



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012134975/10, 24.01.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.01.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

22.01.2010 US 61/297,305;

22.01.2010 EP 10151405.7

(43) Дата публикации заявки: 27.02.2014 Бюл. № 6

(45) Опубликовано: 27.12.2016 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: (см. прод.)(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 22.08.2012(86) Заявка РСТ:
EP 2011/050923 (24.01.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/089255 (28.07.2011)Адрес для переписки:
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-
ПАТЕНТ", И.И. Липатовой

(72) Автор(ы):

БЕРЕНС Карстен (DK),

ЙОХАНСЕН Нильс Лангеланд (DK),

АНДЕРСЕН Хенрик Сун (DK),

НЁРСКОВ-ЛАУРИТЦЕН, Лайф (DK),

БУКАРДТ Енс (DK)

(73) Патентообладатель(и):

НОВО НОРДИСК ХЕЛС КЕА АГ (CH)

(54) ГОРМОНЫ РОСТА С ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ IN VIVO

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложен конъюгат гормона роста (GH), содержащий GH, имеющий одиночную мутацию с внесением Cys, выбранную из A98C, N99C, L101C и V102C, и альбумин-связывающий радикал, присоединенный через гидрофильный спейсер к атому серы этого одиночного Cys. Также предложен конъюгат

гормона роста с конкретными альтернативными вариантами гидрофильного спейсера для присоединения альбумин-связывающего радикала. Данное изобретение может найти применение в получении конъюгатов гормона роста, обладающих повышенной стабильностью и увеличенным временем полужизни *in vivo*. 2 н. и 12 з.п. ф-лы, 2 ил., 6 табл., 51 пр.

(56) (продолжение):

WO 02/055532 A2, 18.07.2002. US 6,608,183 B1, 19.08.2003. WO 03/042245 A2, 22.05.2003. EP 0458064 A2, 27.11.1991. US 5,891,840 A, 06.04.1999. WO 02/055532 A2, 18.07.2002. FILIKOV A.V. et al. "Computational stabilization of human growth hormone." Protein science 11.6 (2002): 1452-1461. URBAN L.J. et al. "An interchain disulfide dimer of human growth hormone." Journal of Biological Chemistry (1977); 252(11): 3697-3702. RU 2 073 686 C1, 20.02.1997.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 605 627**⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.

C07K 14/61 (2006.01)

C07K 17/06 (2006.01)

A61K 38/27 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 5/06 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012134975/10, 24.01.2011

(24) Effective date for property rights:
24.01.2011

Priority:

(30) Convention priority:

22.01.2010 US 61/297,305;

22.01.2010 EP 10151405.7

(43) Application published: 27.02.2014 Bull. № 6

(45) Date of publication: 27.12.2016 Bull. № 36

(85) Commencement of national phase: 22.08.2012

(86) PCT application:

EP 2011/050923 (24.01.2011)

(87) PCT publication:

WO 2011/089255 (28.07.2011)

Mail address:

197101, Sankt-Peterburg, a/ja 128, "ARS-PATENT",
I.I. Lipatovoj

(72) Inventor(s):

BERENS Karsten (DK),

JOKHANSEN Nils Langeland (DK),

ANDERSEN KHenrik Sun (DK),

NERSKOV-LAUPITTSSEN, Lajf (DK),

BUKARDT Ens (DK)

(73) Proprietor(s):

NOVO NORDISK KHELS KEA AG (CH)

(54) GROWTH HORMONES WITH PROLONGED EFFICACY IN VIVO

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology. Conjugate of growth hormone (GH) is disclosed, containing GH with single mutation of Cys addition, selected from A98C, N99C, L101C and V102C, and albumin-binding radical, attached through hydrophilic spacer to sulphur atom of this single Cys. Conjugate of

growth hormone with specific alternative hydrophilic spacers for attachment of albumin-binding radical is also disclosed.

EFFECT: this invention can be used in production of growth hormone conjugates with increased stability and longer half-life *in vivo*.

14 cl, 2 dwg, 6 tbl, 51 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к соединению гормона роста, соединенному с альбумин-связывающим остатком через гидрофильный спейсер, и к способам получения и применения таких соединений. Эти конъюгаты гормона роста обладают повышенной

5 устойчивостью к протеолитической деградации в сочетании более длительным профилем действия и полезны для применения в терапии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Гормон роста - это полипептидный гормон, секретируемый передней долей гипофиза у млекопитающих. В зависимости от биологического вида, гормон роста является

10 белком, состоящим из примерно 190 аминокислотных остатков, что соответствует молекулярной массе примерно 22 кДа. Гормон роста связывается с поверхностными рецепторами клеток, рецепторами гормона роста (GHR), и передает через них сигнал. Гормон роста играет ключевую роль в активации роста, поддержании нормальной композиции тела, анаболизма и метаболизма липидов. Он также оказывает прямое

15 воздействие на промежуточный метаболизм, например, на сниженное поглощение глюкозы, усиленный липолиз, повышенное поглощение аминокислот и синтез белка. Гормон также оказывает влияние на другие ткани, в том числе на жировую ткань, печень, кишечник, почку, скелет, соединительную ткань и мышцы. Был получен рекомбинантный гормон роста человека (hGH), который доступен для приобретения,

20 например: Генотропин™ (Genotropin™, Pharmacia Upjohn), Нутропин™ и Протропин™ (Nutropin™ и Protropin™, Genentech), Хуматроп™ (Humatrope™, Eli Lilly), Серостим™ (Serostim™, Serono), Нордитропин (Norditropin, Novo Nordisk), Омнитроп (Omnitrope, Sandoz), Нутропин Депот (Nutropin Depot, Genentech и Alkermes). Кроме того, на рынке также представлен аналог с дополнительным остатком метионина на N-конце, например:

25 Соматонорм™ (Somatonorm™, Pharmacia Upjohn/Pfizer).

Гормон роста имеет схожую топологию с другими членами белкового семейства гормона роста, пролактином (PRL) и плацентарным лактогеном (PL). Гормон роста классифицируют как белок, содержащий пучок из четырех спиралей (фиг.1), имеющий топологию «вверх-вверх-вниз-вниз» с двумя консервативными дисульфидными связями.

30 В частности, гормон роста дикого типа у человека GH (hGH) состоит из 191 аминокислотного остатка и содержит четыре остатка цистеина в положениях 53, 165, 182 и 189, которые стабилизируют пространственную структуру белка путем образования двух внутримолекулярных дисульфидных связей, соединяющих C53 с C165 и C182 с C189, соответственно (фиг.1). Структура hGH была экспериментально

35 определена с помощью рентгеноструктурной кристаллографии в свободной форме (Chantalet L. et al (1995) Protein and Peptide Letters 3, 333-340) и в комплексе со связывающимся с GH белком (внеклеточным доменом GHR человека (hGHR)) (Devos, A.M. et al Science 255, 306, 1992-312 (1992)). Эти структуры депонированы в базе данных Protein Data Bank (PDB) и находятся в свободном доступе (коды доступа в PDB: 1HGU

40 и 1HWG, соответственно). Таким образом, на основании опубликованных структур hGH можно выявить остатки, важные для связывания hGH с hGHR. Кроме того, динамические свойства hGH были исследованы с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (Kasimova M.R. et al. J. Mol. Biol. 318, 679-695, (2002)). Сопоставляя данные рентгеноструктурного анализа и ЯМР, можно определить области

45 hGH, которые имеют высокую степень структурированности и хорошо отличимы от областей, которые менее структурированы и динамичны (Фиг.2). Менее структурированные и динамичные области hGH, как ожидается, особенно чувствительны к протеолитическому расщеплению, и должная стабилизация таких областей привела

бы к повышению стабильности к протеолизу.

Пытаясь получить аналоги hGH с требуемыми химическими или биологическими свойствами, hGH подвергали многочисленным экспериментам по мутагенезу. В частности, описаны мутации по цистеинам с различными целями.

5 В US 2003/0162949 дано раскрытие вариантов членов семейства супергенов GH, различающихся по остаткам цистеина. Предложен общий способ создания сайт-специфичных, биологически активных конъюгатов этих белков. Способ включает добавление цистеиновых остатков в несущественные области белков или замену цистеиновыми остатками несущественных аминокислот в белках с применением сайт-направленного мутагенеза, а затем - ковалентную сшивку цистеин-реактивного полимера или другого типа цистеин-реактивного остатка с белками через добавленный остаток цистеина.

15 В WO 02/055532 описаны созданные генно-инженерными методами мутантные формы hGH, содержащие по меньшей мере один не полипептидный фрагмент, присоединенный ковалентно, в частности, мутантные формы hGH, в которых введенный остаток цистеина применяли для пегилирования.

В US 5951972 описываются физиологически активные производные природных и рекомбинантных белков и полипептидов млекопитающих и человека, в которых по меньшей мере один имеющий природное происхождение или внесенный остаток цистеина в составе белка служит для образования производных с различными заместителями.

20 Протеолитическое расщепление hGH подробно исследовано. Длинная петля, состоящая из остатков 128-154, содержит предполагаемые сайты расщепления для нескольких протеаз, таких как тромбин, плазмин, коллагеназа, субтилизин и химотрипсино-подобные сериновые протеазы. Соответственно, было показано, что эта часть hGH особенно чувствительна к протеолитическому расщеплению (Lewis, U.J. Ann. Rev. Physiol. 46, 33-42, (1984)). Ферменты, которые, согласно сообщениям, способны осуществлять деградацию hGH, включают тромбин, плазмин, субтилизин, химотрипсино-подобные сериновые протеазы и калликреины.

25 Деградация hGH была исследована в ткани крыс (Garcia-Barros et al. J. Endocrinol. Invest. 23, 748-754, (2000)).

Было обнаружено, что в щитовидной железе крыс химотрипсино-подобные протеазы, проводящие расщепление предпочтительно по объемным и липофильным аминокислотным остаткам, сначала расщепляют пептидную связь между Y143 и S144, в результате чего образуются молекула из двух цепей, а затем, благодаря расщеплению связи между Y42 и S43, происходит высвобождение N-концевого пептида F1-Y42. 35 Расщепленная петля в молекуле из двух цепей подвергается дальнейшему расщеплению между F146 и D147 химотрипсино-подобными протеазами и затем - подвергается действию карбоксипептидаз.

Сообщалось о нескольких способах получения аналогов hGH, стабилизированных в отношении протеолитической деградации.

40 Авторы публикации Alam et al., J. Biotech. 65, 183-190 (1998)) сконструировали мутантные формы hGH, устойчивые к тромбину и плазмину с помощью специфических точечных мутаций. Тромбин специфически расщепляет hGH между R134 и T135, и несущие две мутации, R134D, T135P, формы давали вариант hGH, устойчивый к расщеплению тромбином, а несущие три мутации, R134D, T135P, K140A, формы приводили к устойчивости к плазмину. Кроме того, последняя мутантная форма hGH была устойчива к протеолизу ферментами плазмы человека в течение периода 7 дней.

В EP 534568 описываются мутантные формы hGH, стабилизированные в отношении

протеолитической деградации с помощью внесения мутаций с заменой R134 на аланин, лейцин, треонин, фенилаланин, пролин или гистидин.

В WO 2004/022593/Nautilus описываются общие способы крупномасштабной направленной эволюции для получения модифицированных цитокинов, включая варианты GH, с повышенной протеолитической стабильностью.

В WO 2006/048777/Nautilus, в частности, описаны модифицированные аналоги hGH с улучшенной протеолитической стабильностью. Аналоги содержат от одной до пяти мутаций в положениях 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 и 187-191. Внесение цистеиновых остатков

потенциально может привести к образованию нежелательных сшитых дисульфидными связями димеров, и в WO 2006/048777 замена аминокислотных остатков на цистеин специально исключена из объема изобретения; в WO 2006/048777 (p.65) указано:

«Замещение аминокислот цистеиновыми остатками однозначно исключается, так как это изменение потенциально могло бы привести к образованию межмолекулярных дисульфидных связей».

Имеется очевидная необходимость в разработке соединений hGH, которые устойчивы к протеолитической деградации. Такие стабилизированные соединения должны демонстрировать повышенную стабильность в отношении протеолитического расщепления, сохраняя при этом требуемые биологические свойства hGH. Подобные молекулы GH имели бы повышенную стабильность, замедленный клиренс и/или увеличенный период полувыведения *in vivo*.

Кроме того, хорошо известно, что они изменяют свойства и характеристики пептидов при конъюгации групп с пептидом. в результате чего необходимым образом изменяются свойства пептида. Такая конъюгация в общем случае требует наличия определенных функциональных групп в пептиде для прохождения реакции с другой функциональной группой в конъюгирующей группе. В типичном случае аминокислоты, такие как N-концевая аминокислота или ε-аминокислота лизина, применяли в сочетании с пригодным ацилирующим реагентом. В соответствии с другим вариантом, к белкам можно присоединять полиэтиленгликоль (ПЭГ) или его производные. См. обзор в публикации *Exp. Opin. Ther. Patent.* 14, 859-894, (2004). Показано, что присоединение ПЭГ к гормону роста может оказывать положительное влияние на период полувыведения гормона роста из плазмы, см. WO 03/044056.

Ранее описано применение карбоксипептидаз для модификации C-концевых пептидов. В WO 92/05271 раскрывается применение карбоксипептидаз и нуклеофильных соединений для амидирования C-концевой карбоксильной группы, и в WO 98/38285 описываются варианты карбоксипептидазы Y, пригодные, в частности, для этой цели.

В EP 243 929 раскрывается применение карбоксипептидазы для внедрения полипептидов, репортерных групп или цитотоксических агентов в C-концевую часть белков или полипептидов.

В WO 2005/035553 описаны способы селективной конъюгации пептидов с помощью ферментативного внедрения функциональной группы на C-конец пептида.

Активированные галогенопроизводные и имиды малеиновой кислоты являются некоторыми из функциональных групп, наиболее часто применяемых при присоединении конъюгатов к сульфгидрильным группам в составе пептидов (G.T. Hermanson in *Bioconjugate Techniques* 2. Ed. 2008, Elsevier).

Ранее для изменения свойств пептидов применяли трансклутаминазу. В пищевой промышленности и, в частности, в молочной промышленности доступны многие способы, например, для поперечной сшивки пептидов с применением трансклутаминаз.

В других документах раскрыто применение транsgлутаминазы для изменения свойств физиологически активных пептидов. В EP 950665, EP 785276 и публикации Sato, Adv. Drug Delivery Rev. 54, 487-504, (2002) раскрыта прямая реакция между пептидами, содержащими по меньшей мере один остаток Gln, и ПЭГ с добавленной функциональной аминogруппой или схожими лигандами в присутствии транsgлутаминазы, а в публикации Wada, Biotech. Lett. 23, 1367-1372, (2001) раскрывается прямое конъюгирование β-лактоглобулина с жирными кислотами с помощью транsgлутаминазы. В международной заявке на патент, опубликованной под номером WO 2005/070468, раскрывается применение транsgлутаминазы для внедрения «рукоятки», к которой может быть присоединена конъюгирующая группа.

Гормон роста является ключевым гормоном, участвующим в регуляции не только соматического роста, но также в регуляции метаболизма белков, углеводов и липидов. Основной функцией гормона роста является активация роста. Гормон роста человека представляет собой белок из 191 аминокислотного остатка, имеющий последовательность:

FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPT
PSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEG
IQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRI
VQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 1).

Введение гормона роста человека и его близкородственных вариантов применяют для лечения различных заболеваний, связанных с дефицитом гормона роста. Так как гормон роста является полипептидом, его вводят парентерально, т.е., с помощью иглы. Кроме того, для гормона роста характерен относительно короткий период полувыведения, следовательно, необходимы частые введения, что сопровождается болью и неудобством для пациента. Поэтому сохраняется потребность в получении соединений гормона роста с улучшенными фармакологическими свойствами, такими как, например, увеличенный период полувыведения.

Настоящее изобретение направлено на создание новых конъюгатов соединений гормона роста с улучшенными фармакокинетическими и фармакологическими свойствами, а также способов их получения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Биодоступность вводимого подкожно фармацевтического соединения может быть связана со скоростью абсорбции. Способность соединения проникать через плотные контакты подкожных капилляров может быть, в частности, связана с его физическими и химическими свойствами, а также молекулярной массой или гидродинамическим объемом соединения. Белковый конъюгат, такой как пегилированный hGH (ПЭГ-hGH) с ПЭГ, имеющим молекулярную массу 40 кДа, обладает кажущейся молекулярной массой 150-250 кДа. Молекула hGH с ковалентно связанным альбумином обладает молекулярной массой 87 кДа, тогда как молекула hGH с нековалентно связанным альбумином будет часть времени находиться в диссоциированном от альбумина состоянии и, следовательно, иметь молекулярную массу 22 кДа.

Предполагается, что время, в течение которого сохраняется диссоциированное состояние, зависит, по меньшей мере частично, от аффинности альбумин-связывающего фрагмента. Таким образом, скорость абсорбции молекулы hGH с нековалентно связанным альбумином может быть выше, чем у ПЭГ-hGH. Повышенную скорость абсорбции можно достичь при применении альбумин-связывающих фрагментов, обладающих более низкой аффинностью к альбумину.

Кроме того, физические и химические свойства линкера и/или спейсера, обеспечивающих присоединение альбумин-связывающего фрагмента к hGH, будут влиять на функциональные свойства соединений.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что соединения гормона роста (GH) с одиночной мутацией с внесением Cys и/или дополнительным дисульфидным мостиком можно селективно присоединять к альбумин-связывающему радикалу - через гидрофильный спейсер, который разделяет GH и альбумин-связывающий радикал, при этом в типичном случае химический фрагмент обладает показателем $m\text{LogP} < 0$ - или $c\text{LogP} < 0,5$, с получением конъюгатов GH с улучшенными свойствами, такими как высокая активность *in vitro* или, например, увеличенный период полувыведения *in vivo*, или, например, повышенная устойчивость к протеолитической деградации, возможно, в сочетании с более длительным профилем активности *in vivo*. При присоединении альбумин-связывающего радикала через гидрофильный спейсер к одиночной мутации с внесением Cys биологическая активность может сохраняться и может достигаться улучшение одного или нескольких из упомянутых выше свойств. Такие улучшения также достигаются, когда альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер присоединяют к гормону роста, имеющему дополнительный дисульфидный мостик, например, к N-концу, к положению 40 или положению 141 в составе hGH. Соединение гормона роста также может содержать и одиночную мутацию с внесением Cys, и дополнительный дисульфидный мостик, и в таком случае альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер присоединяют к одиночной мутации с внесением Cys.

В широком смысле настоящее изобретение относится к конъюгату гормона роста, который содержит соединение гормона роста (GH), имеющее:

- а) одиночную мутацию с внесением Cys,
 - б) дополнительный дисульфидный мостик или
 - с) одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительный дисульфидный мостик,
- при этом альбумин-связывающий радикал присоединен через гидрофильный спейсер к указанному GH, или относится к его фармацевтически приемлемой соли.

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения стабильные соединения hGH содержат дополнительную дисульфидную связь (или связи). Дисульфидные связи образуются между парами цистеинов, один или оба из которых внесены посредством точечных мутаций в последовательность hGH дикого типа.

В еще одном варианте воплощения настоящего изобретения стабильные соединения hGH содержат дополнительные цистеины. Цистеины вносят посредством точечных мутаций в последовательности hGH дикого типа.

В дополнительном варианте воплощения настоящего изобретения стабильные соединения hGH содержат дополнительную дисульфидную связь (или связи) и один или несколько дополнительных цистеинов. Дополнительная дисульфидная связь (или связи) образуются между парами дополнительных цистеинов, а дополнительные цистеины внесены посредством точечных мутаций в последовательности hGH дикого типа.

Дополнительно, настоящее изобретение основано на наблюдении того, что добавление альбумин-связывающего радикала через гидрофильный спейсер в гормон роста человека (hGH) может быть осуществлено селективно, при этом существенная доля активности сохраняется. Предпочтительно, альбумин-связывающий радикал присоединяют через гидрофильный спейсер к положению(ям), соответствующему внесённому цистеину (или цистеинами) и/или к положению глутамина 40 и/или к положению глутамина 141 и/или к N-концу в составе hGH, имеющего последовательность

SEQ ID NO:1. Применение трансклутаминазы (TGase), и в частности, TGase из *Streptoverticillium mobaraenae* или *Streptomyces lydicus*, позволяет проводить селективное присоединение альбумин-связывающего радикала через гидрофильный спейсер к положению 40 или положению 141, а остальные 11 остатков глутамин остаются незатронутыми, несмотря на тот факт, что глутамин является субстратом трансклутаминазы.

Таким образом, в одном из вариантов воплощения настоящего изобретения соединение гормона роста (GH) сшито с одним альбумин-связывающим радикалом через гидрофильный спейсер. В типичном случае альбумин-связывающий радикал присоединен к N-концу, или к положению 18, 30, 40, 42, 62, 69, 88, 95, 98, 99, 100, 101, 102, 108, 135, 141 или 154 в составе hGH через гидрофильный спейсер. В дополнительных вариантах воплощения два альбумин-связывающих радикала присоединены к месту одиночной мутации с внесением Cys и к любому одному положению из перечисленных выше, например, к N-концу, положению 40 или положению 141 в составе hGH, через гидрофильный спейсер.

Конъюгаты соединений гормона роста по настоящему изобретению обладают более высокой скоростью подкожной абсорбции, по сравнению с пегилированным hGH, и, таким образом, вызывают в меньшей степени или не вызывают липоатрофию.

Дополнительно, альбумин-связывающий радикал и гидрофильный спейсер являются биодеградируемыми, в отличие от ПЭГ.

Еще одной целью настоящего изобретения является разработка способа улучшения свойств GH посредством конъюгации указанного белка в соответствии со способами по настоящему изобретению.

Дополнительные особенности изобретения относятся к выделенным соединениям гормона роста (GH), содержащим одиночную мутацию с внесением Cys, дополнительную дисульфидную связь или к соединениям гормона роста, содержащим одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь. Дополнительной целью изобретения было стремление сделать такие соединения растворимыми.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг.1 показывает пространственную структуру белка гормона роста.

Фиг.2 показывает аминокислотную последовательность белка гормона роста.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем контексте термин «соединение гормона роста» при использовании в этом документе означает гормон роста, принадлежащий млекопитающему, такой как гормон роста человека, коровы или свиньи, и рекомбинантный гормон роста, такой как рекомбинантный гормон роста человека, коровы или свиньи, а также варианты и мутантные формы таких гормонов роста. При использовании в этом документе «GH» и «соединение гормона роста» являются взаимозаменяемыми. В случае, если GH является вариантом гормона роста, принадлежащего млекопитающему, например, hGH и рекомбинантного hGH, понимается, что указанный вариант является соединением, полученным путем замены одного или нескольких аминокислотных остатков в последовательности гормона роста, например hGH, на другую аминокислоту природного или неприродного происхождения; и/или путем добавления одной или нескольких аминокислот природного или неприродного происхождения к последовательности гормона роста, например hGH; и/или путем делеции одного или нескольких аминокислотных остатков из последовательности гормона роста, например hGH, при этом за любыми из этих этапов, возможно, следует дополнительное получение производных одного или нескольких аминокислотных остатков. В типичном случае

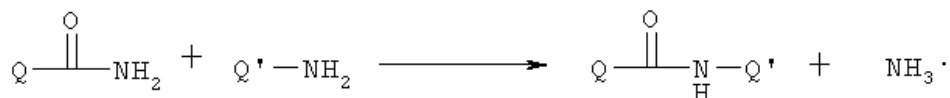
ГН обладает по меньшей мере 80% идентичностью относительно hGH, и, в типичном случае, по меньшей мере 10% активности гормона роста, присущей hGH, согласно определению с помощью способа анализа (I) (пример 46), описанному в этом документе.

В данном контексте термин «альбумин-связывающий радикал» при использовании в этом документе означает радикал, который нековалентно связывается с сывороточным альбумином человека. Альбумин-связывающий радикал, присоединенный к соединению гормона роста (ГН), в типичном случае обладает аффинностью связывания в отношении сывороточного альбумина человека, которая составляет менее чем примерно 10 мкМ, или даже менее чем примерно 1 мкМ. Известен ряд альбумин-связывающих радикалов, принадлежащих к линейным и разветвленным липофильным фрагментам, содержащим 12-40 атомов углерода, соединениям с циклопентанофенантроновым скелетом и/или пептидам, включающим 10-45 аминокислотных остатков, и т.д. Альбумин-связывающие свойства можно измерить с помощью поверхностного плазменного резонанса, как описано в публикации J. Biol. Chem. 277(38), 35035-35042, (2002).

Термин «гидрофильный спейсер» при использовании в этом документе означает спейсер, который разделяет соединение гормона роста и альбумин-связывающий радикал посредством химического фрагмента, который содержит по меньшей мере 5 атомов, отличных от атомов водорода, и при этом 30-50% этих атомов являются либо N, либо O.

Подразумевается, что в данном контексте термин «трансаминирование» и родственные термины обозначают реакцию, при которой происходит реакция обмена между атомом азота амидогруппы боковой цепочки глутамина и атомом азота другого соединения, в частности, атомом азота в составе другого азотсодержащего нуклеофила.

Трансглутаминаза (Е.С.2.3.2.13) известна также как протеин-глутамин-γ-глутамилотрансфераза и катализирует реакцию с общей схемой:



Q-C(O)-NH₂ (аминосодержащий акцептор) может представлять собой пептид или белок, включающий остаток глутамина, и Q'-NH₂ (аминосодержащий донор) представляет собой аminosодержащий нуклеофил. В соответствии с другим вариантом, Q-C(O)-NH₂ и Q'-NH₂ могут представлять собой аminosодержащий акцептор и содержащий лизин пептид или белок, соответственно. В настоящем изобретении, однако, Q-C(O)-NH₂ представляет собой гормон роста, содержащий остаток глутамина, и Q'-NH₂ представляет собой аminosодержащий нуклеофил, как указано выше.

Примеры полезных трансглутаминаз включают трансглутаминазы микробного происхождения, например, такие как трансглутаминазы из *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum* и *Streptomyces griseocarneum* (все раскрыты в US 5156956, содержание которого включено сюда в качестве ссылки), а также из *Streptomyces lavendulae* (раскрыта в US 5252469, содержание которого включено сюда в качестве ссылки) и *Streptomyces ladakanum* (JP 2003/199569, содержание которого включено сюда в качестве ссылки). Следует отметить, что члены выделяемого ранее рода *Streptoverticillium* сейчас включены в род *Streptomyces* (Kaempfer, J. Gen. Microbiol. 137, 1831-1892, (1991)). Другие полезные трансглутаминазы микробного происхождения были выделены из *Bacillus subtilis* (раскрыта в US 5731183, содержание которого включено сюда в качестве ссылки) и из различных представителей миксомицетов. Другими примерами полезных трансглутаминаз микробного происхождения являются

трансглутаминазы, описанные в WO 96/06931 (например трансглутаминаза из *Bacillus lydicus*) и WO 96/22366, содержание которых включено сюда в качестве ссылок. Полезные трансглутаминазы не микробного происхождения включают трансглутаминазу из печени морской свинки и трансглутаминазы из различных морских видов, таких как рыба тай красный, *Pagrus major* (раскрыта в EP - 0555649, содержание которого включено сюда в качестве ссылки) и японская устрица *Crassostrea gigas* (раскрыта в US 5736356, содержание которого включено сюда в качестве ссылки).

Предполагается, что в данном контексте термин «недоступный» указывает на то, что что-то отсутствует или фактически отсутствует в том смысле, что этого невозможно достичь. Когда утверждается, что функциональные группы в белке, который будет конъюгировать, недоступны, подразумевается, что это свидетельствует о том, что указанная функциональная группа отсутствует в белке или, если она присутствует, каким-либо образом защищена от участия в реакциях. Например, указанная функциональная группа может быть погружена глубоко внутрь структуры белка, таким образом, что она экранирована от участия в реакции. Очевидно, что то, является ли функциональная группа доступной или нет, зависит от условий протекания реакции. Можно предположить, что, например, в присутствии денатурирующих агентов или при повышенных температурах белок может разворачиваться и экспонировать функциональные группы, которые в других случаях недоступны. При этом понимается, что «недоступный» означает «недоступный в условиях прохождения реакции, выбранных для конкретной рассматриваемой реакции».

Подразумевается, что термин «алкан» или «алкил» обозначает насыщенный линейный, разветвленный или циклический углеводород. Если не указано другое количество атомов углерода, подразумевается, что термин обозначает углеводороды с количеством атомов углерода от 1 до 30 (включая оба крайние значения), например от 1 до 20 (включая оба крайние значения), например от 1 до 10 (включая оба крайние значения), например от 1 до 5 (включая оба крайние значения). Термины «алкил» и «алкилен» обозначают соответствующие радикалы с одной или двумя свободными валентностями, соответственно.

Термин «C₁₋₆ алкил» обозначает линейный или разветвленный насыщенный углеводород, содержащий от одного до шести атомов углерода включительно. К таким группам относятся, в качестве неограничивающих примеров, метил, 2-пропил, 1-бутил, 2-бутил, 2-метил-2-пропил, 2-метил-1-бутил и н-гексил.

Термин «C₃₋₁₀ циклоалкил» в типичном случае обозначает циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклооктил, циклононил и циклодеканил.

Подразумевается, что термин «алкен» обозначает линейные, разветвленные и/или циклические углеводороды, содержащие по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод. Если не указано другое количество атомов углерода, подразумевается, что термин обозначает углеводороды с количеством атомов углерода от 2 до 30 (включая оба крайние значения), например от 2 до 20 (включая оба крайние значения), например от 2 до 10 (включая оба крайние значения), например от 2 до 5 (включая оба крайние значения). Термины «алкенил» и «алкенилен» обозначают соответствующие радикалы с одной или двумя свободными валентностями, соответственно.

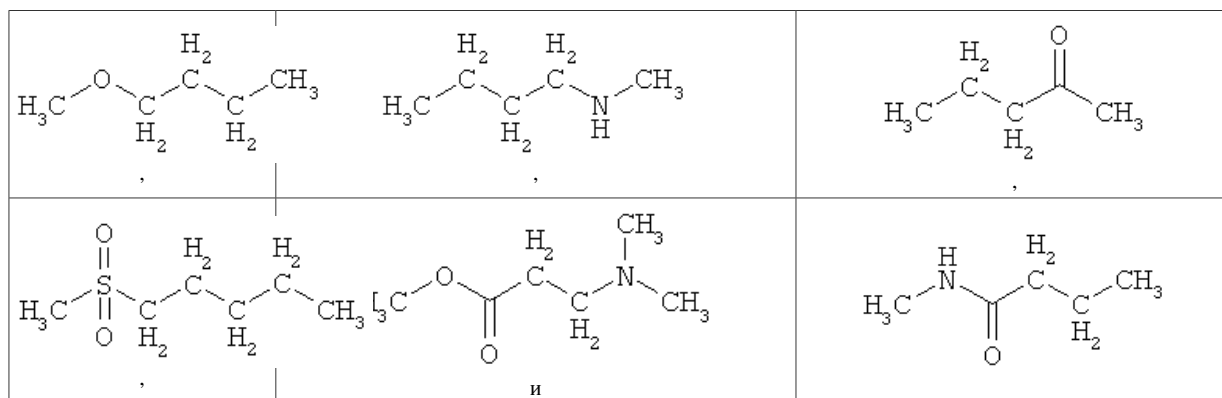
Подразумевается, что термин «алкин» обозначает линейные, разветвленные и/или циклические углеводороды, содержащие по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод, и они, возможно, могут включать одну или несколько двойных связей углерод-углерод. Если не указано другое количество атомов углерода, подразумевается, что термин обозначает углеводороды с количеством атомов углерода от 2 до 30 (включая

оба крайние значения), например от 2 до 20 (включая оба крайние значения), например от 2 до 10 (включая оба крайние значения), например от 2 до 5 (включая оба крайние значения). Термины «алкинил» и «алкинилен» обозначают соответствующие радикалы с одной или двумя свободными валентностями, соответственно.

Подразумевается, что термин «гомоциклическое ароматическое соединение» обозначает ароматические углеводороды, такие как бензол и нафталин.

Подразумевается, что термин «гетероциклическое соединение» обозначает циклическое соединение, содержащее 5, 6 или 7 атомов в кольце, и которых 1, 2, 3 или 4 гетероатома выбраны из N, O и/или S. Примеры включают гетероциклические ароматические соединения, такие как тиофен, фуран, пиран, пиррол, имидазол, пиразол, изотиазол, изооксазол, пиридин, пиазин, пиримидин, пиридазин, а также их частично или полностью гидрогенизированные эквиваленты, такие как пиперидин, пиразолидин, пирролидин, пиrolин, имидазолидин, имидазолин, пиперазин и морфолин.

Подразумевается, что термины «гетероалкан», «гетероалкен» и «гетероалкин» обозначают алканы, алкены и алкины, как указано выше, в которых в структуру указанных фрагментов вставлены один или несколько гетероатомов или групп. Примеры гетерогрупп и гетероатомов включают -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -C(O)- -C(S)- и -N(R*)-, где R* является водородом или C₁-C₆-алкилом. Примеры гетероалканов включают:



Предполагается, что термин «радикал» или «радикал с двумя свободными валентностями» обозначает соединение, у которого были удалены один или два атома водорода, соответственно. Когда это указано особо, радикал также может обозначать фрагмент, образованный формальным удалением более крупной группы атомов, например гидроксила, из соединения.

Предполагается, что термин «галоген» обозначает членов седьмой главной группы периодической таблицы элементов, например F, Cl, Br и I.

В данном контексте предполагается, что термин «арил» обозначает радикал карбоциклического ароматического кольца или радикал системы слитых ароматических колец, где по меньшей мере одно из колец является ароматическим. Типичные арильные группы включают фенил, бифенилил, нафтил и т.п.

Термины «гетероарил» или «гетарил» при использовании в этом документе, сами по себе или в сочетаниях, обозначают радикал ароматического кольца, содержащий в кольце, например, от 5 до 7 атомов, или радикал системы слитых ароматических колец, содержащий в кольцах, например, от 7 до 18 атомов, где по меньшей мере одно кольцо является ароматическим, содержащие один или несколько гетероатомов в качестве атомов колец, выбранные из гетероатомов азота, кислорода или серы, при этом оксиды азота, монооксиды серы и диоксиды серы являются допустимыми заместителями в гетероароматической системе. Примеры включают фуранил, тиенил, тиофенил,

пирролил, имидазолил, пиразолил, триазолил, тетразолил, тиазолил, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил, тиадиазолил, изотиазолил, пиридинил, пиридазинил, пиразинил, пиримидинил, хинолинил, изохинолинил, бензофуранил, бензотиофенил, индолил и индазолили и т.п.

5 Предполагается, что термин «конъюгат» (в качестве существительного) обозначает модифицированный белок, т.е., белок с фрагментом, присоединенным к нему с целью модификации свойств указанного белка. Предполагается, что глагол «конъюгировать» обозначает процесс связывания фрагмента с белком с целью модификации свойств

10 Термин «одиночный Cys» или «свободный цистеин» обозначает остаток цистеина, который не участвует в образовании двойной связи. Таким образом, белок может включать один или несколько одиночных остатков Cys в дополнение к одной или нескольким дополнительным дисульфидным мостикам, при условии что указанные одиночные остатки Cys не приводят к образованию внутреннего дисульфидного мостика

15 (или мостиков).

При использовании в этом документе термин «пролекарство» обозначает биогидролизуемые амиды, биогидролизуемые сложные эфиры, а также включает:

а) соединения, являющиеся пролекарством, в котором активируемая при биогидролизе функциональная активность заключена в соединении по настоящему изобретению, и

20 б) соединения, которые могут быть окислены или восстановлены в биологических условиях по данной функциональной группе с образованием лекарственной субстанции по настоящему изобретению. Примеры таких функциональных групп включают 1,4-дигидропиридин, N-алкилкарбонил-1,4-дигидропиридин, 1,4-циклогексадиен, трет-бутил и т.п.

25 При использовании в этом документе термин «биогидролизуемый сложный эфир» обозначает сложный эфир лекарственной субстанции (например, соединения по изобретению), который а) либо не препятствует проявлению биологической активности исходной субстанции, но придает этой субстанции полезные свойства *in vivo*, такие как длительность действия, регулируемое начало действия и т.п., или б) биологически не

30 активен, но легко превращается *in vivo* в организме субъекта в биологически активный компонент. Полезными являются, например, повышенная растворимость или способность биогидролизуемого сложного эфира при пероральном приеме абсорбироваться из кишечника и превращаться в соединение по настоящему изобретению в плазме. Специалистам в данной области известны многие примеры таких

35 веществ, которые включают, например, сложные эфиры низших алкилов (таких, как C₁-C₄), ацилоксиалкилов, сложные эфиры низших алкоксиацилоксиалкилов, сложные алкоксиацилоксиэфиры, сложные эфиры алкилациламиноалкилов и сложные эфиры холинов.

При использовании в этом документе термин «биогидролизуемый амид» обозначает

40 амид лекарственной субстанции (например, соединения по настоящему изобретению), который либо а) не препятствует проявлению биологической активности исходной субстанции, но придает этой субстанции полезные свойства *in vivo*, такие как длительность действия, начало действия и т.п., либо б) биологически не активен, но легко превращается *in vivo* в организме субъекта в биологически активный

45 компонент. Полезными являются, например, повышенная растворимость или способность биогидролизуемого амида при пероральном приеме абсорбироваться из кишечника и превращаться в соединение по настоящему изобретению в плазме. Специалистам в данной области известны многие примеры таких веществ, которые

включают, например амиды низших алкилов, амиды α-аминокислот, алкоксиациламиды и алкиламиноалкилкарбониламиды.

В данном контексте предполагается, что термин «фармацевтически приемлемая соль» обозначает соли, которые не являются вредными для пациента. Такие соли включают фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли, фармацевтически приемлемые соли металлов, соли аммония и алкилированного аммония. Кислотно-аддитивные соли включают соли неорганических кислот, а также органических кислот. Представительные примеры пригодных неорганических кислот включают хлористоводородную, бромистоводородную, йодистоводородную, фосфорную, серную, азотную кислоты и т.п. Представительные примеры пригодных органических кислот включают муравьиную, уксусную, трихлоруксусную, трифторуксусную, пропионовую, бензойную, коричную, лимонную, фумаровую, гликолевую, молочную, малеиновую, яблочную, малоновую, миндальную, щавелевую, пикриновую, пировиноградную, салициловую, янтарную, метансульфоновую, этансульфоновую, винную, аскорбиновую, памоевую, бисметиленсалициловую, этандисульфоновую, глюконовую, цитраконовую, аспарагиновую, стеариновую, пальмитиновую, ЭДТА, гликолевую, p-аминобензойную, глутаминовую, бензенсульфоновую, p-толуолсульфоновую кислоты и т.п.

Дополнительные примеры фармацевтически приемлемых аддитивных солей неорганических и органических кислот включают фармацевтически приемлемые соли, перечисленные в публикации J. Pharm. Sci. 66, 2, (1977), содержание которой включено сюда в качестве ссылки. Примеры солей металлов включают соли лития, натрия, калия, магния и т.п. Примеры солей аммония и алкилированного аммония включают соли аммония, метиламмония, диметиламмония, триметиламмония, этиламмония, гидроксиэтиламмония, диэтиламмония, бутиламмония, тетраметиламмония и т.п.

«Терапевтически эффективное количество» соединения при использовании в этом документе означает количество, достаточное для того, чтобы вылечить, ослабить или частично прекратить клинические проявления данного заболевания и его осложнений. Количество, достаточное для достижения этой цели, называется «терапевтически эффективным количеством». Эффективные количества для каждой цели будут зависеть от степени тяжести заболевания или травмы, а также от массы тела и общего состояния субъекта. Понятно, что определение соответствующей дозировки может быть достигнуто путем проведения стандартных экспериментальных исследований, путем построения матрицы значений и тестирования различных точек этой матрицы, и все эти способы хорошо известны прошедшим обучение врачам и ветеринарам.

При использовании в этом документе термины «лечение» и «проведение лечения» означают проведение терапии и оказание помощи пациенту с целью борьбы с таким состоянием, как заболевание или нарушение. Предполагается, что термин включает полный спектр способов терапии для данного состояния, от которого страдает пациент, таких как введение активного соединения для ослабления симптомов или осложнений, для замедления прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, для смягчения или избавления от симптомов и осложнений, и/или для вылечивания или избавления от заболевания, нарушения или состояния, а также для профилактики состояния, при этом под профилактикой следует понимать проведение терапии и оказание помощи пациенту с целью борьбы с заболеванием, нарушением или состоянием, которые включают введение активного соединения с целью предотвращения возникновения симптомов или осложнений. Пациент, которому будут проводить лечение, предпочтительно является млекопитающим, в частности, человеком, но сюда также включены животные, такие как собаки, кошки, коровы, овцы и свиньи.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В широком смысле настоящее изобретение относится к стабильному конъюгату гормона роста, который содержит соединение гормона роста (GH), имеющее:

а) одиночную мутацию с внесением Cys,

б) дополнительный дисульфидный мостик или

с) одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительный дисульфидный мостик, при этом альбумин-связывающий радикал присоединен через гидрофильный спейсер к указанному GH, или относится к его фармацевтически приемлемой соли.

В случае, когда присутствует одиночная мутация с внесением Cys, альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер связан с атомом серы в составе Cys. Если присутствует дополнительный дисульфидный мостик (но нет одиночной мутации с внесением Cys), то альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер связан с определенным положением в составе соединения гормона роста, таким как положение 40, положение 141 или N-конец hGH, как описано в этом документе.

Когда два или несколько альбумин-связывающих радикалов связаны с соединением гормона роста через гидрофильный спейсер, то тогда такие альбумин-связывающие радикалы связаны с областью одиночной мутации с внесением Cys, если такая мутация присутствует, или, если присутствует только дополнительный дисульфидный мостик, альбумин-связывающий радикал связан через гидрофильный спейсер с положением в составе соединения гормона роста, как описано в этом документе.

В одном варианте воплощения соединение гормона роста содержит одну одиночную мутацию с внесением Cys.

В другом варианте воплощения соединение гормона роста содержит две одиночные мутации с внесением Cys.

В дополнительном варианте воплощения соединение гормона роста содержит дополнительный дисульфидный мостик.

В еще одном дополнительном варианте воплощения соединение гормона роста содержит одну одиночную мутацию с внесением Cys и один дополнительный дисульфидный мостик.

В дополнительном варианте воплощения GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью относительно аминокислотной последовательности гормона роста человека (hGH) (SEQ ID NO:1). В дополнительных вариантах воплощения GH обладает по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 95% идентичностью относительно hGH, например по меньшей мере 96%, например по меньшей мере 97%, например по меньшей мере 98% или например по меньшей мере 99% идентичностью относительно SEQ ID NO:1. В дополнительных вариантах воплощения указанные значения идентичности относительно hGH сопряжены с по меньшей мере 10%, например по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 60%, например по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH, согласно определению с помощью способа анализа I, описанного в этом документе. Любой вариант воплощения с указанием идентичности последовательности может быть скомбинирован с любым вариантом воплощения с указанием активности, например GH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 60% активности гормона роста, характерной для hGH; GH имеющий по меньшей мере 90% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 40% активности гормона роста, характерной для hGH; GH имеющий по меньшей мере 95% идентичности относительно hGH в сочетании

с по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH и т.д. Как описано в этом документе, GH может быть экспрессирован в виде MetGH, что указывает на то, что последовательность содержит дополнительный N-концевой метионин.

В одном варианте воплощения GH является вариантом гормона роста, где произведена одиночная мутация с внесением Cys. В дополнительных вариантах воплощения GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее от одной до пяти мутаций, в дополнение к одиночной мутации с внесением Cys.

В дополнительном варианте воплощения альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер связан с местом одиночной мутации с внесением Cys. В одном варианте воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена на N-конце, в H1, H2, L2 или H3 в составе GH. В дополнительных вариантах воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена на N-конце, при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: T3C, P5C, S7C или в H1 (соответствует AK9-35), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C или в L1 (соответствует AK36-71), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C или, предпочтительно, любой одной из: Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C или в H2, L2 или H3 (соответствуют AK72-98, AK99-106 и AK107-127), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C и G126C в составе hGH (SEQ ID NO: 1) или в L3 или H4 (соответствуют AK128-154 и AK155-184). В L3 и H4 (128-154 и AK155-184) мутация является такой как одна из следующих мутаций: E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C или в C-конце, при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: E186C G187C G190C.

Если одиночная мутация с внесением Cys присутствует в варианте hGH, эта мутация расположена в положении соответствующих аминокислотных остатков.

В некоторых вариантах воплощения GH одиночная мутация с внесением Cys была произведена в положении, эквивалентном исходному GH, то есть, эквивалентном положению в составе hGH (SEQ ID NO:1), выбранному из группы, состоящей из: 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 и G190, например, из группы, состоящей из: T3, P5, S7, D11, H18, Q29, E30, E33, A34, Y35, E88, Q91, S95, A98, N99, S100, L101, V102, Y103, D107, S108, D112, Q122 и G126, при этом конъюгат GH дополнительно содержит альбумин-связывающий фрагмент на боковой цепочке указанного одиночного остатка цистеина.

В дополнительных вариантах воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в пределах AK93-106 в составе hGH или соответствующих остатков в составе вариантов hGH. В дополнительных указанных вариантах воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в пределах L2, например в пределах AK99-106 или AK99-103 или соответствующих остатков.

Когда одиночная мутация с внесением Cys расположена в конъюгате соединения гормона роста по настоящему изобретению, типичной одиночной мутацией с внесением Cys является E30C. Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является Y42C. Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является S55C. Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является S57C. Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является S62C.

Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является Q69C.
 Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является S95C.
 Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является A98C.
 Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является N99C.
 5 Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является S100C.
 Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является L101
 С.Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является V102C.
 Дополнительной типичной одиночной мутацией с внесением Cys является S108C.

Согласно кристаллической структуре комплекса rhGH/рецептор (PDB: 3NHR), пучок
 10 состоит из четырех основных спиралей: первой спирали (A), остатки 9-34, второй
 спирали (B), остатки 72-92 и остатки 94-100, третьей спирали (C), остатки 106-128, и
 четвертой спирали (D), остатки 155-184 (M.R. Kasimova et. al. J. Mol. Biol. 318, 679-695,
 (2002)). Четыре основные спирали называют кором белка. Остатки, которые не являются
 частью спиральных областей, называют петлевыми остатками, и они могут являться
 15 частью гибких областей, петель, β -поворотов, шпилек и витков. Немного другое
 расположение спиралей получено для hGH в комплексе со связывающимся с ним белком
 (PDB: 1HWG), по сравнению с указанием расположения спиралей, рассмотренным
 выше.

Более того, изобретение относится к конъюгату GH, содержащему по меньшей мере
 20 один внесенный остаток цистеина, при этом данный остаток был внесен в положение,
 эквивалентное положению в спиральной или петлевой области в составе hGH. В
 частности, аминокислотные остатки могут быть внесены в положения, экспонированном
 на поверхности спиральной или петлевой области, у которой более 25% ее боковых
 цепочек экспонируются на поверхности, предпочтительно - более 50% ее боковых
 25 цепочек экспонируются на поверхности, например, в модельной структуре свободного
 hGH или в модельной структуре hGH в комплексе с двумя молекулами его рецептора.
 В предпочтительном варианте воплощения положение в спирали или петле эквивалентно
 положению вне пределов сайта связывания с рецептором в составе hGH. Остатки,
 экспонированные на поверхности, можно идентифицировать с помощью алгоритмов
 30 компьютерной химии. Например, относительную поверхностную доступность можно
 вычислить с помощью компьютерной программы Quanta 2005 от компании Accelrys
 Inc., применяя атомные координаты из находящихся в свободном доступе структур
 (структур с кодами доступа в PDB 1 HGU и 1 HWG) и установки программы по
 умолчанию. Описание принципа, лежащего в основе алгоритма, можно найти в
 35 публикации B. Lee and F.M. Richards, «The Interpretation of Protein Structures: Estimation of
 Static Accessibility» J. Mol. Biol. 55, 379-400, (1971).

В дополнительном варианте воплощения альбумин-связывающий радикал через
 гидрофильный спейсер связан с GH, содержащим дополнительный дисульфидный
 мостик. В типичном случае альбумин-связывающий радикал через гидрофильный
 40 спейсер связан с N-концом, положением 40 или положением 141 в составе hGH.

В дополнительном варианте воплощения GH содержит дополнительные дисульфидные
 связи между петлевым сегментом и спиральным сегментом или внутри петлевого
 сегмента или между петлевыми сегментами или между спиральными сегментами.

В дополнительном варианте воплощения GH содержит дополнительную
 45 дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один цистеин присутствует в петлевом
 сегменте, например, в сегменте, ограниченном аминокислотными остатками 128-154
 (L3).

В дополнительном варианте воплощения GH содержит дополнительную

дисульфидную связь, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет петлевой сегмент со спиральным сегментом.

В дополнительном варианте воплощения GH содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет петлевой сегмент со спиралью В или спиралью 2 (соответствующей АК72-98).

В дополнительном варианте воплощения GH, содержит дополнительную дисульфидную связь, соединяющую спираль 2 (соответствующую АК72-98) с петлей 3 (соответствующей АК128-154).

В дополнительном варианте воплощения GH содержит дополнительную дисульфидную связь между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих 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 и/или V185C/S188C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения GH содержит дополнительную дисульфидную связь между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих 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 и/или V185C/S188C в hGH (SEQ ID NO:1).

В дополнительном варианте воплощения дополнительная дисульфидная связь расположена между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих 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 и/или R94C/D107C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения дополнительная дисульфидная связь расположена между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения дополнительная дисульфидная связь расположена между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих 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 и/или S85C/S144C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения дополнительная дисульфидная связь расположена между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или S85C/S144C в составе SEQ ID NO:1. В типичном случае дополнительная дисульфидная связь расположена между парой Q84C/Y143C.

