赖性方式再次下降,其中最低剂量中观察到最快降低,而最高剂量观察到最慢降低。在最高剂量下,在开始更快速地下降之前,IGF-1血浆水平保持在800-900ng/mL持续3天。对于所有给药组,与溶媒对照组相比,IGF-1血浆浓度水平升高直到第3天。对于10nmol、50nmol和150nmol给药组,在整个研究(7天)期间,IGF-1血浆浓度水平升高。

[1443] 实施例50

[1444] 消除

[1445] 据假设,吸收速率与分子通过皮下毛细血管的紧密连接的能力有关,这是一种与分子大小的性质。具有40kDa PEG的PEG-hGH的表观分子量(mw)为150-250kDa。具有共价结合的白蛋白的hGH分子的mw=87kDa,而具有非共价结合的白蛋白的hGH分子将因时间与白蛋白部分解离,因此mw=22kDa。在解离状态中耗用的时间将取决于白蛋白结合部分的亲和力。因此这类化合物的吸收速率比PEG-hGH的吸收速率快,并且速率应随对白蛋白具有较低亲和力的白蛋白结合部分的使用而提高。

[1446] 将试验溶液在由甘氨酸20mg/mL、甘露醇2mg/mL、$NaHCO_3$ 2.4mg/mL组成的标准缓冲液中稀释,调节pH至8.2。

[1447] 用^{125}I碘化由Chemistry&Isotope Lab.Novo Nordisk A/S进行。最终的放射性制剂的比放射活性为3μCi/mL,并在3mL Penfill中提供。

[1448] 将该溶液保存在2-8℃下直至使用。

[1449] 在5只杂种LYD雌性猪中测量选定化合物的消除率(Disappearance rate)。给猪称重,禁食,分发特殊的"猪外套"以携带γ计数器和发射器,并且在开始研究前关在单独的栏中。

[1450] 研究前,使所有猪禁食18小时。

[1451] 用具有固定黑色针塞(needle stopper)的Novopen3®和NovoFine®28G针分别在颈部左右侧对动物皮下给药(60nmol)。注射深度为5mm。

[1452] 通过便携式设备测量放射性贮库的消除,持续约24-48小时。

[1453] 对于各单独的动物,结果表示为AUC(0-45小时),如表5所示。

[1454] 如上所述和如表5所示,测定一系列化合物的体外效力、半衰期和其它特征。

[1455] 表5.化合物特性。

[1456]

化合物	体外效力	$T_{½}$ (i.v.大鼠) (小时)	消除 AUC (0-45 小时)	IGF-1 增加的持续时间(小时)
hGH	1.0 (def)	0.23	519	-
44.9	8.2	4.2	2259	>48
44.8	1.8	2.6	1490	>24
44.1	4.7	5.6	1750	>48
44.3	1.5	1.3	2152	<24

[1457]

44.6	4.7	3.2	1558	<24
44.7	4.5	3.8	2039	<24
44.5	5.8	4.1	1599	>48
44.4	3.9	2.5	1588	>48

[1458] 实施例51

[1459] 猪中的体内研究

[1460] 为了进一步证实本发明的hGH白蛋白缀合物的功能,选择3种化合物用于在猪中的其它药代动力学研究。制备相当于化合物44.1、44.4和44.5的化合物,在脱去MAEA纯化标签后,使白蛋白结合剂与hGH变体缀合。

[1461] 在标准缓冲液(20mg/mL甘氨酸、2mg/mL甘露醇、2.4mg/mL $NaHCO_3$,pH调节至8.2)中,将试验化合物稀释至100nmol/mL的终浓度。研究中使用5月龄和重为9-12kg的二十四只雄性Göttingen小型猪(minipig)。将各试验化合物给予8只动物,其中4只小型猪接受静脉内推注给药,4只动物接受皮下给药。静脉内注射通过24G Venflon在耳部给予。在最长5秒内,推注给予该剂量,接着给予2mL 0.9%NaCl。在距耳约5-7cm且距颈中部7-9cm的颈部右侧给予皮下注射。每只动物接受单剂量的10nmol/kg试验化合物。在下列时间点自每只动物中收集血样:给药前、注射后0.08、0.25、0.5、1、2、4、6、8、18、24、48、72、96、120、168、240和336小时。自各个血样中分离血浆,在分析试验化合物前保存在-20℃下。通过非房室药代动力学方法对血浆浓度-时间数据进行分析。

[1462] 表6.单剂量皮下给予10nmol/kg后的药代动力学参数估算值。

[1463]

化合物	如下化合物中的 ABW-卤素	AUC/剂量 (h*kg/l)	$T_{½}$ (小时)	MRT (小时)	MAT (小时)	F (%)
51.1	44.1	139 (37.5)	11 (1.2)	30.6 (4.1)	10.0	38.6
51.2	44.5	101 (22.5)	12 (2.7)	25.2 (3.9)	11.6	60.8
51.3	44.4	144 (34.7)	12.6 (3.5)	33.1 (1.7)	12.1	35.6

[1464] ()中为平均值±SD

[1465] 表6表示3种试验化合物的关键药代动力学参数。AUC/剂量是试验化合物剂量校正的暴露的估值。$T_{1/2}$是吸收期完成后试验化合物的终末半衰期。MRT是试验化合物的平均滞留时间,相当于试验化合物分子在体内的平均时间。MAT是相应的平均吸收时间,并且是分子处于吸收期的平均时间的估值。F是有关静脉内给药的试验化合物的绝对生物利用度。

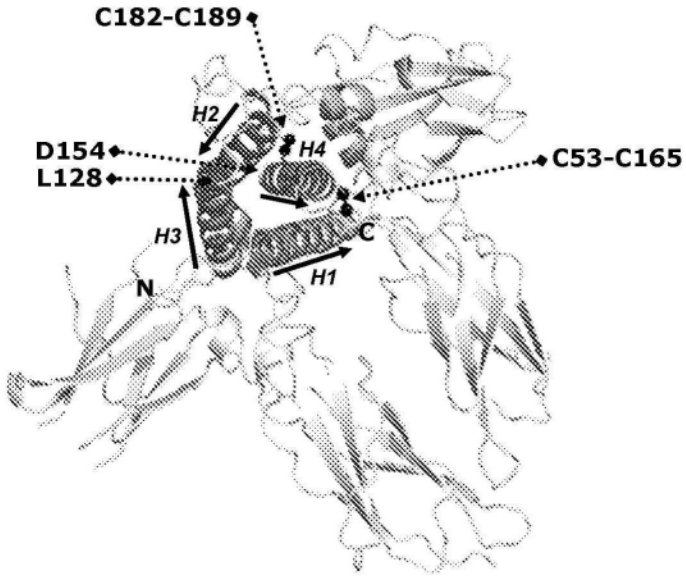


图1

```
1     FPTIPLSRLF DNAMLRAHRL HQLAFDTYQE FEEAYIPKEQ KYSFLQNPQT SLCFSESIPT
                        H1                                  L1
61    PSNREETQQK SNLELLRISL LLIQSWLEPV QFLRSVFANS LVYGASDSNV YDLLKDLEEG
                        H2                    L2            H3
121   IQTLMGRLED GSPRTGQIFK QTYSKFDTNS HNDDALLKNY GLLYCFRKDM DKVETFLRIV
                        L3                                  H4
181   QCRSVEGSCG F
```

图2