В дополнительном варианте воплощения альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер связан с GH, содержащим одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительный дисульфидный мостик. В типичном случае альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер связан с местом одиночной мутации с внесением

Cys. В некоторых вариантах воплощения GH содержит дополнительный дисульфидный мостик Q84C/Y143C и одиночную мутацию с внесением Cys L101C, к которой через гидрофильный спейсер присоединен альбумин-связывающий радикал.

В дополнительных воплощениях GH содержит дополнительную дисульфидную связь и одиночную мутацию с внесением Cys, выбранную из любой одной мутации из: 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 и G190C, например, из любой одной мутации из: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C и G126C в составе hGH (SEQ ID NO:1) или соответствующих остатков в составе варианта hGH.

В некоторых вариантах воплощения GH содержит дополнительную дисульфидную связь и одиночную мутацию с внесением Cys, и указанная одиночная мутация с внесением Cys была произведена в положении, эквивалентном исходному GH, то есть, эквивалентном положению в составе hGH (SEQ ID NO:1), выбранному из группы, состоящей из: 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 и G190, предпочтительно - из группы: T3, P5, S7, D11, H18, Q29, E30, E33, A34, Y35, E88, Q91, S95, A98, N99, S100, L101, V102, Y103, D107, S108, D112, Q122 и G126. Конъюгат GH дополнительно содержит альбумин-связывающий фрагмент на боковой цепочке указанного одиночного остатка цистеина.

В дополнительном варианте воплощения GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительные дисульфидные связи между петлевым сегментом и спиральным сегментом или внутри петлевого сегмента или между петлевыми сегментами или между спиральными сегментами.

В дополнительном варианте воплощения GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один цистеин присутствует в петлевом сегменте, например, в сегменте, ограниченном аминокислотными остатками 128-154 (L3).

В дополнительном варианте воплощения GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет петлевой сегмент, например, ограниченный аминокислотными остатками 128-154, со спиральным сегментом, например, со спиралью В или спиралью 2 (соответствующей АК72-98).

В дополнительном варианте воплощения GH, содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь, соединяющую спираль 2 (соответствующую АК72-98) с петлей 3 (соответствующей АК128-154).

В дополнительном варианте воплощения GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих 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/L138C, 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

и/или V185C/S188C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительный дисульфидный мостик между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих 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/L138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C и/или V185C/S188C в составе hGH (SEQ ID NO:1).

В дополнительном варианте воплощения GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительный дисульфидный мостик между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих 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 и/или R94C/D107C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения дополнительная дисульфидная связь расположена между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительный дисульфидный мостик между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих 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 и/или S85C/S144C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или S85C/S144C в составе SEQ ID NO:1.

Растворимость гидрофильного спейсера (B) можно описать с помощью его значения $\log P$. Показатель $\log P$, также называемый коэффициентом распределения, - это логарифм соотношения концентраций соединения в двух фазах двух несмешиваемых растворителей в равновесном состоянии. В типичном случае одним из растворителей является вода, а второй выбран из октан-1-ола, хлороформа, циклогексана, дипеларгоната пропиленгликоля (PGDP). Значения $\log P$, измеренные в различных этих растворителях, отличаются в основном из-за эффектов, связанных с образованием водородных связей. Октанол может быть акцептором и донором при образовании водородных связей, тогда как циклогексан является инертным. Хлороформ может являться донором при образовании водородных связей, а PGDP может быть только акцептором. Значения $\log P$ можно измерить с помощью стандартных способов, известных специалистам в данной области.

В одном из вариантов воплощения изобретения гидрофильный спейсер имеет $\log P$ менее 0, например менее 0,5, во всех растворителях - октан-1-оле, хлороформе, циклогексане и дипеларгоната пропиленгликоле (PGDP).

В дополнительном варианте воплощения гидрофильный спейсер имеет $\log P$ менее -1 во всех растворителях - октан-1-оле, хлороформе, циклогексане и дипеларгоната пропиленгликоле (PGDP).

В соответствии с другим вариантом значение $\log P$ можно вычислить как $m\log P$ и/

или cLogP для альбумин-связывающей части или части, соответствующей гидрофильному спейсеру, применяя опубликованные алгоритмы (Т. Fujita; J. Iwasa and C. Hansch, J. Am. Chem. Soc. 86, 5175-5180, (1964) «A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients», C.A. Lipinski et al. Advanced Drug Delivery Reviews, 23, 3-25, (1997)

5 «Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings» и I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano, Chem. Pharm. Bull. 42, 976-978, (1994) «Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods»).

В одном из вариантов воплощения настоящего изобретения гидрофильный спейсер
10 (В) имеет показатель $m\text{LogP} < 0$.

В дополнительном варианте воплощения соединение гормона роста (GH) соединено с одним альбумин-связывающим радикалом через гидрофильный спейсер (В).

В дополнительном варианте воплощения соединение гормона роста (GH) соединено с альбумин-связывающим радикалом через гидрофильный спейсер (В), присоединенный
15 к свободному цистеину в составе соединения гормона роста (GH).

В другом варианте воплощения соединение гормона роста (GH) соединено с двумя альбумин-связывающими радикалами через один или два гидрофильных спейсера. Таким образом, в одном примере один альбумин-связывающий радикал соединен через один гидрофильный спейсер (В) с местом одиночной мутации с внесением Cys, а второй
20 альбумин-связывающий радикал соединен через один гидрофильный спейсер (В') с глутамином в положении 40 или положении 141; или, в соответствии с другим вариантом, два альбумин-связывающих радикала соединены через один гидрофильный спейсер (В) с местом одиночной мутации с внесением Cys или с глутамином в положении 40, положении 141 или с N-концом. В еще одном варианте воплощения соединение гормона
25 роста (GH) соединено с тремя альбумин-связывающими радикалами через один или несколько гидрофильных спейсеров.

В одном варианте воплощения гидрофильный спейсер содержит по меньшей мере один мотив OEG, радикал 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты, т.е. $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$. В дополнительном варианте воплощения гидрофильный спейсер
30 содержит по меньшей мере два мотива OEG. Ориентация такого мотива (или мотивов) OEG в одном варианте воплощения такова, что $-\text{C}(\text{O})-$ находится ближе к соединению гормона роста, но не связывает соединение гормона роста с линкером альбумин-связывающего фрагмента, а $-\text{NH}-$ находится ближе к альбумин-связывающему радикалу. В дополнительных воплощениях, содержащих два мотива OEG, эти два мотива имеют
35 одинаковую ориентацию или разную ориентацию. В одном варианте воплощения два таких мотива OEG расположены рядом друг с другом, тогда как в соответствии с другими вариантами воплощения такие мотивы OEG разделены одним или несколькими ковалентно соединенными атомами.

В одном варианте воплощения гидрофильный спейсер содержит по меньшей мере
40 один остаток глутаминовой кислоты. Аминокислотный остаток глутаминовой кислоты содержит две карбоксильные группы. Его гамма-карбоксильную группу можно применять для образования амидной связи с эпсилон-аминогруппой лизина или с аминогруппой молекулы OEG, если она присутствует, или с аминогруппой другого остатка Glu, если он присутствует. Альфа-карбоксильную группу можно, в соответствии
45 с другим вариантом, применять для образования схожей амидной связи с эпсилон-аминогруппой лизина или с аминогруппой молекулы OEG, если она присутствует, или с аминогруппой другого остатка Glu, если он присутствует. Аминогруппа Glu может, в свою очередь, образовывать амидную связь с карбоксильной группой альбумин-

связывающего радикала или с карбоксильной группой мотива OEG, если он присутствует, или с гамма-карбоксильной группой или альфа-карбоксильной группой другой Glu, если она присутствует. Соединение аминокислоты одной Glu с гамма-карбоксильной группой второй Glu можно называть мотивом «гамма-Glu».

5 В одном варианте воплощения гидрофильный спейсер содержит по меньшей мере один комбинированный мотив OEG-Glu $(-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OH})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-)$ или по меньшей мере один комбинированный мотив Glu-OEG $(-\text{NH}-\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OH})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-)$ или их сочетания, при этом в такие мотивы Glu-OEG и OEG-Glu могут быть разделены одним или несколькими ковалентно связанными атомами или быть напрямую связаны друг с другом амидной связью между остатками Glu, образующими мотив гамма-Glu.

Дополнительная особенность настоящего изобретения относится к конъюгату гормона роста, при этом конъюгат гормона роста имеет формулу (I):

15 $\text{A}-\text{W}-\text{B}-\text{GH} \quad (\text{I}),$

где

GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее одиночную мутацию с внесением Cys,

В представляет собой гидрофильный спейсер, соединенный с атомом серы в составе Cys, внесенного в результате мутации,

W является химической группой, соединяющей A и B, и

A представляет собой альбумин-связывающий радикал; и относится к его фармацевтически приемлемым солям.

В дополнительном варианте воплощения GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью относительно аминокислотной последовательности гормона роста человека (hGH) (SEQ ID NO:1). В дополнительных вариантах воплощения GH обладает по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 96%, например по меньшей мере 97%, например по меньшей мере 98% или например по меньшей мере 99% идентичностью относительно hGH (SEQ ID NO:1). В дополнительных вариантах воплощения указанные значения идентичности относительно hGH сопряжены с по меньшей мере 10%, например по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 60%, например по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH, согласно определению с помощью способа анализа I, описанного в этом документе. Любой вариант воплощения с указанием идентичности последовательности может быть скомбинирован с любым вариантом воплощения с указанием активности, например GH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 60% активности гормона роста, характерной для hGH; GH имеющий по меньшей мере 90% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 40% активности гормона роста, характерной для hGH; GH имеющий по меньшей мере 95% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH и т.д.

В дополнительных вариантах воплощения конъюгат GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys, которая выбрана из любой одиночной мутации с внесением Cys в N-концевой, H1-, L1-, H2-, L2- или H3-областях в составе GH. В таких дополнительных вариантах воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена на N-конце, при этом мутация является такой как одна из следующих

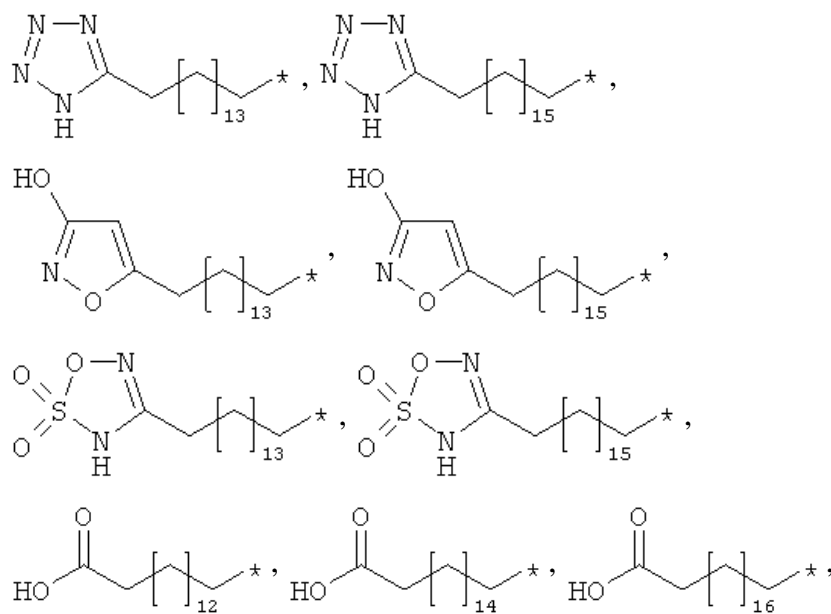
мутаций: T3C, P5C, S7C или в H1 (соответствует АК9-35), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C или в L1 (соответствует АК36-71), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C или, предпочтительно, любой одной из: Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C или в H2, L2 или H3 (соответствуют АК72-98, АК99-106 и АК107-127), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C и G126C в составе hGH (SEQ ID NO:1) или в L3 или H4 (соответствуют АК128-154 и АК155-184). В L3 и H4 (128-154 и АК155-184) мутация является такой как одна из следующих мутаций: E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C или в С-конце, при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: E186C G187C G190.

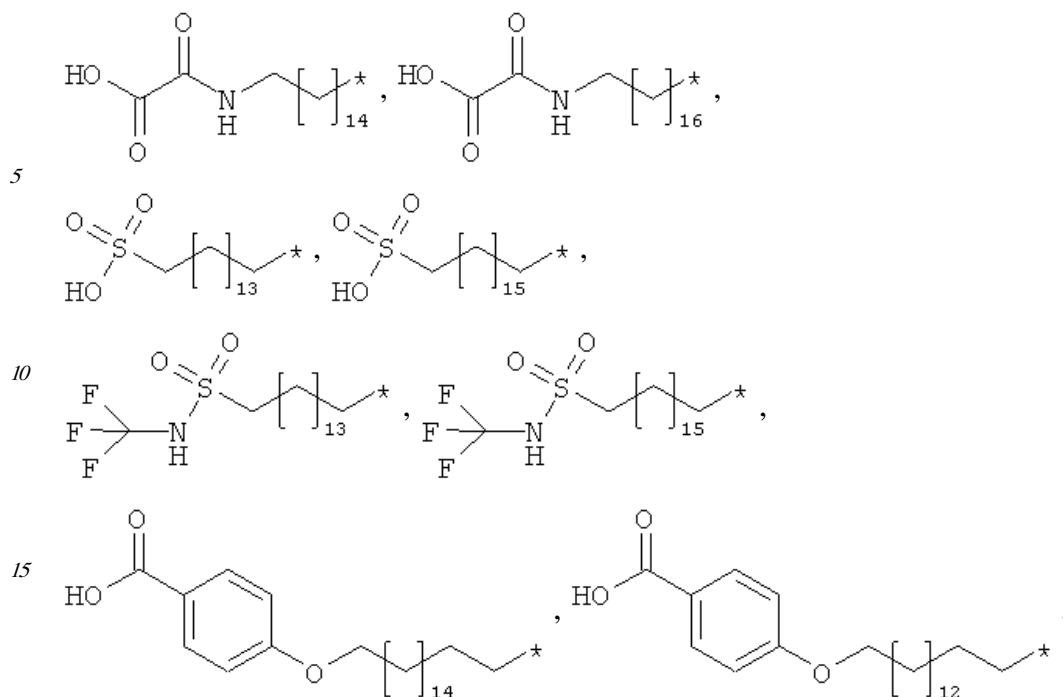
Если одиночная мутация с внесением Cys присутствует в варианте hGH, эта мутация расположена в положении соответствующих аминокислотных остатков.

Дополнительные варианты воплощения включают конъюгаты GH, где одиночная мутация с внесением Cys в составе GH выбрана ил любой одной из следующих мутаций: 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 и G190C, например, из любой одной мутации из: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C и G126C в составе hGH (SEQ ID NO:1).

В других дополнительных вариантах воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в пределах АК93-106 в составе hGH или соответствующих остатков в составе вариантов hGH. В дополнительных указанных вариантах воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в пределах L2, например в пределах АК99-106 или АК99-103 или соответствующих остатков.

В дополнительном варианте воплощения А выбран из:





20 где * обозначает место присоединения к В через W. В дополнительном варианте воплощения W имеет формулу -W₇-Y-, где

Y является -(CH₂)_{I7}-C₃₋₁₀-циклоалкил-W₈- или ковалентной связью,

I7 является 0-6,

25 W₇ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{S3}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s3 является 0 или 1,

30 W₈ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s4}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s4 является 0 или 1.

В дополнительных вариантах воплощения В включает или состоит из одного или нескольких мотивов OEG и/или гамма-Glu, как описано выше.

В дополнительном варианте воплощения В имеет формулу:

-X₁-X₂-X₃-X₄-

35 где

X₁ является -W₁-[(CHR¹)_{I1}-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{I2}-W₃]_{m3}}_{n2}-,

X₂ является -[(CHR³)_{I3}-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n2}E2]_{m5}-[(CHR⁴)_{I4}-W₅]_{m6}}_{n4}-,

40 X₃ является -[(CHR⁵)_{I5}-W₆]_{m7}-,

X₄ является F-D1-(CH₂)_{I6}-D2-,

I1, I2, I3, I4, I5 и I6 независимо выбраны из 0-16,

m1, m3, m4, m6 и m7 независимо выбраны из 0-10,

m2 и m5 независимо выбраны из 0-25,

45 n1, n2, n3 и n4 независимо выбраны из 0-16,

F является арилом, гетероарилом, пирролидин-2,5-дионом или ковалентной связью, при этом арильные и гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH или C₁₋₆-алкилом,

R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-NH-C(=NH)-NH_2$, C_{1-6} -алкила, арила или гетероарила; при этом алкильные, арильные и гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-CN$ или OH ,

$D1, D2, E1$ и $E2$ независимо выбраны из $-O-$, $-N(R^6)-$, $-N(C(O)R^7)-$ или ковалентной связи; при этом R^6 и R^7 независимо представляют собой водород или C_{1-6} -алкил,

W_1-W_5 независимо выбраны из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s2}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или ковалентной связи; где $s2$ является 0 или 1,

W_6 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s1}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)C_{1-6}$ -алкила, $-C(O)NHC_{1-6}$ -алкила или ковалентной связи; где $s1$ является 0 или 1 и C_{1-6} -алкильная группа, возможно, несет замещения оксо-группой, пирролидин-2,5-дионом, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ или $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$; где (*) указывает точку присоединения атома углерода в составе CH к $X4$.

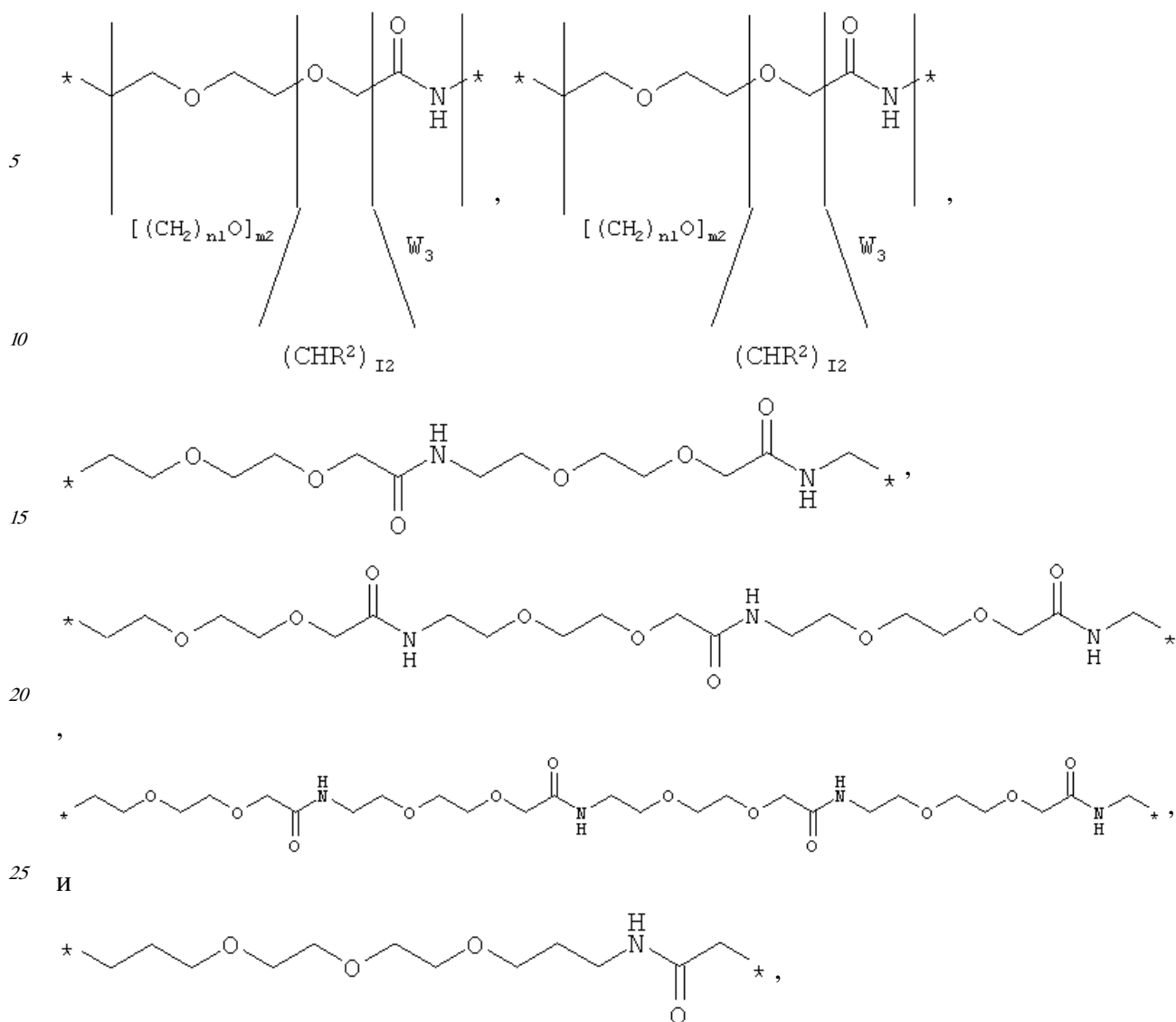
В дополнительном варианте воплощения $I1, I2, I3, I4, I5$ и $I6$ независимо являются 0-6. В дополнительном варианте воплощения $m1, m3, m4, m6$ и $m7$ независимо являются 0-6. В дополнительном варианте воплощения $m2$ и $m5$ независимо являются 0-10. В дополнительном варианте воплощения $n1, n2, n3$ и $n4$ независимо являются 0-10. В дополнительном варианте воплощения $D1$ и $D2$ независимо выбраны из $-O-$ или $-N(R^6)-$ или ковалентной связи.

В дополнительном варианте воплощения $E1$ и $E2$ независимо выбраны из $-O-$ или $-N(R^6)-$ или ковалентной связи.

В дополнительном варианте воплощения W_1-W_8 независимо выбраны из группы, состоящей из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-CO)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-NHC(O)C_{1-6}$ -алкила, $-C(O)NHC_{1-6}$ -алкила или ковалентной связи; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ или $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$; где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к $X4$.

В дополнительном варианте воплощения R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила; при этом C_{1-6} -алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

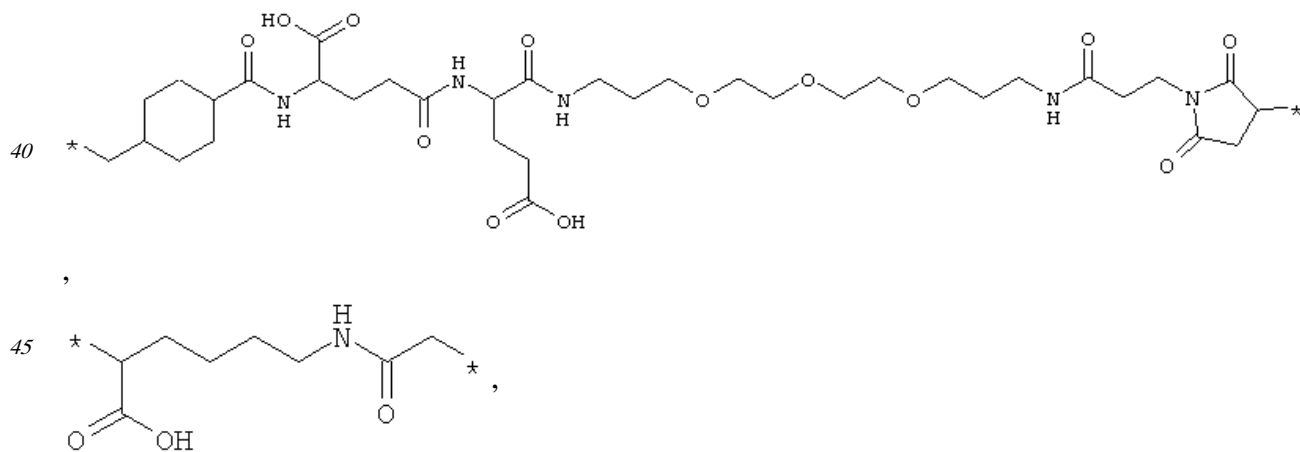
В дополнительном варианте воплощения $-[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$ и $-[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$, где $E1$ и $E2$ являются $-O-$, выбраны из:

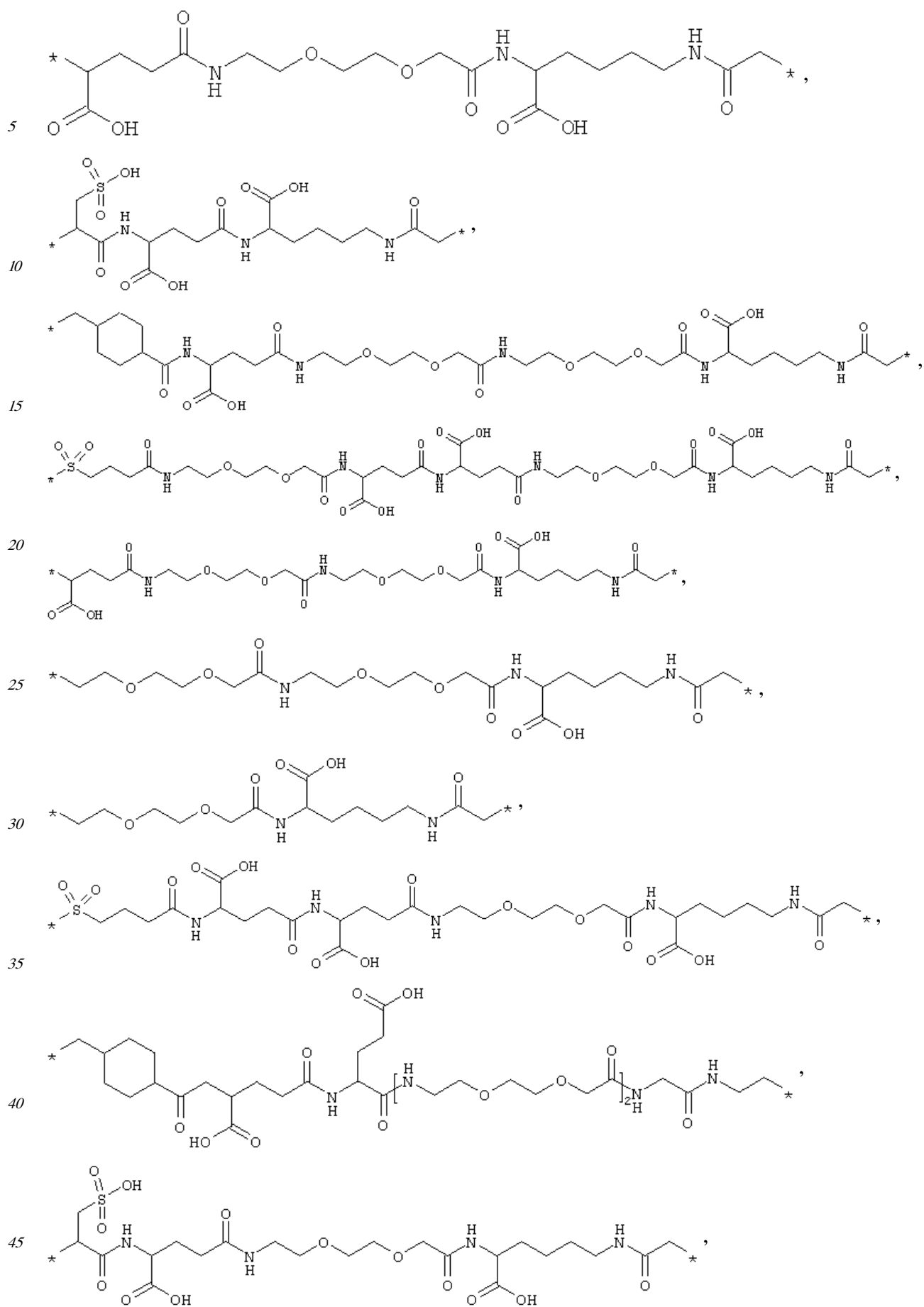


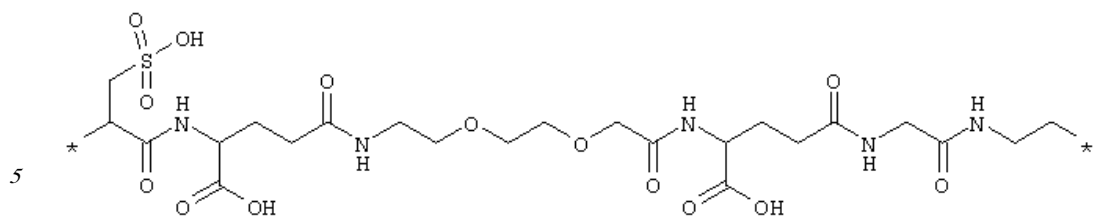
при этом предполагается, что * указывает точку присоединения, т.е., свободную связь.

В дополнительном варианте воплощения X4 является ковалентной связью и W₆ выбран из пирролидин-2,5-диона, -NHC(O)CH*CH₂COOH или NHC(O)CH₂CH*COOH, при этом (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к GH.

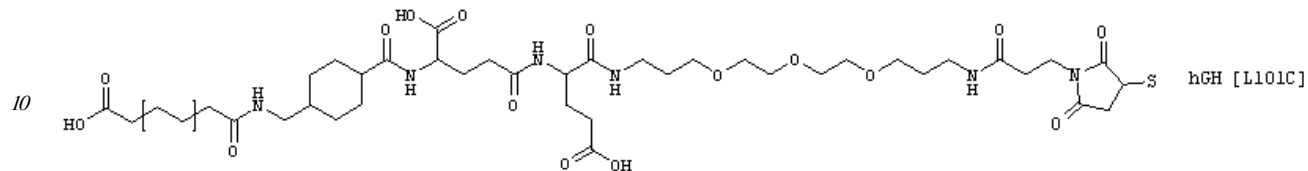
В дополнительном варианте воплощения В выбран из:



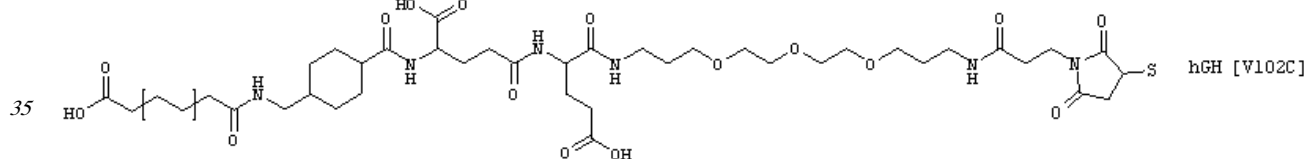
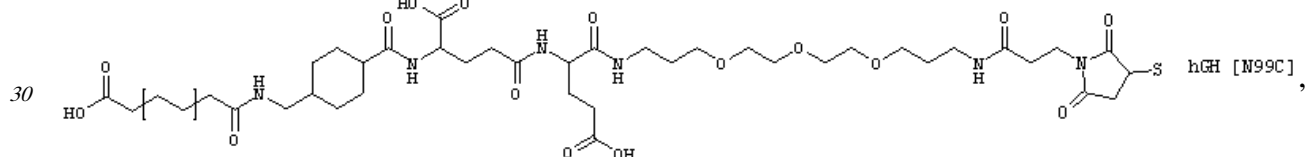
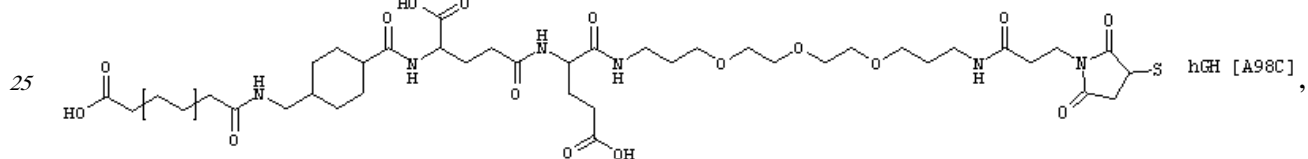
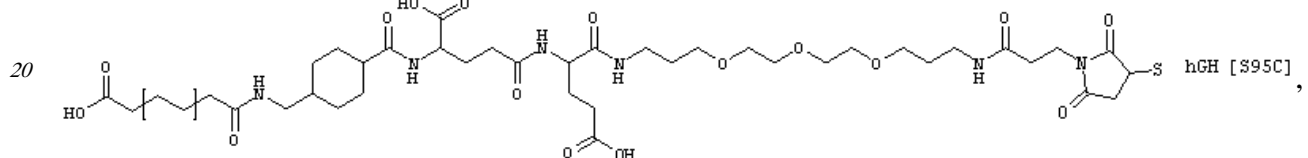
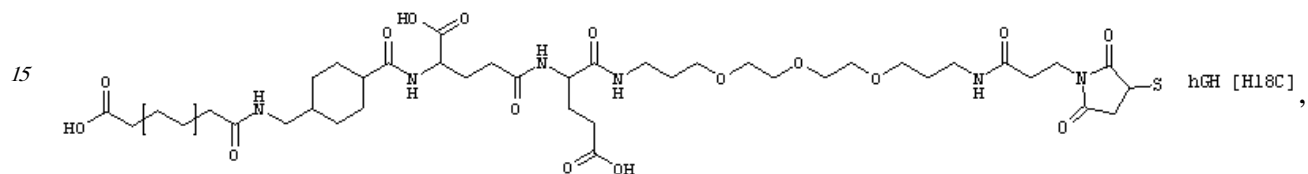




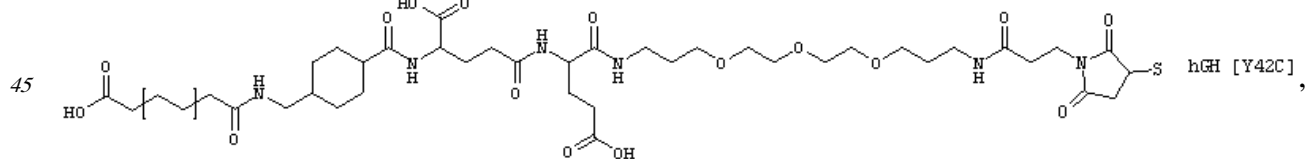
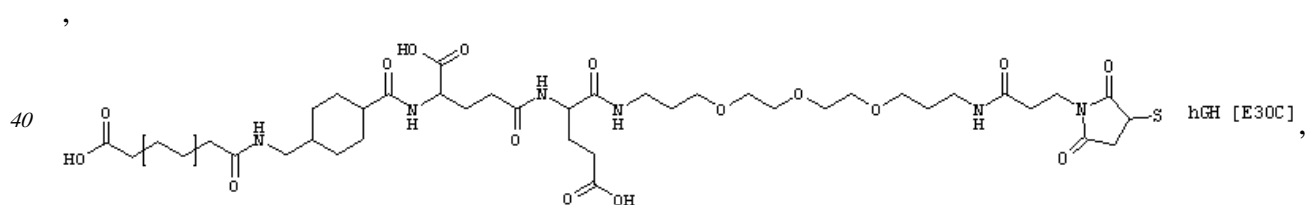
В дополнительном варианте воплощения конъюгат GH выбран из:

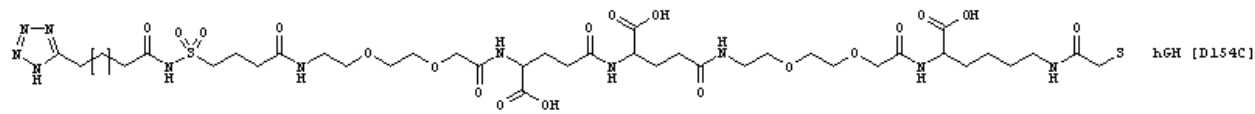
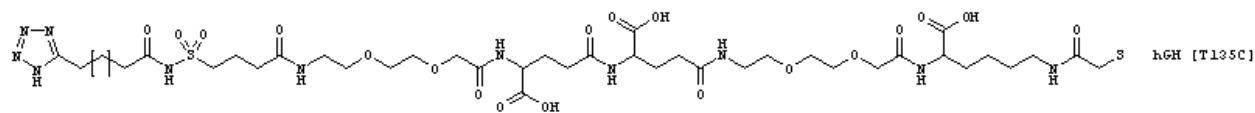
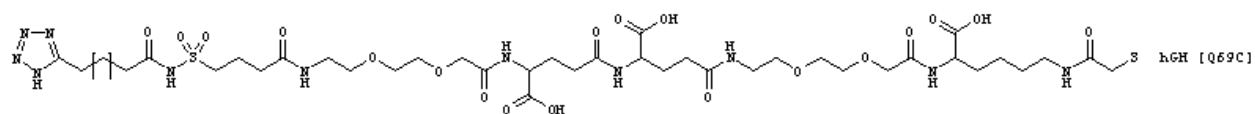
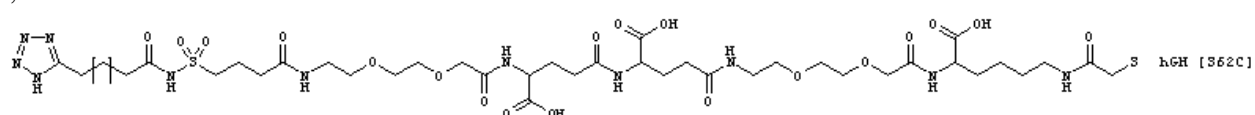
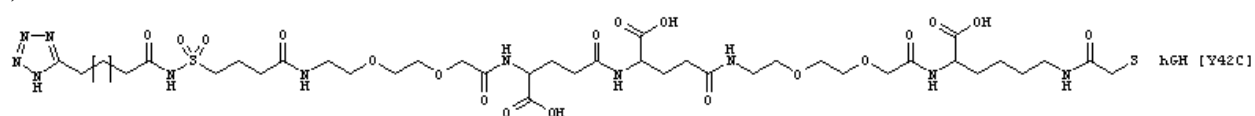
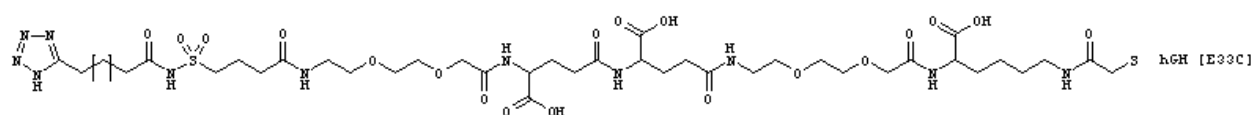
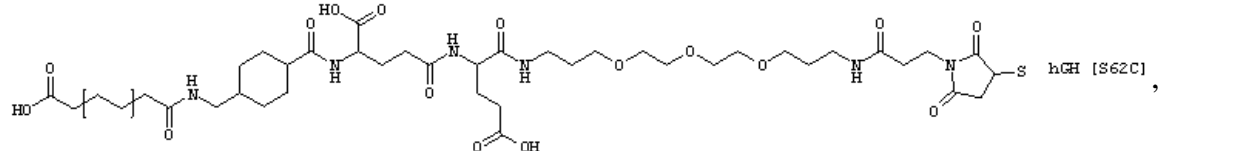
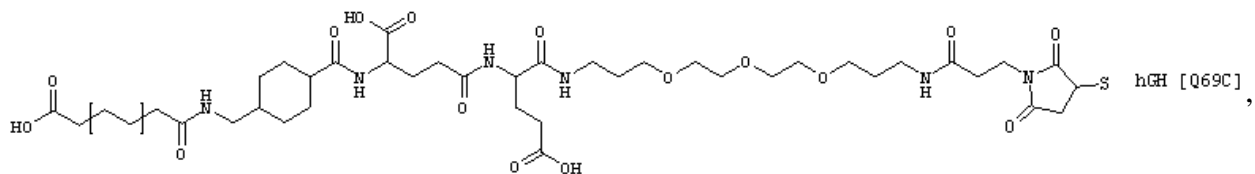
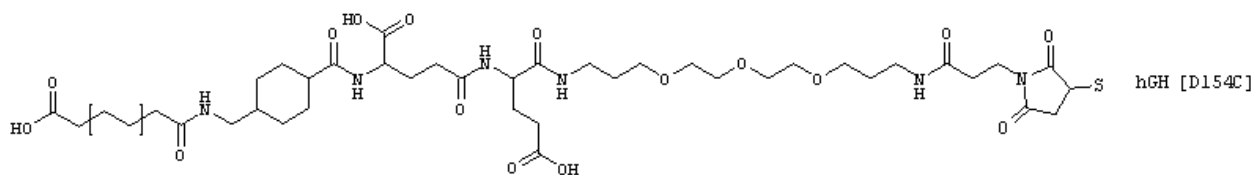
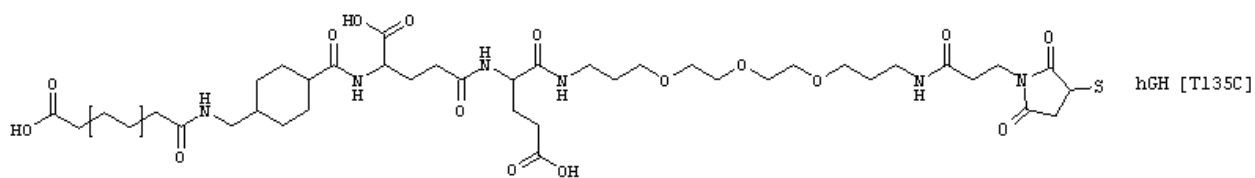


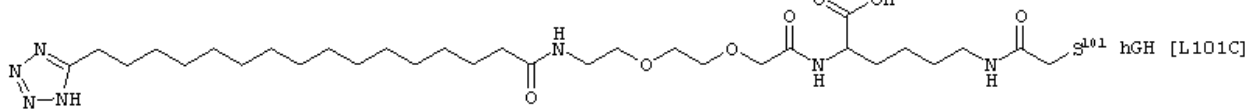
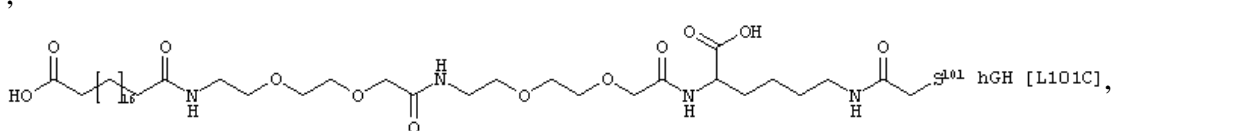
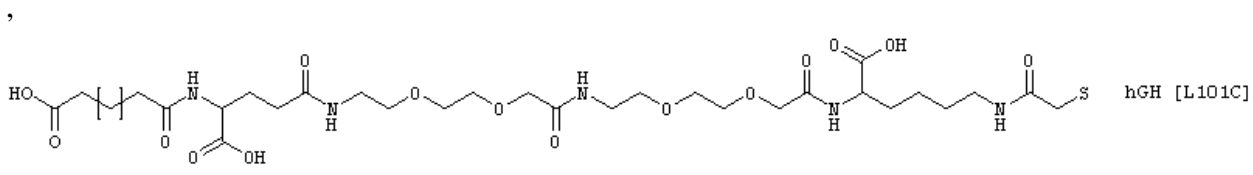
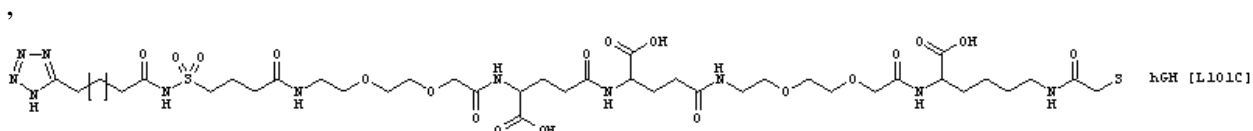
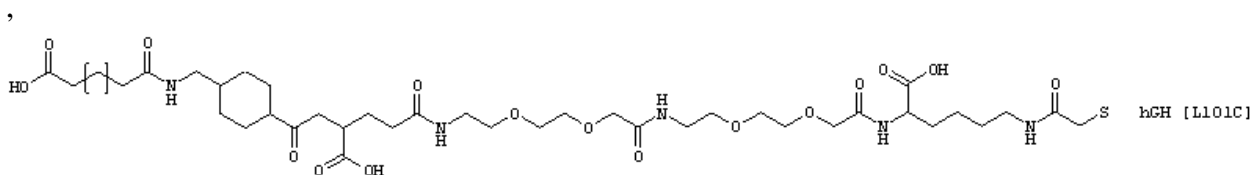
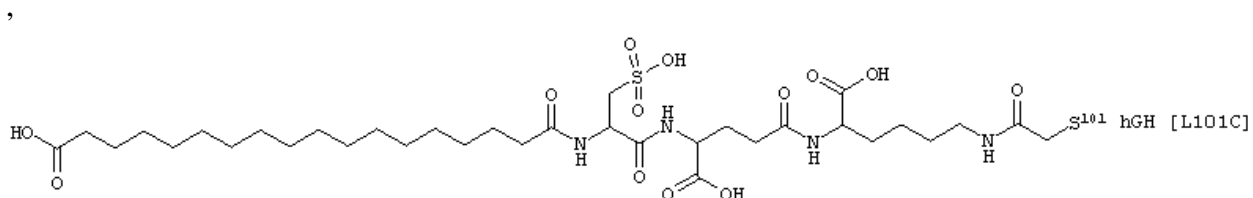
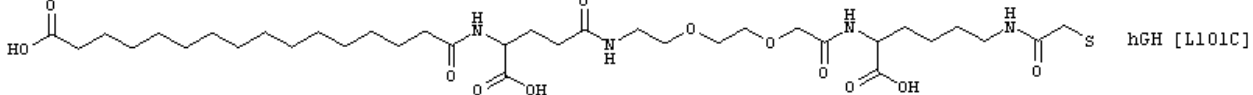
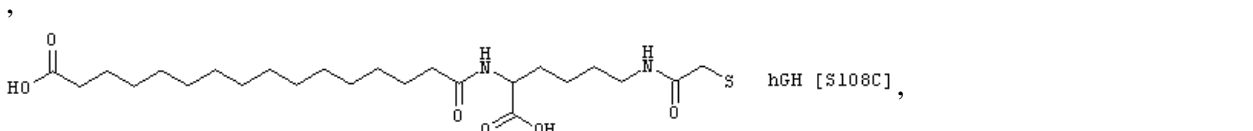
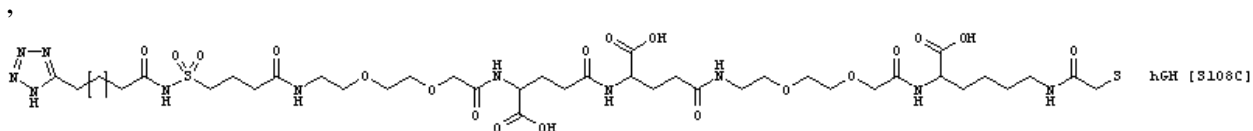
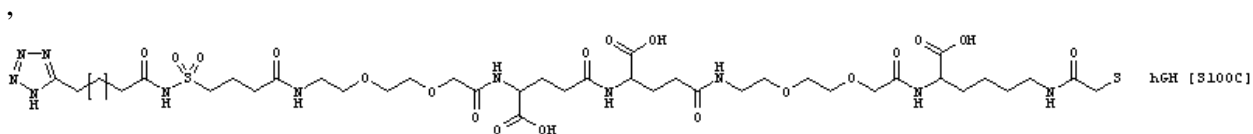
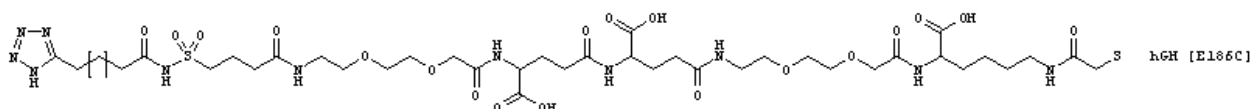
,

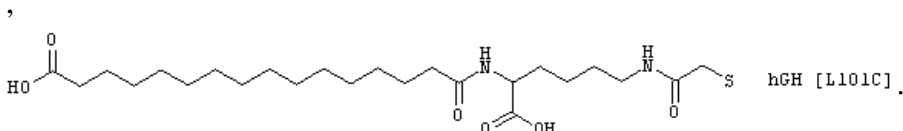
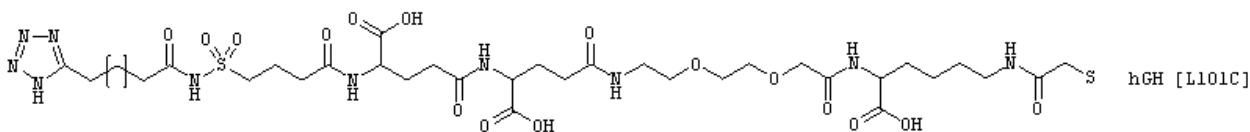
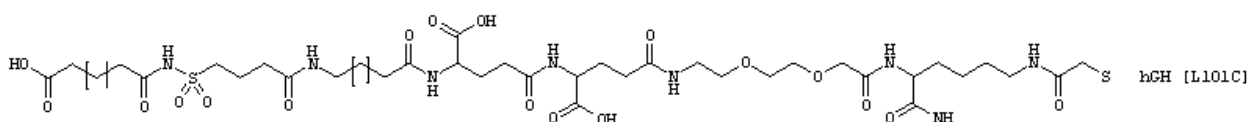


2

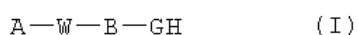








Дополнительная особенность настоящего изобретения относится к конъюгату гормона роста, который имеет формулу (I):



где

GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее дополнительный дисульфидный мостик,

B представляет собой гидрофильный спейсер,

W является химической группой, соединяющей A и B, и

A представляет собой альбумин-связывающий радикал; и относится к его фармацевтически приемлемым солям.

В дополнительном варианте воплощения GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью относительно аминокислотной последовательности гормона роста человека (hGH) (SEQ ID NO:1). В дополнительных вариантах воплощения GH обладает по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 96%, например по меньшей мере 97%, например по меньшей мере 98% или например по меньшей мере 99% идентичностью относительно hGH (SEQ ID NO:1). В дополнительных вариантах воплощения указанные значения идентичности относительно hGH сопряжены с по меньшей мере 10%, например по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 60%, например по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH, согласно определению с помощью способа анализа I, описанного в этом документе. Любой вариант воплощения с указанием идентичности последовательности может быть скомбинирован с любым вариантом воплощения с указанием активности, например GH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 60% активности гормона роста, характерной для hGH; GH имеющий по меньшей мере 90% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 40% активности гормона роста, характерной для hGH; GH имеющий по меньшей мере 95% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH и т.д.

В дополнительном варианте воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит дополнительные дисульфидные связи между петлевым сегментом и спиральным сегментом или внутри петлевого сегмента или между петлевыми сегментами или между спиральными сегментами.

В дополнительном варианте воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит

дополнительную дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один цистеин присутствует в петлевом сегменте, например, в сегменте, ограниченном аминокислотными остатками 128-154.

В дополнительном варианте воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит 5 одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет петлевой сегмент, например, ограниченный аминокислотными остатками 128-154 (H3), со спиральным сегментом, например, со спиралью В или спиралью 2 (соответствующей АК72-98).

В дополнительном варианте воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит 10 дополнительную дисульфидную связь, соединяющую спираль 2 (соответствующую АК72-98) с петлей 3 (соответствующей АК128-154).

В дополнительном варианте воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит дополнительную дисульфидную связь между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, 15 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/L138C, 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 и/или V185C/S188C в 20 составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения дополнительный дисульфидный мостик расположен между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H18C/Y143C, H21C/M170C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/S144C, F54C/F146C, I58C/Q141C, I58C/S144C, P59C/Q137C, P61C/E66C, 25 P61C/T67C, S71C/S132C, L73C/S132C, L73C/F139C, R77C/L138C, R77C/F139C, L81C/Q141C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C и/или V185C/S188C в hGH (SEQ ID NO:1).

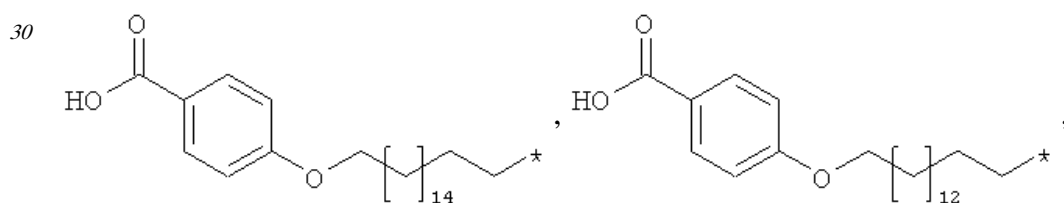
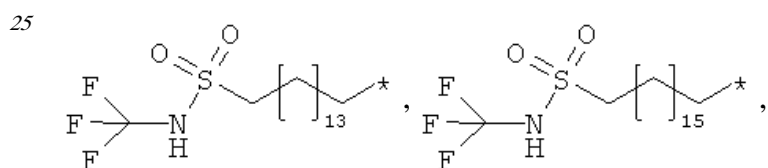
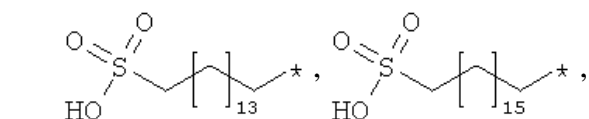
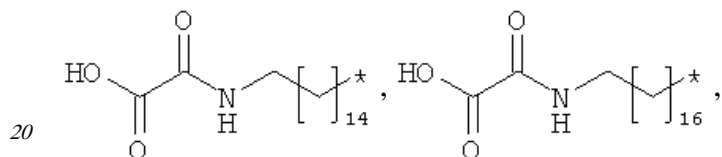
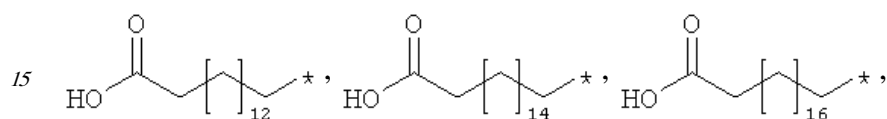
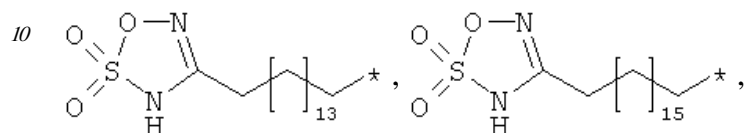
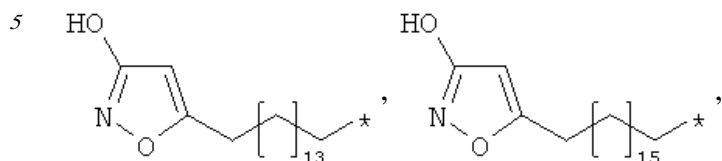
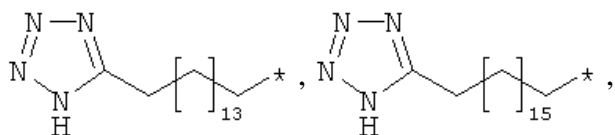
В дополнительном варианте воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит 30 дополнительную дисульфидную связь между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения дополнительная дисульфидная связь расположена между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит 40 дополнительную дисульфидную связь между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих 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 и/или S85C/S144C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит 45 дополнительную дисульфидную связь между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или S85C/S144C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения А выбран из:



где * указывает место присоединения к В через W. В дополнительном варианте воплощения W имеет формулу -W₇-Y-, где

Y является -(CH₂)_{I7}-C₃₋₁₀-циклоалкил-W₈- или ковалентной связью,

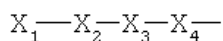
I7 является 0-6,

W₇ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{S3}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s3 является 0 или 1,

W₈ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s4}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s4 является 0 или 1.

В дополнительных вариантах воплощения В включает или состоит из одного или нескольких мотивов OEG и/или гамма-Glu, как описано выше.

В дополнительном варианте воплощения В имеет формулу:



где

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

X_2 является $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n2}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

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

X_4 является $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$,

$I1, I2, I3, I4, I5$ и $I6$ независимо выбраны из 0-16,

$m1, m3, m4, m6$ и $m7$ независимо выбраны из 0-10,

$m2$ и $m5$ независимо выбраны из 0-25,

$n1, n2, n3$ и $n4$ независимо выбраны из 0-16,

F является арилом, гетероарилом, пирролидин-2,5-дионом или ковалентной связью, при этом арильные и гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, $-CN$, $-OH$, $-C(O)OH$,

$-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкилом,

R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$,

$-S(O)_2OH$, $-NH-C(=NH)-NH_2$, C_{1-6} -алкила, арила или гетероарила; при этом алкильные, арильные и гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-CN$ или OH ,

$D1, D2, E1$ и $E2$ независимо выбраны из $-O-$, $-N(R^6)-$, $-N(C(O)R^7)-$ или ковалентной связи; при этом R^6 и R^7 независимо представляют собой водород или C_{1-6} -алкил,

W_1-W_5 независимо выбраны из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s2}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или ковалентной связи; где $s2$

является 0 или 1,

W_6 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s1}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)C_{1-6}$ -алкила, $-C(O)NHC_{1-6}$ -алкила или

ковалентной связи; где $s1$ является 0 или 1 и C_{1-6} -алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ или $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$;

при этом (*) указывает точку присоединения атома углерода в составе CH к X_4 .

В дополнительном варианте воплощения $I1, I2, I3, I4, I5$ и $I6$ независимо являются 0-6. В дополнительном варианте воплощения $m1, m3, m4, m6$ и $m7$ независимо являются 0-6. В дополнительном варианте воплощения $m2$ и $m5$ независимо являются 0-10. В дополнительном варианте воплощения $n1, n2, n3$ и $n4$ независимо являются 0-10. В дополнительном варианте воплощения $D1$ и $D2$ независимо выбраны из $-O-$ или $-N(R^6)-$ или ковалентной связи.

В дополнительном варианте воплощения $E1$ и $E2$ независимо выбраны из $-O-$ или $-N(R^6)-$ или ковалентной связи.

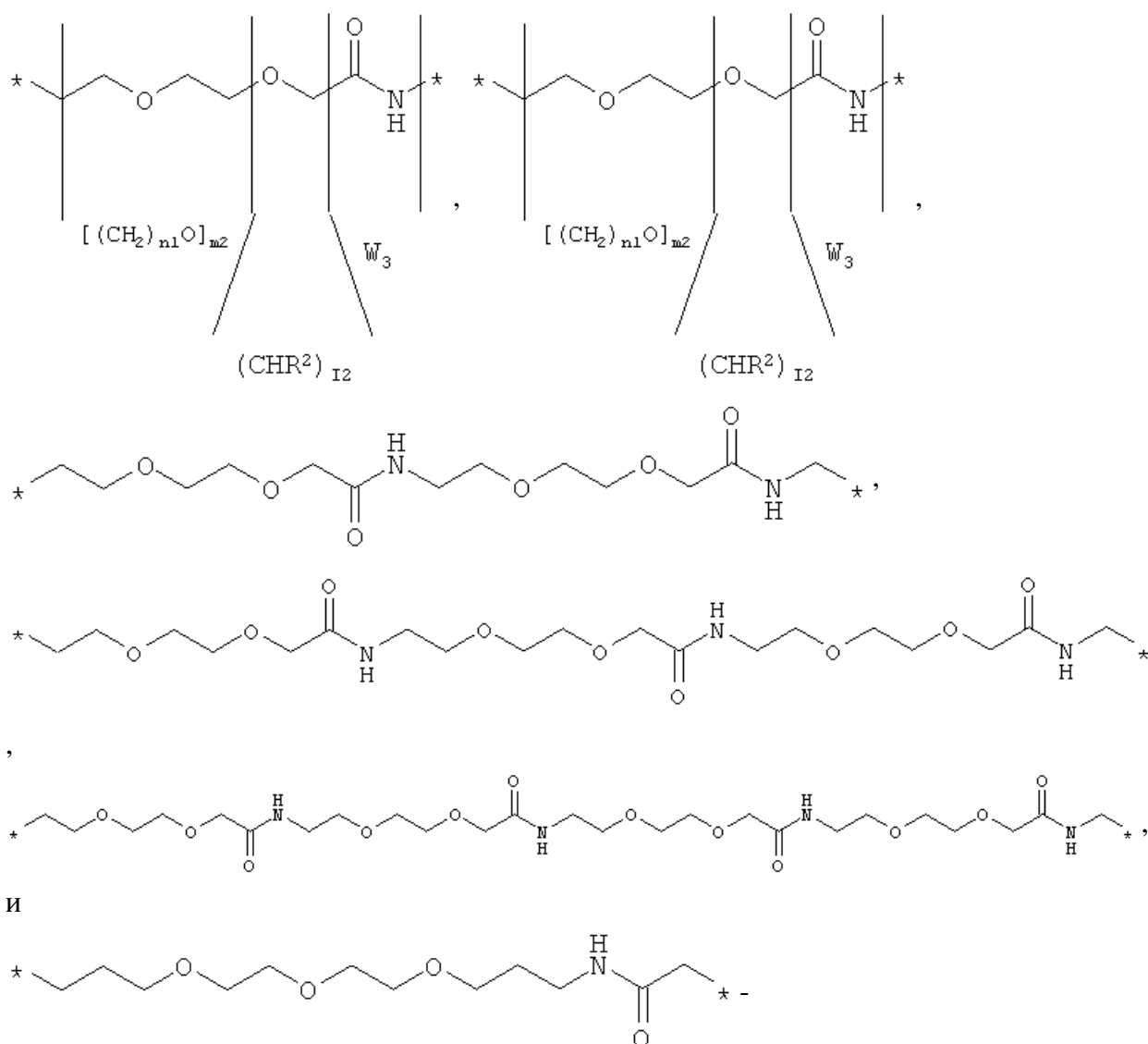
В дополнительном варианте воплощения W_1-W_8 независимо выбраны из группы,

состоящей из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-NHC(O)C_{1-6}$ -алкила, $-C(O)NHC_{1-6}$ -алкила или ковалентной связи; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ или

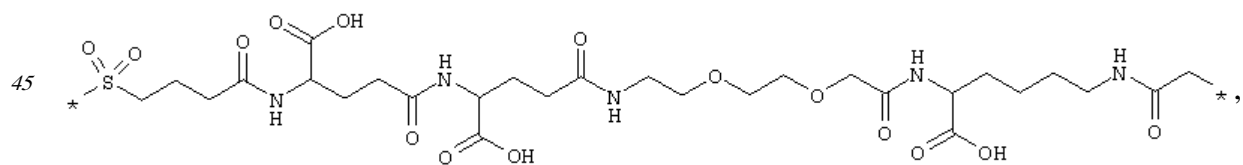
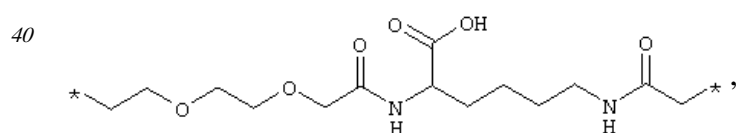
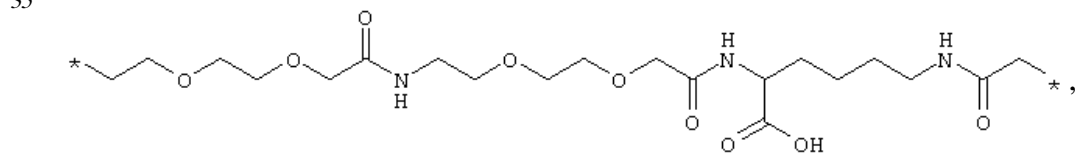
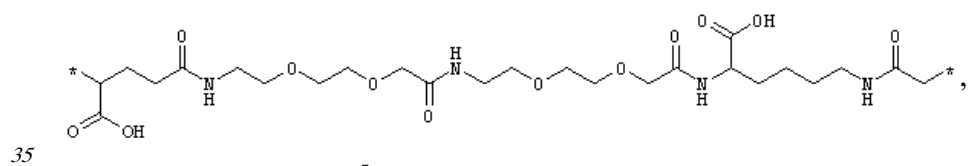
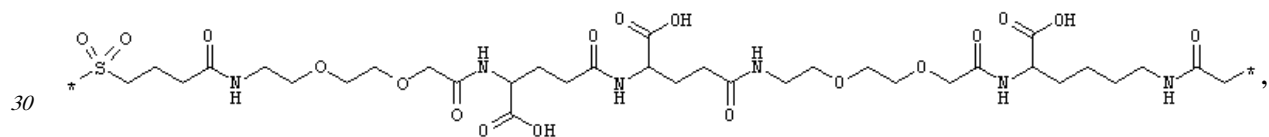
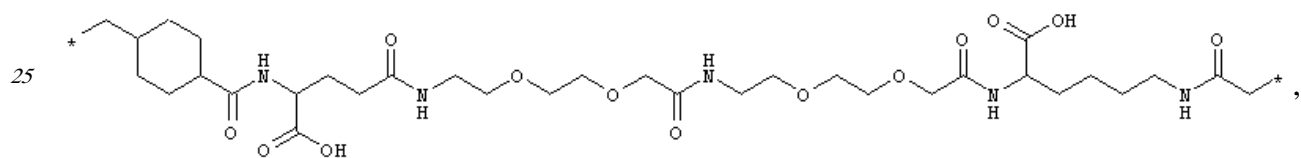
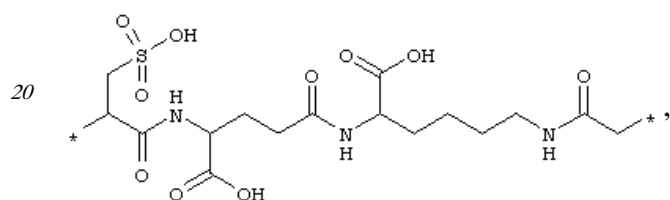
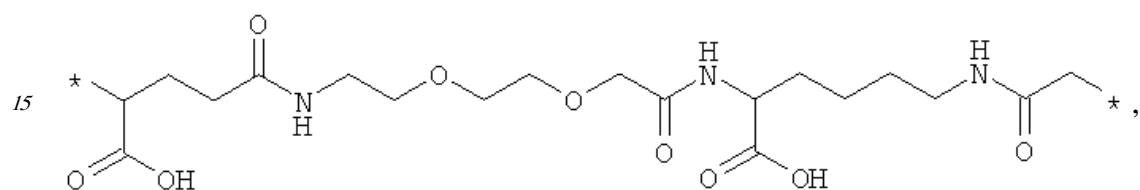
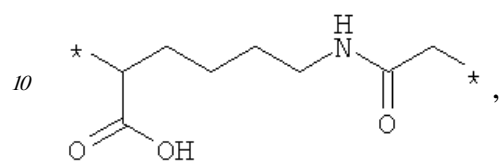
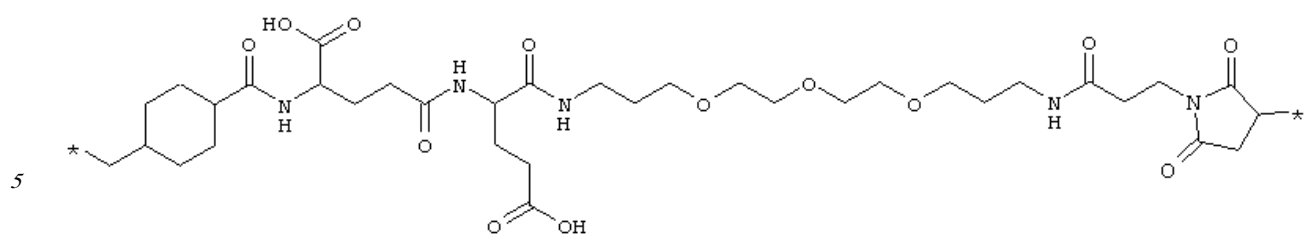
$-NHC(O)CH_2CH^*COOH$; где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к X_4 .

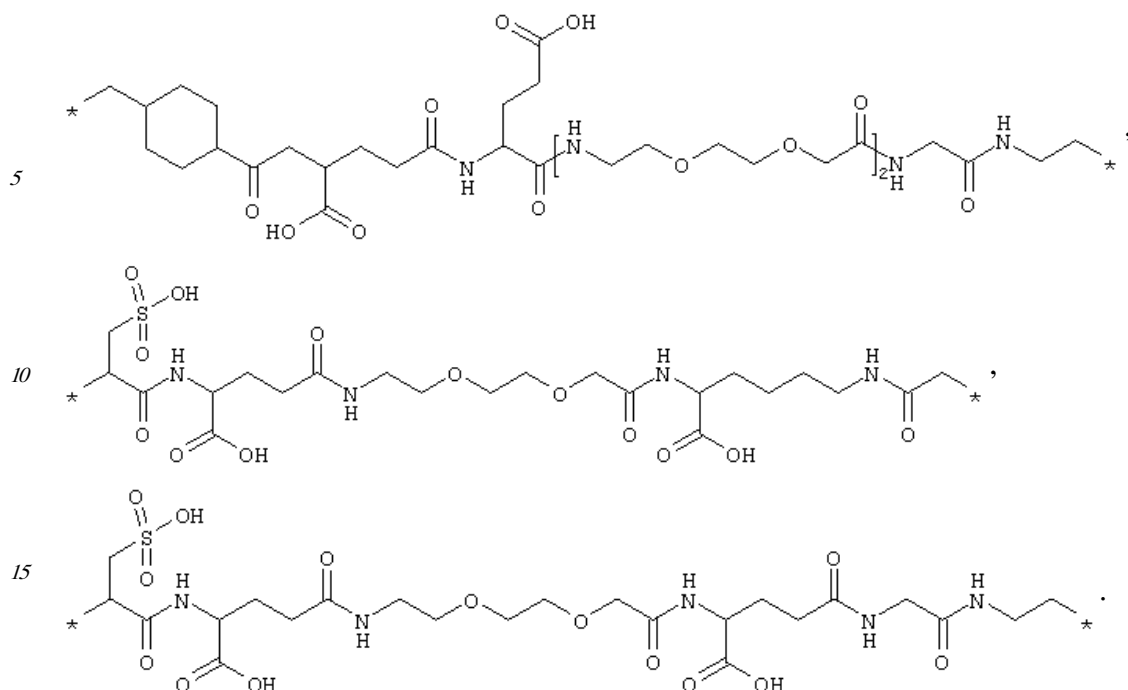
В дополнительном варианте воплощения R^1 , R^2 , R^3 , R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила; при этом C_{1-6} -алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

В дополнительном варианте воплощения $-[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}n2-$ и $-[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}n4-$, где $E1$ и $E2$ являются $-O-$, выбраны из:



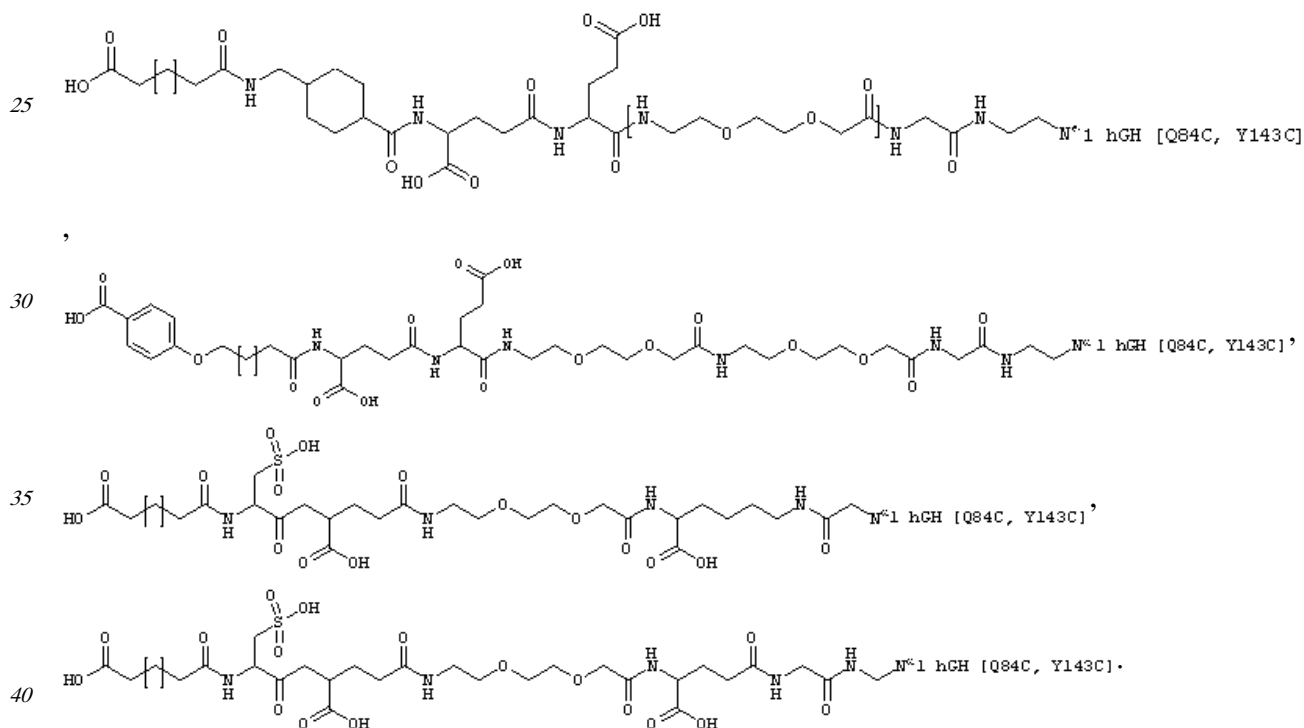
при этом предполагается, что * указывает точку присоединения, т.е., свободную связь. В дополнительном варианте воплощения B выбран из:



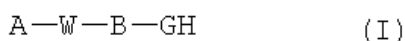


В дополнительном варианте воплощения А через В присоединен к остатку глутамина
20 в положении, соответствующем положению 40, положению 141 в SEQ ID NO:1, или N-концевому остатку соединения гормона роста.

В дополнительном варианте воплощения конъюгат GH выбран из:



Дополнительная особенность настоящего изобретения относится к конъюгату
гормона роста, при этом конъюгат гормона роста имеет формулу (I):



45 где

GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее одиночную мутацию
с внесением Cys и дополнительный дисульфидный мостик,

В представляет собой гидрофильный спейсер, соединенный с атомом серы в составе

Cys, внесенного в результате мутации, W является химической группой, соединяющей A и B, и A представляет собой альбумин-связывающий радикал; и относится к его фармацевтически приемлемым солям.

В дополнительном варианте воплощения GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью относительно аминокислотной последовательности гормона роста человека (hGH) (SEQ ID NO:1). В дополнительных вариантах воплощения GH обладает по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 96%, например по меньшей мере 97%, например по меньшей мере 98% или например по меньшей мере 99% идентичностью относительно hGH (SEQ ID NO:1). В дополнительных вариантах воплощения указанные значения идентичности относительно hGH сопряжены с по меньшей мере 10%, например по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 60%, например по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH, согласно определению с помощью способа анализа I, описанного в этом документе. Любой вариант воплощения с указанием идентичности последовательности может быть скомбинирован с любым вариантом воплощения с указанием активности, например GH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 60% активности гормона роста, характерной для hGH; GH имеющий по меньшей мере 90% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 40% активности гормона роста, характерной для hGH; GH имеющий по меньшей мере 95% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH и т.д.

В дополнительных вариантах воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит дополнительную дисульфидную связь и одиночную мутацию с внесением Cys, которая выбрана из любой одиночной мутации с внесением Cys в N-концевой, H1-, L1-, H2-, L2- или H3-областях в составе GH. В таких дополнительных вариантах воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена на N-конце, при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: T3C, P5C, S7C или в H1 (соответствует АК9-35), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C или в L1 (соответствует АК36-71), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C или, предпочтительно, любой одной из: Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C или в H2, L2 или H3 (соответствуют АК72-98, АК99-106 и АК107-127), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C и G126C в составе hGH (SEQ ID NO:1) или в L3 или H4 (соответствуют АК128-154 и АК155-184). В L3 и H4 (128-154 и АК155-184) мутация является такой как одна из следующих мутаций: E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C или в C-конце, при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: E186C G187C G190C.

Если одиночная мутация с внесением Cys присутствует в варианте hGH, эта мутация расположена в положении соответствующих аминокислотных остатков.

Дополнительные варианты воплощения включают конъюгаты GH, содержащие дополнительную дисульфидную связи, и где одиночная мутация с внесением Cys в составе GH выбрана из любой одной из следующих мутаций: 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 и G190C, например, из любой одной мутации из: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C и

5 G126C в составе hGH (SEQ ID NO:1).

В других дополнительных вариантах воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в пределах АК93-106 в составе hGH или соответствующих остатков в составе вариантов hGH. В дополнительных указанных вариантах воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в пределах L2, например в пределах

10 АК99-106 или АК99-103 или соответствующих остатков.

В дополнительном варианте воплощения дополнительная дисульфидная связь может являться дополнительной дисульфидной связью между петлевым сегментом и спиральным сегментом или внутри петлевого сегмента или между петлевыми сегментами или между спиральными сегментами.

15 В дополнительном варианте воплощения GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один из цистеинов присутствует в петлевом сегменте, например, в сегменте, ограниченном аминокислотными остатками 128-154 (L3).

В дополнительном варианте воплощения GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет петлевой сегмент, например, ограниченный аминокислотными остатками 128-154, со спиральным сегментом, например, со спиралью В или спиралью 2 (соответствующей АК72-98).

В дополнительном варианте воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит 25 одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь, соединяющую спираль 2 (соответствующую АК72-98) с петлей 3 (соответствующей АК128-154).

В дополнительном варианте воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь между 30 по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих 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, 35 S85C/Y143C, S85C/S144C, P89C/F146C, F92C/F146C, F92C/T148C, R94C/D107C, V102C/A105C, L156C/F146C, L156C/T148C и/или V185C/S188C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения дополнительный дисульфидный мостик расположен между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H18C/Y143C, H21C/M170C, N47C/T50C, 40 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 и/или V185C/S188C в hGH (SEQ ID NO:1).

45 В дополнительном варианте воплощения GH, входящий в состав конъюгата, содержит одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих 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 и/или R94C/D107C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения дополнительная дисульфидная связь расположена между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих D26C/V102C, D26C/Y103C, S57C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C, S85C/S144C, F92C/T148C и/или R94C/D107C в составе SEQ ID NO:1.

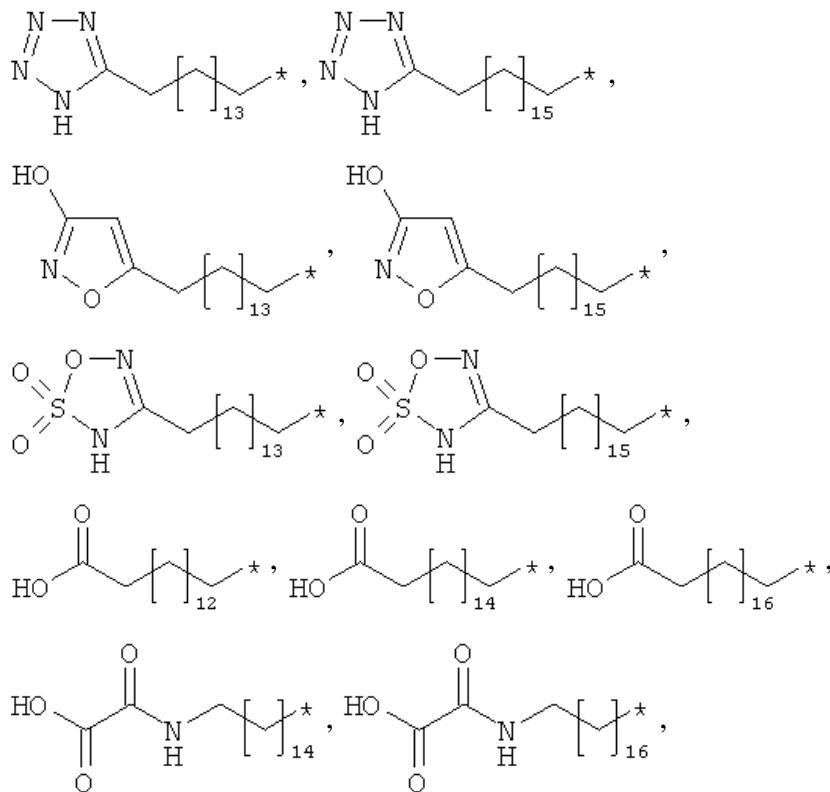
В дополнительном варианте воплощения дополнительная дисульфидная связь расположена между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, F54C/Y143C, F54C/S144C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, I58C/Y143C, I58C/S144C, P59C/Q137C, S71C/S132C, L81C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или S85C/S144C в составе SEQ ID NO:1.

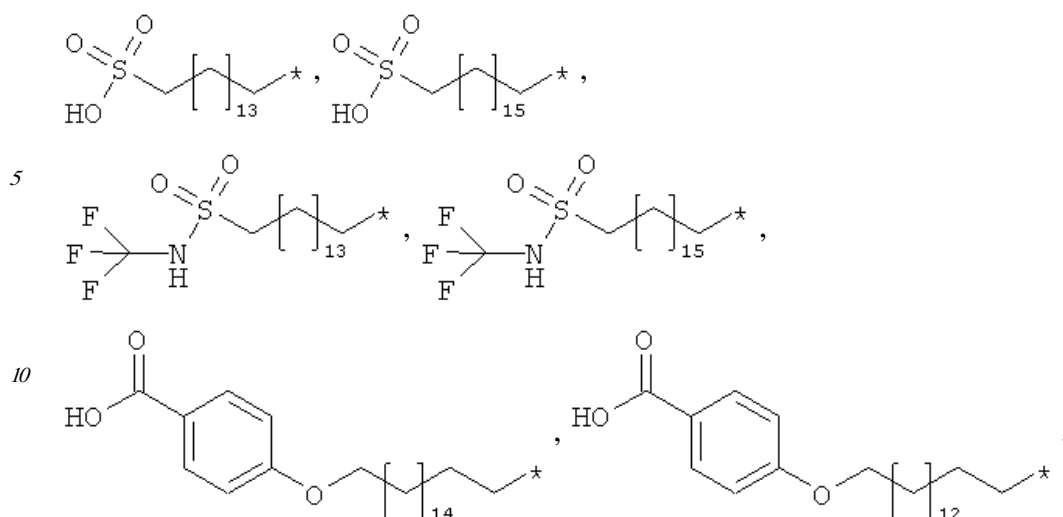
В дополнительном варианте воплощения дополнительная дисульфидная связь расположена между одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или S85C/S144C в составе SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys в L2 и дополнительную дисульфидную связь, которая соединяет петлевой сегмент, например, ограниченный аминокислотными остатками 128-154 (H3), со спиральным сегментом, например, со спиралью В или спиралью 2 (соответствующей AK72-98).

В одном варианте воплощения GH содержит сочетание мутаций, выбранных из следующей группы: 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 и C102C/S85C/S144C.

В дополнительном варианте воплощения А выбран из:

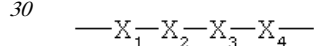




15 где * указывает место присоединения к В через W.
В дополнительном варианте воплощения W имеет формулу -W7-Y-,
где
Y является -(CH₂)₁₇-C3-₁₀-циклоалкил-W₈- или ковалентной связью,
I7 является 0-6,
20 W₇ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S
(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC
(O)-, -(CH₂)_{s3}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s3 является 0 или 1,
W₈ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S
25 (O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC
(O)-, -(CH₂)_{s4}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s4 является 0 или 1.

В дополнительных вариантах воплощения В включает или состоит из одного или нескольких мотивов OEG и/или гамма-Glu, как описано выше.

В дополнительном варианте воплощения В имеет формулу:



где

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

35 X₂ является -[(CHR³)₃-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n2}E₂]_{m5}-[(CHR⁴)₄-W₅]_{m6}]_{n4}-,

$$X_3 \text{ является } -[(CHR^5)_{I5-W_6}]_{m7-},$$

X_4 является F-D1-(CH₂)₁₆-D2-,

I1, I2, I3, I4, I5 и I6 независимо выбраны из 0-16,

40 m1, m3, m4, m6 и m7 независимо выбраны из 0-10,

m_2 и m_5 независимо выбраны из 0-25,

n_1, n_2, n_3 и n_4 независимо выбраны из 0-16,

Является арилом, гетероарилом, пирролидин-2,5-дионом или ковалентной связью, при этом арильные и

гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, -CN, -ОН, -C(O)ОН.

-C(O)NH₂, -S(O)₂OH или C₁₋₆-алкилом,

R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$,

-S(O)₂OH, -NH-C(=NH)-NH₂, C₁₋₆-алкила, арила или гетероарила; при этом алкильная, арильная и гетероарильная группы, возможно, содержат в качестве заместителей галоген, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN или -OH,

5 D1, D2, E1 и E2 независимо выбраны из -O-, -N(R⁶)-, -N(C(O)R⁷)- или ковалентной связи; при этом R⁶ и R⁷ независимо представляют собой водород или C₁₋₆-алкил,

W₁-W₅ независимо выбраны из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s2}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s2 является 0 или 1,

W₆ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s1}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C₁₋₆-алкила, -C(O)NHC₁₋₆-алкила или ковалентной связи; где s1 является 0 или 1 и C₁₋₆-алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, -NHC(O)CH*CH₂COOH или -NHC(O)CH₂CH*COOH; при этом (*) указывает точку присоединения атома углерода в составе CH к X₄.

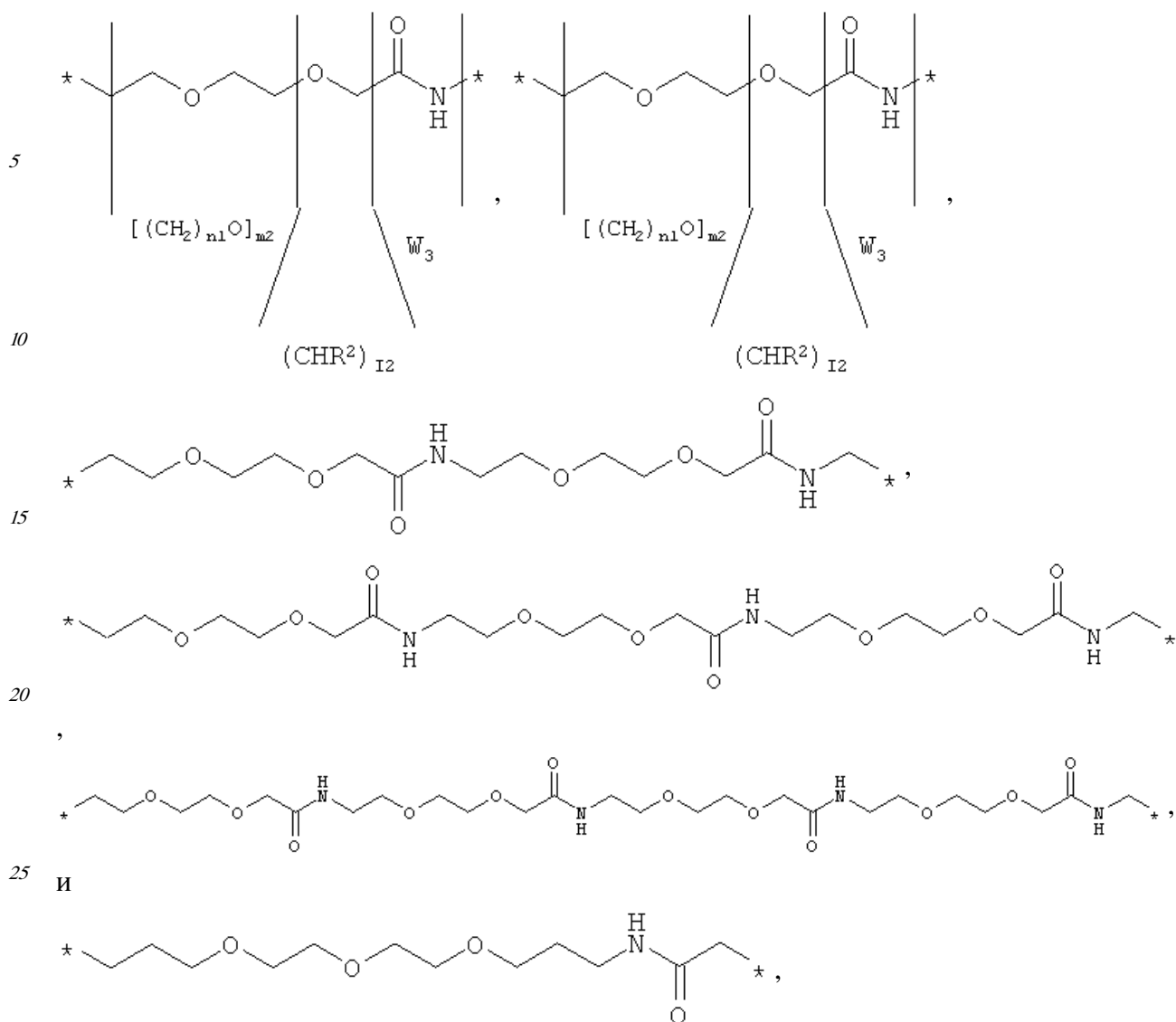
В дополнительном варианте воплощения I1, I2, I3, I4, I5 и I6 независимо являются 0-6. В дополнительном варианте воплощения m1, m3, m4, m6 и m7 независимо являются 0-6. В дополнительном варианте воплощения m2 и m5 независимо являются 0-10. В дополнительном варианте воплощения n1, n2, n3 и n4 независимо являются 0-10. В дополнительном варианте воплощения D1 и D2 независимо выбраны из -O- или -N(R⁶)- или ковалентной связи.

В дополнительном варианте воплощения E1 и E2 независимо выбраны из -O- или -N(R⁶)- или ковалентной связи.

В дополнительном варианте воплощения W₁-W₈ независимо выбраны из группы, состоящей из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -NHC(O)C₁₋₆-алкила, -C(O)NHC₁₋₆-алкила или ковалентной связи; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, -NHC(O)CH*CH₂COOH или -NHC(O)CH₂CH*COOH; где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к X₄.

В дополнительном варианте воплощения R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ независимо выбраны из водорода, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH или C₁₋₆-алкила; при этом C₁₋₆-алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей -C(O)OH, -C(O)NH₂ или -S(O)₂OH.

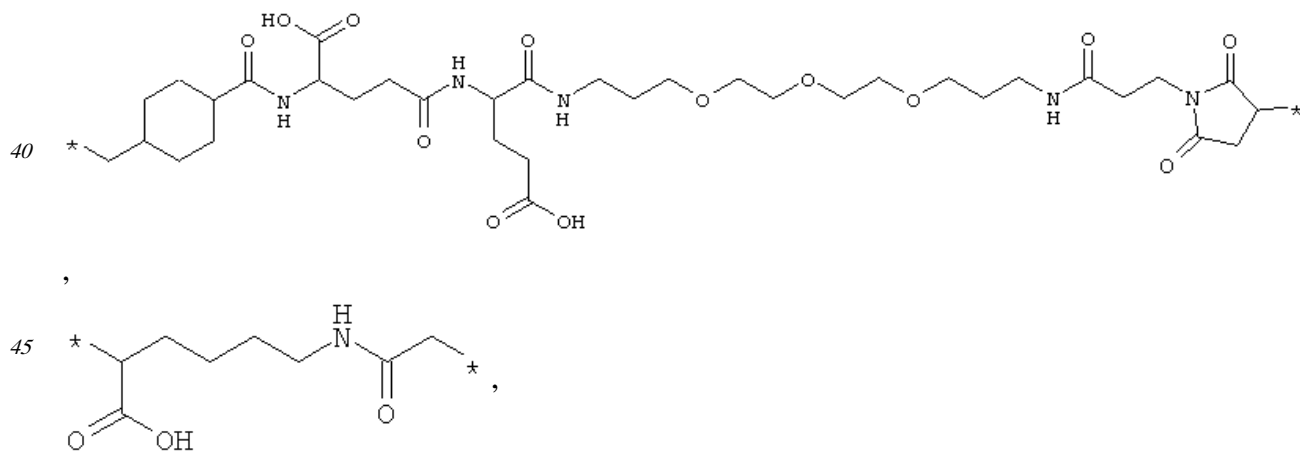
В дополнительном варианте воплощения -{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{I2}-W₃]_{m3}}_{n2}- и -{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)_{I4}-W₅]_{m6}}_{n4}-, где E1 и E2 являются -O-, выбраны из

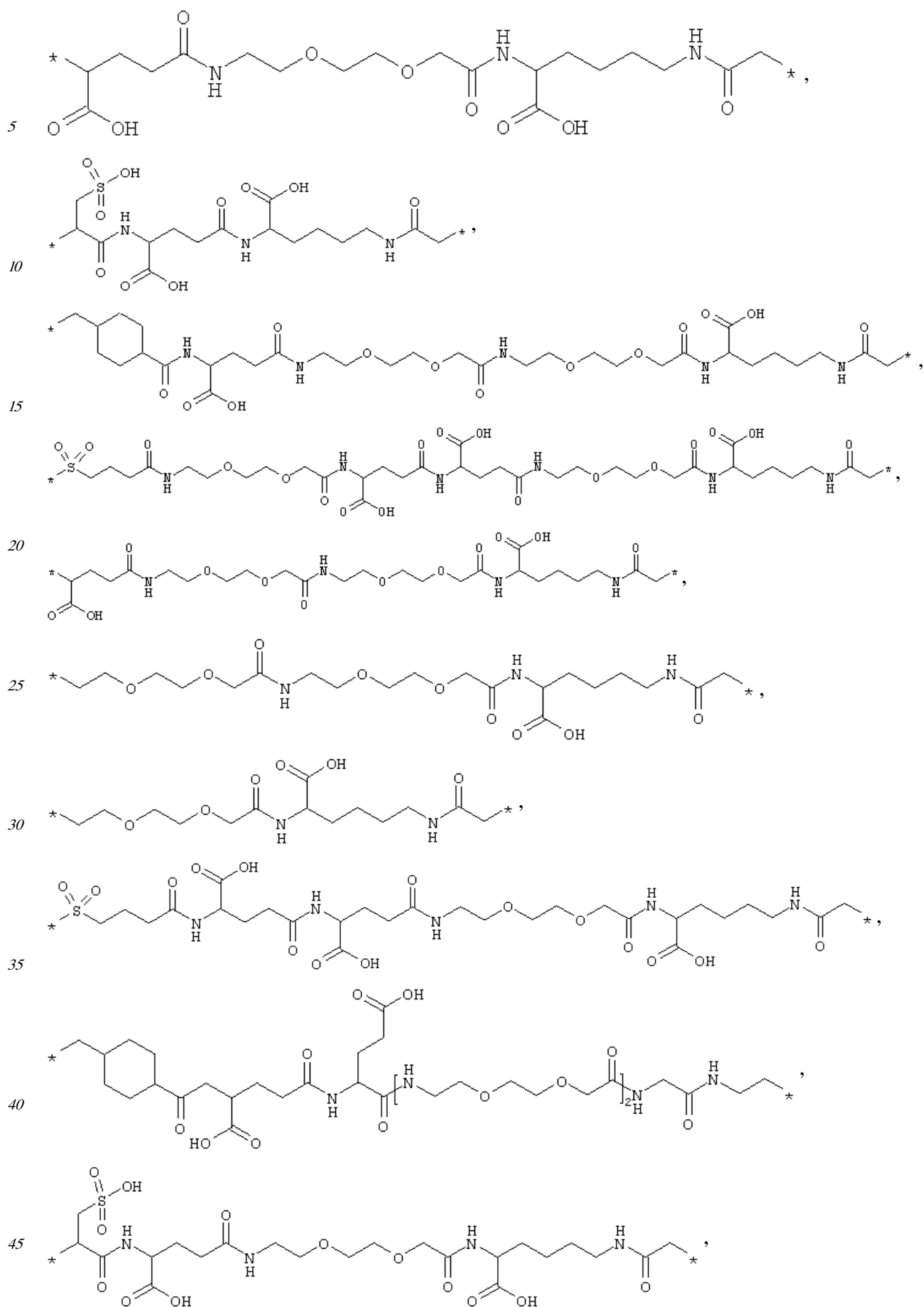


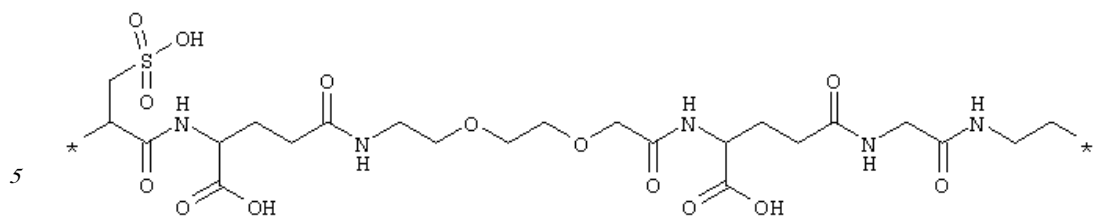
при этом предполагается, что * указывает точку присоединения, т.е., свободную связь.

В дополнительном варианте воплощения X_4 является ковалентной связью и W_6 выбран из пирролидин-2,5-диона, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ или $NHC(O)CH_2CH^*COOH$, при этом (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к GH .

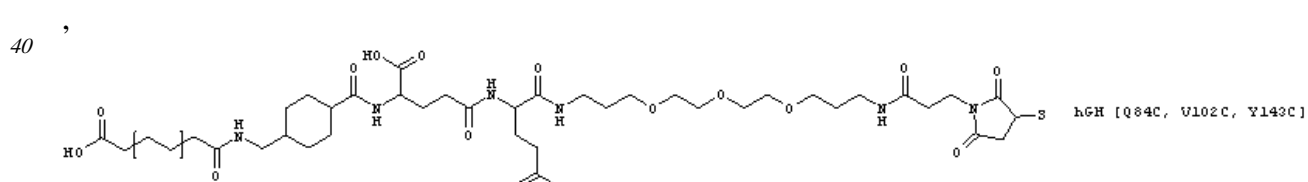
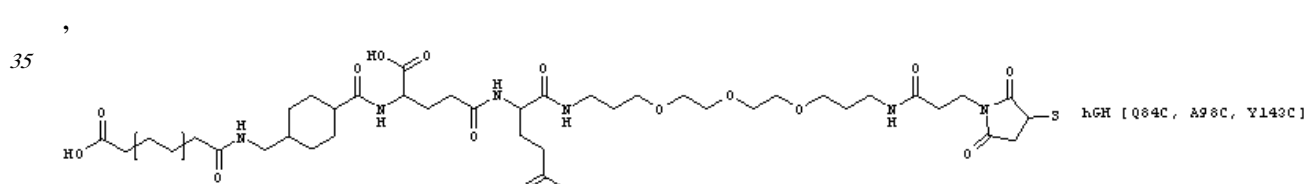
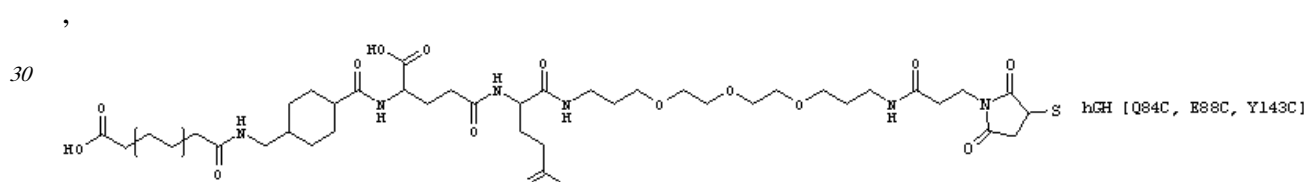
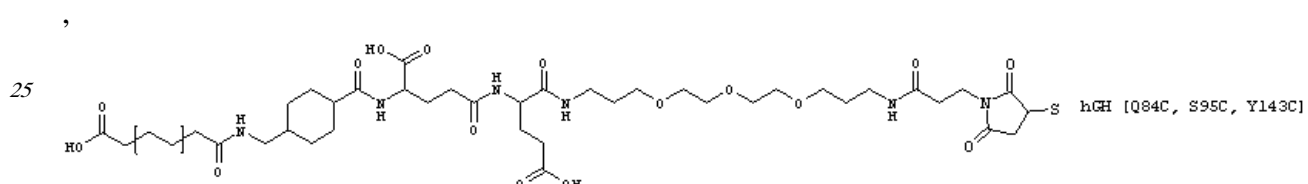
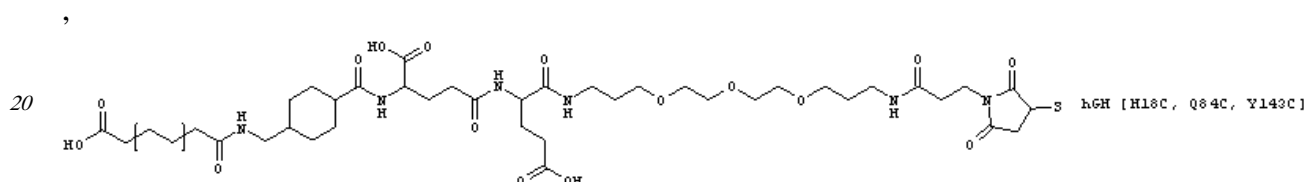
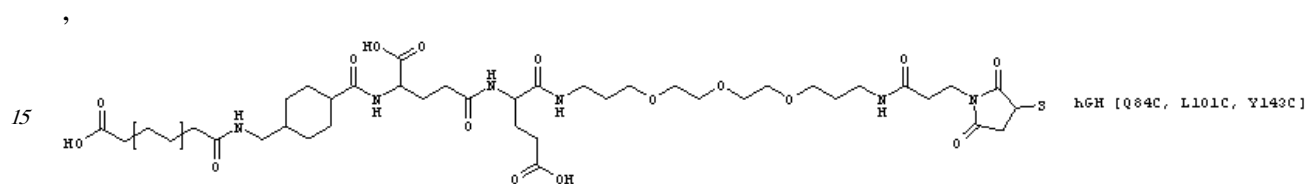
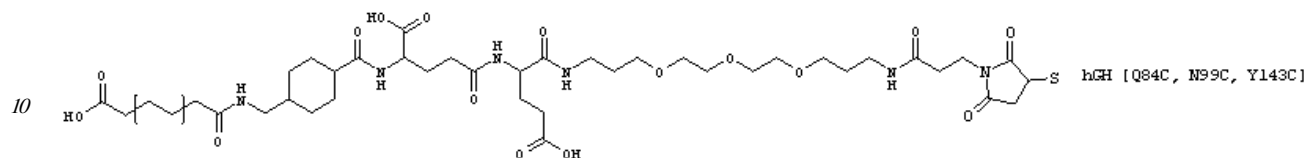
В дополнительном варианте воплощения В выбран из:



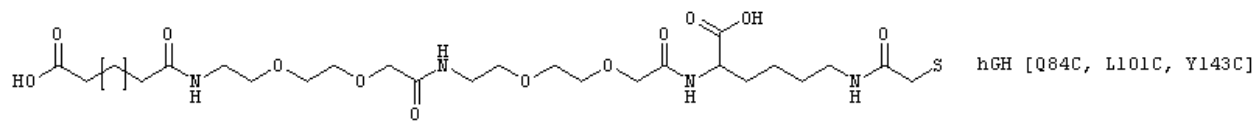
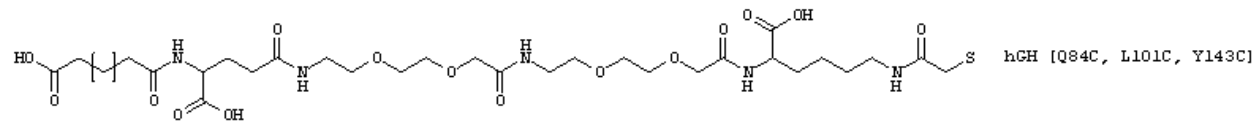
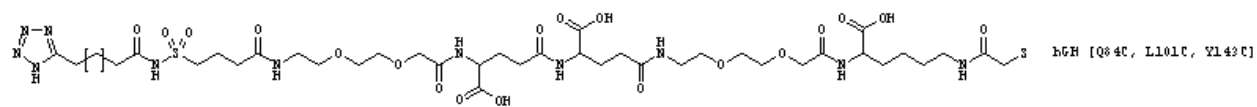
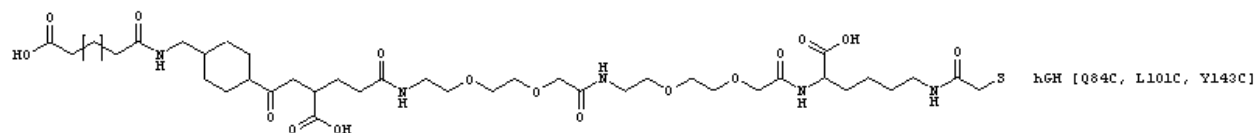
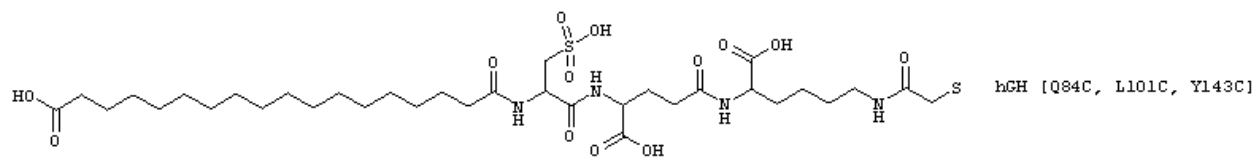
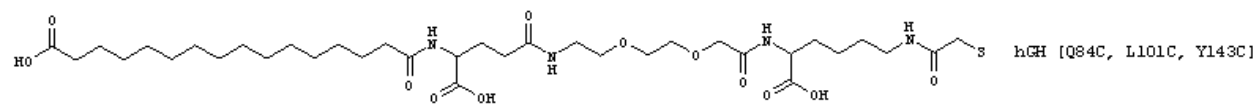
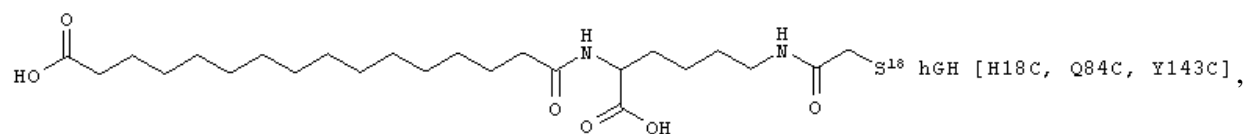
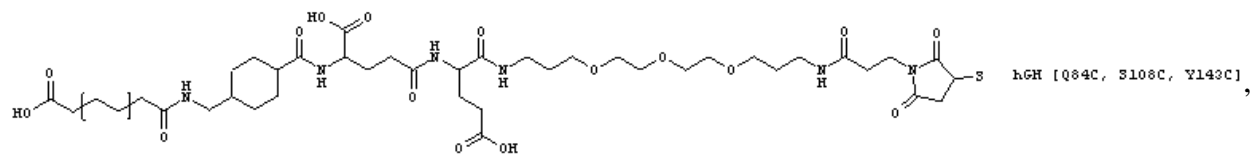
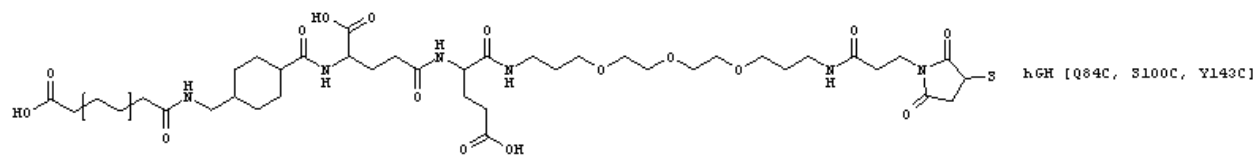
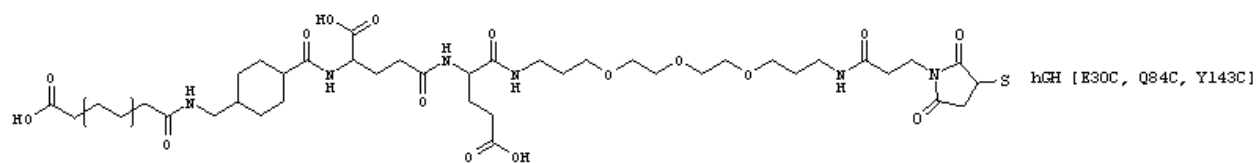


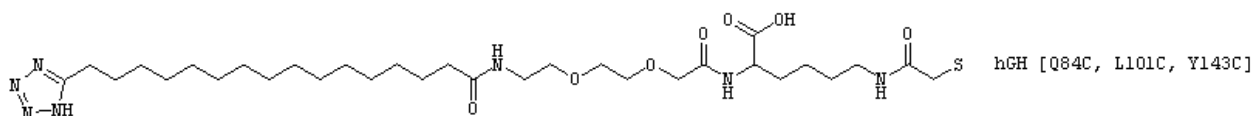


В дополнительном варианте воплощения конъюгат GH выбран из:

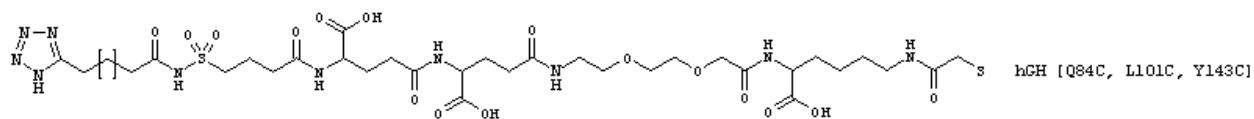


45 ,

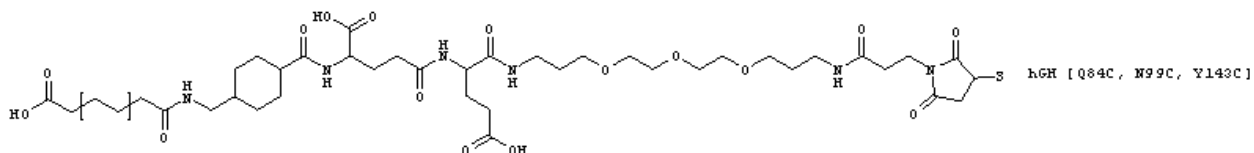




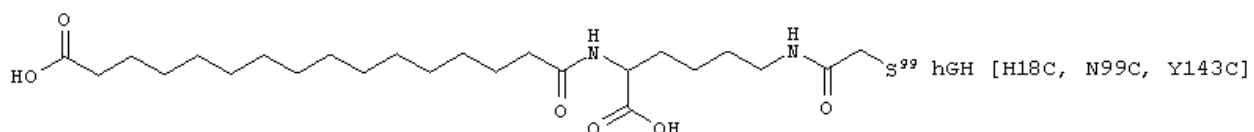
5



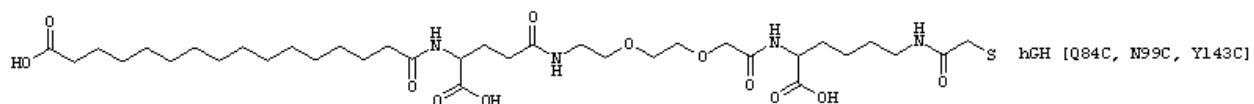
10



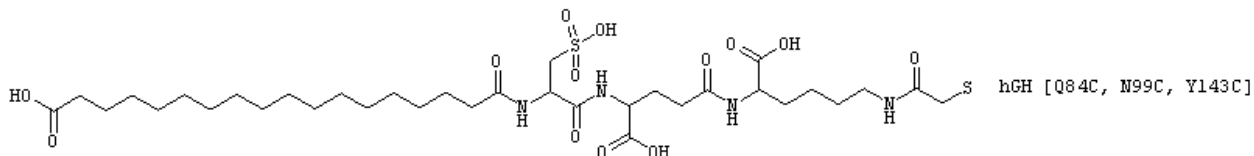
15



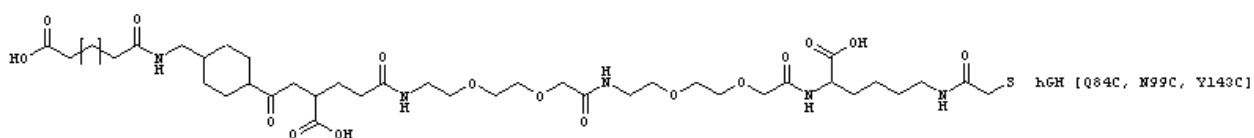
20



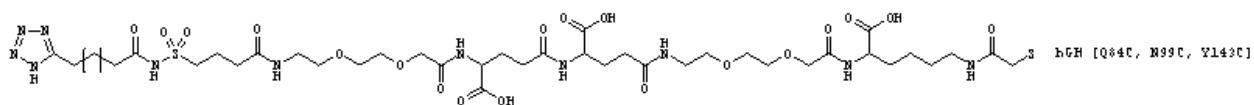
25



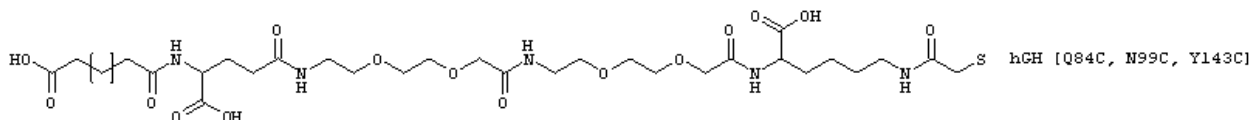
30



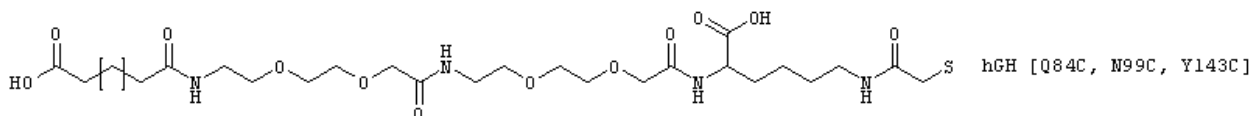
35

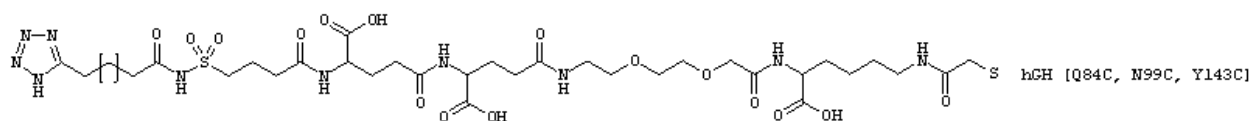
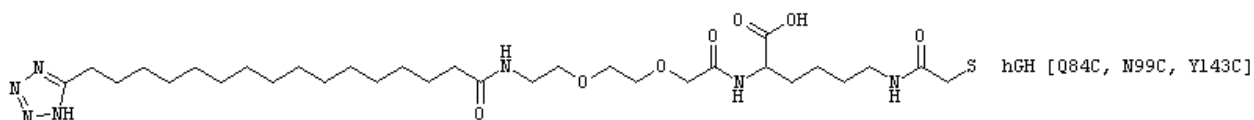


40



45





В типичном случае конъюгат по настоящему изобретению содержит один альбумин-связывающий радикал (А), присоединенный через гидрофильный спейсер (В), например, через один гидрофильный спейсер (В), к соединению гормона роста (GH).

Однако соединение гормона роста (GH) может быть связано с двумя альбумин-связывающими радикалами через гидрофильный спейсер.

Таким образом, дополнительная особенность настоящего изобретения относится к конъюгату гормона роста формулы (II):



где

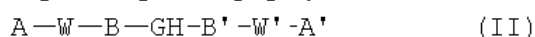
ГН представляет собой соединение гормона роста, содержащее одиночную мутацию с внесением Cys, В и В' независимо являются гидрофильными спейсерами, присоединенными к атому серы в составе внесенного мутацией Cys,

W является химической группой, соединяющей A и B,

W' является химической группой, соединяющей A' и B',

А и А' независимо представляет собой альбумин-связывающий радикал, а также к его фармацевтически приемлемым солям.

Кроме того, еще одна особенность настоящего изобретения относится к конъюгату гормона роста формулы (II):



где

ГН представляет собой соединение гормона роста, содержащее дополнительный мостик, В и В' независимо являются гидрофильными спенсерами, W является химической группой, соединяющей А и В,

W' является химической группой, соединяющей A' и B',

А и А' независимо представляет собой альбумин-связывающий радикал, а также к его фармацевтически приемлемым солям.

Еще одна дополнительная особенность настоящего изобретения относится к конъюгату гормона роста формулы (II):



где

GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительный дисульфидный мостик,

В и В' независимо являются гидрофильными спейсерами, соединенными с атомом серы в составе Cys, внесенного в результате мутации,

W является химической группой, соединяющей A и B,

W' является химической группой, соединяющей A' и B' .

А и А' независимо представляет собой альбумин-связывающий радикал, а также к его фармацевтически приемлемым солям.

В конъюгате формулы (II, описанном выше, W' выбрана из тех же групп, что и W ,

А' выбран из тех же групп, что и А, а В' выбран из тех же групп, что и В, и следует понимать, что W и W', А и А', и В и В' независимо выбраны из любой из соответствующих групп, указанных в этом документе. Таким образом, любые варианты воплощения W, А и В в этом документе также являются вариантами воплощения W', А' и В'. Дополнительно, любой из вариантов воплощения, описанных в этом документе, независимо относится как к конъюгатам формулы (I), так и к конъюгатам формулы (II), и то же относится к широкому спектру их особенностей и воплощений, если применимо.

Приведенные выше варианты воплощения, а также варианты воплощения, которые будут описаны в этом документе далее, следует рассматривать как относящиеся к любой из особенностей, описанных в этом документе, а также к любому из вариантов воплощения, описанных в этом документе, если не указано, что вариант воплощения относится к определенной особенности или особенностям настоящего изобретения.

В одном из вариантов воплощения GH является вариантом hGH, при этом понимается, что вариант является соединением, полученным путем замены одного или нескольких аминокислотных остатков в последовательности hGH на другую аминокислоту природного или не природного происхождения; и/или путем добавления одной или нескольких аминокислот природного или не природного происхождения к последовательности hGH; и/или путем делеции одного или нескольких аминокислотных остатков из последовательности hGH, при этом за любыми из этих этапов, возможно, следует дополнительное получение производных одного или нескольких аминокислотных остатков.

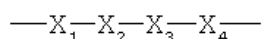
В дополнительном варианте воплощения GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 90% идентичностью относительно аминокислотной последовательности гормона роста человека (hGH) (SEQ ID NO:1). В дополнительных вариантах воплощения GH обладает по меньшей мере 80%, например по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 95%, например по меньшей мере 96%, например по меньшей мере 97%, например по меньшей мере 98% или например по меньшей мере 99% идентичностью относительно hGH (SEQ ID NO:1). В дополнительных вариантах воплощения указанные значения идентичности относительно hGH сопряжены с по меньшей мере 10%, например по меньшей мере 20%, например по меньшей мере 40%, например по меньшей мере 60%, например по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH, согласно определению с помощью способа анализа I, описанного в этом документе.

Любой вариант воплощения с указанием идентичности последовательности может быть скомбинирован с любым вариантом воплощения с указанием активности, например GH, имеющий по меньшей мере 80% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 60% активности гормона роста, характерной для hGH; GH имеющий по меньшей мере 90% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 40% активности гормона роста, характерной для hGH; GH имеющий по меньшей мере 95% идентичности относительно hGH в сочетании с по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH и т.д.

В дополнительном варианте воплощения GH является hGH (SEQ ID NO:1).

В дополнительных вариантах воплощения В включает или состоит из одного или нескольких мотивов OEG и/или гамма-Glu, как описано выше.

В дополнительном варианте воплощения конъюгата формулы (I) или (II) гидрофильный спейсер В имеет формулу:



где

X_1 является $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$, X_2 является $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n2}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

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

X_4 является $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$,

$I1, I2, I3, I4, I5$ и $I6$ независимо выбраны из 0-16,

$m1, m3, m4, m6$ и $m7$ независимо выбраны из 0-10,

$m2$ и $m5$ независимо выбраны из 0-25,

$n1, n2, n3$ и $n4$ независимо выбраны из 0-16,

F является арилом, гетероарилом, пирролидин-2,5-дионом или ковалентной связью, при этом арильные и

гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, $-CN$, $-OH$, $-C(O)OH$,

$-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкилом,

R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-NH-C(=NH)-NH_2$, C_{1-6} -алкила, арила или гетероарила; при этом алкильная, арильная и гетероарильная группы, возможно, содержат в качестве заместителей галоген, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-CN$ или $-OH$,

$D1, D2, E1$ и $E2$ независимо выбраны из $-O-$, $-N(R^6)-$, $-N(C(O)R^7)-$ или ковалентной связи; при этом R^6 и R^7 независимо представляют собой водород или C_{1-6} -алкил,

W_1-W_5 независимо выбраны из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s2}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или ковалентной связи; где $s2$ является 0 или 1,

W_6 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s1}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)C_{1-6}$ -алкила, $-C(O)NHC_{1-6}$ -алкила или ковалентной связи; где $s1$ является 0 или 1 и алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ или

$-NHC(O)CH_2CH^*COOH$; где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к X_4 .

В дополнительном варианте воплощения W_1 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или ковалентной связи. В типичном случае W_1 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

В дополнительном варианте воплощения W_2 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или ковалентной связи. В типичном случае W_2 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

В дополнительном варианте воплощения W_3 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или ковалентной связи. В типичном случае W_3 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

В дополнительном варианте воплощения W_4 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или ковалентной связи. В типичном случае W_4 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

В дополнительном варианте воплощения W_5 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или ковалентной связи. В типичном случае W_5 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

В дополнительном варианте воплощения W_6 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-CH_2NHC(O)-$,

$-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-NHC(O)C_{1-6}$ -алкила, $-C(O)NHC_{1-6}$ -алкила или ковалентной связи; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей пирролидин-2,5-дион, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ или $NHC(O)CH_2CH^*COOH$; где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к X_4 . В типичном случае W_6 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$ или $-NHC(O)C_{1-6}$ -алкила.

В дополнительном варианте воплощения $D1$, $D2$, F все являются ковалентными связями, 16 является 0 , и $W6$ выбрана из пирролидин-2,5-диона, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ или $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$, где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к GH .

В дополнительном варианте воплощения R^1 выбран из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$. В типичном случае R^1 выбран из $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или C_{1-6} -алкила; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

В дополнительном варианте воплощения R^2 выбран из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$. В типичном случае R^2 выбран из $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или C_{1-6} -алкила; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

В дополнительном варианте воплощения R^3 выбран из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$. В типичном случае R^3 выбран из $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или C_{1-6} -алкила; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

В дополнительном варианте воплощения R^4 выбран из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$. В типичном случае R^4 выбран из $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или C_{1-6} -алкила; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

В дополнительном варианте воплощения R^5 выбран из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)$

NH_2 , $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ или C_{1-6} -алкила; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$. В типичном случае R^5 выбран из $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ или C_{1-6} -алкила; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ или $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$.

В дополнительном варианте воплощения E1 выбран из -O- или $-\text{N}(\text{R}^6)-$ или ковалентной связи. В типичном случае E1 выбран из -O-.

В дополнительном варианте воплощения E2 выбран из -O- или $-\text{N}(\text{R}^6)-$ или ковалентной связи. В типичном случае E2 выбран из -O-.

В дополнительном варианте воплощения E1 и E2 оба являются -O-.

В дополнительном варианте воплощения E1 и E2 оба являются $-\text{N}(\text{R}^6)-$.

В дополнительном варианте воплощения F является фенилом, пирролидин-2,5-дионом или ковалентной связью.

В дополнительном варианте воплощения D1 выбран из -O- или $-\text{N}(\text{R}^6)-$ или ковалентной связи. В типичном случае D1 выбран из $-\text{N}(\text{R}^6)-$.

В дополнительном варианте воплощения D2 выбран из -O- или $-\text{N}(\text{R}^6)-$ или ковалентной связи. В типичном случае D1 выбран из $-\text{N}(\text{R}^6)-$.

В дополнительном варианте воплощения I1 является 0-6, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения I2 является 0-6, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения I3 является 0-6, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения I4 является 0-6, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения I5 является 0-6, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения I6 является 0-6, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения m1 является 0-6, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения m2 является 0-10, например 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В дополнительном варианте воплощения m3 является 0-5, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения m4 является 0-5, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения m5 является 0-10, например 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В дополнительном варианте воплощения m6 является 0-5, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения m7 является 0-5, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения n1 является 0-10, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

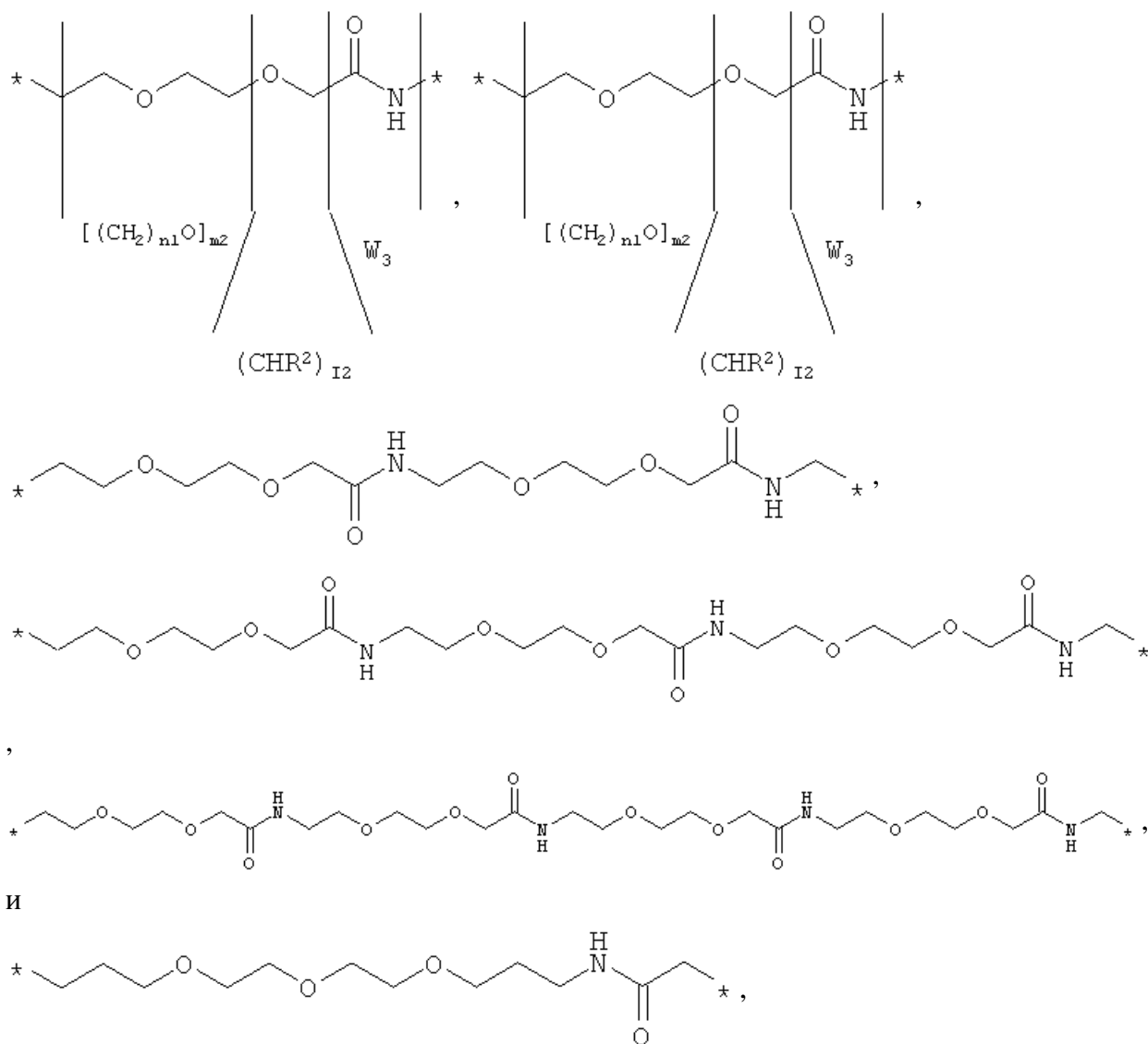
В дополнительном варианте воплощения n2 является 0-10, например 0, 1, 2, 3, 4, 5

или 6.

В дополнительном варианте воплощения n_3 является 0-10, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения n_4 является 0-10, например 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном варианте воплощения X_1 является $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}$ и X_2 является $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}$, где $\{[(CH_2)_{n1}O]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}$ и $\{[(CH_2)_{n3}O]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}$ - выбраны из:



при этом предполагается, что * указывает точку присоединения, т.е., свободную связь.

В дополнительном варианте воплощения молекулярная масса указанного гидрофильного спейсера находится в диапазоне от 80 Дальтон (Да) до 1500 Да или в диапазоне от 300 Да до 1100 Да.

В дополнительном варианте воплощения W имеет формулу:

$-W_7-Y-$,

где

Y является $-(CH_2)_{17}$ -C3- $_{10}$ -циклоалкил- W_8 - или ковалентной связью,

I7 является 0-6,

W_7 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s3}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или ковалентной связи; где $s3$ является 0 или 1,

W_8 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s4}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или ковалентной связи; где $s4$ является 0 или 1.

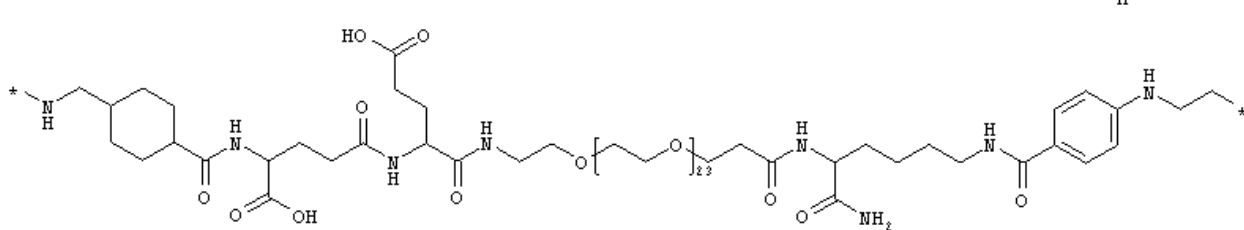
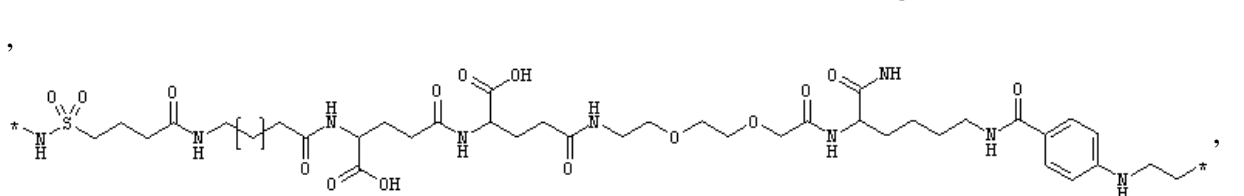
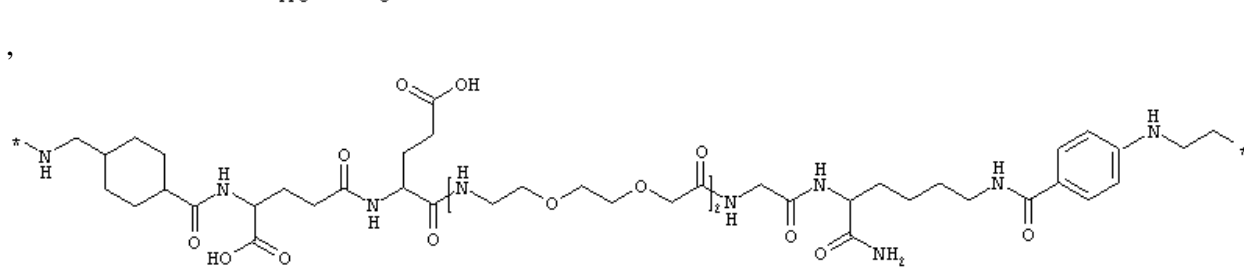
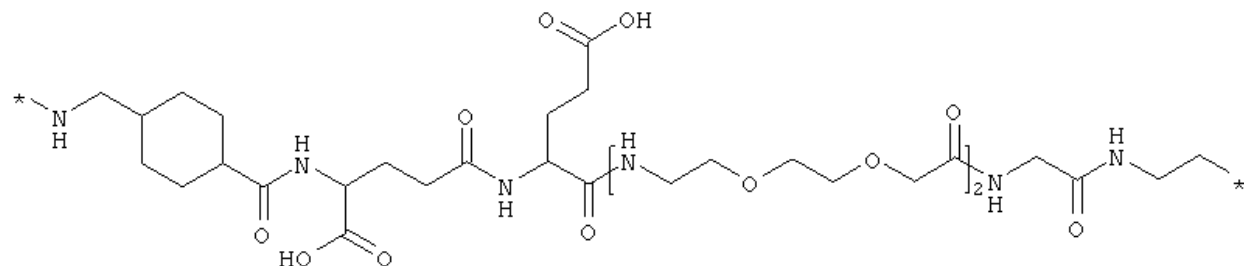
В одном варианте воплощения W Y является $-(CH_2)_{17}$ -циклогексил- W_8 -. В дополнительном варианте воплощения Y является ковалентной связью.

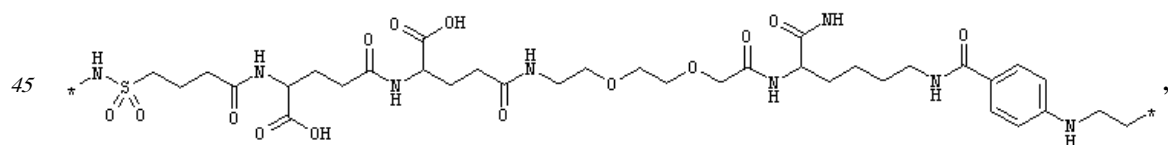
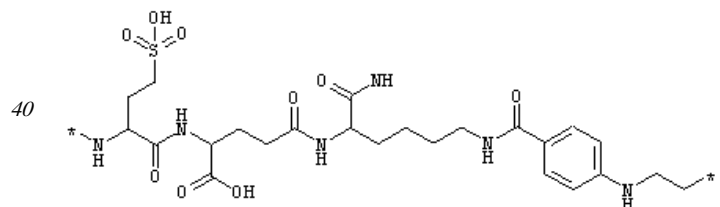
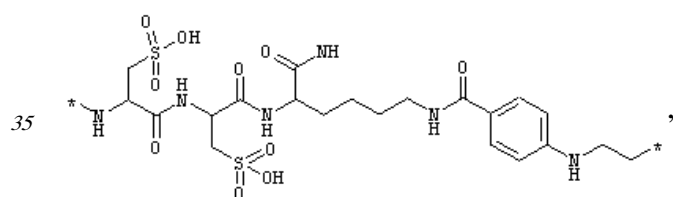
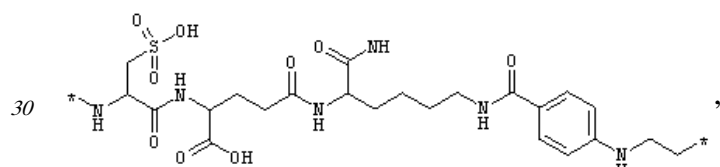
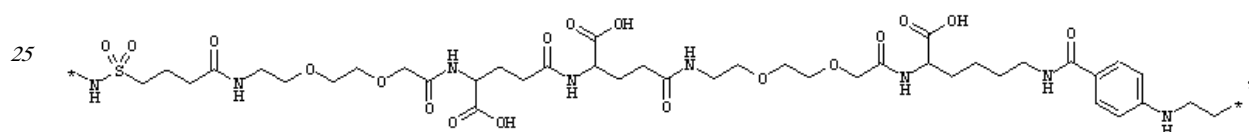
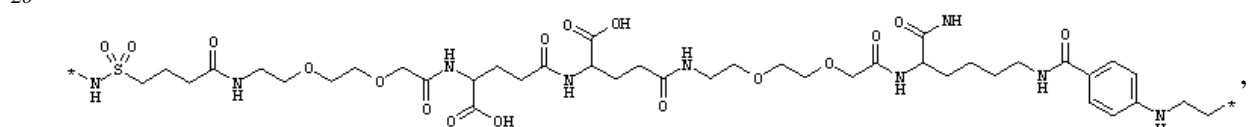
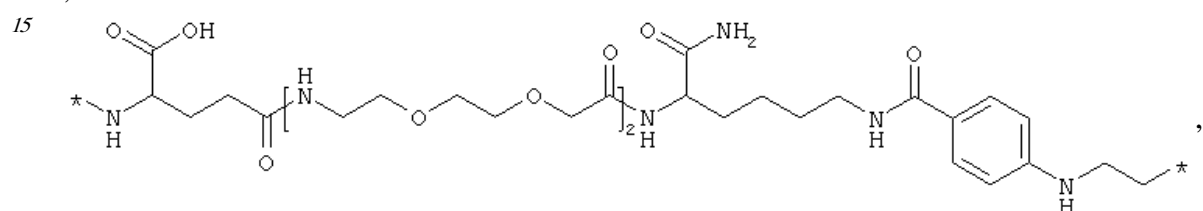
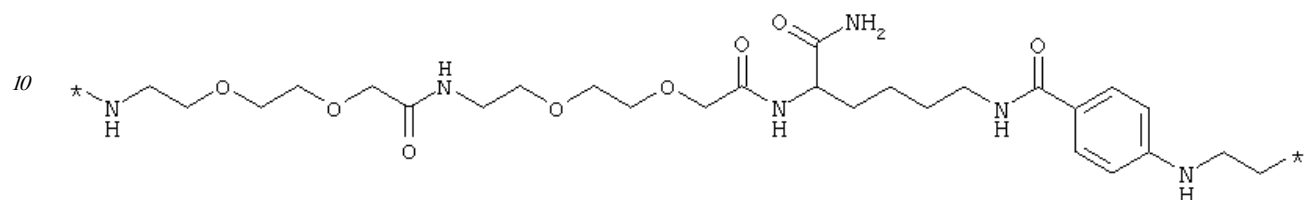
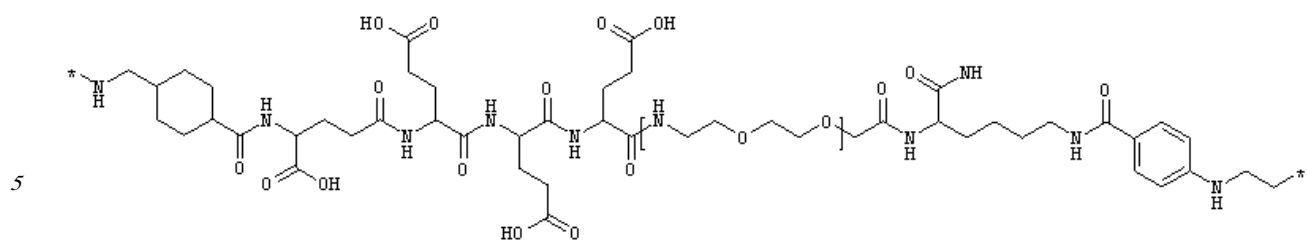
В одном варианте воплощения W_7 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или ковалентной связи. В типичном случае W_7 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

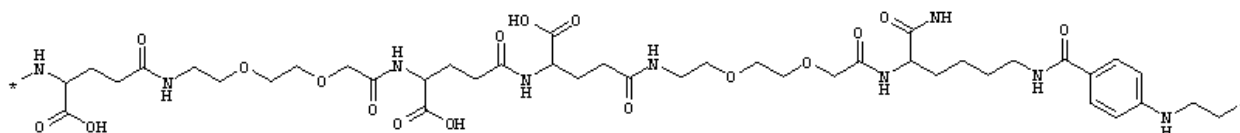
В дополнительном варианте воплощения W_8 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$ или ковалентной связи. В типичном случае W_8 выбрана из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$ или $-C(O)NHS(O)_2-$.

В дополнительном варианте воплощения I7 является 0 или 1.

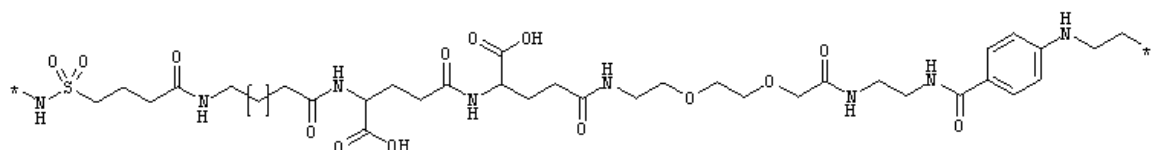
В дополнительном варианте воплощения гидрофильный спейсер В по настоящему изобретению выбран из:



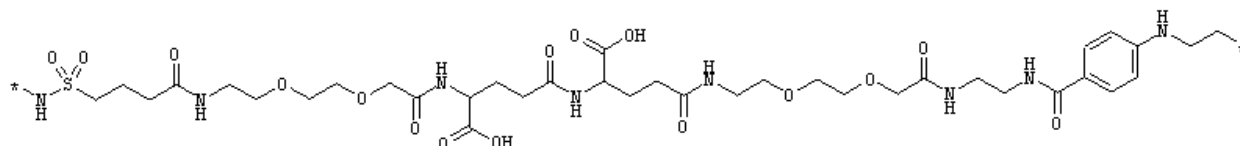




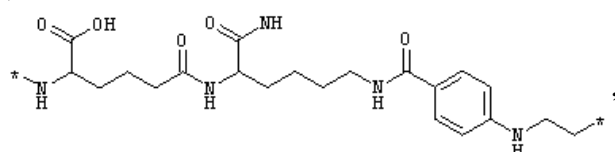
5 ,



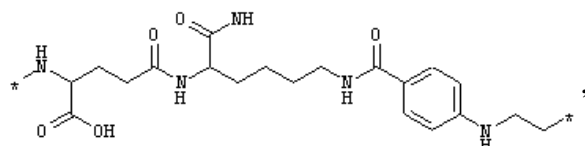
10



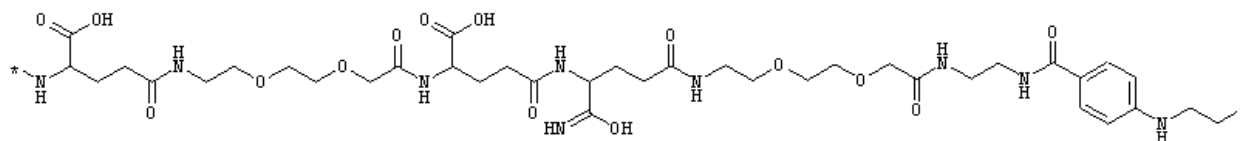
15 ,



20



25



при этом предполагается, что * указывает точку присоединения, т.е., свободную
связь.

30

Альбумин-связывающий радикал (заместитель А в формуле (I) или (II) выше),
связанный с соединением гормона роста по настоящему изобретению, является
липофильным радикалом, который нековалентно связывается с альбумином. В типичном
случае альбумин-связывающий радикал при физиологических значениях pH заряжен
отрицательно и обладает аффинностью связывания в отношении сывороточного
альбумина человека, которая составляет менее чем примерно 10 мкМ, или даже менее
чем примерно 1 мкМ.

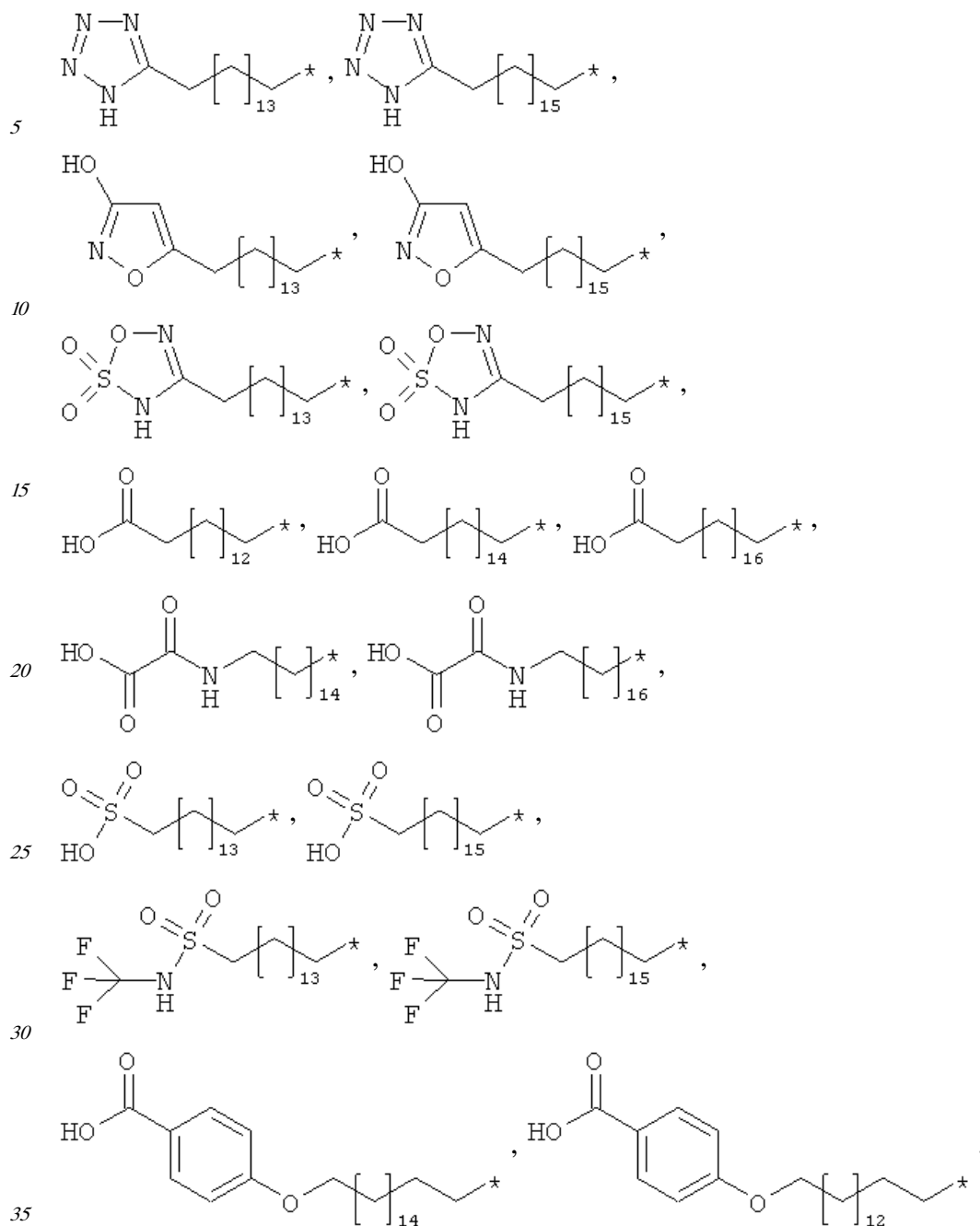
35

В дополнительном варианте воплощения соединения гормона роста по настоящему
изобретению альбумин-связывающий радикал выбран из алкильной группы с линейной
цепочкой, разветвленной алкильной группы, группы, содержащей ω-карбоксильную
группу или изостеру ω-карбоксильной группы. В типичном случае альбумин-
связывающий радикал содержит от 6 до 40 атомов углерода. В дополнительном варианте
воплощения альбумин-связывающий радикал содержит от 8 до 26 атомов углерода. В
дополнительном варианте воплощения альбумин-связывающий радикал содержит от
8 до 20 атомов углерода.

40

В дополнительном варианте воплощения А содержит от 14 до 26 атомов углерода
и включает ω-карбоксильную группу. В дополнительном варианте воплощения А
содержит от 14 до 26 атомов углерода и включает изостеру ω-карбоксильной группы,
например, тетразол.

В дополнительном варианте воплощения А выбран из:



где * указывает место присоединения к В через W.

Гидрофильный спейсер (В) предпочтительно вносится в положение в составе соединения гормона роста (GH) избирательно, с целью иметь возможность контроля над тем, будет ли с соединением гормона роста связан один или два альбумин-связывающих радикала (А). Гидрофильный спейсер (В) может быть связан с боковой цепочкой аминокислоты в составе соединения GH. Такая боковая цепочка аминокислоты может являться химически модифицированной боковой цепочкой аминокислоты в составе соединения GH. В соответствии с другим вариантом, такая боковая цепочка аминокислоты может являться ферментативно модифицированной боковой цепочкой аминокислоты в составе соединения GH. Предпочтительно, применяют трансглутаминазу для присоединения гидрофильного спейсера к остатку глутамина в положении, соответствующем положению 40 или положению 141 в SEQ ID NO:1. Еще одним способом избирательного внесения гидрофильного спейсера является

присоединение к N-концевому остатку в составе соединения гормона роста, такого как hGH (SEQ ID NO:1).

В конъюгате гормона роста формулы (I) фрагмент A-W-B может быть линейным или разветвленным. В одном из вариантов воплощения A-W-B не является линейным пептидом.

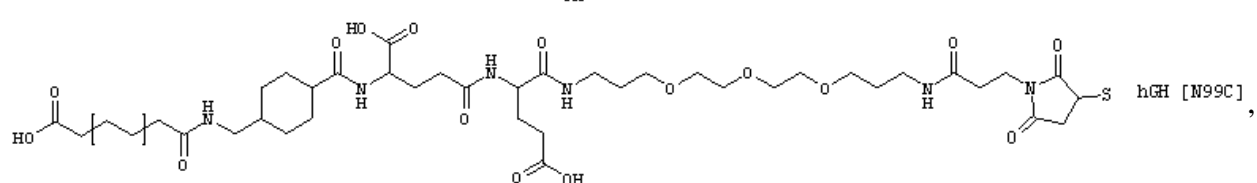
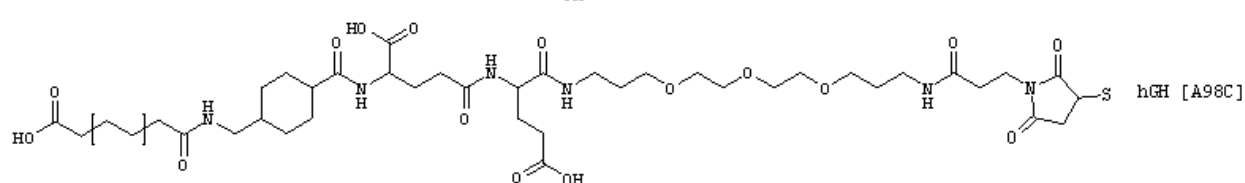
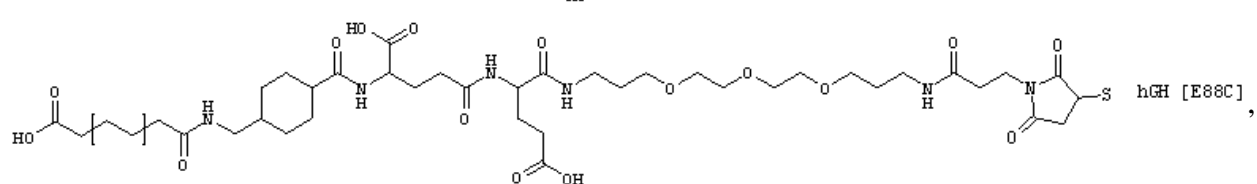
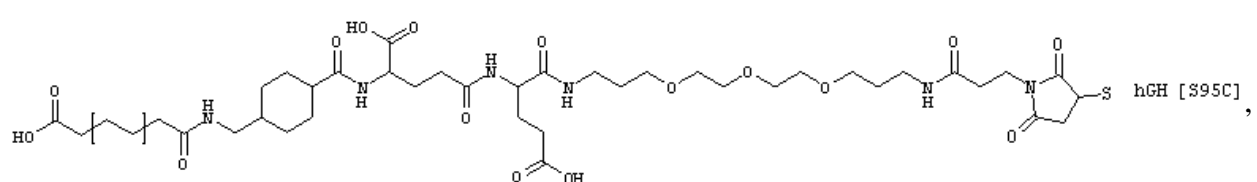
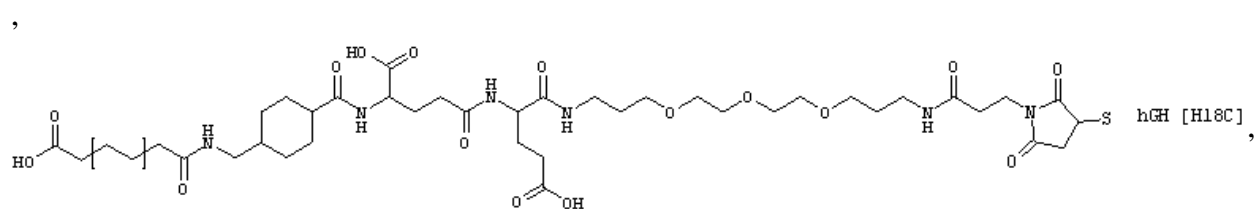
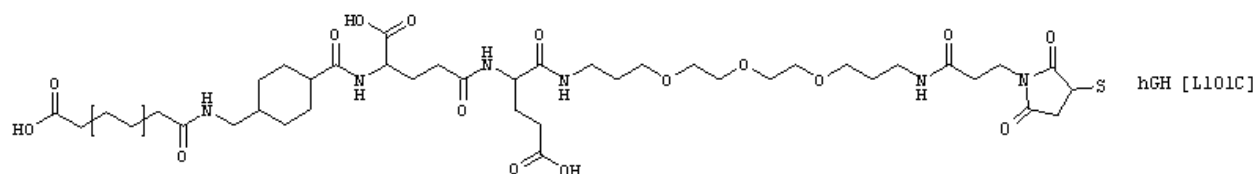
В дополнительном варианте воплощения альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер присоединен к остатку глутамина в положении, соответствующем положению 40 в SEQ ID NO:1.

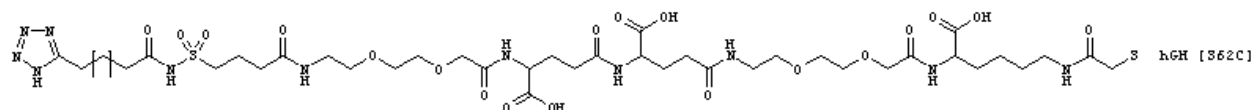
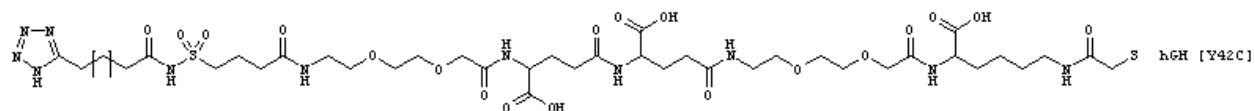
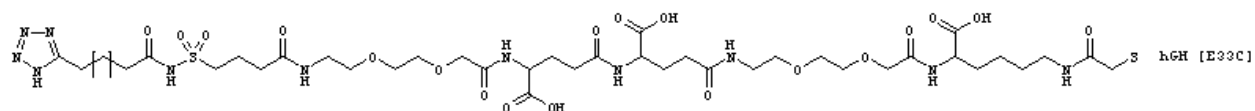
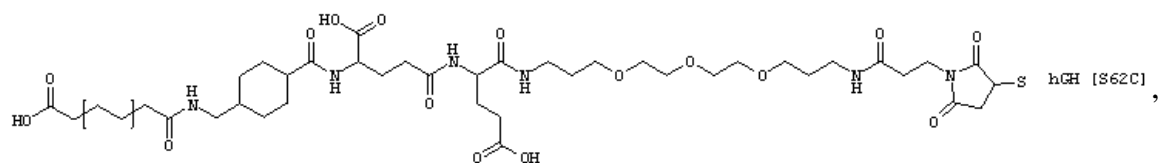
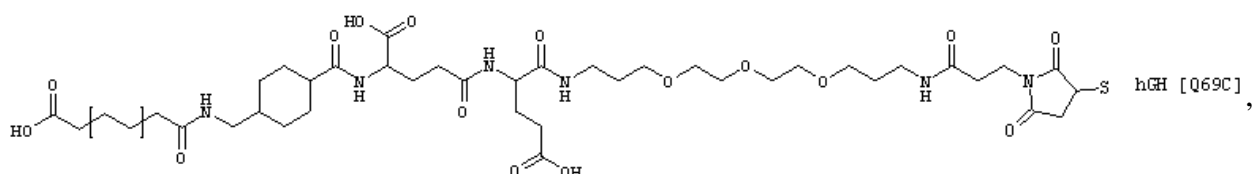
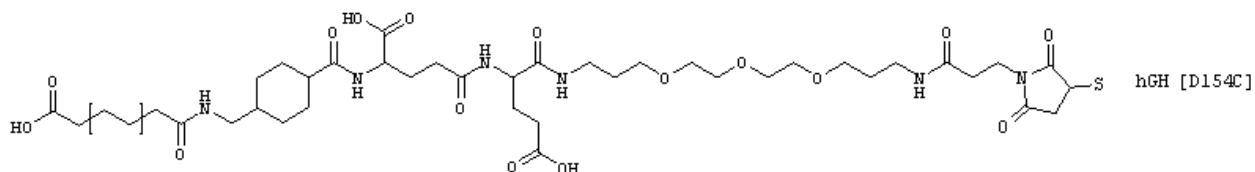
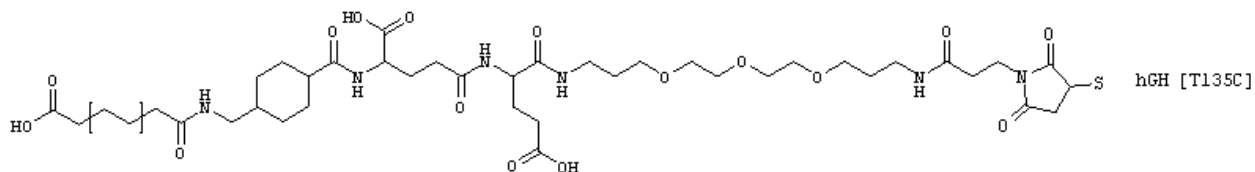
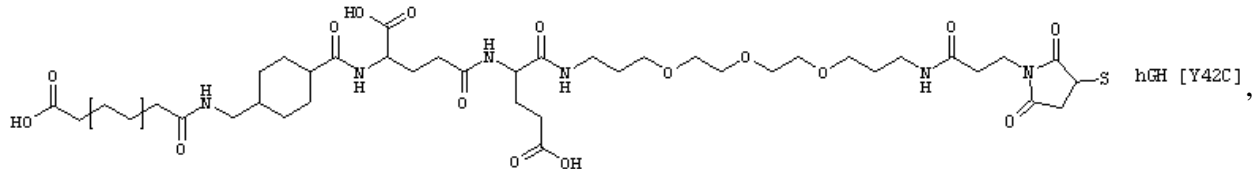
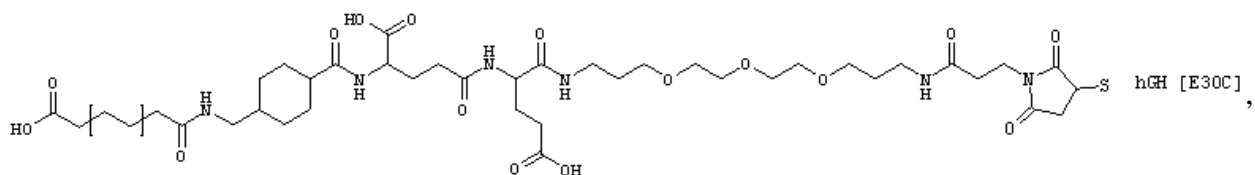
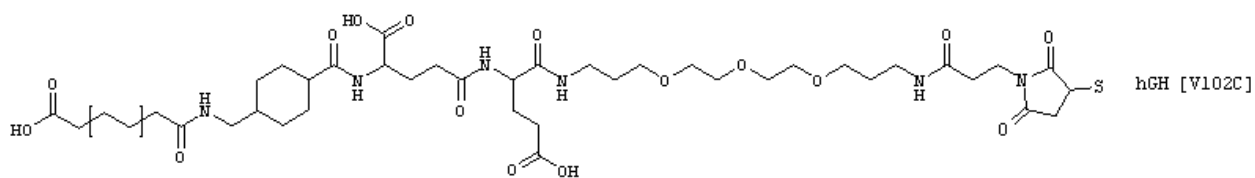
В дополнительном варианте воплощения альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер присоединен к остатку глутамина в положении, соответствующем положению 141 в SEQ ID NO:1.

В дополнительном варианте воплощения альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер присоединен к N-концевому остатку соединения гормона роста, такого как hGH (SEQ ID NO:1).

В дополнительном варианте воплощения альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер присоединен к глутаминовому остатку в положении, соответствующем положению 40, положению 141, и к N-концевому остатку соединения гормона роста, такого как hGH (SEQ ID NO:1).

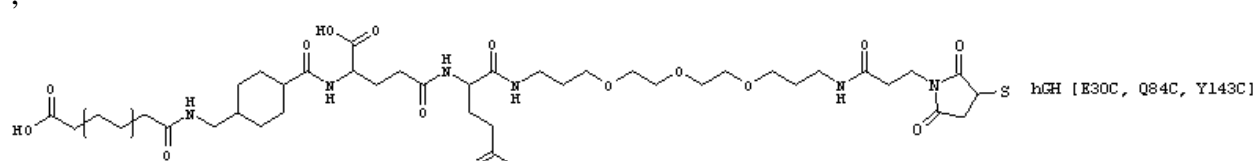
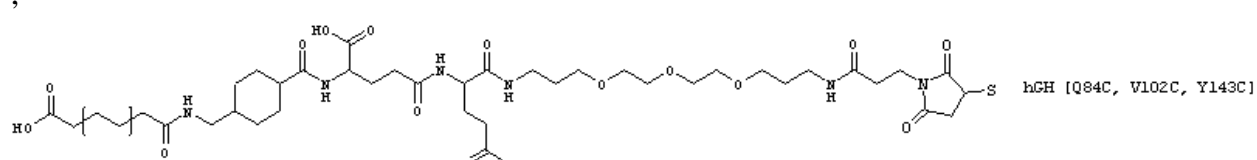
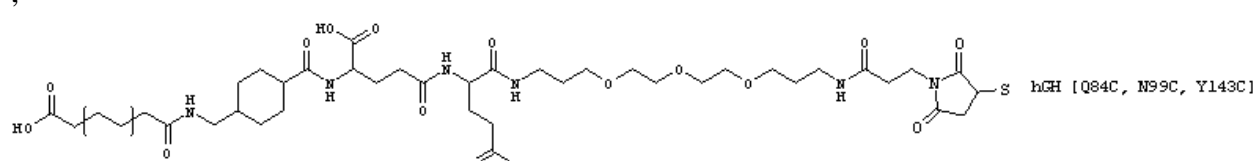
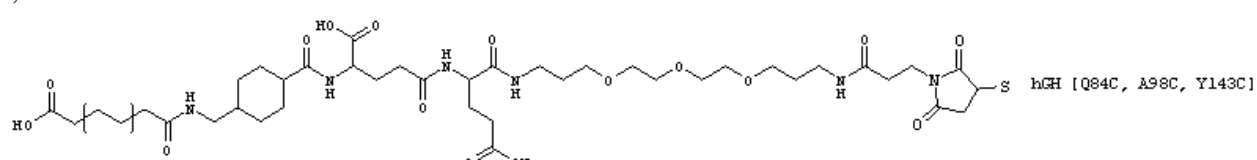
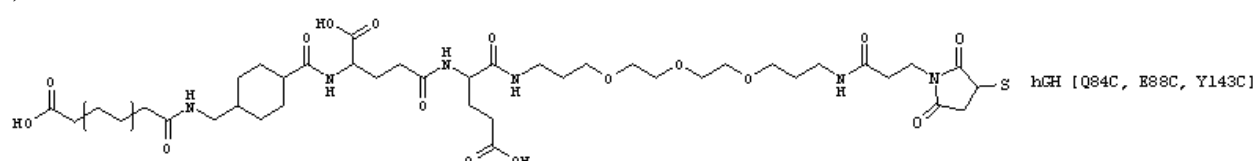
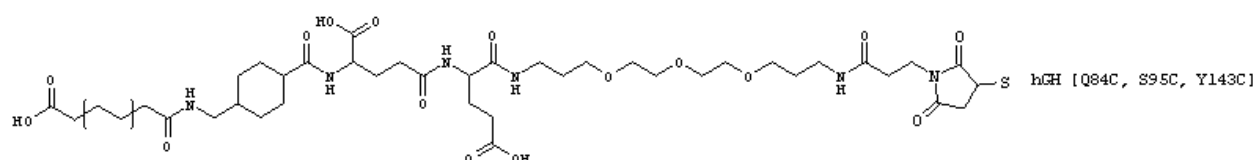
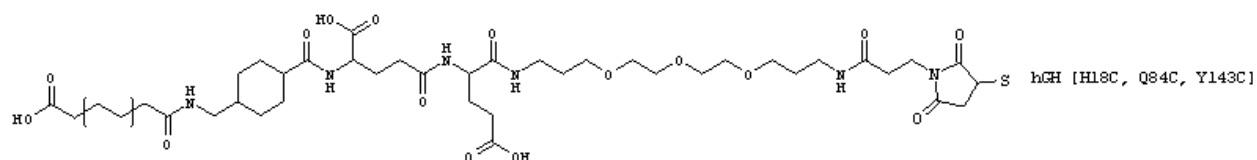
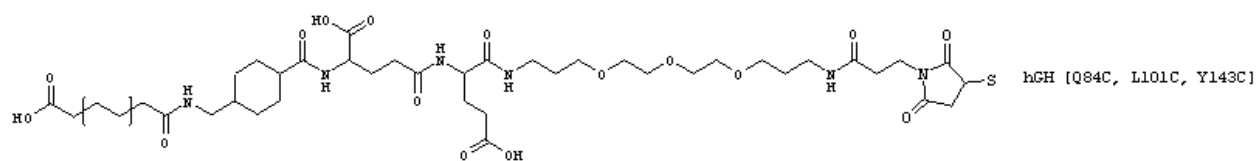
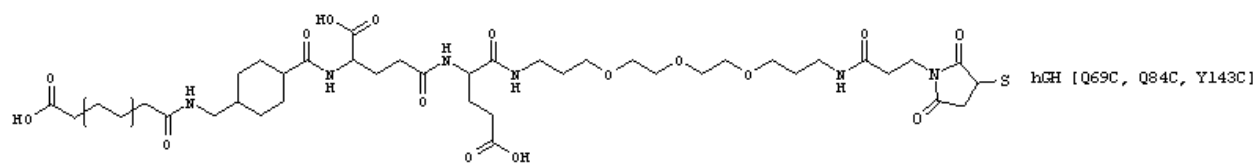
Конъюгаты гормона роста по настоящему изобретению выбраны из:

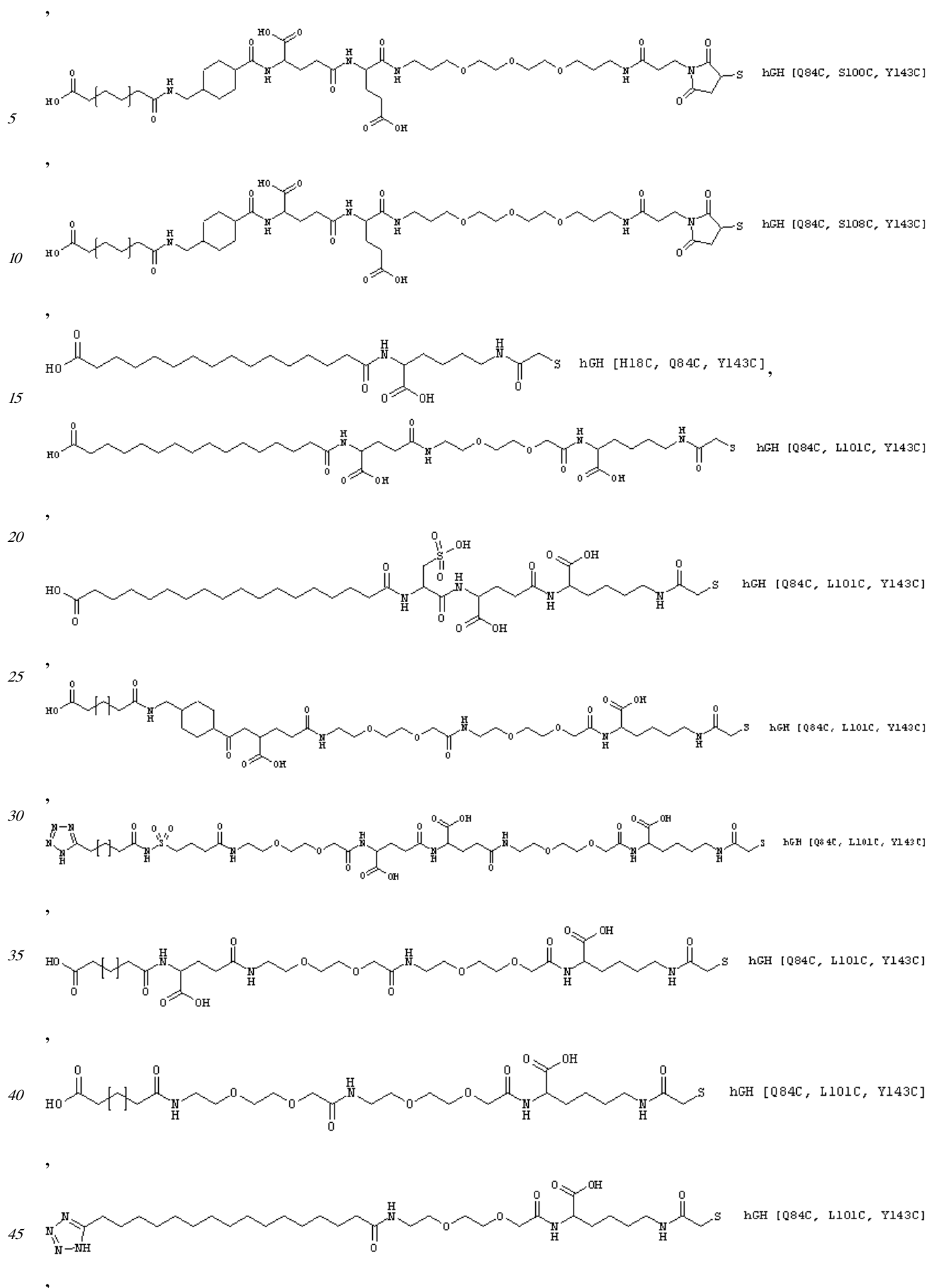


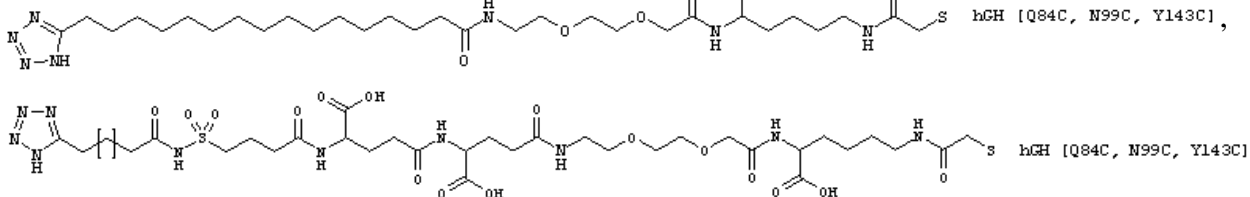
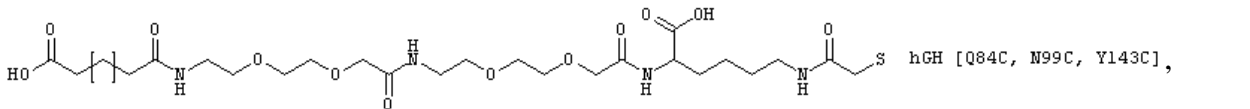
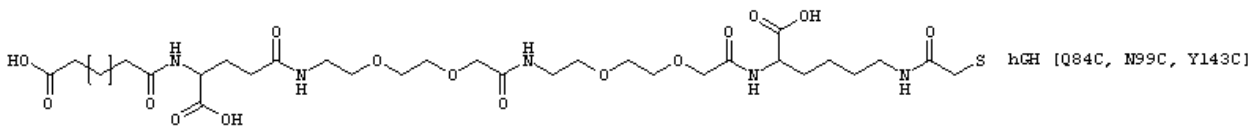
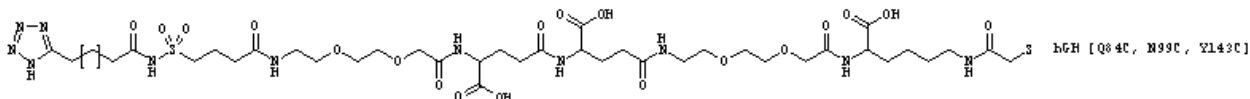
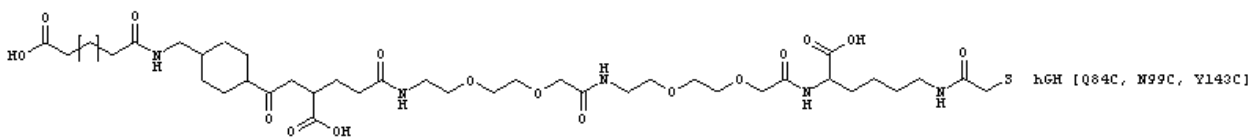
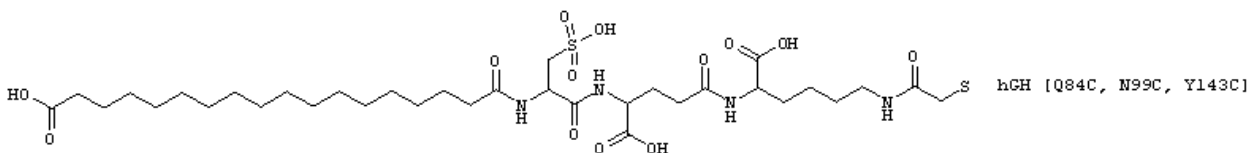
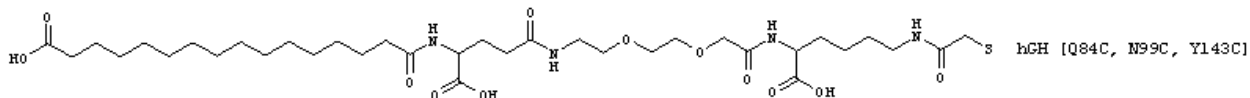
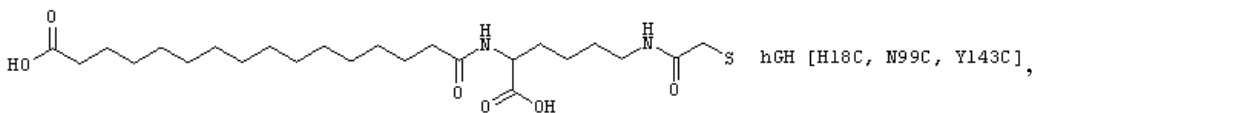
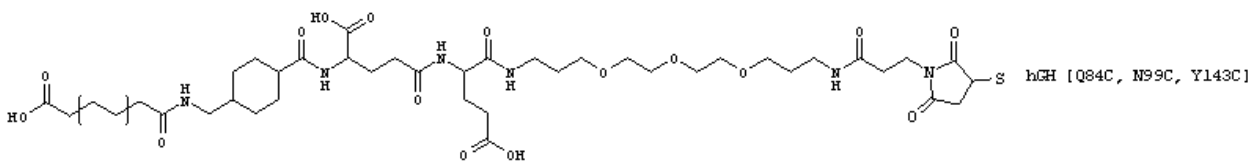
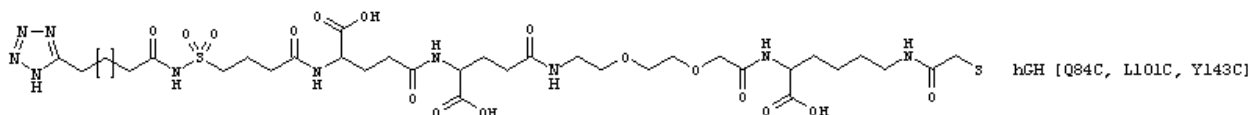












Дополнительной особенностью настоящего изобретения является то, что оно

относится к вариантам гормона роста, таким как соединения гормона роста (GH), описанные в этом документе. Варианты гормона роста могут быть полезны в качестве терапевтических агентов или в качестве промежуточных продуктов при получении конъюгатов гормона роста. Соединения гормона роста могут быть получены с применением рекомбинантных способов, известных специалистам в данной области, или как описано в этом документе. В одном варианте воплощения вариант гормона роста является растворимым.

Дополнительной особенностью изобретения является то, что оно относится к композиции, содержащей вариант гормона роста, такой как описан в этом документе.

В одном варианте воплощения композиция содержит вариант гормона роста, включающий одиночную мутацию с внесением Cys, выбранную из следующей группы: P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C и G126C.

В одном варианте воплощения изобретения вариант гормона роста в составе композиции содержит одиночную мутацию с внесением Cys на N-конце (AK1-8), в спирали 1, в петле 1, в спирали 2, в петле 2 или в спирали 3 соединения гормона роста.

В одном варианте воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в N-конце, при этом мутация представляет собой, например, одну из следующих: P5C, S7C. В одном варианте воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в H1 (соответствующей AK9-35), например, одна из следующих мутаций: D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C. В одном варианте воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в L1 (соответствующей AK36-71), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: K38C, E39C, Y42C, S43C, D47C, P48C, S55, S57C, P59C, S62C, E65C, Q69C или, предпочтительно, одна из следующих мутаций: Y42C, S55C, S57C, S62C, Q69C. В одном варианте воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в H2 (AK72-98), например, одна из следующих мутаций: E88C, Q91C, S95C и A98C. В одном варианте воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в пределах AK99-127. В одном варианте воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в L2 (AK99-106), такая как одна из мутаций N99C, S100C, L101C, V102C и Y103C. В одном варианте воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в H3 (AK107-127), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: D107C, S108C, D112C, Q122C и G126C в составе hGH (SEQ ID NO:1) или в L3 или H4 (соответствуют AK128-154 и AK155-184), при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: E129C, D130C, G131C, P133C, T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, V180C, или в C-конце, при этом мутация является такой как одна из следующих мутаций: E186C G187C и G190C. Если одиночная мутация с внесением Cys присутствует в варианте hGH, эта мутация расположена в положении соответствующих аминокислотных остатков. В других дополнительных вариантах воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в пределах AK93-106 в составе hGH или соответствующих остатков в составе вариантов hGH. В дополнительных указанных вариантах воплощения одиночная мутация с внесением Cys расположена в пределах L2, например в пределах AK99-106 или AK99-104 или соответствующих остатков.

В одном варианте воплощения композиция по изобретению содержит вариант гормона роста, включающий одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительную дисульфидную связь. В одном варианте воплощения одиночная мутация с внесением Cys является любой из описанных выше одиночных мутаций с внесением Cys. В одном варианте воплощения одиночная мутация с внесением Cys в составе GH выбрана ил

любой одной из следующих мутаций: 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 и G190C, например, из любой одной мутации из: P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C и G126C в составе hGH (SEQ ID NO:1) или по соответствующим основаниям. В одном варианте воплощения дополнительная дисульфидная связь выбрана из группы пар мутаций с внесением цистеина: 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/L138C, 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 и/или V185C/S188C. В одном варианте воплощения вариант гормона роста содержит одиночный цистеин и дополнительную дисульфидную связь, выбранную из следующих пар мутаций с внесением цистеина: S57C/Y143C, Q84C/Y143C, S85C/Y143C и/или S85C/S144C.

В одном варианте воплощения вариант гормона роста содержит одиночную мутацию с внесением Cys в L2 и дополнительную дисульфидную связь, которая соединяет петлевой сегмент, например, ограниченный аминокислотными остатками 128-154 (H3), со спиральным сегментом, например, со спиралью В или спиралью 2 (соответствующей АК72-98). В одном варианте воплощения вариант гормона роста содержит сочетание мутаций, выбранных из следующей группы: 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 и C102C/S85C/S144C. В одном варианте воплощения вариант гормона роста содержит сочетание мутаций, выбранных из следующей группы: A98C/Q84C/Y143C, N99C/Q84C/Y143C, S101C/Q84C/Y143C, L101C/Q84C/Y143C и C102C/Q84C/Y143C. В одном варианте воплощения вариант гормона роста содержит мутации L101C, Q84C и Y143C.

Дополнительной особенностью настоящего изобретения является то, что оно относится к конъюгату гормона роста, который содержит соединение гормона роста (GH), связанное с альбумин-связывающим радикалом через гидрофильный спейсер, или к его фармацевтически приемлемой соли для применения в терапии. Дополнительно, в конъюгате гормона роста по настоящему изобретению GH, альбумин-связывающий радикал и гидрофильный спейсер выбраны из любого из вышеуказанных воплощений, в частности, конъюгат гормона роста имеет формулу (I) или (II).

Дополнительной особенностью настоящего изобретения является то, что оно относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат гормона роста, который включает соединение гормона роста (GH), связанное с альбумин-связывающим радикалом через гидрофильный спейсер, или его фармацевтически приемлемую соль, возможно, в сочетании с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом.

Термин «идентичность», как известно специалистам в данной области, означает взаимосвязь между последовательностями двух или нескольких белков, которая определяется путем сравнения этих последовательностей. В данной области «идентичность» также означает степень сходства последовательностей между белками, которая определяется по количеству совпадений между цепочками из двух или более

аминокислотных остатков. «Идентичность» измеряют в процентах идентичных совпадений между более короткой и другими (из двух или нескольких) последовательностями, выровненными с внесением пропусков (если необходимо) с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (т.е., «алгоритмов»). Идентичность родственных белков можно легко вычислить с применением известных способов. Такие способы включают в качестве неограничивающих примеров способы, описанные в литературе: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G, eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo et al., SIAM J. Applied Math., 48, 1073, (1988).

Предпочтительные способы определения идентичности разработаны таким образом, чтобы они обеспечивали максимальное совпадение между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности описаны в компьютерных программах, находящихся в свободном доступе. Предпочтительные компьютерные способы определения идентичности между двумя последовательностями включают пакет программ GCG, в состав которого входит программа GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12, 387, (1984)); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215, 403-410, (1990)). Программа BLASTX находится в свободном доступе и предоставлена Национальным центром биотехнологической информации (NCBI) и другими ресурсами (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., см. выше). Для определения идентичности также можно использовать хорошо известный алгоритм Смита-Уотермана.

Например, используя компьютерный алгоритм GAP (Genetics Computer Group, Университет Висконсина, Мадисон, Висконсин, США), два белка, для которых необходимо определить процент идентичности последовательностей, выравнивают до достижения оптимального совпадения их соответствующих аминокислот («подогнанного перекрытия», согласно определению, данному в алгоритме). Совместно с алгоритмом используют штраф за внесение пропуска (который вычисляется как трехкратное среднее значение по диагонали; «среднее значение по диагонали» - это среднее значение по диагонали в используемой матрице сравнения; «диагональ» - это оценка или число, присвоенное каждому полному совпадению аминокислот конкретной матрицей сравнения) и штраф за продление пропуска (который обычно равен 1/10 от штрафа за внесение пропуска), а также матрицу сравнения, такую как PAM250 или BLOSUM62. Также алгоритмы применяют стандартную матрицу сравнения (см. Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, vol.5, suppl.3, (1978) для информации о матрице сравнения PAM 250; Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89, 10915-10919, (1992) для информации по матрице сравнения BLOSUM 62).

Предпочтительные параметры для сравнения белковых последовательностей включают следующие значения:

Алгоритм: Needleman et al., J. Mol. Biol, 48, 443-453, (1970); матрица сравнения: BLOSUM 62 по: Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10915-10919, (1992); штраф за пропуск: 12; Штраф за длину пропуска: 4; Пороговое значение сходства: 0.

Программу GAP полезно использовать с вышеуказанными параметрами. Вышеупомянутые параметры являются параметрами по умолчанию для сравнения

белков (в том числе - отсутствие штрафа за пропуски на концах) с применением алгоритма GAP.

Соединения по настоящему изобретению обладают улучшенными фармакологическими свойствами, по сравнению с соответствующим неконъюгированным гормоном роста, который также называют исходным соединением. Примеры таких фармакологических свойств включают функциональный период полувыведения *in vivo*, иммуногенность, фильтрацию в почках, защиту от действия протеаз и связывание альбумина.

Термин «функциональный период полувыведения *in vivo*» используется в его стандартном значении, т.е., в значении времени, через которое в организме / целевом органе еще сохраняется 50% биологической активности GH или конъюгата GH, или времени, за которое активность GH или конъюгата GH достигает 50% от ее начального значения. В качестве альтернативы определения функционального периода полувыведения *in vivo* можно определять «период полувыведения из плазмы *in vivo*», т.е., время, через которое в плазме циркулирует 50% GH или конъюгата GH, не выведенного из организма. Определение периода полувыведения из плазмы часто проводить легче, чем определение функционального периода полувыведения, и амплитуда значений периода полувыведения из плазмы обычно является хорошим показателем амплитуды функционального периода полувыведения *in vivo*. Термины, альтернативные термину «период полувыведения из плазмы» включают «период полувыведения из сыворотки», «период полувыведения из циркуляции», «период полувыведения из системы кровообращения», «сывороточный клиренс», «плазменный клиренс» и «период полувыведения в результате клиренса».

Термин «повышенный» при использовании в связи с функциональным периодом полувыведения *in vivo* или периодом полувыведения из плазмы применяется для указания на то, что соответствующий период полувыведения конъюгата GH статистически значимо повышен, по сравнению с этим показателем для исходного GH, при определении в сопоставимых условиях. Например соответствующий период полувыведения может быть повышен по меньшей мере примерно на 25%, например, по меньшей мере примерно на 50%, например, по меньшей мере примерно на 100%, 150%, 200%, 250% или 500%. В одном из вариантов воплощения соединения по настоящему изобретению демонстрируют повышенный период полувыведения, составляющий по меньшей мере примерно 5 ч, предпочтительно - по меньшей мере примерно 24 ч, более предпочтительно - по меньшей мере примерно 72 ч и наиболее предпочтительно - по меньшей мере примерно 7 дней, по сравнению с периодом полувыведения исходного GH.

Измерение периода полувыведения из плазмы *in vivo* можно проводить с применением ряда способов, описанных в литературных источниках. Повышение периода полувыведения из плазмы *in vivo* можно вычислять по снижению клиренса (CL) или повышению среднего времени удержания (MRT). Про конъюгированное GH по настоящему изобретению, для которого показатель CL понижен до уровня менее чем 70%, например менее чем 50%, например менее чем 20%, например менее чем 10% относительно уровня CL исходного GH, согласно определению с применением пригодного способа анализа, говорят, что оно обладает повышенным периодом полувыведения из плазмы *in vivo*. Про конъюгированное GH по настоящему изобретению, для которого показатель среднего времени удержания повышен до уровня более чем 130%, например более чем 150%, например более чем 200%, например более чем 500% относительно уровня среднего времени удержания исходного GH, согласно

определению с применением пригодного способа анализа, говорят, что оно обладает повышенным периодом полувыведения из плазмы *in vivo*. Клиренс и среднее время удержания можно оценить с применением стандартных способов фармакокинетических исследований на пригодных подопытных животных. Выбор подопытного животного для исследования конкретного белка может быть произведен специалистом в данной области. Испытание на человеке, безусловно, проводится на заключительном этапе. Пригодные подопытные животные включают нормальных самцов крыс линии Спрейг-Даули, мышей и яванских макаков. В типичном случае инъекции мышам и крысам проводят в виде разовой подкожной дозы насыщения, тогда как обезьянам инъекции можно делать как в виде разовой подкожной дозы насыщения, так и в виде разовой внутривенной дозы. Вводимое при инъекции количество зависит от подопытного животного. Далее отбирают пробы крови в течение периода от одного до пяти дней, в зависимости от того, что необходимо для оценки показателей клиренса и среднего времени удержания. Анализ проб крови проводят с помощью стандартных методик твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Термин «иммуногенность» соединения означает способность соединения при ведении его человеку вызывать вредный для организма иммунный ответ, как гуморальный, так и клеточный, либо оба эти типа ответа. В субпопуляции людей могут быть представители, которые демонстрируют чувствительность к определенным введенным белкам. Иммуногенность можно измерить, проведя количественную оценку присутствия антител к гормону роста и/или отвечающих на присутствие гормона роста Т-клеток у чувствительного человека с применением стандартных способов, известных специалистам в данной области. В одном из вариантов воплощения конъюгированный ГН по настоящему изобретению демонстрирует снижение иммуногенности у чувствительного пациента по меньшей мере примерно на 10%, предпочтительно - по меньшей мере примерно на 25%, более предпочтительно - по меньшей мере примерно на 40% и наиболее предпочтительно - по меньшей мере примерно на 50% относительно иммуногенности для данного пациента исходного ГН. Подразумевается, что термин «защита от действия протеаз» или «защищенный от действия протеаз» при использовании в этом документе указывает на то, что конъюгированный ГН по настоящему изобретению более устойчив к действию пептидаз или протеаз плазмы, чем исходный ГН. Известно, что ферменты протеазы и пептидазы, присутствующие в плазме, участвуют в деградации циркулирующих белков, таких как, например, циркулирующие пептидные гормоны, такие как гормон роста. Такую защиту от действия протеаз можно измерить с применением способа из примера А, описанного в этом документе.

Гормон роста может быть чувствителен к деградации, например, тромбином, плазмином, субтилизином и химотрипсин-подобной сериновой протеиназой. Способы анализа для оценки деградации с участием этих протеаз описаны в публикации J. Biotech., 65, 183, (1998). В одном из вариантов воплощения скорость гидролиза конъюгата ГН составляет менее чем 70%, например менее чем 40%, например менее чем 10% от этого показателя для исходного ГН.

Наиболее распространенным белковым компонентом циркулирующей крови у млекопитающих является сывороточный альбумин, который в норме присутствует в концентрации примерно 3-4,5 грамма на 100 мл цельной крови. Сывороточный альбумин - это белок крови с массой примерно 65000 Да, который выполняет в системе кровообращения несколько важных функций. Он выполняет функцию переносчика различных органических молекул, присутствующих в крови, основного переносчика

различных метаболитов, таких как жирные кислоты и билирубин, в крови и, благодаря его многочисленности, служит регулятором осмотического давления циркулирующей крови. Период полувыведения сывороточного альбумина составляет более одной недели, и один из способов повышения периодом полувыведения белков из плазмы состоит в их конъюгировании с белком из группы белков, которые связываются с сывороточным альбумином. Способность связывать альбумин можно определить как описано в публикации J. Med. Chem., 43, 1986, (2000) содержание которой включено сюда в качестве ссылки.

Конъюгаты гормона роста формулы (I) или (II) проявляют активность гормона роста и могут сами по себе применяться для лечения заболеваний или состояний, для которых полезно повышение количества циркулирующего гормона роста. В частности, изобретение направлено на создание способа лечения заболеваний, включающих дефицит гормона роста (ДГР); синдром Шерешевского-Тернера; синдром Прадера-Вилли (PWS); Нунан синдром; синдром Дауна; хроническое заболевание почек; ювенильный ревматоидный артрит; муковисцидоз; ВИЧ-инфекция у детей, получающих BMPT лечение (детей с ВИЧ / ВИЧ-ассоциированным синдромом липодистрофии); дети маленького роста, рожденные слишком маленькими для гестационного возраста (SGA); низкий рост у детей, родившихся с очень низкой массой тела при рождении (VLBW), кроме случаев SGA; скелетная дисплазия; гипохондроплазия; ахондроплазия; идиопатический низкий рост (ISS); ДГР у взрослых; переломы длинных костей, таких как большая берцовая кость, малоберцовая кость, бедренная кость, плечевая кость, лучевая кость, локтевая кость, ключи пястные кости, плюсневая кость и фаланги пальцев; переломы губчатых костей, таких как череп, кости запястья и предплюсны; пациенты после хирургической операции на сухожилиях или связках, например, руки, колена или плеча; пациенты, проходившие или проходящие процедуру остеогенеза для вытяжения кости; пациенты после замены тазобедренного сустава или диска, восстановления мениска, артродеза позвонков или имплантации протеза, например, в колено, бедро, плечо, локоть, запястье или челюсть; пациенты, которым были имплантированы материалы, используемые при остеосинтезе, такие как штифты, винты и пластины; пациенты с несросшимися или неправильно сросшимися переломами; пациенты после остеотомии, например, из большой берцовой кости или 1 пальца ноги; пациенты после имплантации трансплантата; дегенерация суставного хряща в колене, вызванная травмой или артритом; остеопороз у больных с синдромом Шерешевского-Тернера; остеопороз у мужчин; взрослые пациенты на постоянном диализе (APCD); ассоциированные с нарушением питания сердечно-сосудистое заболевание у APCD; возвратный случай кахексии у APCD; рак у APCD; хроническое обструктивное заболевание легких у APCD; ВИЧ-инфекция у APCD; пожилые пациенты APCD; хроническое заболевание печени у APCD; синдром усталости у APCD; болезнь Крона; нарушение функции печени; мужчины с ВИЧ-инфекцией; синдром короткой кишки; центральное ожирение; ВИЧ-ассоциированный синдромом липодистрофии (HALS); мужское бесплодие; пациенты после общей плановой операции, алкогольной / наркотической детоксикации или неврологической травмы; старение; ослабленные пожилые люди; остеоартрит; травматические повреждения хряща; эректильная дисфункция; фибромиалгия; расстройства памяти; депрессия; черепно-мозговая травма; субарахноидальное кровоизлияние; очень низкая масса тела при рождении; метаболический синдром; глюкокортикоидная миопатия; низкий рост из-за глюкокортикоидной терапии у детей; способа, включающего введение пациенту, которому это необходимо, терапевтически эффективного количества конъюгата гормона

роста формулы (I) или (II).

Дополнительная особенность изобретения состоит в том, что оно направлено на создание способа ускорения восстановления мышечной ткани, нервной ткани или заживления ран; ускорения или улучшения кровоснабжения поврежденной ткани; или снижения риска развития инфекции в поврежденной ткани, при этом способ включает введение пациенту, которому это необходимо, эффективного количества терапевтически эффективного количества конъюгата гормона роста формулы (I) или (II).

В дополнительном варианте воплощения, изобретение относится к применению конъюгата гормона роста формулы (I) или (II) при изготовлении лекарств для лечения заболеваний, при которых полезно повышение уровня гормона роста в плазме, таких как упомянутые выше заболевания.

Типичная парентеральная доза находится в диапазоне от 10^{-9} мг/кг до примерно 100 мг/кг массы тела на одно введение. Типичные дозы для введения находятся в диапазоне от примерно 0,0000001 до примерно 10 мг/кг массы тела на одно введение. Конкретная величина дозы будет зависеть, например, от симптома, лекарственного средства, частоты и способа введения, пола, возраста и общего состояния субъекта, который получает лечение, природы и степени тяжести заболевания или состояния, которое необходимо лечить, требуемого эффекта лечения и других факторов, очевидных для специалиста в данной области.

Типичной частотой введения является два раза в день, один раз в день, раз в два дня, два раза в неделю, один раз в неделю или с еще более длительными интервалами между введениями доз. Благодаря увеличенным периодам полувыведения химерных белков по настоящему изобретению режим дозирования с длительными интервалами между введениями доз, такой как два раза в неделю, один раз в неделю или с еще более длительными интервалами между введениями доз, является одним из воплощений изобретения.

Лечение многих заболеваний проводится с применением в терапии более чем одного лекарственного средства, вводимых одновременно или последовательно. Следовательно, в объем настоящего изобретения включено применение конъюгата гормона роста формулы (I) или (II) в терапевтических способах лечения одного из вышеуказанных заболеваний в сочетании с одним или несколькими другими терапевтически активными соединениями, обычно применяемыми при лечении указанных заболеваний. Аналогично, в объем настоящего изобретения включено применение конъюгата гормона роста формулы (I) или (II) в сочетании с одним или несколькими другими терапевтически активными соединениями, обычно применяемыми при лечении одного из указанных выше заболеваний, при изготовлении лекарства для указанного заболевания.

Общие способы

Ферментативная конъюгация:

При получении конъюгата гормона роста по настоящему изобретению в типичном случае по меньшей мере одна из ковалентных связей, образованных при получении конъюгата A-W-B-GH формулы (I), получена с применением фермента, как проиллюстрировано в примерах далее. Такой фермент может быть выбран, например, из группы, состоящей из трансглутаминаз, сериновых протеаз и цистеиновых протеаз. В типичном случае указанный фермент является трансглутаминазой. Такая трансглутаминаза может быть выбрана, например, из группы, состоящей из трансглутаминаз микробного происхождения, тканевых трансглутаминаз и фактора XIII и их вариантов. В другом варианте воплощения указанный фермент является цистеиновой протеазой. Конъюгат гормона роста по настоящему изобретению может

быть получен с применением множества различных способов, неограничивающие примеры которых приведены ниже.

Настоящее изобретение также направлено на создание способов получения конъюгатов A-W-B-GH формулы (I).

5 Трансглутаминаза

Как указано выше, по меньшей мере одна из ковалентных связей, образованных при получении конъюгата A-W-B-GH по настоящему изобретению, может быть получена с применением трансглутаминазы. Трансглутаминазы могут включать трансглутаминазы микробного происхождения, например, такие как трансглутаминазы из разных видов *Streptomyces*; *S. mobaraense*, *S. cinnamomeum*, *S. griseocameum* (US 5156956 содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки), *S. lavendulae* (US 5252469 содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки) и *S. ladakanum* (JP 2003/199569 содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки). Другие полезные трансглутаминазы микробного происхождения были выделены из *Bacillus subtilis* (раскрыта в US 5731183, содержание которого включено сюда в качестве ссылки) и из различных представителей миксомицетов. Другими примерами полезных трансглутаминаз микробного происхождения являются трансглутаминазы, описанные в WO 1996/06931 (например, трансглутаминаза из *Bacillus licheniformis*) и WO 1996/22366, содержание которых включено сюда в качестве ссылок. Полезные трансглутаминазы не микробного происхождения включают трансглутаминазу из печени морской свинки и трансглутаминазы из различных морских видов, таких как рыба тай красный, *Pagrus major* (раскрыта в EP 0555649, содержание которого включено сюда в качестве ссылки) и японская устрица *Crassostrea gigas* (раскрыта в US 5736356, содержание которого включено сюда в качестве ссылки). Также могут быть полезны функциональные аналоги и производные этих ферментов.

В типичном случае трансглутаминаза, применяемая в способах по изобретению, является трансглутаминазой микробного происхождения. В одном из вариантов воплощения трансглутаминаза происходит из *S. mobaraense* или является ее вариантом, например, как описано в WO 2007/020290 и WO 2008/020075. В другом варианте воплощения трансглутаминаза происходит из *S. ladakanum* или является ее вариантом, например, как описано в WO 2008/020075.

Конъюгирование GH с A-W-B по настоящему изобретению может быть достигнуто с помощью опосредуемой трансглутаминазой модификации, приводящей к избирательному изменению по специфическим положениям лизина (Lys) или глутамина (Gln) в составе последовательности соединения GH, в зависимости от применяемого субстрата. Применение в качестве субстратов аминов приведет к модификации глутаминов, тогда как применением первичных амидов приведет к модификации лизинов. Последовательность hGH (SEQ ID NO:1) содержит 9 остатков лизина в положениях 38, 41, 70, 115, 140, 145, 158, 168 и 172 и 13 остатков глутамина в положениях 22, 29, 40, 46, 49, 68, 69, 84, 91, 122, 137, 141 и 181, хотя не все эти остатки легко доступны для модификации или пригодны для модификации, поскольку это приведет к снижению эффективности взаимодействия с белками, связывающимися с гормоном роста, следовательно, в результате уменьшится биологическая активность. Выявленная рентгеноструктурным анализом белковая кристаллическая структура комплекса hGH и связывающегося с ним белка (код доступа в PDB: 3NHR) демонстрирует, что по меньшей мере 4 лизина (38, 41, 168 и 172) участвуют в связывании с белком, связывающимся с гормоном роста, и потенциально только один из глутаминов (Gln 46). Это делает глутамины более привлекательной мишенью для избирательного

присоединения альбумин-связывающего линкера. Эти соображения относительно структуры дополнительно подтверждены результатами, резюмированными в публикации N. Chêne et al, *Reprod. Nutr. Develop.* 29, 1-25 (1989), где сделан вывод о том, что показано, что химические модификации, воздействующие на лизины, оказывают негативное влияние на биологическую активность *in vivo* и на емкость связывания соединения GH с рецепторами в печени.

Механизм химической реакции I

Особенностью настоящего изобретения является то, что оно относится к получению конъюгата гормона роста формулы (I), при этом соединение GH обрабатывают модифицирующей свойства группой, применяя химическую реакцию, катализируемую транслугтаминазой. Сначала вносят альдегидную или кетонную группу в ходе двухэтапной реакции, применяя аминоспирты с последующей их обработкой периодатом с образованием альдегидной или кето-группы в результате окислительного расщепления. Неограничивающие примеры аминоспиртов, приводимые исключительно для иллюстрации, включают 1,3-диамино-2-пропанол и 1-амино-2,3-дигидроксипропан.

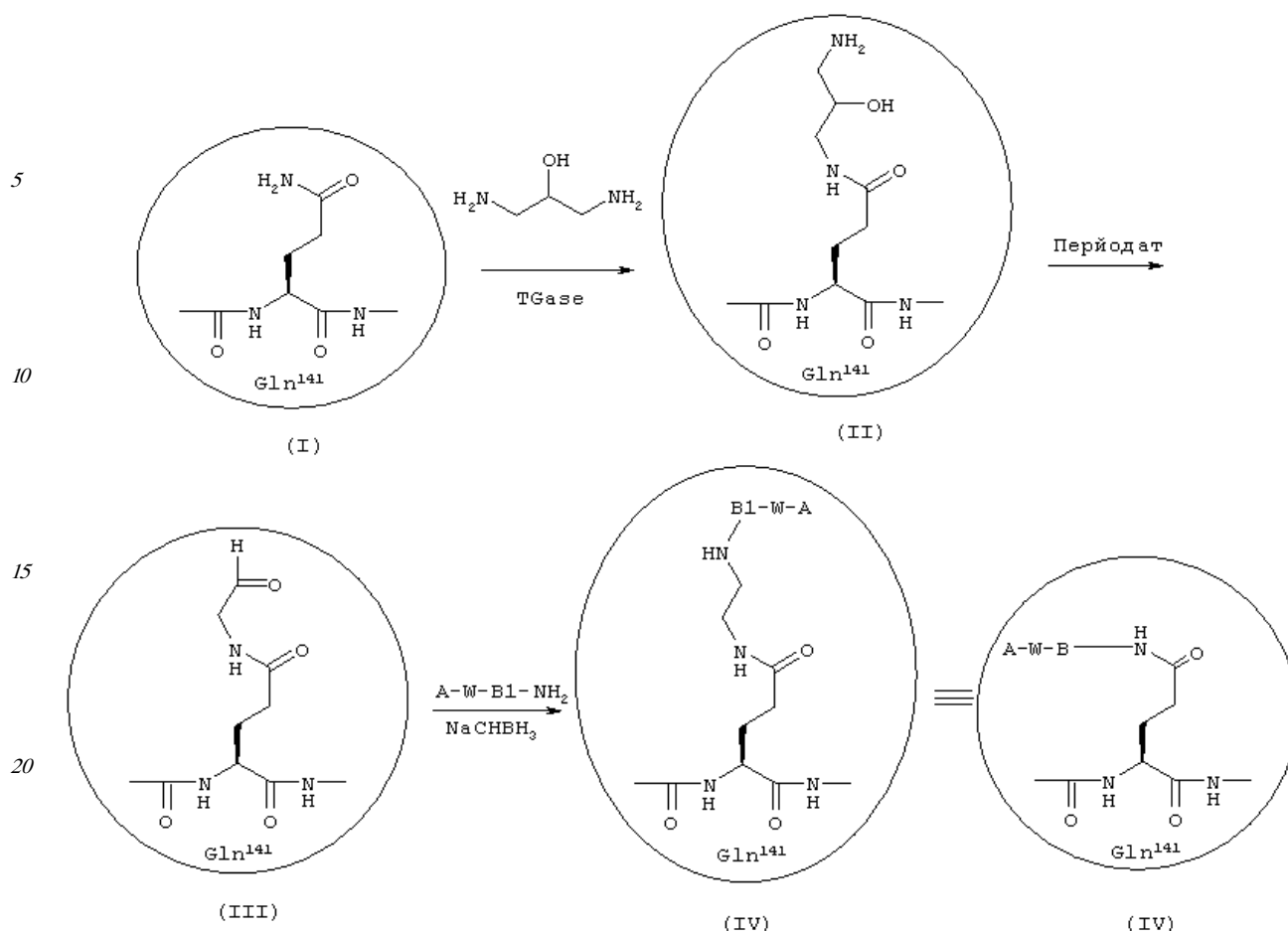
Дополнительной особенностью настоящего изобретения является то, что оно относится к получению конъюгата гормона роста формулы (I), включающему обработку альдегида или кетона, полученных из соединения GH, производным анилина или гетероариламина с модифицирующей свойства группой с получением амина (III→IV).

В одном варианте воплощения альдегид, полученный из соединения GH, обрабатывают производным анилина или гетероариламина с модифицирующей свойства группой.

Подразумевается, что термин «альдегид (или кетон), полученный из соединения GH» или «полученный из соединения GH альдегид или кетон» обозначает соединение GH, к которому была ковалентно присоединена альдегидная или кетонная функциональная группа, или соединение GH, на котором была образована альдегидная или кетонная функциональная группа.

Способы приготовления альдегидов, полученных из соединения GH, таких как соединение (III), изображенное ниже, хорошо известны специалистам в данной области, и любые из этих известных методик можно применять для приготовления альдегида (III), полученного из соединения GH, необходимого для воплощения изобретения, раскрытого в этом документе.

В одном из вариантов воплощения конъюгат A-W-B-GH (IV) получают, как изображено ниже:

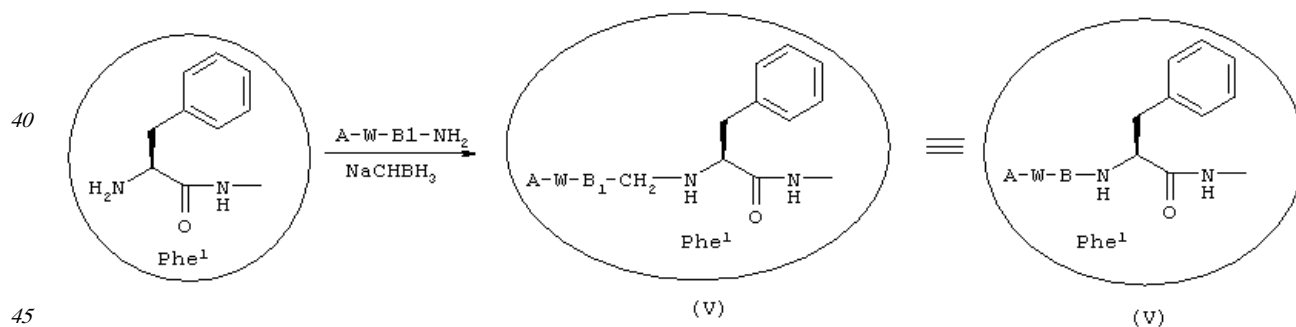


Опосредуемая трансглутаминазой ферментативная реакция с участием GH (I) приводит к модификации Gln в положении 141 и/или 40, давая продукт (II).

Модифицированное GH (II) обрабатывают периодатом для расщепления аминокислота с образованием альдегида, полученного из GH (III). Конъюгирование альдегида, полученного из GH, (III) с A-W-B1-NH₂ происходит по механизму восстановительного алкилирования (III→IV). Реакция восстановительного алкилирования, такая как приведена в этом документе в качестве примера, хорошо известна специалистам в данной области и приводит к образованию соединений GH (IV), модифицированных по положению Gln(141) и/или (40).

Механизм химической реакции II

В одном из вариантов воплощения конъюгат A-W-B-GH получают с применением восстановительного аминирования по N-концу соединения GH, как изображено ниже:

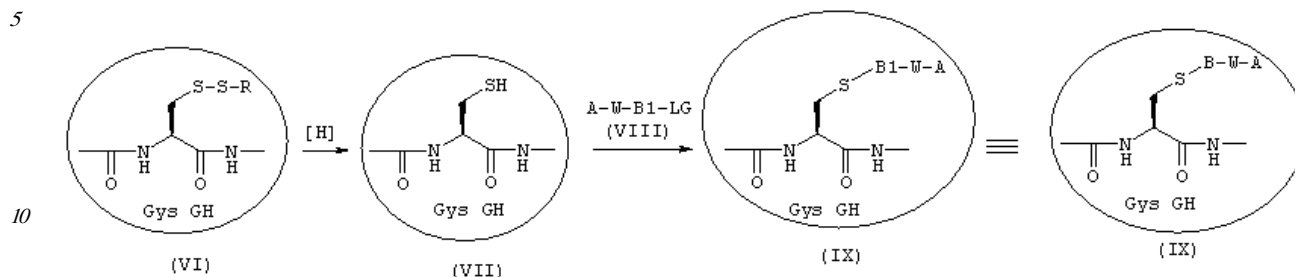


Конъюгирование GH с A-W-B1-CHO происходит по механизму восстановительного алкилирования (GH→V). Реакция восстановительного алкилирования, такая как приведена в качестве примера выше, хорошо известна специалистам в данной области

как способ модификации N-конца соединения GH.

Механизм химической реакции III

В одном из вариантов воплощения конъюгат A-W-B-GH получают, как изображено ниже:



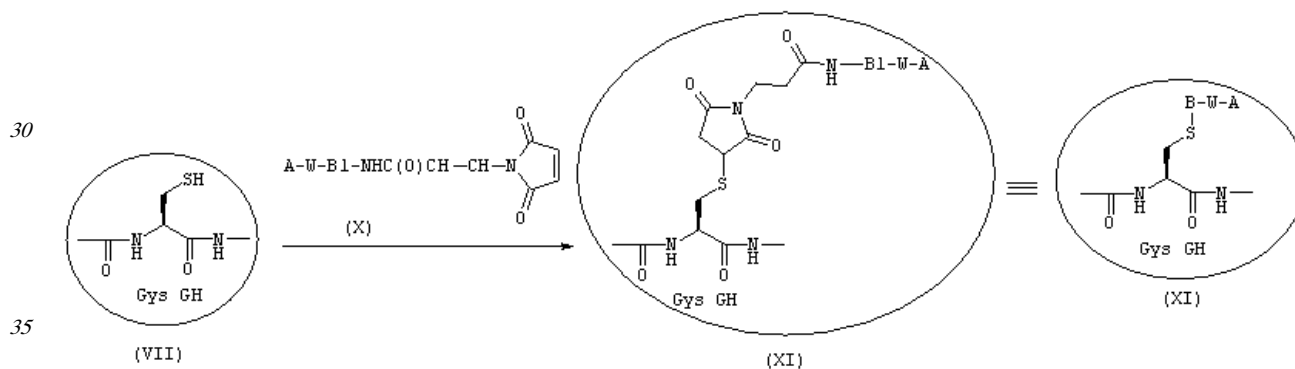
При этом цистеиновый остаток, возможно, защищен образованием смешанного дисульфида (VI) (GH-S-S-R), где R является малым органическим фрагментом.

15 Неограничивающие примеры смешанных дисульфидов могут включать дисульфиды, образованные между цистамином ($R = -CH_2CH_2NH_2$); цистеином ($R = -CH_2CH(C(O)OH)NH_2$); гомоцистеином ($R = -CH_2CH_2CH(C(O)OH)NH_2$) и глутатионом ($R = -CH_2CH(C(O)NH-CH_2C(O)OH)NH-C(O)CH_2CH_2CH(C(O)OH)NH_2$).

20 В процессе получения производного применяют альбумин-связывающий линкер A-W-B1-LG, где LG представляет собой неорганическую уходящую группу, такую как -Cl, -Br, -I, или органическую уходящую группу, такую как мекзилат или тозилат. Конъюгирование GH с A-W-B1-LG происходит по механизму нуклеофильного замещения (VII→IX).

Механизм химической реакции IV

25 В одном из вариантов воплощения конъюгат A-W-B-GH получают, как изображено ниже:



Соединение GH, в котором с Cys снята защитная группа (VII), полученное из (VI) (см. выше) может вступать в реакцию с альбумин-связывающим линкером, несущим в качестве заместителя мальмид, (X) давая в результате конъюгат GH: A-W-B1-NHC(O)CH₂CH₂-пирролидин-2,5-дион-3-GH (XI).

где гидрофильный спейсер B1 имеет формулу:

-X1-X2-X3-X4-

где

45 X₁ является -W₁[(CHR¹)_{I1}-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{I2}-W₃]_{m3}}_{n2}-, X₂ является -[(CHR³)_{I3}-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)_{I4}-W₅]_{m6}}_{n4}-,

X₃ является -[(CHR⁵)_{I5}]_{m7}-, X₄ является ковалентной связью,

И1, И2, И3, И4 и И5 независимо выбраны из 0-16,
 m1, m3, m4, m6 и m7 независимо выбраны из 0-10,
 m2 и m5 независимо выбраны из 0-25,
 n1, n2, n3 и n4 независимо выбраны из 0-16,

R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-C(O)OH$,
 $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-NH-C(=NH)-NH_2$, C_{1-6} -алкила, арила или гетероарила;

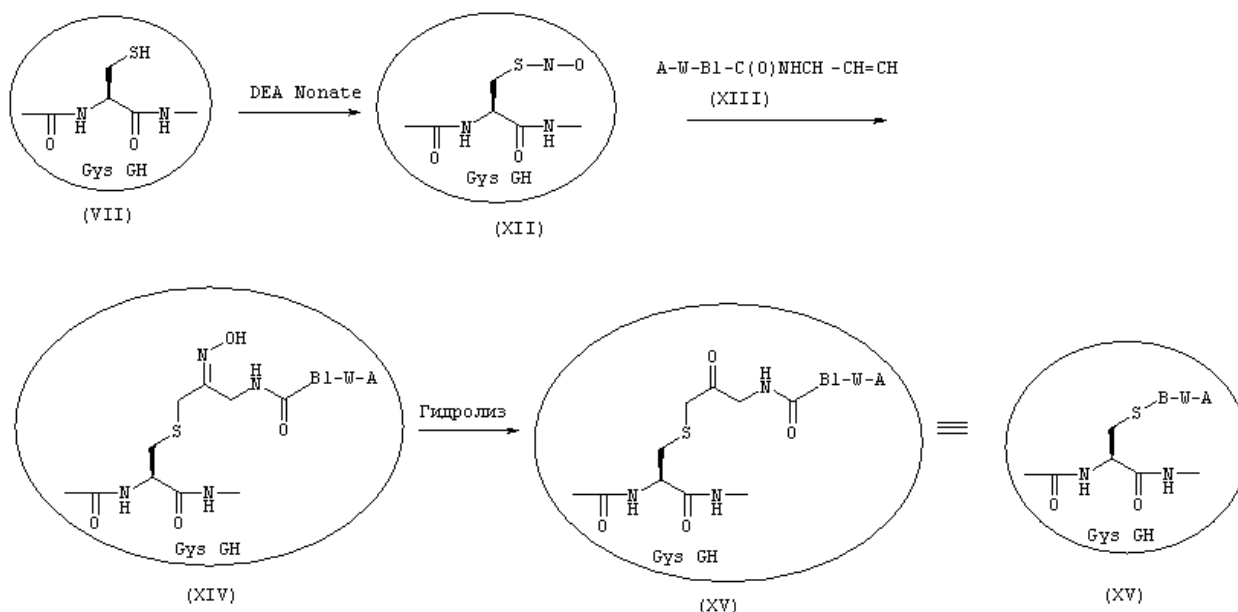
при этом алкильные, арильные и гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-CN$ или $-OH$,

E1 и E2 независимо выбраны из $-O-$, $-NR^6-$, $-N(COR^7)-$ или ковалентной связи; при этом R^6 и R^7 независимо представляют собой водород или C_{1-6} -алкил,

W_1-W_5 независимо выбраны из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s2}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)$ или ковалентной связи; где $s2$ является 0 или 1.

Механизм химической реакции V

В одном из вариантов воплощения конъюгат A-W-B-GH получают, как изображено ниже:



Альбумин-связывающие радикалы могут быть присоединены к производным GH, содержащим одиночные Cys, с применением химической реакции S-нитрозилирования, как описано в WO 2009/024791.

Соединение GH, в котором с Cys снята защитная группа (VII), подвергают S-нитрозилированию, добавляя донор NO, такой как реактив DEA NOate (Sigma Aldrich). Нитрозилированное по одиночному Cys соединение GH (XII) затем реагирует с несущим в качестве заместителя аллиламин альбумин-связывающим фрагментом (XIII), давая оксим (XIV), который после гидролиза дает конъюгат GH:

$A-W-B1-C(O)NHCH_2C(O)CH_2-Cys-GH$ (XV)

где гидрофильный спейсер B1 имеет формулу:

$-X_1-X_2-X_3-X_4-$

где

X_1 является $-W_1[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}$ -, X_2 является $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}$ -,

X_3 является $-[(CHR^5)_{I5}]_{m7}$, X_4 является ковалентной связью,

$I1, I2, I3, I4$ и $I5$ независимо выбраны из 0-16,

$m1, m3, m4, m6$ и $m7$ независимо выбраны из 0-10,

$m2$ и $m5$ независимо выбраны из 0-25,

$n1, n2, n3$ и $n4$ независимо выбраны из 0-16,

R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-NH-C(=NH)-NH_2$, C_{1-6} -алкила, арила или гетероарила; при этом алкильные, арильные и гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-CN$ или $-OH$,

$E1$ и $E2$ независимо выбраны из $-O-$, $-N(R^6)-$, $-N(C(O)R^7)-$ или ковалентной связи; при этом R^6 и R^7 независимо представляют собой водород или C_{1-6} -алкил,

W_1-W_5 независимо выбраны из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s2}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или ковалентной связи; где $s2$ является 0 или 1.

Близкое родство с природным пептидом обычно рассматривается как преимущество при терапевтических вмешательствах, включающих введение вариантов или аналогов этого природного пептида, так как оно сводит к минимуму риск, например, образования каких-либо нежелательных антител.

GH может быть модифицирован по его С-концу с применением карбоксипептидазы Y (EC. 3.4.16.5), и пригодные модифицированные субстраты описаны в WO 2007/093594. После двухэтапной методики, описанной в публикации В. Peschke et al. «C-Terminally PEGylated GH derivatives» Bioorg. Med. Chem. 15, 4382-4395, (2007), при которой

производят ферментативный обмен С-концевого аланина с N^{ϵ} -(4-ацетилбензоил)лизином, следует реакция с производными связывающей альбумин молекулы по изобретению.

Из вышесказанного очевидно, что изобретение дополнительно относится к промежуточному линкеру, применяемому при получении конъюгата A-W-B-GH.

Соединение указанного линкера может быть описано формулой (III):



где A представляет собой альбумин-связывающий радикал, B1 представляет собой гидрофильный спейсер,

W является химической группой, связывающей A и B1, и U представляет собой конъюгирующий фрагмент.

Исходя из вышесказанного, конъюгирующий фрагмент будет меняться в зависимости от применяемого способа конъюгации, что, в конце концов, можно также видеть в конечном соединении hGH (A-W-B-GH).

В дополнительных вариантах воплощения соединения, A-W-B1-U, A и W - как описано в любом из приведенных выше вариантов воплощения.

Если применяют способ, описанный в этом документе как химическая реакция IV, можно дополнительно указать в качестве варианта воплощения соединения A-W-B1-U, где U содержит или состоит из арила, гетероарила, замещенного мальимида или

пирролидин-2,5-диона, такого как $\text{-NHC(O)CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ пирролидин-2,5-дион.

В соответствии с другими вариантами воплощения соединения A-W-B1-U фрагмент U содержит D1-(CH₂)₁₆-D2, где D1 и D2 независимо выбраны из -O-, -N(R6)-, -NC(O)R7- или ковалентной связи; где R6 и R7 независимо представляют собой водород или C₁₋₆-алкил.

Схожим образом, применение химической реакции III, описанной в этом документе выше, потребует линкерных соединений, в которых U содержит или состоит из уходящей группы, такой как Cl, Br, I, -OH, -OS(O)₂Me, -OS(O)₂CF₃ или -OTs, или, предпочтительно, соединений формулы (III), где уходящая группа является соединением галогена, выбранным из Cl, Br и I, предпочтительно Br.

Дополнительные варианты воплощения линкерных соединений (которые применяются в химической реакции V) в соответствии с изобретением заданы формулой (III), где U содержит или состоит из аллиламина (H₂C=CH-CH₂-NH₂), такого как -C(O)NHCH₂-CH=CH₂.

При применении способа, описанного в этом документе как химическая реакция I, в качестве варианта воплощения может быть дополнительно указано соединение A-W-B1-U, где U содержит или состоит из амина (-NH₂).

В соответствии с другими вариантами воплощения U может содержать или состоять из альдегида, такого как -CHO.

Далее, соединения могут быть конъюгированы с любым терапевтическим соединением, которое содержит акцепторную группу, конъюгацию к которой может обеспечивать «U». В предпочтительном варианте воплощения терапевтическое соединение является полипептидом. Пептиды могут естественным образом содержать аминокислотные остатки, которые могут функционировать как акцепторная группа, например, остатки Gln, остатки Phe и остатки Cys. В соответствии с другим вариантом такие аминокислотные остатки могут быть внедрены в соответствующее положение в составе полипептида.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

Еще одной целью является создание фармацевтической композиции, содержащей конъюгат гормона роста по настоящему изобретению, такой как конъюгат гормона роста формулы (I) или (II), который присутствует в концентрации от 10⁻¹⁵ мг/мл до 200 мг/мл, такой как, например, от 10⁻¹⁰ мг/мл до 5 мг/мл, и при этом указанное соединение имеет значение pH от 2,0 до 10,0. Композиция может дополнительно содержать фармацевтические вспомогательные вещества, такие как буферная система, консервант (ы), придающий тоничность агент (или агенты), хелатирующий агент (или агенты), стабилизаторы и поверхностно-активные вещества. В одном из вариантов воплощения изобретения фармацевтическая композиция является водной композицией, т.е., композицией, содержащей воду. Такая композиция в типичном случае представляет собой раствор или суспензию. В дополнительном варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция является родным раствором. Термин «водная композиция» определяется как композиция, содержащая по меньшей мере 50% (об./об.) воды. Схожим образом, термин «водный раствор» определяется как раствор, содержащий по меньшей мере 50% (об./об.) воды, и термин «водная суспензия» определяется как суспензия, содержащая по меньшей мере 50% (об./об.) воды.

В другом варианте воплощения фармацевтическая композиция является лиофилизированной композицией, к которой врач или пациент добавляет растворители

и/или разбавители перед применением.

В другом варианте воплощения фармацевтическая композиция является высушенной композицией (например, лиофилизированной или высушенной распылением), готовой для применения без предварительного растворения.

5 Дополнительной особенностью изобретения является то, что оно относится к фармацевтической композиции, содержащей водный раствор конъюгата гормона роста, такого как конъюгат гормона роста формулы (I) или (II), и буферный раствор, при этом указанный конъюгат GH присутствует в концентрации 0,1-100 мг/мл или выше, и при этом указанная композиция имеет значение pH от примерно 2,0 до примерно 10,0.

10 В еще одном варианте воплощения изобретения значение pH композиции выбрано из списка, состоящего из 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 и 10,0.

15 В дополнительном варианте воплощения изобретения буфер выбран из группы, состоящей из ацетата натрия, карбоната натрия, цитрата, глицилглицина, гистидина, глицина, лизина, аргинина, дигидрофосфата натрия, гидрофосфата двунатрия, фосфата натрия и трис-(гидроксиметил)-аминометана, бицина, трицина, яблочной кислоты, сукцината, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, аспарагиновой
20 кислоты или их смесей. Каждый из этих указанных буферов составляет альтернативный вариант воплощения изобретения.

В дополнительном варианте воплощения композиция также содержит фармацевтически приемлемый консервант. В дополнительном варианте воплощения изобретения консервант выбран из группы, состоящей из фенола, о-крезола, m-крезола,
25 p-крезола, метил-p-гидроксibenзоата, пропил-p-гидроксibenзоата, 2-феноксietанола, бутил-p-гидроксibenзоата, 2-фенилэтанола, бензилового спирта, хлоробутанола и тиомерсала, бронопола, бензойной кислоты, имидомочевины, хлоргексидина, дегидроацетата натрия, хлорокрезола, этил-p-гидроксibenзоата, хлорида бензетония, хлорфенезина (3-(p-хлорфенокси)пропан-1,2-диола) или их смесей. В дополнительном
30 варианте воплощения изобретения консервант присутствует в концентрации от 0,1 мг/мл до 20 мг/мл. В дополнительном варианте воплощения изобретения консервант присутствует в концентрации от 0,1 мг/мл до 5 мг/мл. В дополнительном варианте воплощения изобретения консервант присутствует в концентрации от 5 мг/мл до 10 мг/мл. В дополнительном варианте воплощения изобретения консервант присутствует в
35 концентрации от 10 мг/мл до 20 мг/мл. Каждый из этих указанных консервантов составляет альтернативный вариант воплощения изобретения. Применение консерванта в фармацевтических композициях хорошо известные специалистам в данной области. Для удобства приведена ссылка на: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

40 В дополнительном варианте воплощения композиция также содержит изотонический агент. В дополнительном варианте воплощения изобретения изотонический агент выбран из группы, состоящей из соли (например хлорида натрия), сахара или сахарного спирта, аминокислоты (например L-глицина, L-гистидина, аргинина, лизина, изолейцина, аспарагиновой кислоты, триптофана, треонина), альдита (например глицерола
45 (глицерина), 1,2-пропандиола (пропиленгликоля), 1,3-пропандиола, 1,3-бутандиола) полиэтиленгликоля (например ПЭГ400) или их смесей. Можно применять любой сахар, такой как моно-, ди-, или полисахариды или водорастворимые глюкоканы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу,

трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал и карбоксиметилцеллюлозу-Na. В одном из вариантов воплощения добавка в виде сахара представлена сахарозой. Сахарные спирты определяют как углеводороды C4-C8, содержащие по меньшей мере одну группу -ОН, и они включают, например, маннитол, сорбитол, инозитол, галактитол, дульцитол, ксилитол и арабитол. В одном из вариантов воплощения добавка в виде сахарного спирта представлена маннитолом. Сахара или сахарные спирты, упомянутые выше, можно применять по отдельности или в сочетании. Отсутствует установленное ограничение на применяемое количество, при условии, что сахар или сахарный спирт растворим в жидком препарате и не оказывает нежелательного воздействия на стабилизирующие эффекты, полученные благодаря применению способов по изобретению. В одном из вариантов воплощения концентрация сахара или сахарного спирта составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 150 мг/мл. В дополнительном варианте воплощения изотонический агент присутствует в концентрации от 1 мг/мл до 50 мг/мл. В дополнительном варианте воплощения изобретения изотонический агент присутствует в концентрации от 1 мг/мл до 7 мг/мл. В дополнительном варианте воплощения изобретения изотонический агент присутствует в концентрации от 8 мг/мл до 24 мг/мл. В дополнительном варианте воплощения изобретения изотонический агент присутствует в концентрации от 25 мг/мл до 50 мг/мл. Каждый из этих указанных изотонических агентов составляет альтернативный вариант воплощения изобретения. Применение изотонического агента в фармацевтических композициях хорошо известные специалистам в данной области.

Для удобства приведена ссылка на: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

В дополнительном варианте воплощения композиция также содержит хелатирующий агент. В дополнительном варианте воплощения изобретения хелатирующий агент выбран из солей этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), лимонной кислоты и аспарагиновой кислоты и их смесей. В дополнительном варианте воплощения изобретения хелатирующий агент присутствует в концентрации от 0,1 мг/мл до 5 мг/мл. В дополнительном варианте воплощения изобретения хелатирующий агент присутствует в концентрации от 0,1 мг/мл до 2 мг/мл. В дополнительном варианте воплощения изобретения хелатирующий агент присутствует в концентрации от 2 мг/мл до 5 мг/мл. Каждый из этих указанных хелатирующих агентов составляет альтернативный вариант воплощения изобретения. Применение хелатирующего агента в фармацевтических композициях хорошо известные специалистам в данной области.

Для удобства приведена ссылка на: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

В дополнительном варианте воплощения композиция также содержит стабилизирующий агент. Применение стабилизирующего агента в фармацевтических композициях хорошо известные специалистам в данной области. Для удобства приведена ссылка на: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

В частности, композиции по изобретению являются стабилизированными жидкими фармацевтическими композициями, терапевтически активные компоненты которых включают белок, который, возможно, демонстрирует образование агрегатов во время хранения в составе жидких фармацевтических композиций. Под «образованием агрегатов» подразумевается физическое взаимодействие между белковыми молекулами, которое приводит к образованию олигомеров, которые могут оставаться растворимыми, или крупных видимых невооруженным глазом агрегатов, которые выпадают в осадок

из раствора. Под термином «во время хранения» подразумевается, что жидкая фармацевтическая композиция или композиция не вводится субъекту сразу же после получения. Вместо этого после получения ее упаковывают для хранения, либо в жидкой форме, либо в замороженном состоянии, либо в высушенной форме для дальнейшего восстановления в жидкую форму или в другую форму, пригодную для введения субъекту. Под «высушенной формой» подразумевается, что жидкая фармацевтическая композиция или композиция высушена посредством сублимационной сушки (т.е., лиофилизации; см., например, Williams and Polli, J. Parenteral Sci. Technol., 38, 48-59, (1984)), сушки распылением (см. Masters (1991) in Spray-Drying Handbook (5th ed; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp.491-676; Broadhead et al. Drug Devel. Ind. Pharm. 18, 1169-1206, (1992); и Mumenthaler et al., Pharm. Res., 11, 12-20, (1994)), или сушки воздухом (Carpenter and Crowe, Cryobiology 25, 459-470, (1988) и Roser, Biopharm. 4, 47-53, (1991)). Образование агрегатов из белка во время хранения жидкой фармацевтической композиции может оказывать нежелательное влияние на биологическую активность этого белка, приводя к потере терапевтической эффективности фармацевтической композиции. Кроме того, образование агрегатов может вызывать другие проблемы, такие как закупорка трубок, мембран или насосов, в случае, если содержащую белок фармацевтическую композицию вводят с применением инфузионной системы.

Фармацевтические композиции по изобретению могут дополнительно содержать некоторое количество основной аминокислоты, достаточное для снижения образования агрегатов из белка во время хранения композиции. Под «основной аминокислотой» подразумевается аминокислота или сочетание аминокислот, при этом любая данная аминокислота присутствует либо в форме свободного основания, либо в форме ее соли. В случае применения сочетания аминокислот все эти аминокислоты могут присутствовать в форме свободных оснований, все могут присутствовать в форме своих солей или некоторые из них могут присутствовать в форме свободных оснований, тогда как другие - в форме своих солей. В одном из вариантов воплощения аминокислоты, применяемые при получении композиций по изобретению, - это аминокислоты, несущие заряд на боковой цепочке, такие как аргинин, лизин, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота. Любой стереоизомер (т.е., L- или D-изомер или их смеси) конкретной аминокислоты (метионина, гистидина, аргинина, лизина, изолейцина, аспарагиновой кислоты, триптофана, треонина и их смесей) или сочетания этих стереоизомеров или глицин или органическое основание, включая в качестве неограничивающего примера имидазол, могут присутствовать в фармацевтических композициях по изобретению при условии, что конкретная аминокислота или органическое основание присутствует либо в форме свободного основания, либо в форме своей соли. В одном варианте воплощения применяют L-стереоизомер аминокислоты. В одном из вариантов воплощения применяют L-стереоизомер. Композиции по изобретению также могут быть приготовлены с применением аналогов этих аминокислот. Под «аналогом аминокислоты» подразумевается производное встречающейся в природе аминокислоты, которое вызывает требуемый эффект снижения образования агрегатов белком во время хранения жидких фармацевтических композиций по изобретению. Пригодные аналоги аргинина включают, например, аминогуанидин, орнитин и N-моноэтил-L-аргинин, пригодные аналоги метионина включают этионин и бутионин и пригодные аналоги цистеина включают S-метил-L цистеин. Что касается других аминокислот, аналоги аминокислот включают в состав композиций либо в форме свободного основания, либо в форме их солей. В дополнительном варианте воплощения аминокислоты или аналоги аминокислот применяют в концентрации,

достаточной для предотвращения или замедления агрегации белка.

В дополнительном варианте воплощения метионин (или другие серосодержащие аминокислоты или аналоги аминокислот) могут быть добавлены с целью ингибирования окисления остатков метионина до сульфоксида метионина в случае, когда белок, действующий в качестве терапевтического агента, является белком, содержащим по меньшей мере один остаток метионина, подверженный такому окислению. Под «ингибированием» подразумевается минимальное накопление окисленных форм метионина с течением времени. Ингибирование окисления метионина приводит к общему поддержанию правильной молекулярной формы белка. Может применяться любой стереоизомер метионина (L-или D-изомер) или любые их сочетания. Количество, которое будет добавлено, должно быть количеством, достаточным для ингибирования окисления остатков метионина таким образом, чтобы количество сульфоксида метионина было приемлемым согласно указаниям органов государственного регулирования. В типичном случае это означает, что композиция содержит не более чем от примерно 10% до примерно 30% сульфоксида метионина. В общем случае этого можно достичь добавлением метионина в таком количестве, чтобы соотношение добавленного метионина к остаткам метионина находилось в диапазоне от примерно 1:1 до примерно 1000:1, например, от 10:1 до примерно 100:1.

В дополнительном варианте воплощения изобретения композиция также содержит стабилизирующий агент, выбранный из группы высокомолекулярных полимеров или низкомолекулярных соединений. В дополнительном варианте воплощения изобретения стабилизирующий агент выбран из полиэтиленгликоля (например, ПЭГ3350), поливинилового спирта (PVA), поливинилпирролидона, карбокси- или гидроксицеллюлозы или их производных (например, гидроксипропилцеллюлозы: HPC, HPC-SL, HPC-L и гидроксипропил метилцеллюлозы: HPMS), циклодекстринов, серосодержащих субстанций, таких как монотиоглицерин, тиогликолевая кислота и 2-метилтиоэтанол, и различных солей (например, хлорида натрия). Каждый из этих указанных стабилизирующих агентов составляет альтернативный вариант воплощения изобретения.

Фармацевтические композиции также могут содержать дополнительные стабилизирующие агенты, которые дополнительно усиливают стабильность содержащегося в них терапевтически активного белка. Стабилизирующие агенты, представляющие особый интерес для настоящего изобретения, включают в качестве неограничивающих примеров метионин и ЭДТА, которые защищают белок от окисления метионина, и неионное поверхностно-активное вещество, которое защищает белок от агрегации, связанной с процессами замораживания-оттаивания или механического сдвигового воздействия.

В дополнительном варианте воплощения композиция также содержит поверхностно-активное вещество. В дополнительном варианте воплощения изобретения поверхностно-активное вещество выбрано из детергента, этоксилированного касторового масла, полигликированных глицеридов, ацетилированных моноглицеридов, сложных эфиров сорбитана с жирными кислотами, блок-полимеров полиоксипропилена-полиоксиэтилена (например, полиоксамеров, таких как Плюроник® F68, полуксамер 188 и 407, Тритон X-100), сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана с жирными кислотами, производных полиоксиэтилена и полиэтилена, таких как алкилированные и алкоксилированные производные (твины, например Твин-20, Твин-40, Твин-80 и Brij-35), моноглицеридов или их этоксилированных производных, диглицеридов или их полиоксиэтилен-производных, спиртов, глицерина, пектинов и фосфолипидов (например

фосфатидилсерина, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола, дифосфатидилглицерина и сфингомиелина), производных фосфолипидов (например дипальмитоилфосфатидной кислоты) и лизофосфолипидов (например пальмитоиллизофосфатидил-L-серина и сложных эфиров 1-ацил-sn-глицеро-3-фосфата и этаноламина, холина, серина или треонина) и алкил-, алкоксил- (сложных эфиров алкилов), алкокси- (простых эфиров алкилов)-производных лизофосфатидила и фосфатидилхолинов, например лаурил- и миристоил-производных лизофосфатидилхолина, дипальмитоилфосфатидилхолина, и модификаций полярной группы головки, а именно - холинов, этаноламинов, фосфатидной кислоты, серинов, треонинов, глицеринов, инозитола и положительно заряженных DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, лизофосфатидилсерина и лизофосфатидилтреонина, и глицерофосфолипидов (например, цефалинов), глицерогликолипидов (например, галактопиранозида), сфингогликолипидов (например церамидов, ганглиозидов), додецилфосфохолина, лизолектина куриного яйца, производных фусидовой кислоты (например тауродигидрофусидата натрия и т.д.), длинноцепочечных жирных кислот и их солей C₆-C₁₂ (например олеиновой кислоты и каприловой кислоты), ацилкарнитинов и

производных, N^α-ацилированных производных лизина, аргинина или гистидина, или ацилированных по боковой цепочке производных лизина или аргинина,

N^α-ацилированных производных дипептидов, содержащих любое сочетание лизина, аргинина или гистидина и нейтральной или кислой аминокислоты, N^α-ацилированного производного трипептида, содержащего любое сочетание нейтральной аминокислоты и двух заряженных аминокислот, DSS (докузата натрия, регистрационный номер CAS [577-11-7]), докузата кальция, регистрационный номер CAS [128-49-4]), докузата калия, регистрационный номер CAS [7491-09-0]), ДСН (додецилсульфата натрия или лаурилсульфата натрия), каприлата натрия, хелевой кислоты или ее производных, желчных кислот и их солей и конъюгатов глицина или таурина, урсодезоксихолевой кислоты, холата натрия, дезоксихолата натрия, таурохолата натрия, гликохолата натрия, N-гексадецил-N,N-диметил-3-аммоний-1-пропансульфоната, анионных (алкиларил-сульфонаты) одновалентных сурфактантов, цвиттерионных сурфактантов (например, N-алкил-N,N-диметиламмоний-1-пропансульфонатов, 3-холамида-1-пропилдиметиламмоний-1-пропансульфоната, катионных сурфактантов (оснований четвертичного аммония) (например, бромид цетилтриметиламмония, хлорида цетилпиридиния), неионных сурфактантов (например додецил β-D-глюкопиранозида), полоксаминов (например, Tetronic), которые являются тетрафункциональными блок-сополимерами, полученными путем последовательного добавления пропиленоксида и этиленоксида к этилендиамину, или же сурфактант может быть выбран из группы производных имидазолина, или их смесей. Каждое из этих указанных поверхностно-активных веществ составляет альтернативный вариант воплощения изобретения.

Применение поверхностно-активного вещества в фармацевтических композициях хорошо известны специалистам в данной области. Для удобства приведена ссылка на: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000.

Допускается, что в фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут присутствовать другие ингредиенты. Такие дополнительные ингредиенты могут включать смачивающие агенты, эмульгирующие агенты, антиоксиданты, объемообразующие агенты, модификаторы тоничности, хелатирующие агенты, ионы металлов, маслянистые носители, белки (например, сывороточный альбумин человека, желатин или белки) и цвиттер-ион (например, аминокислоту, такую как бетаин, таурин,

аргинин, глицин, лизин и гистидин). Такие дополнительные ингредиенты, несомненно, не должны оказывать нежелательного воздействия на общую стабильность фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции, содержащие конъюгат гормона роста по настоящему изобретению, можно вводить пациенту, которому необходимо такое лечение, в нескольких областях тела, например, местно, например в области кожи или слизистой оболочки, в областях, которые позволяют исключить этап всасывания, например, путем введения в артерию, в вену, в сердце, и в областях, которые включают этап всасывания, например, при введении в кожу, под кожу, в мышцу или в брюшную полость.

Введение фармацевтических композиций по изобретению может производиться несколькими путями, например лингвально, сублингвально, буккально, в ротовую полость, перорально, в желудок и в кишечник, интраназально, внутрилегочно, например, через бронхиолы и альвеолы, или с помощью сочетания этих путей, эпидермально, дермально, трансдермально, вагинально, ректально, в глаз, например, через слизистую оболочку глаза, через уретру и парентерально пациентам, которым необходимо такое лечение.

Композиции по настоящему изобретению могут быть введены в виде нескольких лекарственных форм, например, в виде растворов, суспензий, эмульсий, микроэмульсий, гетерогенной эмульсии, пен, целебных мазей, паст, пластырей, мазей, таблеток, таблеток с оболочкой, полосканий, капсул, например твердых желатиновых капсул и мягких желатиновых капсул, суппозиториев, ректальных капсул, капель, гелей, распыляемых растворов, порошка, аэрозолей, лекарственных форм для ингаляции, глазных капель, офтальмологических мазей, офтальмологических полосканий, вагинальных суппозиториев, вагинальных колец, вагинальных мазей, инъекционного раствора, растворов, трансформирующихся *in situ*, например, превращающихся *in situ* в гель, затвердевающих *in situ*, осаждающихся *in situ*, кристаллизующихся *in situ*, раствора для инфузии и имплантатов.

Композиция по изобретению может быть дополнительно смешана или присоединена, например, посредством ковалентных, гидрофобных и электростатических взаимодействий, к носителю лекарственного средства, системе доставки лекарственного средства и усовершенствованной системе доставки лекарственного средства с целью дополнительного повышения стабильности конъюгата гормона роста, повышения биодоступности, повышения растворимости, снижения риска нежелательных эффектов, выполнения режима хронотерапии, хорошо известного специалистам в данной области, и повышения степени приверженности пациента терапии или любого сочетания этих свойств. Примеры носителей, систем доставки лекарственного средства и усовершенствованных систем доставки лекарственного средства включают в качестве неограничивающих примеров полимеры, например целлюлозу и ее производные, полисахариды, например декстран и его производные, крахмал и его производные, поливиниловый спирт, акрилатные и метакрилатные полимеры, полимолочную и полигликолевую кислоту и их блок-сополимеры, полиэтиленгликоли, транспортные белки, например альбумин, гели, например системы, превращающиеся в гель при нагревании, такие как блок-сополимерные системы, хорошо известные специалистам в данной области, мицеллы, липосомы, микросферы, наночастицы, жидкие кристаллы и их дисперсии, L2-фаза и ее дисперсии, хорошо известные специалистам в области фазового поведения систем липид-вода, полимерные мицеллы, гетерогенные эмульсии, самоэмульгирующиеся системы, самомикроэмульгирующиеся системы, циклодекстраны и их производные и дендримеры.

Композиции по настоящему изобретению полезны в составе твердых, полутвердых форм, порошков или растворов для легочного введения конъюгата гормона роста с применением, например, ингалятора для дозирования аэрозоля, ингалятора для сухого порошка и небулайзера, все из которых являются устройствами, хорошо известными

5 специалистам в данной области.

Композиции по настоящему изобретению особенно полезны в сочетании с системами доставки лекарственного средства с контролируемым, непрерывным, длительным, с задержкой и замедленным высвобождением. В частности, в качестве неограничивающих примеров, композиции полезны в сочетании с системами для парентерального

10 контролируемого высвобождения и непрерывного высвобождения (при этом обе системы позволяют во много раз снизить количество введений), хорошо известными специалистам в данной области. Еще более предпочтительными являются системы контролируемого высвобождения и непрерывного высвобождения, вводимые подкожно. Не ограничивая объем изобретения, примеры полезных систем и композиций

15 контролируемого высвобождения включают гидрогели, маслянистые гели, жидкие кристаллы, полимерные мицеллы, микросферы, наночастицы,

Способы получения систем контролируемого высвобождения, полезных для композиций по настоящему изобретению, включают в качестве неограничивающих примеров кристаллизацию, конденсацию, ко-кристаллизацию, преципитацию, ко-

20 преципитацию, эмульгирование, диспергирование, гомогенизацию высоким давлением, инкапсуляцию, сушку распылением, микроинкапсуляцию, коацервацию, разделение фаз, испарение растворителя с получением микросфер, экструзию и процессы в сверхкритической жидкости. Приведена общая ссылка на руководства Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, New York, 2000) и Drug and the

25 Pharmaceutical Sciences vol.99: Protein Composition and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, New York, 2000).

Парентеральное введение может проводиться путем подкожной, внутримышечной, интраперитонеальной или внутривенной инъекции с помощью шприца, возможно, шприца-ручки. В соответствии с другим вариантом парентеральное введение может

30 быть осуществлено с применением инфузионного насоса. Дополнительной особенностью является композиция, которая может являться раствором или суспензией для введения конъюгата гормона роста в форме назального или легочного аэрозоля. Еще одной дополнительной особенностью является то, что фармацевтические композиции, содержащие конъюгат гормона роста по изобретению, также могут быть адаптированы

35 к трансдермальному введению, например, посредством безыгольной инъекции или с помощью пластыря, возможно, пластыря для ионтофореза, или к введению через слизистую, например, через буккальную поверхность.

Термин «стабилизированная композиция» относится к композиции с повышенной физической стабильностью, повышенной химической стабильностью или повышенной

40 физической и химической стабильностью.

Термин «физическая стабильность» белковой композиции при использовании в этом документе относится к склонности белка образовывать биологически неактивные и/или нерастворимые агрегаты белков в результате воздействия на белок экстремальных температурных и механических факторов и/или взаимодействия с границами раздела

45 фаз и поверхностями, которые оказывают дестабилизирующее влияние, например, с гидрофобными поверхностями и границами раздела фаз. Физическую стабильность водных белковых композиций оценивают с помощью визуального осмотра и/или измерения мутности после воздействия на композицию, помещенную в пригодные

контейнеры (например, картриджи или флаконы), экстремальных механических или физических факторов (например, взбалтывания) при различных значениях температуры в течение различных периодов времени. Визуальный осмотр композиций проводят в остро сфокусированном свете с темным фоном. Мутность композиций

5 охарактеризовывают с помощью визуальной оценки степени мутности, например, по шкале от 0 до 3 (при этом композиция, в которой мутность отсутствует, соответствует визуальной оценке 0, а композиция, в которой мутность видна при дневном свете, соответствует визуальной оценке 3). Композицию относят к физически нестабильной с точки зрения агрегации белков, если она демонстрирует мутность при визуальной
10 оценке при дневном свете. В соответствии с другим вариантом, мутность композиций можно оценить с помощью простых измерений мутности, хорошо известных специалистам в данной области. Физическую стабильность водных белковых композиций также можно оценить с применением спектроскопического агента или зонда, свидетельствующего о конформационном состоянии белка. Зонд предпочтительно
15 является малой молекулой, которая, предпочтительно, связывается с белком, находящимся в ненативной конформации. Одним из примеров низкомолекулярного спектроскопического зонда для исследования структуры белка является тиюфлавин Т. Тиюфлавин Т - это флуоресцентный краситель, который широко применяется для детекции амилоидных фибрилл. В присутствии фибрилл и, вероятно, также других
20 белковых агрегатов, тиюфлавин Т, связанный с фибрильной формой белка, приобретает новый максимум поглощения при 450 нм и демонстрирует повышенное испускание примерно при 482 нм. Несвязанный тиюфлавин Т в существенной степени лишен флуоресцентных свойств при этих длинах волн.

В качестве зондов для выявления изменений структуры белка с нативной на
25 ненативную могут применяться и другие малые молекулы. Например, зонды типа «гидрофобной заплатки», которые связываются предпочтительно с экспонированными гидрофобными областями белка. В общем случае гидрофобные области скрыты внутри третичной структуры белка, находящегося в нативном состоянии, но становятся экспонированными, когда белок начинает разворачиваться или денатурировать.
30 Примерами таких низкомолекулярных спектроскопических зондов являются ароматические гидрофобные красители, такие как антрацен, акридин, фенантролин или им подобные. Другим типом спектроскопических зондов являются комплексы металлов с аминокислотами, такие как комплексы кобальта с гидрофобными аминокислотами, например с фенилаланином, лейцином, изолейцином, метионином и
35 валином или им подобными.

Термин «химическая стабильность» белковой композиции при использовании в этом документе относится к химическим ковалентным изменениям в структуре белка, ведущим к образованию продуктов химической дегградации с потенциально более низкой биологической активностью и/или потенциально повышенной иммуногенностью, по
40 сравнению с белком, имеющим нативную структуру. Различные продукты химической дегградации могут образовываться в зависимости от типа и природы нативного белка и условий окружающей среды, которые воздействуют на белок. Скорее всего, невозможно полностью избежать потерь, вызванных химической дегградацией, и, как хорошо известно специалистам в данной области, часто при хранении и применении
45 белковой композиции наблюдаются возрастающие количества продуктов химической дегградации. Большинство белков склонны к дезаминированию, процессу, при котором аминокислотная боковая цепочка глутаминового или аспарагинового остатков гидролизуются с образованием свободной карбоксильной группы. Другие пути

деградации включают образование высокомолекулярных продуктов трансформации, при которой две или несколько молекул белка ковалентно связываются друг с другом в результате реакции трансамидации и/или дисульфидных взаимодействий, что ведет к образованию ковалентно связанных димерных, олигомерных и полимерных продуктов деградации (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J.& Manning M.C., Plenum Press, New York 1992). Окисление (например, остатков метионина) можно упомянуть как еще один вариант химической деградации. Химическую стабильность белковой композиции можно оценить, измерив количество продуктов химической деградации в различных временных точках после воздействия различных условий окружающей среды (образование продуктов деградации часто может быть ускорено, например, при повышении температуры). Количество каждого отдельного продукта деградации часто определяют разделением продуктов деградации в зависимости от размеров и/или заряда их молекул с помощью различных хроматографических методик (например, эксклюзионной ВЭЖХ и/или обратнофазовой ВЭЖХ).

Следовательно, как упомянуто выше, термин «стабилизированная композиция» относится к композиции с повышенной физической стабильностью, повышенной химической стабильностью или повышенной физической и химической стабильностью. В общем случае композиция должна быть стабильна в течение периода применения и хранения (при соблюдении рекомендованных условий применения и хранения) до достижения даты, до которой действует срок годности.

В одном из вариантов воплощения изобретения фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат гормона роста формулы (I) или (II), стабильна в течение более чем 6 недель применения и более чем 3 лет хранения.

В другом варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат гормона роста формулы (I) или (II), стабильна в течение более чем 4 недель применения и более чем 3 лет хранения.

В дополнительном варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат гормона роста формулы (I) или (II), стабильна в течение более чем 4 недель применения и более чем двух лет хранения.

В еще одном дополнительном варианте воплощения изобретения фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат гормона роста формулы (I) или (II), стабильна в течение более чем 2 недель применения и более чем двух лет хранения.

Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, процитированные в этом документе, таким образом включены сюда в качестве ссылок и в той же степени, как если бы для каждой ссылки было отдельно и специально указано, что она включена в качестве ссылки и была полностью изложена в этом документе.

Все заголовки и подзаголовки используются в этом документе только для удобства и не должны трактоваться как ограничивающие изобретение каким-либо образом.

Любое сочетание описанных выше элементов во всех возможных их вариантах включено в объем изобретения, если в этом документе не указано иначе или за исключением случаев, когда это явным образом опровергается контекстом.

Термины в единственном и множественном числе при использовании в контексте описания изобретения следует толковать как охватывающие значение термина и в единственном, и во множественном числе (т.е., относящиеся к одному или нескольким копиям объекта), если в этом документе не указано иначе или за исключением случаев, когда это явным образом опровергается контекстом.

Предполагается, что перечисление в этом документе диапазонов значений служит в качестве упрощенного способа указания отдельно каждого конкретного значения,

попадающего в диапазон, если в этом документе не указано иначе, и каждое конкретное значение включено в описание изобретения, как если бы они были отдельно перечислены в этом документе. Если не указано иначе, все точные значения, приведенные в этом документе, являются выражением соответствующих приблизительных значений (например, все приведенные для примера точные значения, относящиеся к конкретному фактору или измерению, можно рассматривать также как значения, указывающие на соответствующий приблизительный показатель, определяемые словом «примерно», где это уместно).

Все описанные в этом документе способы можно осуществлять в любом пригодном порядке, если в этом документе не указано иначе или за исключением случаев, когда это явным образом опровергается контекстом.

Использование любого и всех вместе примеров, или указание средствами языка на то, что приводится пример (например, словами «такой как»), представленный в этом документе, предназначено только для лучшего представления изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если не указано иное. Ни одна формулировка в описании изобретения не должна толковаться как указывающая на какой-либо элемент как имеющий существенное значение для практического применения изобретения, если это не указано явно.

Цитирование и внедрение патентных документов осуществлены в этом документе только для удобства и не отражают какого-либо взгляда на достоверность, патентоспособность и/или исковую силу таких патентных документов.

Неполный список вариантов воплощения, описывающих изобретение, приведен ниже.

Список вариантов воплощений

Воплощение 1: Конъюгат гормона роста, содержащий соединение гормона роста (GH), включающее:

- а) одиночную мутацию с внесением Cys,
 - б) дополнительный дисульфидный мостик или
 - с) одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительный дисульфидный мостик,
- при этом альбумин-связывающий радикал присоединен через гидрофильный спейсер к указанному GH или его фармацевтически приемлемую соль.

2. Конъюгат по воплощению 1, при этом GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью относительно аминокислотной последовательности гормона роста человека (hGH) (SEQ ID NO:1), например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью относительно hGH, или GH является hGH (SEQ ID NO:1).

3. Конъюгат по воплощению 1, при этом GH или конъюгат GH обладает по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH.

4. Конъюгат по любому из воплощений 1-3, при этом альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер связан с GH, содержащим одиночную мутацию с внесением Cys.

5. Конъюгат по воплощению 4, при этом одиночная мутация с внесением Cys расположена в любой из областей, выбранных из N-концевой, H1-, H2-, L2- или H3-областей в составе GH.

6. Конъюгат по воплощению 5, при этом GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys, выбранную из любой из следующих мутаций: Y3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C,

V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C и G126C.

7. Конъюгат по любому из воплощений 1-3, при этом альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер связан с GH, содержащим дополнительный дисульфидный мостик.

5 8. Конъюгат по воплощению 7, где дополнительная дисульфидная связь расположена между петлевым сегментом и спиральным сегментом или внутри петлевого сегмента или между петлевыми сегментами или между спиральными сегментами.

9. Конъюгат по любому из воплощений 7-8, где GH содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один цистеин присутствует в петлевом
10 сегменте, например, в сегменте, ограниченном аминокислотными остатками 128-154 (L3).

10. Конъюгат по любому из воплощений 7-9, где GH содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет петлевой сегмент со спиральным сегментом, например, со спиралью В или H2.

15 11. Конъюгат по любому из воплощений 7-10, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет L3 с H2.

12. Конъюгат по любому из воплощений 7-11, при этом дополнительный дисульфидный мостик расположен между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C,
20 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 и/или V185C/
25 S188C в hGH (SEQ ID NO:1), например, между Q84C/Y143C.

13. Конъюгат по любому из воплощений 1-3, при этом альбумин-связывающий радикал через гидрофильный спейсер связан с GH, содержащим одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительный дисульфидный мостик.

14. Конъюгат по воплощению 13, при этом GH содержит одиночную мутацию с
30 внесением Cys, выбранную из любой из следующих мутаций: 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 и G126C.

15. Конъюгат по любому из воплощений 13-14, где дополнительная дисульфидная связь расположена между петлевым сегментом и спиральным сегментом или внутри
35 петлевого сегмента или между петлевыми сегментами или между спиральными сегментами.

16. Конъюгат по любому из воплощений 13-15, где GH содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один цистеин присутствует в петлевом сегменте, например, в сегменте, ограниченном аминокислотными остатками 128-154
40 (L3).

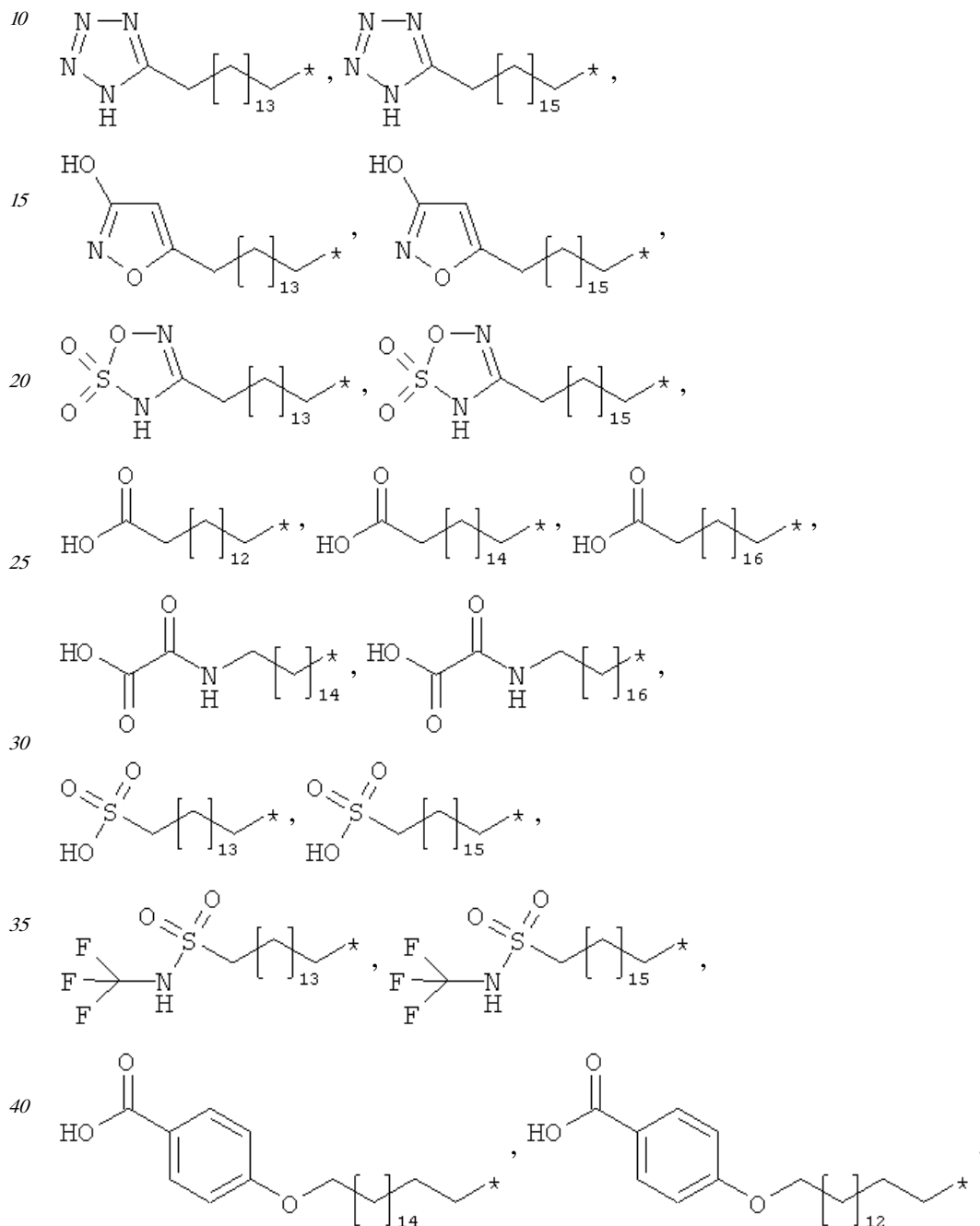
17. Конъюгат по любому из воплощений 13-16, где GH содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет петлевой сегмент со спиральным сегментом, например, со спиралью В или H2.

18. Конъюгат по любому из воплощений 13-16, где дополнительная дисульфидная связь соединяет петлевой сегмент, такой как сегмент, ограниченный аминокислотными
45 остатками 128-154 (L3), со спиралью В или H2.

19. Конъюгат по любому из воплощений 13-18, при этом дополнительный дисульфидный мостик расположен между по меньшей мере одной из пар аминокислот

в положениях, соответствующих 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 и/или V185C/S188C в hGH (SEQ ID NO:1), например, между Q84C/Y143C.

20. Конъюгат по любому из воплощений 1-19, при этом альбумин-связывающий радикал выбран из:



где * указывает место присоединения гидрофильного спейсера через химическую группу, связывающую альбумин-связывающий радикал и гидрофильный спейсер.

21. Конъюгат по любому из воплощений 1-20, при этом химическая группа, соединяющая альбумин-связывающий радикал и гидрофильный спейсер, имеет формулу:

-W₇-Y-, где

Y является -(CH₂)₁₇-C₃₋₁₀-циклоалкил-W₈- или ковалентной связью,

I₇ является 0-6,

W₇ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s3}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s₃ является 0 или 1,

W₈ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s4}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s₄ является 0 или 1.

22. Конъюгат по любому из воплощений 1-21, при этом гидрофильный спейсер имеет формулу:

-X₁-X₂-X₃-X₄-

где

X₁ является -W₁-[(CHR¹)_{I1}-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{I2}-W₃]_{m3}]_{n2}-, X₂ является -[(CHR³)_{I3}-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)_{I4}-W₅]_{m6}]_{n4}-,

X₃ является -[(CHR⁵)_{I5}-W₆]_{m7}-,

X₄ является F-D1-(CH₂)_{I6}-D2-,

I₁, I₂, I₃, I₄, I₅ и I₆ независимо выбраны из 0-16,

m₁, m₃, m₄, m₆ и m₇ независимо выбраны из 0-10,

m₂ и m₅ независимо выбраны из 0-25,

n₁, n₂, n₃ и n₄ независимо выбраны из 0-16,

F является арилом, гетероарилом, пирролидин-2,5-дионом или ковалентной связью, при этом арильные и гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH или C₁₋₆-алкилом,

R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ независимо выбраны из водорода, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -NH-C(=NH)-NH₂, C₁₋₆-алкила, арила или гетероарила; при этом алкильная, арильная и гетероарильная группы, возможно, содержат в качестве заместителей галоген, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN или -OH,

D1, D2, E1 и E2 независимо выбраны из -O-, -N(R⁶)-, -N(C(O)R⁷)- или ковалентной связи; при этом R⁶ и R⁷ независимо представляют собой водород или C₁₋₆-алкил,

W₁-W₅ независимо выбраны из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s2}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s₂ является 0 или 1,

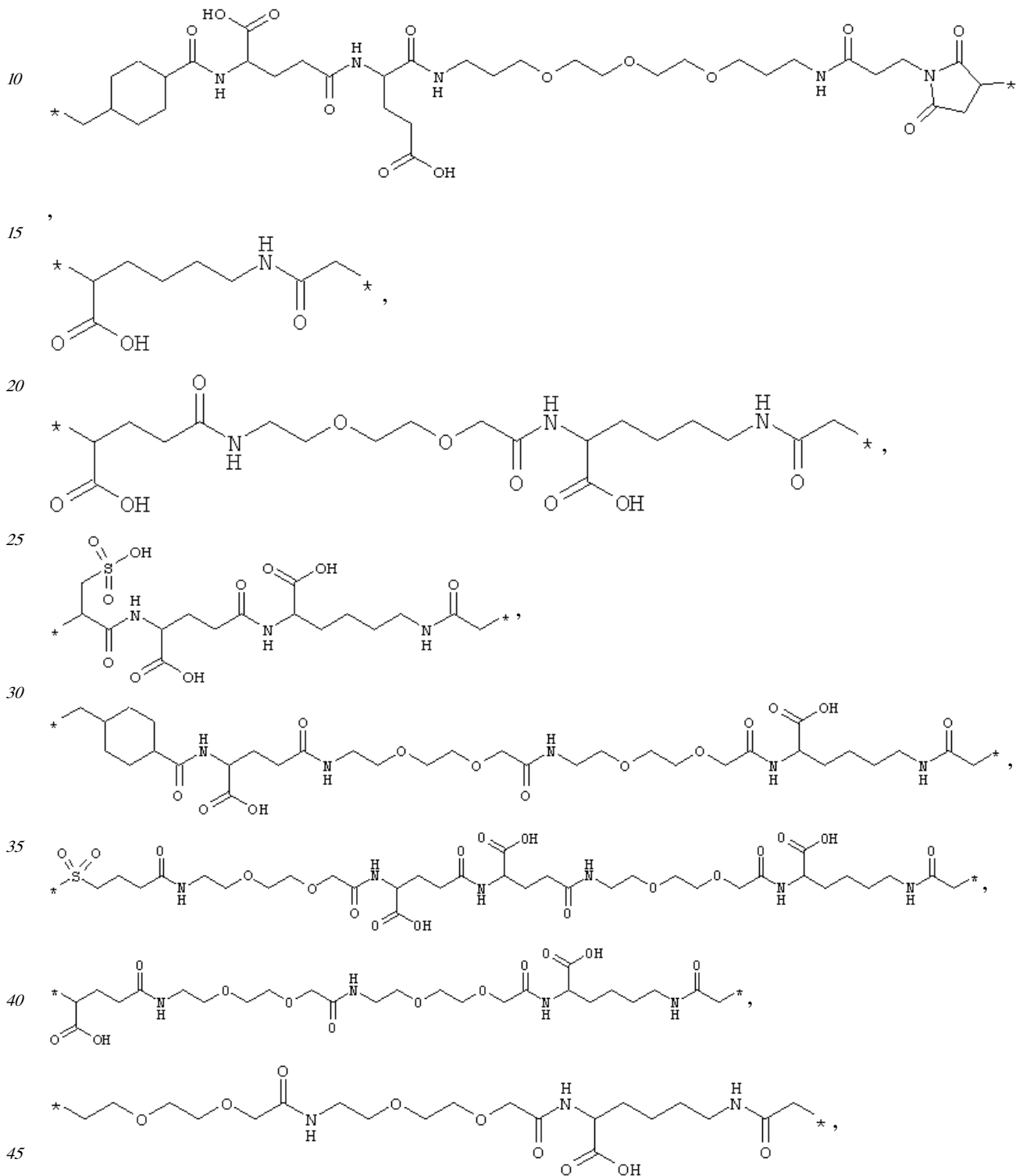
W₆ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s1}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C₁₋₆-алкила, -C(O)NHC₁₋₆-алкила или ковалентной связи; где s₁ является 0 или 1 и C₁₋₆-алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, -NHC(O)CH*CH₂COOH или -NHC(O)CH₂CH*COOH; при этом (*) указывает точку присоединения атома углерода

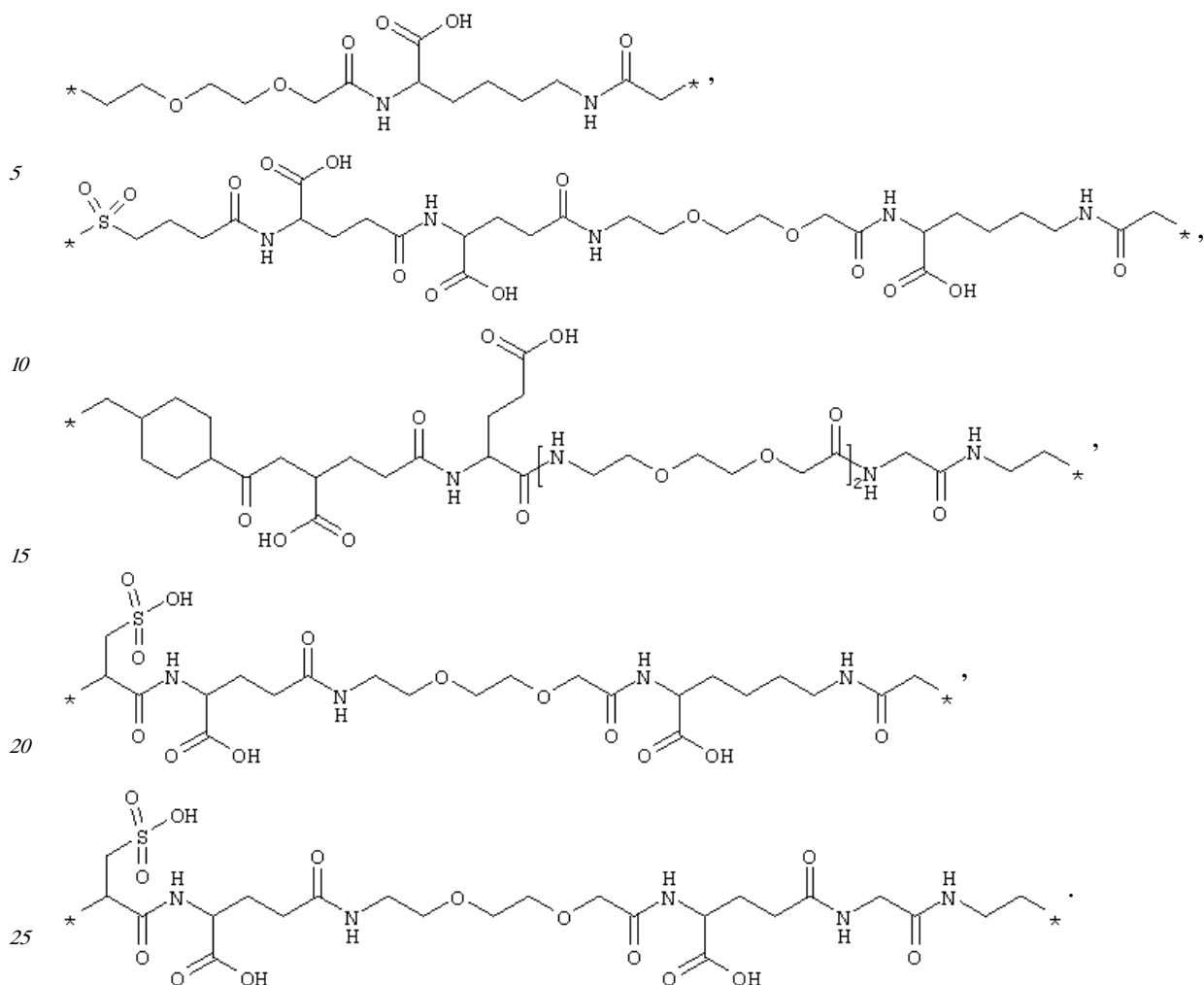
в составе СН к X_4 .

23. Конъюгат по любому из воплощений 1-22, где X_4 является ковалентной связью и W_6 выбран из пирролидин-2,5-диона, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ или

$-NHC(O)CH_2CH^*COOH$; где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе СН к GH .

24. Конъюгат по воплощению 22, при этом гидрофильный спейсер выбран из:





25. Конъюгат гормона роста, при этом конъюгат гормона роста имеет формулу (I):



где

GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее одиночную мутацию с внесением Cys,

В представляет собой гидрофильный спейсер, соединенный с атомом серы в составе Cys, внесенного в результате мутации,

W является химической группой, соединяющей A и B, и

A представляет собой альбумин-связывающий радикал; и его фармацевтически приемлемые соли.

26. Конъюгат по воплощению 25, при этом GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью относительно аминокислотной последовательности гормона роста человека (DGH) (SEQ ID NO:1), например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью относительно hGH, или GH является hGH (SEQ ID NO:1).

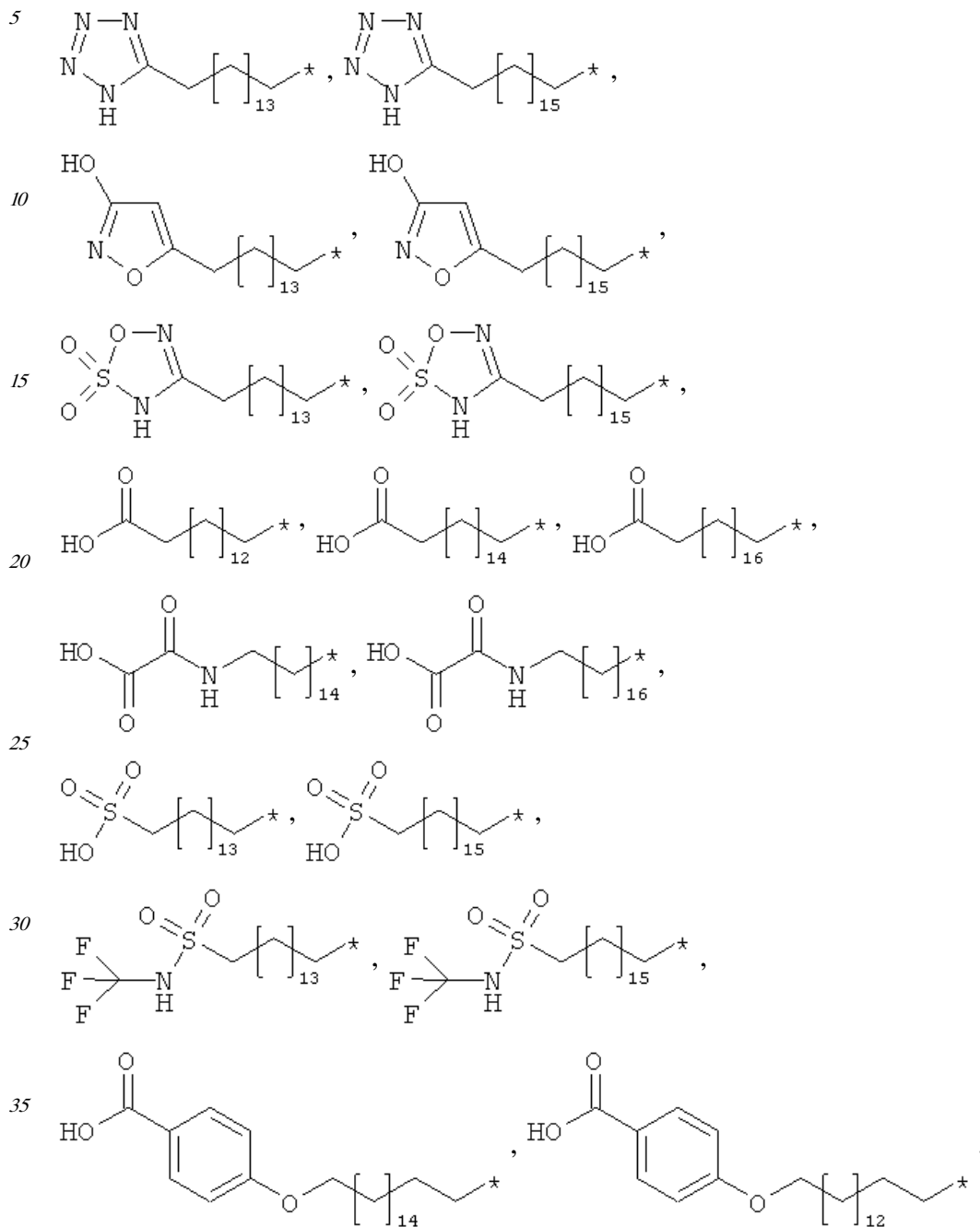
27. Конъюгат по воплощению 25, при этом GH или конъюгат GH обладает по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH.

28. Конъюгат по любому из воплощений 25-27, при этом одиночная мутация с внесением Cys расположена в любой из областей, выбранных из N-концевой, H1-, H2-, L2- или H3-областей в составе GH.

29. Конъюгат по любому из воплощений 25-28, где GH содержит одиночную мутацию

с внесением Cys, выбранную из любой из следующих мутаций: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C и G126C.

30. Конъюгат по любому из воплощений 25-29, при этом А выбран из:



где * указывает место присоединения к В через W. 31. Конъюгат по любому из воплощений 25-30, при этом W имеет формулу:

-W₇-Y-, где

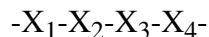
Y является -(CH₂)₁₇-C₃₋₁₀-циклоалкил-W₈- или ковалентной связью,

17 является 0-6,

W₇ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)₃-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s₃ является 0 или 1,

W₈ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s4}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s₄ является 0 или 1.

32. Конъюгат по любому из воплощений 25-31, при этом В имеет формулу:



где X₁ является -W₁-[(CHR¹)_{I1}-W₂]_{m1}-{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR²)_{I2}-W₃]_{m3}}_{n2}-, X₂ является -[(CHR³)_{I3}-W₄]_{m4}-{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}[(CHR⁴)_{I4}-W₅]_{m6}}_{n4}-,

X₃ является -[(CHR₅)_{I5}-W₆]_{m7}-,

X₄ является F-D1-(CH₂)_{I6}-D2-,

I1, I2, I3, I4, I5 и I6 независимо выбраны из 0-16,

m1, m3, m4, m6 и m7 независимо выбраны из 0-10,

m2 и m5 независимо выбраны из 0-25,

n1, n2, n3 и n4 независимо выбраны из 0-16,

F является арилом, гетероарилом, пирролидин-2,5-дионом или ковалентной связью, при этом арильные и гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, -CN, -OH, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH или C₁₋₆-алкилом,

R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ независимо выбраны из водорода, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -NH-C(=NH)-NH₂, C₁₋₆-алкила, арила или гетероарила; при этом алкильная, арильная и гетероарильная группы, возможно, содержат в качестве заместителей галоген, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)OH, -S(O)₂OH, -CN или -OH,

D1, D2, E1 и E2 независимо выбраны из -O-, -N(R⁶)-, -N(C(O)R⁷)- или ковалентной связи; при этом R⁶ и R⁷ независимо представляют собой водород или C₁₋₆-алкил,

W₁-W₅ независимо выбраны из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s2}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s₂ является 0 или 1,

W₆ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s1}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)C₁₋₆-алкила, -C(o)NHC₁₋₆-алкила или ковалентной связи; где s₁ является 0 или 1 и C₁₋₆-алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, -NHC(O)CH*CH₂COOH или -NHC(O)CH₂CH*COOH; при этом (*) указывает точку присоединения атома углерода в составе CH к X₄.

33. Конъюгат по любому из воплощений 25-32, где:

I1, I2, I3, I4, I5 и I6 независимо являются 0-6,

m1, m3, m4, m6 и m7 независимо являются 0-6,

m2 и m5 независимо являются 0-10 и

n1, n2, n3 и n4 независимо являются 0-10.

34. Конъюгат по любому из воплощений 25-33, при этом D1 и D2 независимо выбраны из -O- или -N(R⁶)- или ковалентной связи.

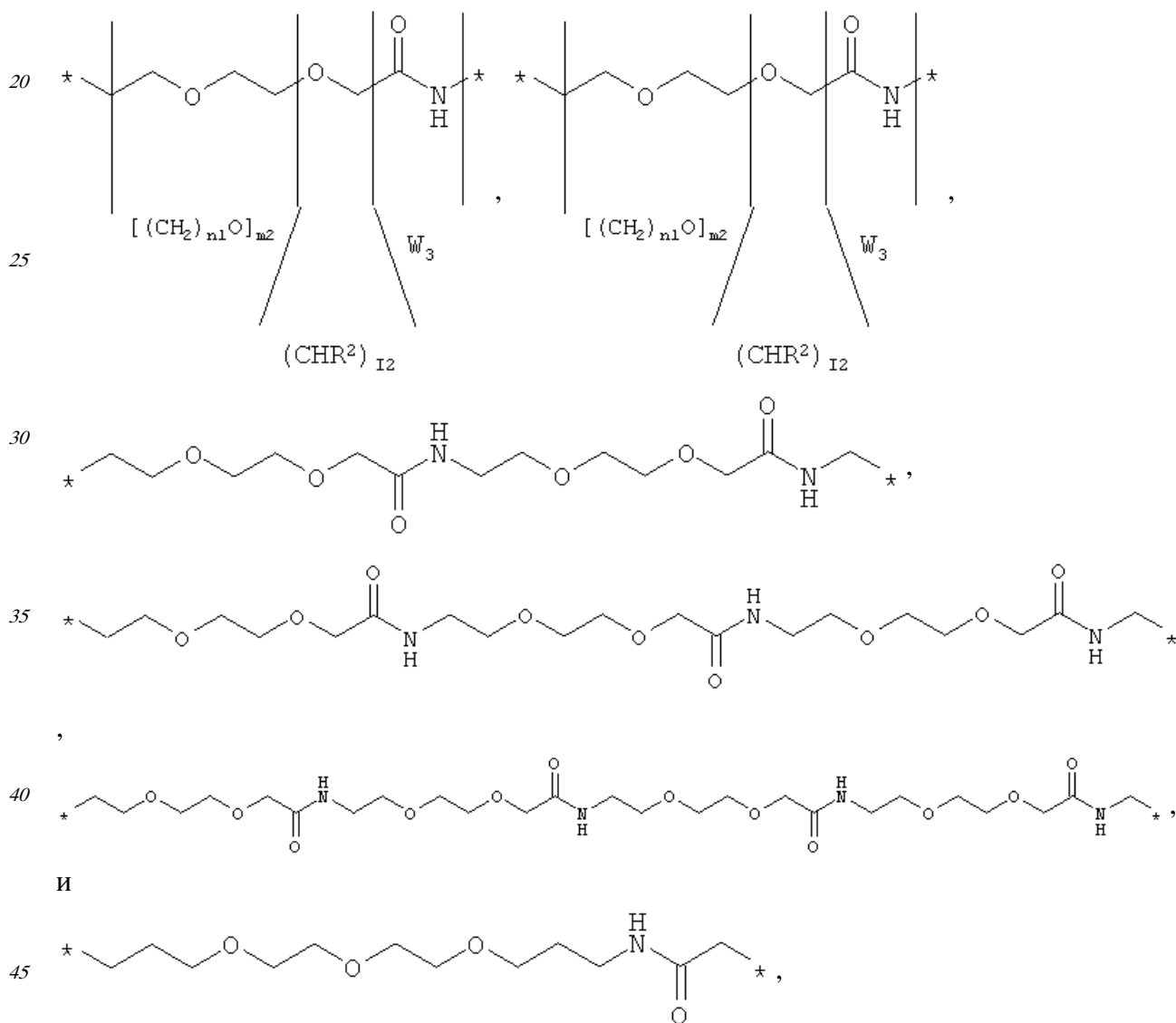
35. Конъюгат по любому из воплощений 25-34, при этом E1 и E2 независимо выбраны

из -O- или -N(R⁶)- или ковалентной связи.

36. Конъюгат по любому из воплощений 25-35, где W₁-W₈ независимо выбраны из группы, состоящей из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)
 5 -, -NHC(O)C₁₋₆-алкила, -C(O)NHC₁₋₆-алкила или ковалентной связи; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, -NHC(O)CH*CH₂COOH или -NHC(O)CH₂CH*COOH; где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к X₄.

37. Конъюгат по любому из воплощений 25-36, при этом R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ независимо
 10 выбраны из водорода, -C(O)OH, -C(O)NH₂, -S(O)₂OH или C₁₋₆-алкила; при этом C₁₋₆-алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей -C(O)OH, -C(O)NH₂ или -S(O)₂OH.

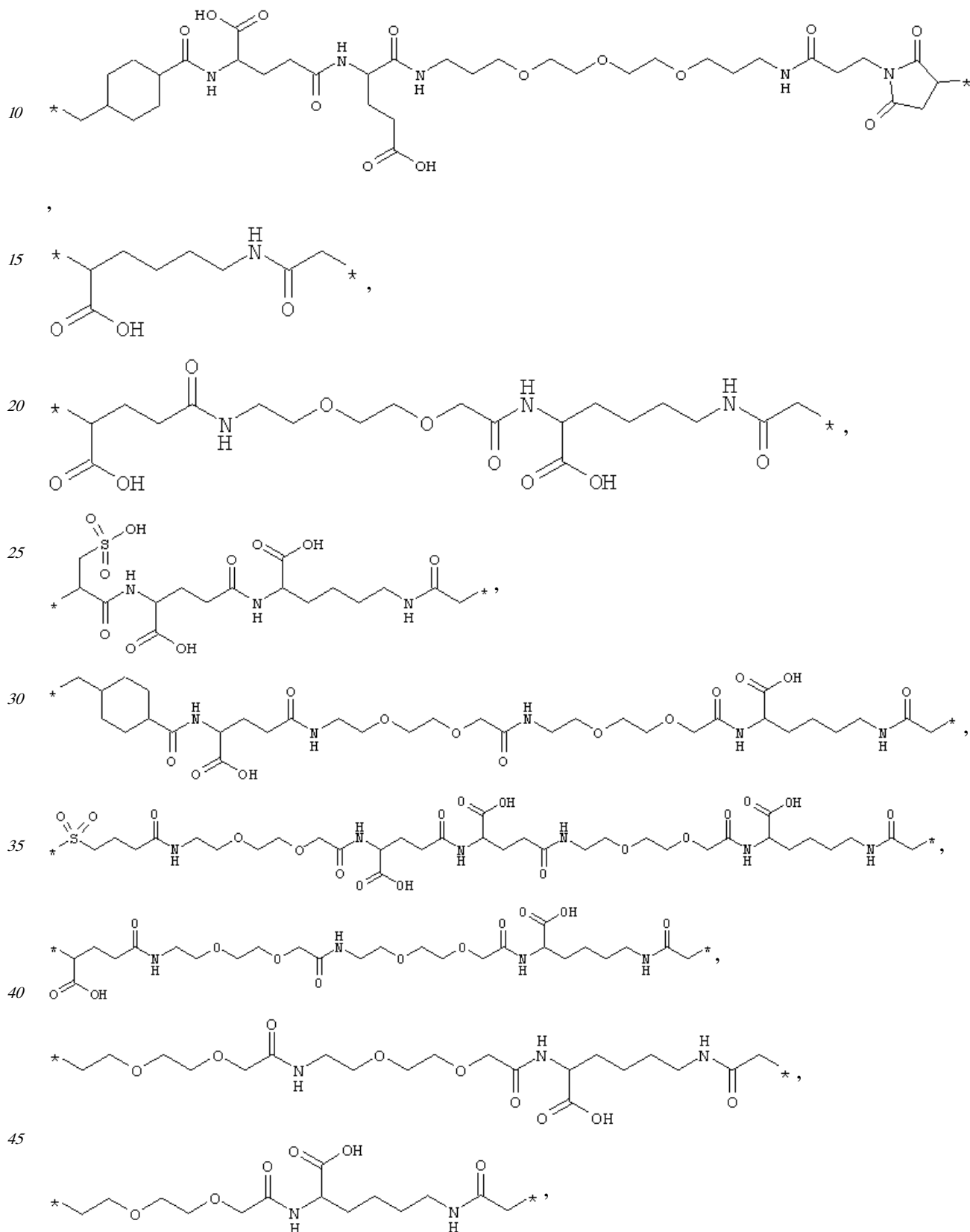
38. Конъюгат по любому из воплощений 25-37, при этом -{[(CH₂)_{n1}E1]_{m2}-[
 15 (CHR²)_{I2}-W₃]_{m3}}_{n2}- и -{[(CH₂)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR⁴)_{I4}-W₅]_{m6}}_{n4}-, где E1 и E2 являются -O-,
 выбраны из:

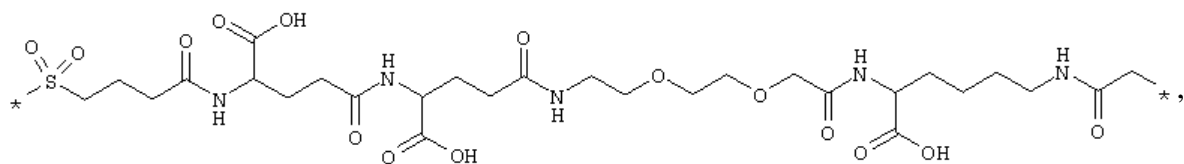


при этом предполагается, что * указывает точку присоединения, т.е., свободную связь.

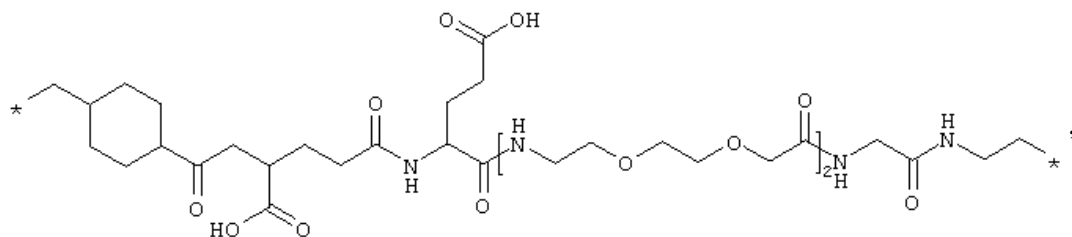
39. Конъюгат по любому из воплощений 25-38, где X_4 является ковалентной связью и W_6 выбран из пирролидин-2,5-диона, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ или $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$; где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к GH .

40. Конъюгат по любому из воплощений 25-39, при этом В выбран из:

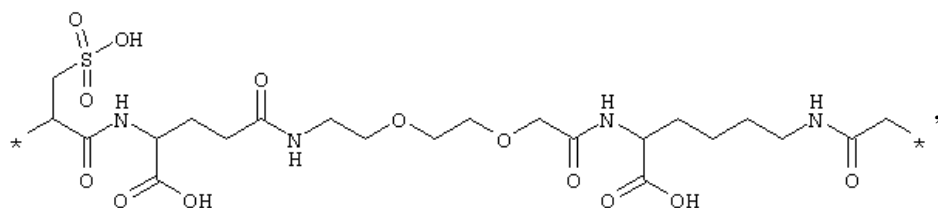




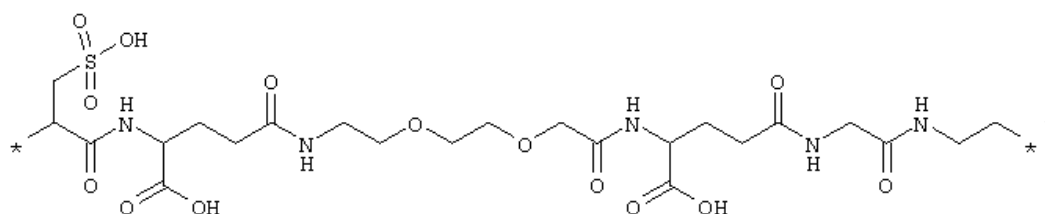
5



10



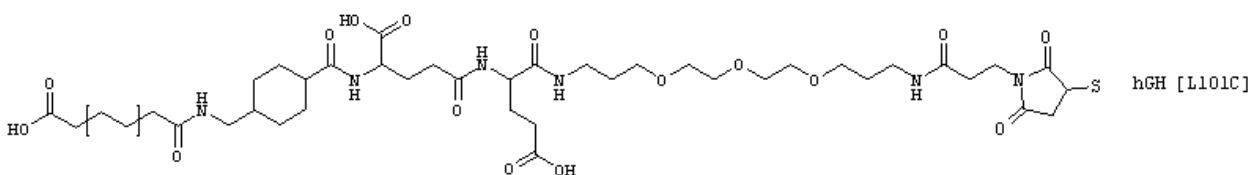
15



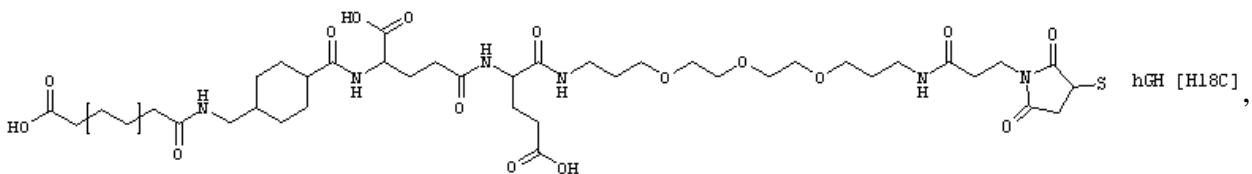
20

41. Конъюгат по любому из воплощений 25-40, при этом указанное соединение
выбрано из:

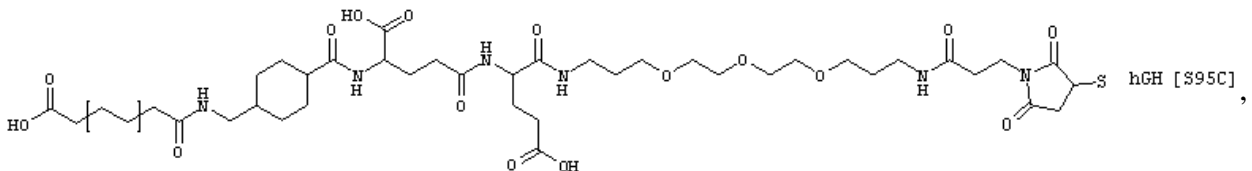
25



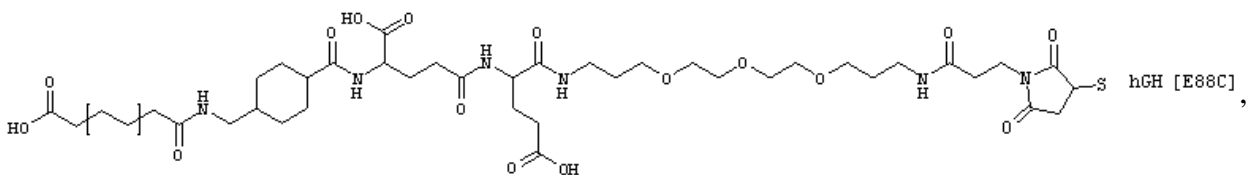
30



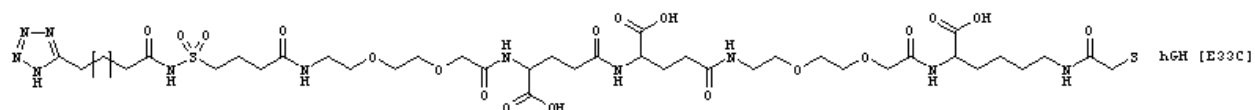
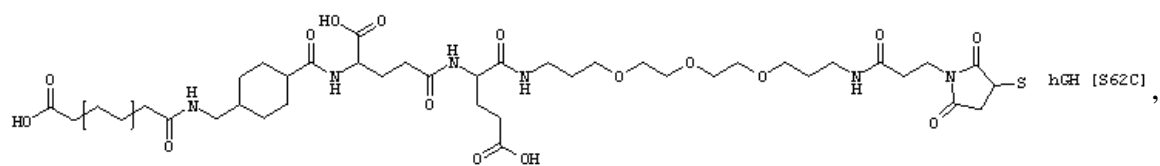
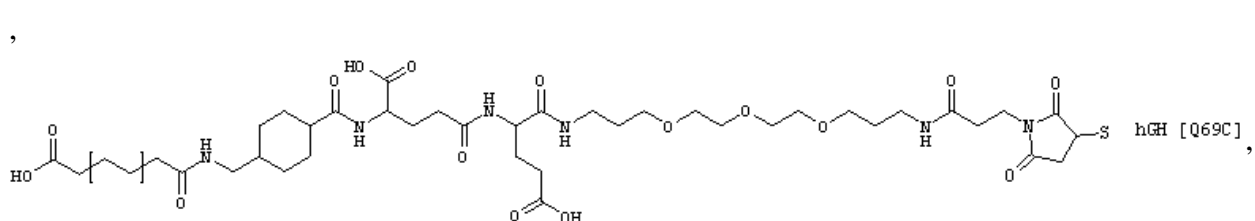
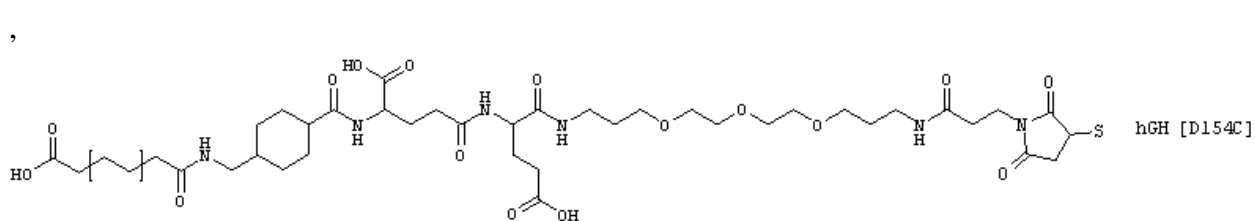
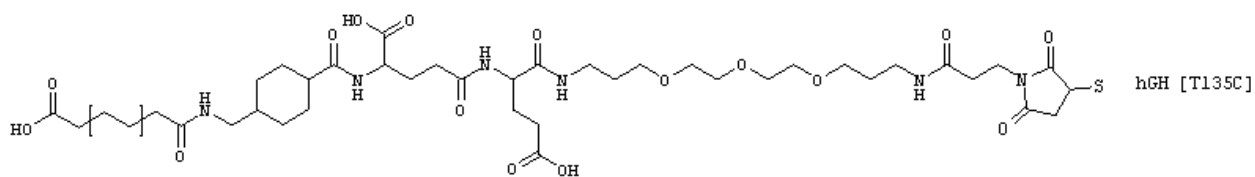
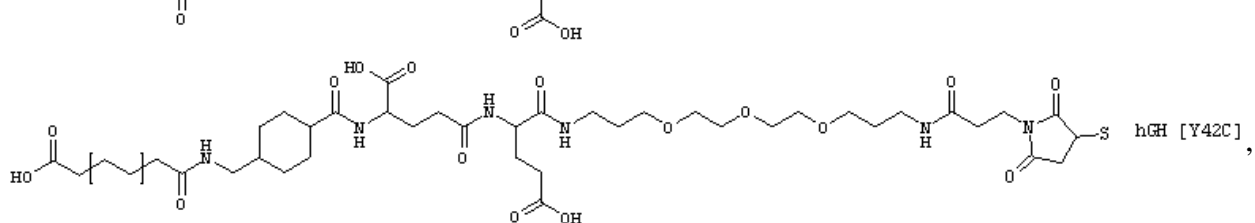
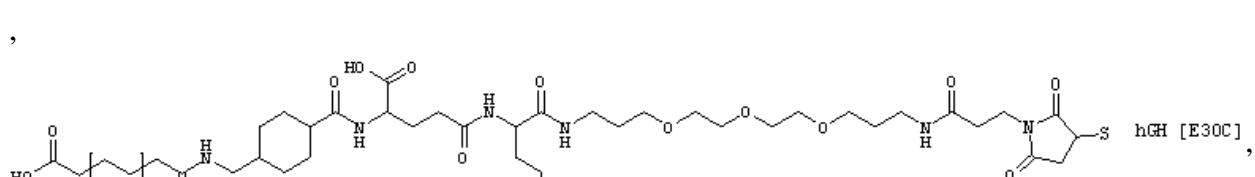
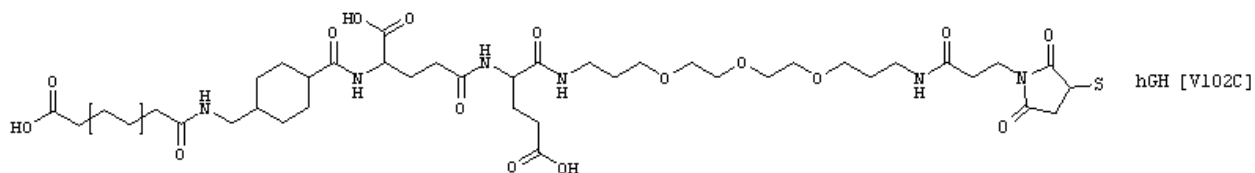
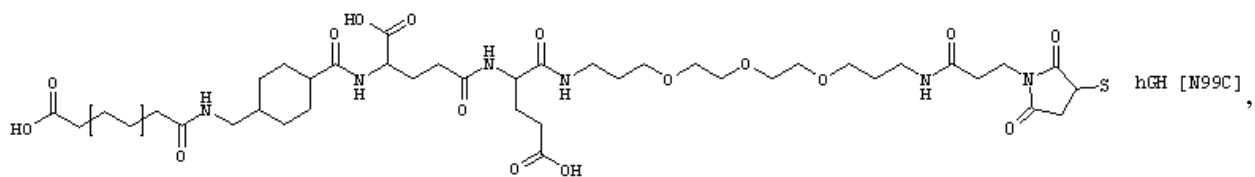
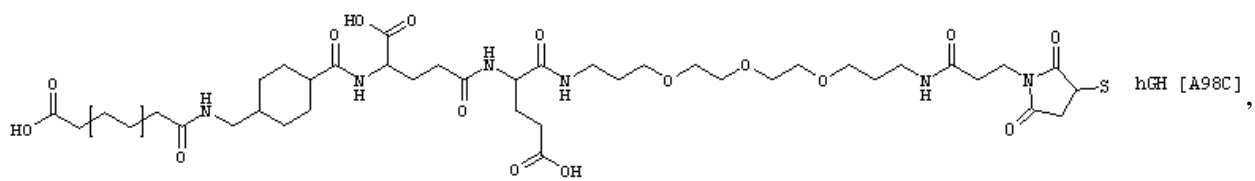
35

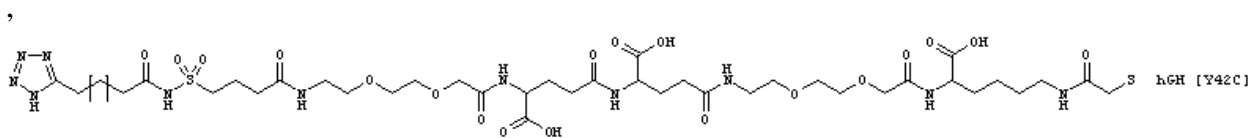


40

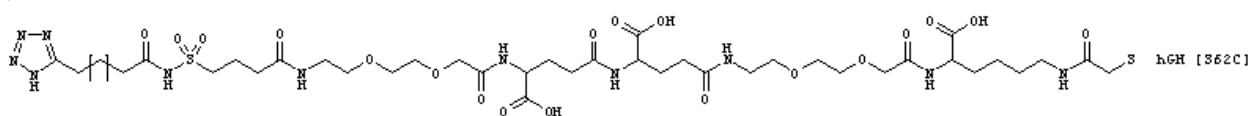


45

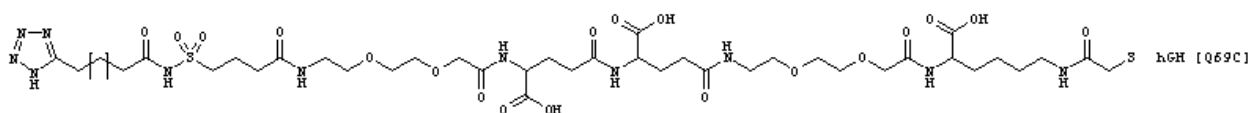




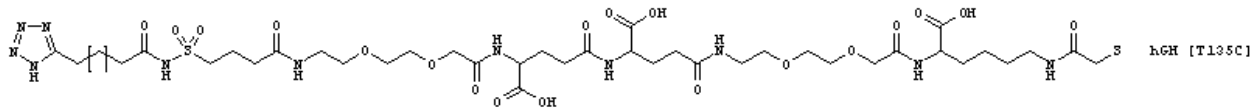
5



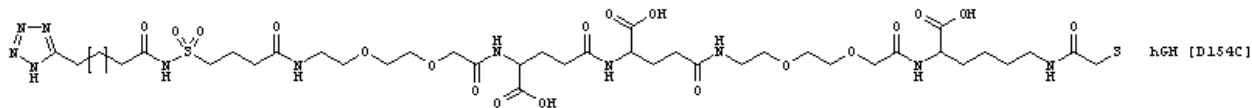
10



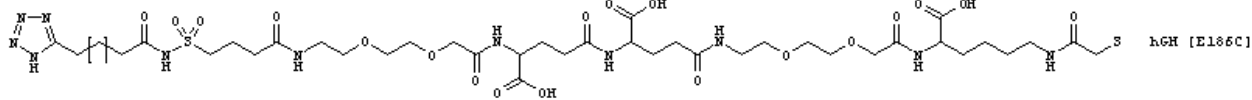
15



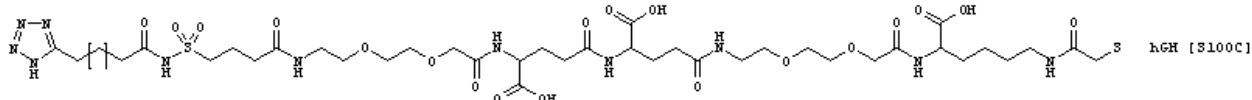
20



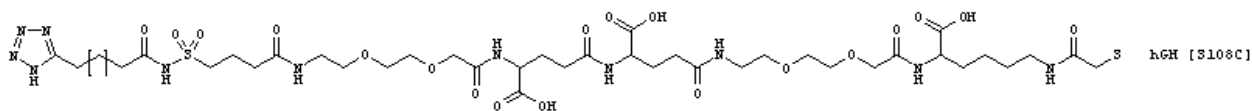
25



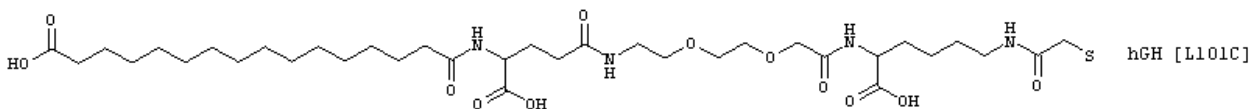
30



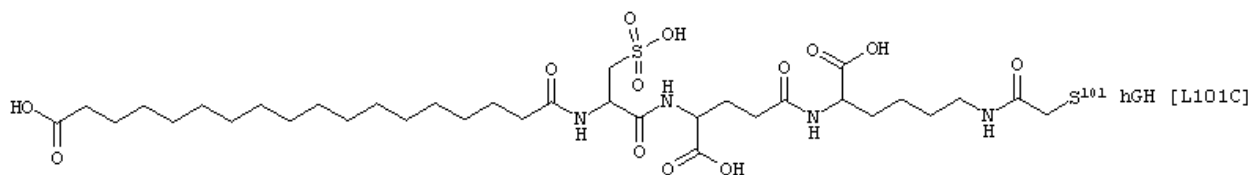
35

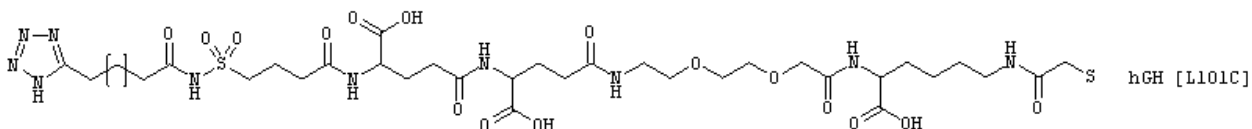
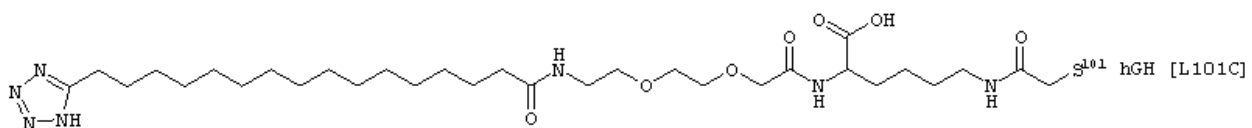
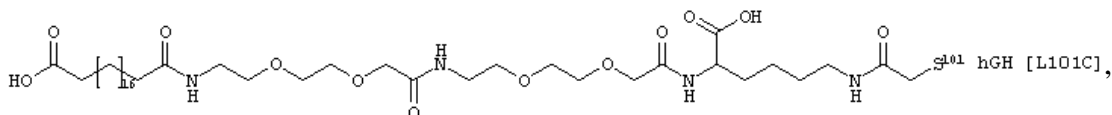
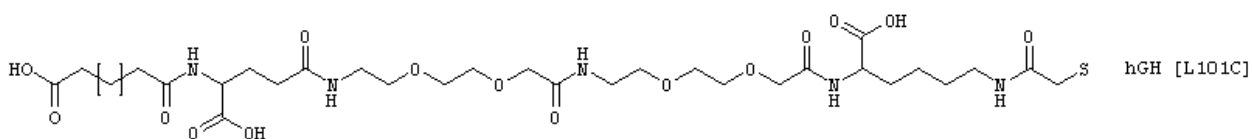
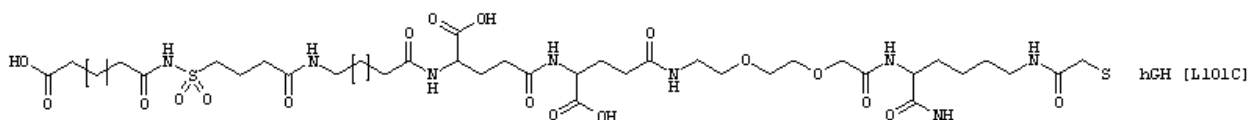
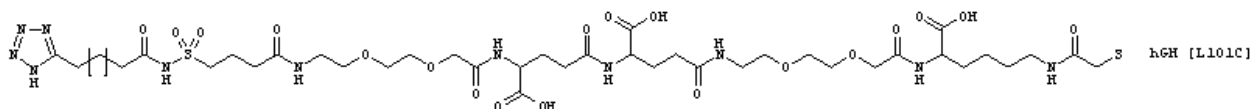
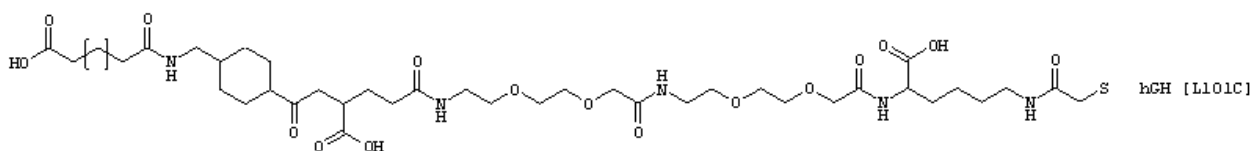


40



45





42. Конъюгат гормона роста, при этом конъюгат гормона роста имеет формулу (I):



где

GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее дополнительный дисульфидный мостик,

B представляет собой гидрофильный спейсер,

W является химической группой, соединяющей A и B, и

A представляет собой альбумин-связывающий радикал; и его фармацевтически приемлемые соли.

43. Конъюгат по воплощению 42, при этом GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью относительно аминокислотной последовательности гормона роста человека (hGH) (SEQ ID NO:1), например, по меньшей мере 80%, по

меньшей мер 85%, по меньшей мер 90% или по меньшей мер 95% идентичностью относительно hGH, или GH является hGH (SEQ ID NO:1).

44. Конъюгат по воплощению 42, при этом GH или конъюгат GH обладает по меньшей мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH.

5 45. Конъюгат по воплощению 44, при этом активность измерена *in vitro* с применением количественного определения с использованием клеток BAF (тест I)

46. Конъюгат по любому из воплощений 42-45, при этом GH содержит дополнительные дисульфидные связи между петлевым сегментом и спиральным сегментом или внутри петлевого сегмента или между петлевыми сегментами или между
10 спиральными сегментами.

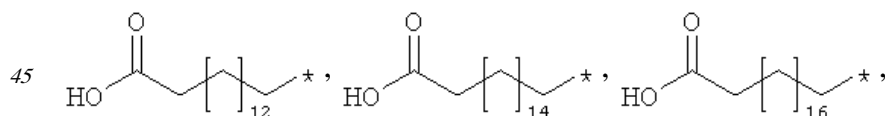
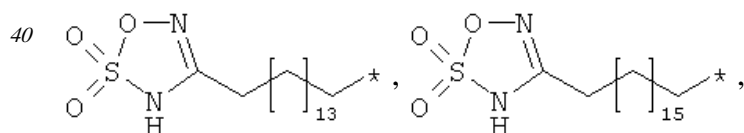
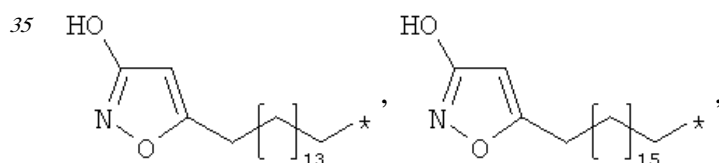
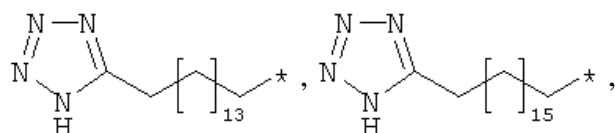
47. Конъюгат по любому из воплощений 42-46, где GH содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один цистеин присутствует в петлевом сегменте, например, в сегменте, ограниченном аминокислотными остатками 128-154 (L3).

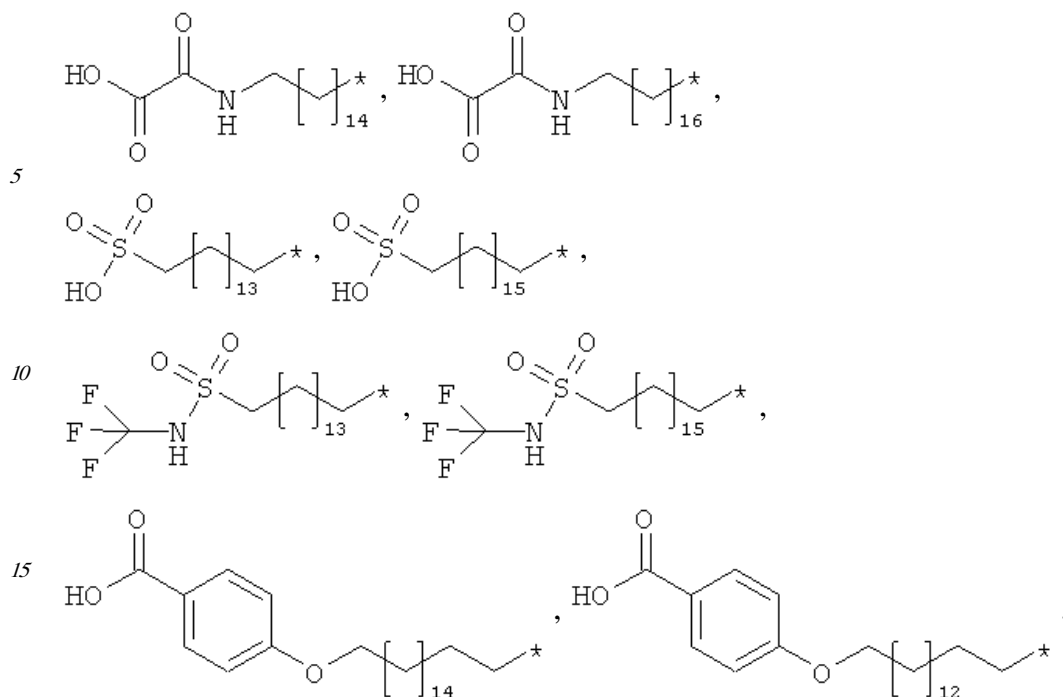
15 48. Конъюгат по любому из воплощений 42-47, где GH содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет петлевой сегмент со спиральным сегментом, например, со спиралью В или спиралью 2.

49. Конъюгат по любому из воплощений 42-48, где GH содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет L3 (128-
20 154) со спиралью В или спиралью 2.

50. Конъюгат по любому из воплощений 42-49, при этом дополнительный дисульфидный мостик расположен между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/
25 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 и/или V185C/S188C в hGH (SEQ ID NO:1), например, между Q84C/Y143C.

30 51. Конъюгат по любому из воплощений 42-50, при этом А выбран из:





где * указывает место присоединения к В через W.

52. Конъюгат по любому из воплощений 42-51, при этом W имеет формулу: $-W_7-Y-$,

где

Y является $-(CH_2)_{I7}-C3-10$ -циклоалкил- W_8- или ковалентной связью,

I7 является 0-6,

W₇ выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s3}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или ковалентной связи; где s3 является 0 или 1,

W₈ выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s4}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или ковалентной связи; где s4 является 0 или 1.

53. Конъюгат по любому из воплощений 42-52, при этом В имеет формулу:

$-X_1-X_2-X_3-X_4-$

где

X₁ является $-W_1-[(CHR^1)_{I1}-W_2]_{m1}-\{[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}-W_3]_{m3}\}_{n2}-$,

X₂ является $-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-$,

X₃ является $-[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7}-$,

X₄ является $F-D1-(CH_2)_{I6}-D2-$,

I1, I2, I3, I4, I5 и I6 независимо выбраны из 0-16,

m1, m3, m4, m6 и m7 независимо выбраны из 0-10,

m2 и m5 независимо выбраны из 0-25,

n1, n2, n3 и n4 независимо выбраны из 0-16,

F является арилом, гетероарилом, пирролидин-2,5-дионом или ковалентной связью, при этом арильные и гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, $-CN$, $-OH$, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкилом,

R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-NH-C(=NH)-NH_2$, C_{1-6} -алкила, арила или гетероарила; при этом алкильная, арильная и гетероарильная группы, возможно, содержат в качестве заместителей галоген, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)OH$, $-S(O)_2OH$, $-CN$ или $-OH$,

$D1, D2, E1$ и $E2$ независимо выбраны из $-O-$, $-N(R^6)-$, $-N(C(O)R^7)-$ или ковалентной связи; при этом R^6 и R^7 независимо представляют собой водород или C_{1-6} -алкил,

W_1-W_5 независимо выбраны из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s2}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$ или ковалентной связи; где $s2$ является 0 или 1,

W_6 выбран из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-C(O)NHCH_2-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-OC(O)NH-$, $-NHC(O)O-$, $-C(O)CH_2-$, $-CH_2C(O)-$, $-C(O)CH=CH-$, $-CH=CHC(O)-$, $-(CH_2)_{s1}-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-NHC(O)C_{1-6}$ -алкила, $-C(O)NHC_{1-6}$ -алкила или ковалентной связи; где $s1$ является 0 или 1 и C_{1-6} -алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, $-NHC(O)CH*CH_2COOH$ или $-NHC(O)CH_2CH*COOH$; при этом (*) указывает точку присоединения атома углерода в составе CH к X_4 .

54. Конъюгат по любому из воплощений 42-53, где:

$I1, I2, I3, I4, I5$ и $I6$ независимо являются 0-6,

$m1, m3, m4, m6$ и $m7$ независимо являются 0-6,

$m2$ и $m5$ независимо являются 0-10 и $n1, n2, n3$ и $n4$ независимо являются 0-10.

55. Конъюгат по любому из воплощений 42-54, при этом $D1$ и $D2$ независимо выбраны из $-O-$ или $-N(R^6)-$ или ковалентной связи.

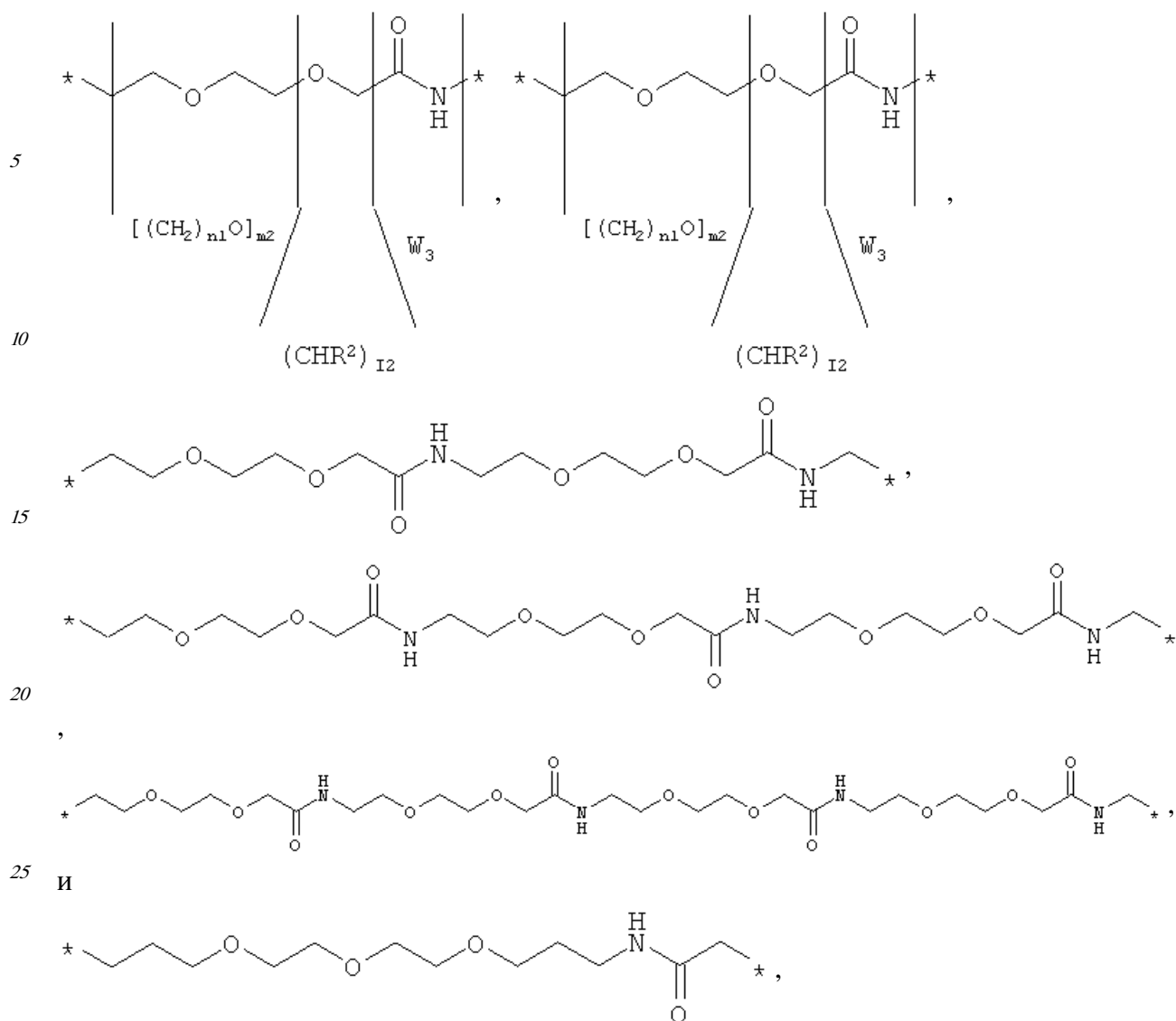
56. Конъюгат по любому из воплощений 42-55, при этом $E1$ и $E2$ независимо выбраны из $-O-$ или $-N(R^6)-$ или ковалентной связи.

57. Конъюгат по любому из воплощений 42-56, где W_1-W_8 независимо выбраны из группы, состоящей из $-C(O)NH-$, $-NHC(O)-$, $-CH_2NHC(O)-$, $-C(O)NHS(O)_2-$, $-S(O)_2NHC(O)-$, $-NHC(O)C_{1-6}$ -алкила или $-C(O)NHC_{1-6}$ -алкила или ковалентной связи; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион $-NHC(O)CH*CH_2COOH$ или $NHC(O)CH_2CH*COOH$; где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к X_4 .

58. Конъюгат по любому из воплощений 42-57, при этом R^1, R^2, R^3, R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2OH$ или C_{1-6} -алкила;

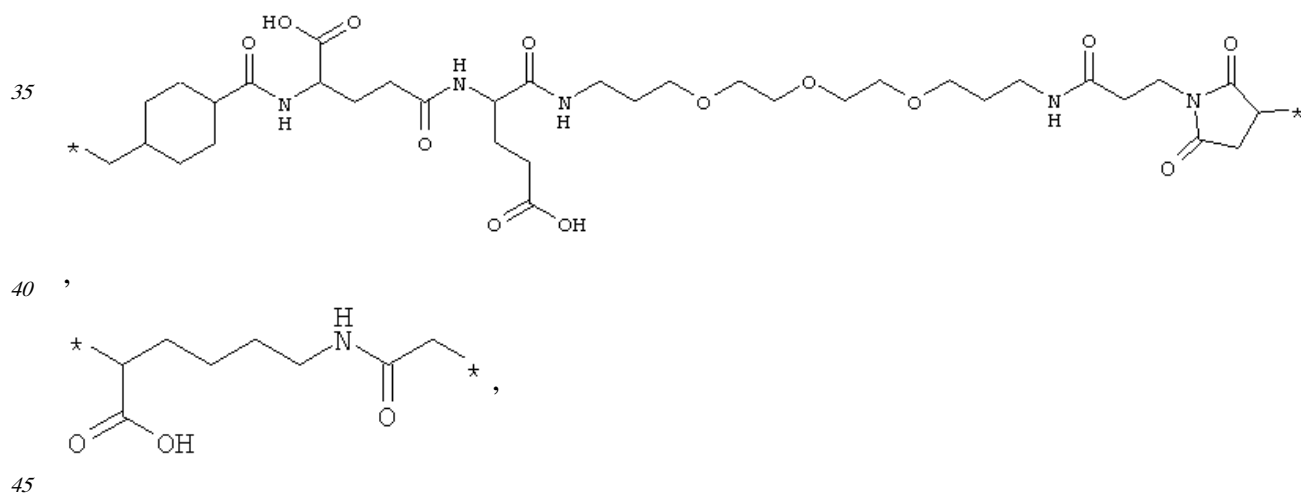
при этом C_{1-6} -алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$ или $-S(O)_2OH$.

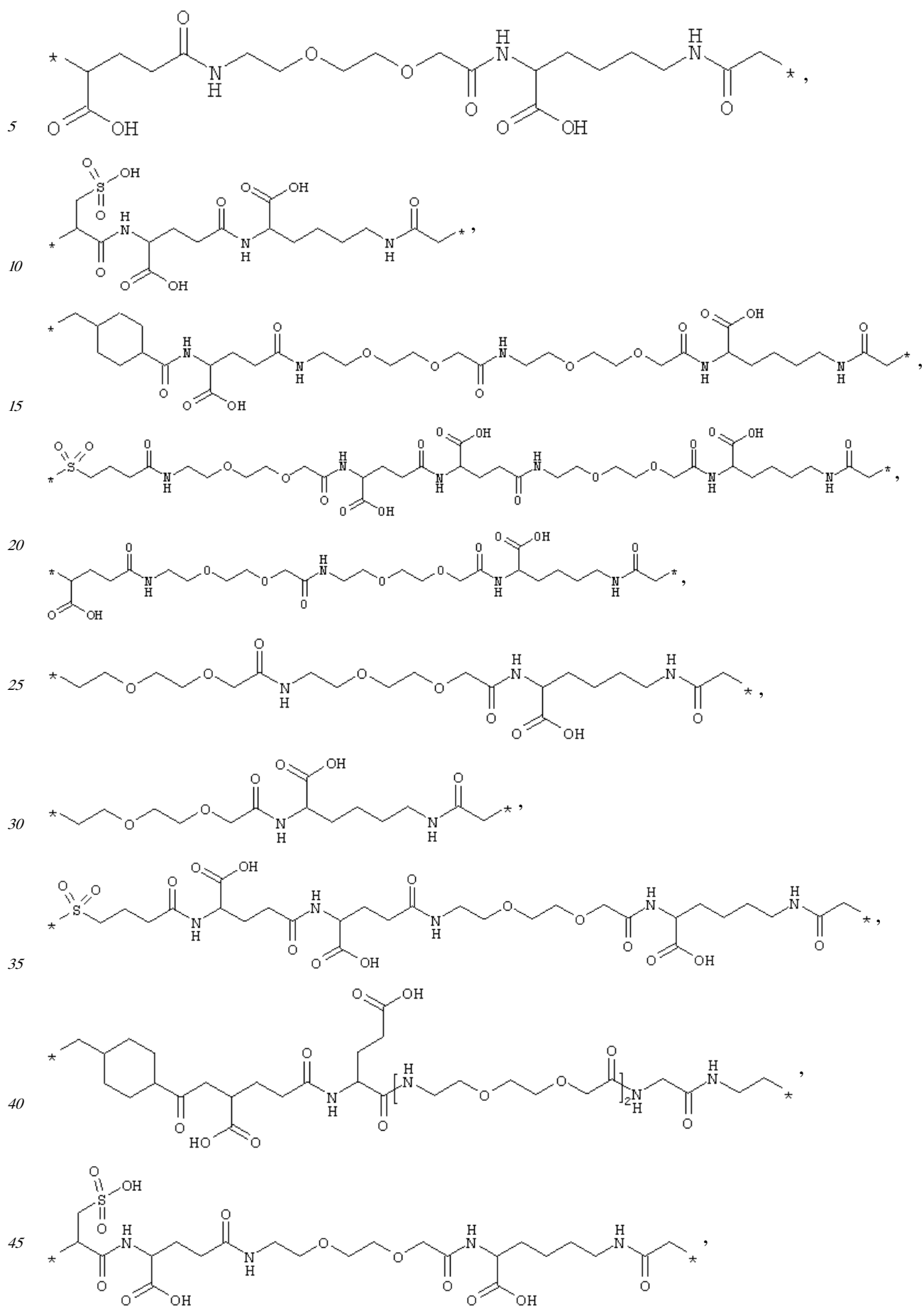
59. Конъюгат по любому из воплощений 42-58, при этом $-[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{I2}W_3]_{m3}\}_{n2}-$ и $-[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}W_5]_{m6}\}_{n4}-$, где $E1$ и $E2$ являются $-O-$, выбраны из:

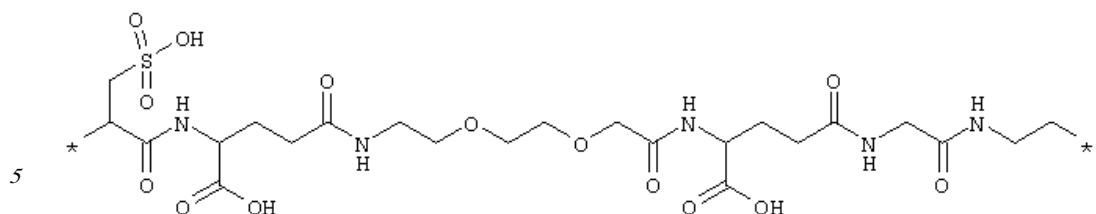


при этом предполагается, что * указывает точку присоединения, т.е. свободную СВЯЗЬ.

60. Конъюгат по любому из воплощений 42-59, при этом В выбран из:

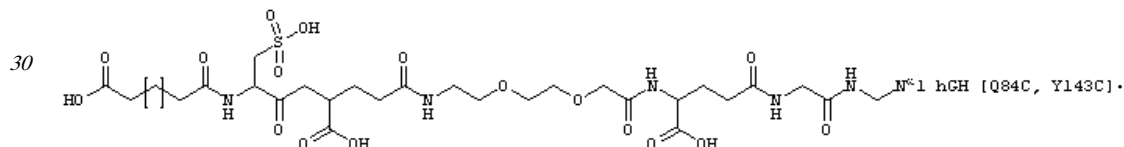
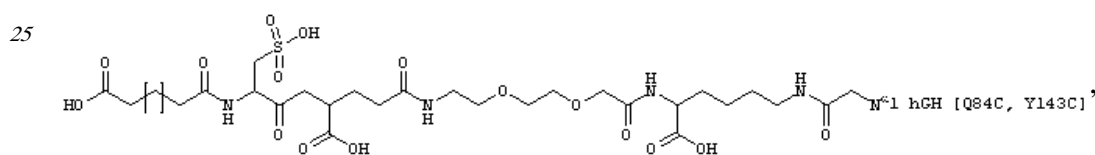
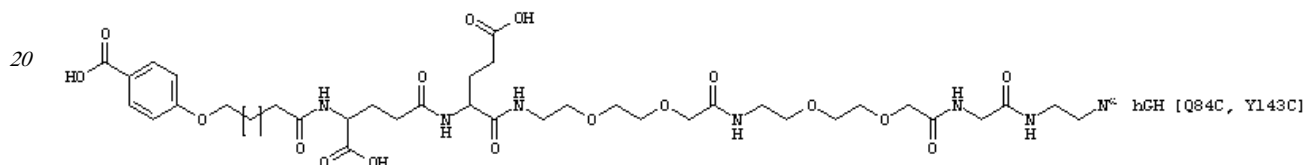
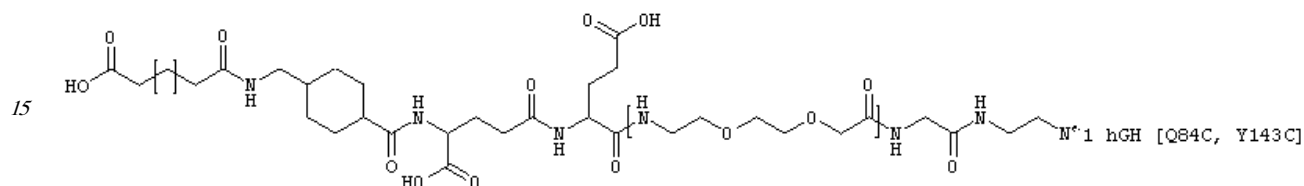






61. Конъюгат по любому из воплощений 42-60, при этом А через В присоединен к остатку глутамина в положении, соответствующем положению 40, положению 141 в hGH с последовательностью SEQ ID NO:1, или N-концевому остатку соединения гормона роста.

62. Конъюгат по любому из воплощений 42-61, при этом указанное соединение выбрано из:



63. Конъюгат гормона роста, при этом конъюгат гормона роста имеет формулу (I):



где GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее одиночную мутацию с внесением Cys и дополнительный дисульфидный мостик,

В представляет собой гидрофильный спейсер, соединенный с атомом серы в составе Суз, внесенного в результате мутации,

W является химической группой, соединяющей А и В, и

А представляет собой альбумин-связывающий радикал; и его фармацевтически приемлемые соли.

64. Конъюгат по воплощению 63, при этом GH представляет собой соединение гормона роста, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью относительно аминокислотной последовательности гормона роста человека (hGH) (SEQ ID NO:1), например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичностью относительно hGH, или GH является hGH (SEQ ID NO:1).

65. Конъюгат по воплощению 64, при этом GH или конъюгат GH обладает по меньшей

мере 80% активности гормона роста, характерной для hGH.

66. Конъюгат по любому из воплощений 63-65, при этом одиночная мутация с внесением Cys расположена в любой из областей, выбранных из N-концевой, H1-, H2-, L2- или H3-областей в составе GH.

5 67. Конъюгат по любому из воплощений 63-66, при этом GH содержит одиночную мутацию с внесением Cys, выбранную из любой из следующих мутаций:

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,
10 T135C, G136C, T142C, D147C, N149C, D154C, A155C, L156C, R178C, E186C, G187C и G190C, например, из любой одной мутации из: T3C, P5C, S7C, D11C, H18C, Q29C, E30C, E33C, A34C, Y35C, E88C, Q91C, S95C, A98C, N99C, S100C, L101C, V102C, Y103C, D107C, S108C, D112C, Q122C и G126C.

68. Конъюгат по любому из воплощений 63-67, где дополнительная дисульфидная связь расположена между петлевым сегментом и спиральным сегментом или внутри петлевого сегмента или между петлевыми сегментами или между спиральными сегментами.

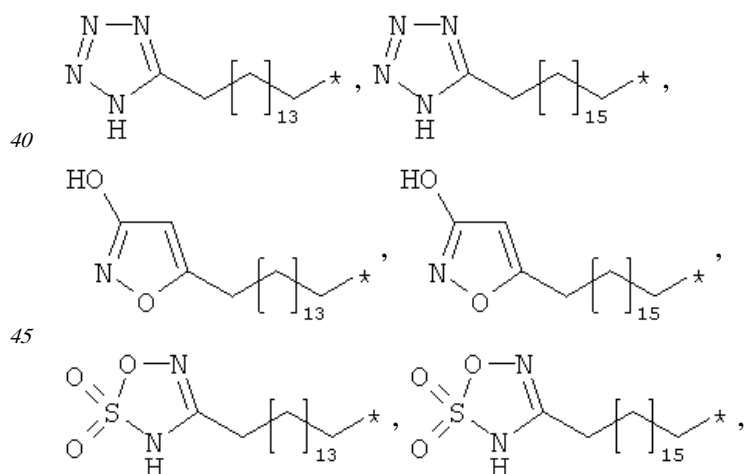
69. Конъюгат по любому из воплощений 63-68, где GH содержит дополнительную дисульфидную связь, при этом по меньшей мере один цистеин присутствует в петлевом сегменте, например, в сегменте, ограниченном аминокислотными остатками 128-154 (L3).

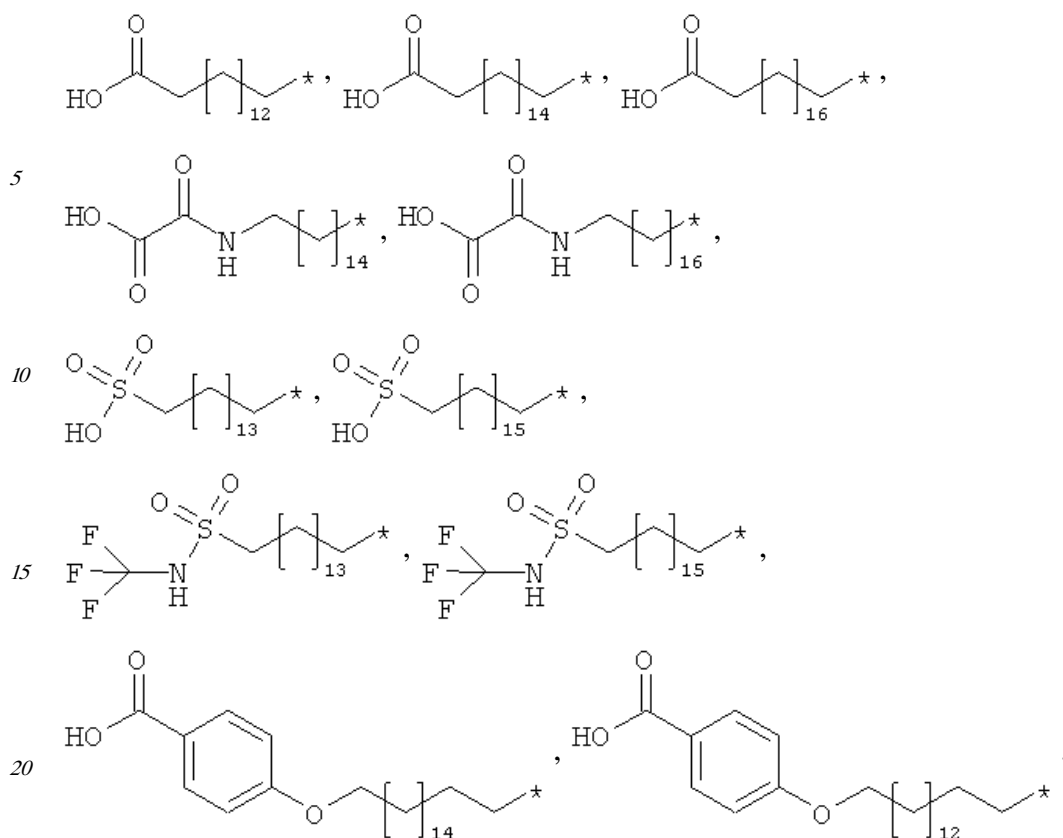
70. Конъюгат по любому из воплощений 63-69, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет петлевой сегмент со спиральным сегментом, таким как H2.

25 71. Конъюгат по любому из воплощений 63-70, при этом дополнительная дисульфидная связь соединяет L3 со спиралью H2.

72. Конъюгат по любому из воплощений 63-71, при этом дополнительный дисульфидный мостик расположен между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/
30 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 и/или V185C/S188C в hGH (SEQ ID NO:1), например, между Q84C/Y143C.

73. Конъюгат по любому из воплощений 63-72, при этом А выбран из:





где * указывает место присоединения к В через W.

74. Конъюгат по любому из воплощений 63-73, при этом W имеет формулу:

$-W_7-Y-$, где

У является $-(\text{CH}_2)_{17}\text{-C}\equiv\text{C-10-циклоалкил-W}_8$ - или ковалентной связью,

I7 является 0-6.

W₇ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S

(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s3}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s3 является 0 или 1,

W₈ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s4}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s₄ является 0 или 1.

75. Конъюгат по любому из воплощений 63-74, при этом В имеет формулу:

$$-X_1-X_2-X_3-X_4-$$

где X_1 является $-W_1-[(CHR^1)_{l1}-W_2]_{m1}-[(CH_2)_{n1}E1]_{m2}-[(CHR^2)_{l2}-W_3]_{m3}\}_{n2}$ -, X_2 является

$$-[(CHR^3)_{I3}-W_4]_{m4}-\{[(CH_2)_{n3}E2]_{m5}-[(CHR^4)_{I4}-W_5]_{m6}\}_{n4}-,$$
$$X_3 \text{ является } -[(CHR^5)_{I5}-W_6]_{m7-},$$

X_4 является F-D1-(CH₂)₁₆-D2-,

I1, I2, I3, I4, I5 и I6 независимо выбраны из 0-16,

m_1, m_3, m_4, m_6 и m_7 независимо выбраны из 0-10,

m_2 и m_5 независимо выбраны из 0-25,

n_1, n_2, n_3 и n_4 независимо выбраны из 0-16,

Г является арилом, гетероарилом, пирролидин-2,5-дионом или ковалентной связью,

при этом арильные и гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ или C_{1-6} -алкилом,

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$, C_{1-6} -алкила, арила или гетероарила; при этом алкильная, арильная и гетероарильная группы, возможно, содержат в качестве заместителей галоген, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$, $-\text{CN}$ или $-\text{OH}$,

D1 , D2 , E1 и E2 независимо выбраны из $-\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}^6)-$, $-\text{N}(\text{C}(\text{O})\text{R}^7)-$ или ковалентной связи; при этом R^6 и R^7 независимо представляют собой водород или C_{1-6} -алкил,

W_1 - W_5 независимо выбраны из $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_{s2}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$ или ковалентной связи; где $s2$ является 0 или 1,

W_6 выбран из $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_{s1}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -алкила, $-\text{C}(\text{O})\text{NHC}_{1-6}$ -алкила или ковалентной связи; где $s1$ является 0 или 1 и C_{1-6} -алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}^*\text{CH}_2\text{COOH}$ или $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}^*\text{COOH}$; при этом (*) указывает точку присоединения атома углерода в составе CH к X_4 .

76. Конъюгат по любому из воплощений 63-75, где:

I1 , I2 , I3 , I4 , I5 и I6 независимо являются 0-6,

m1 , m3 , m4 , m6 и m7 независимо являются 0-6, m2 и m5 независимо являются 0-10 и n1 , n2 , n3 и n4 независимо являются 0-10.

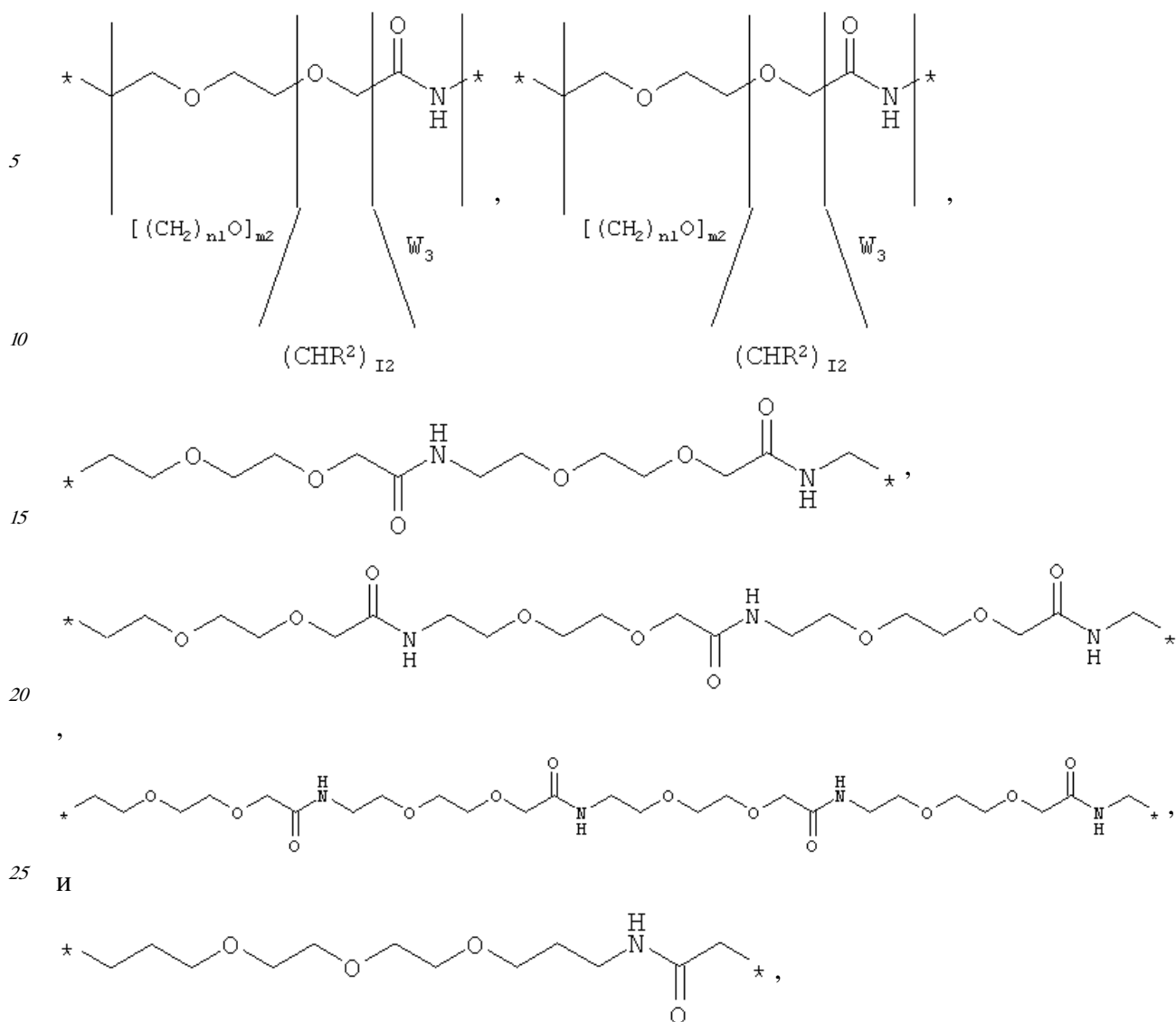
77. Конъюгат по любому из воплощений 63-75, при этом D1 и D2 независимо выбраны из $-\text{O}-$ или $-\text{N}(\text{R}^6)-$ или ковалентной связи.

78. Конъюгат по любому из воплощений 63-77, при этом E1 и E2 независимо выбраны из $-\text{O}-$ или $-\text{N}(\text{R}^6)-$ или ковалентной связи.

79. Конъюгат по любому из воплощений 63-78, где W_1 - W_8 независимо выбраны из группы, состоящей из $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -алкила или $-\text{C}(\text{O})\text{NHC}_{1-6}$ -алкила или ковалентной связи; при этом алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей оксо-группу, пирролидин-2,5-дион, $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}^*\text{CH}_2\text{COOH}$ или $\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}^*\text{COOH}$; где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к X_4 .

80. Конъюгат по любому из воплощений 63-79, при этом R^1 , R^2 , R^3 , R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ или C_{1-6} -алкила; при этом C_{1-6} -алкильная группа, возможно, содержит в качестве заместителей $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ или $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$.

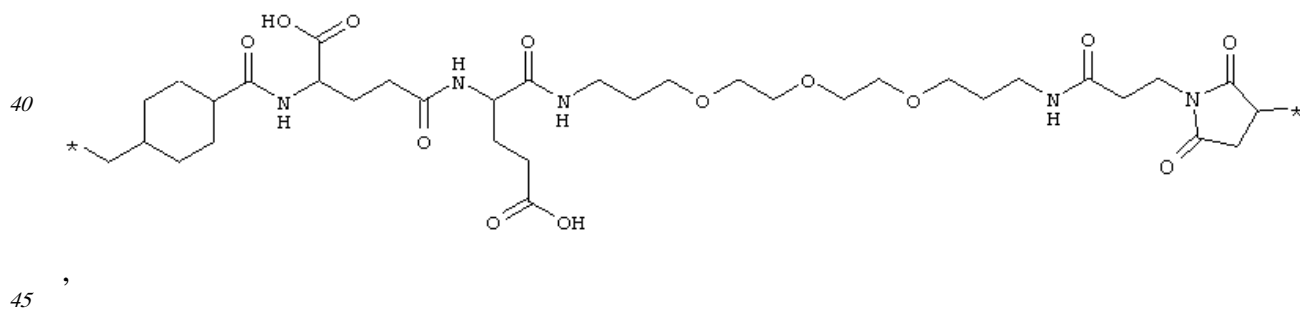
81. Конъюгат по любому из воплощений 63-80, при этом $-\{[(\text{CH}_2)_{n1}\text{E1}]_{m2}-[(\text{CHR}^2)_{l2}-\text{W}_3]_{m3}\}_{n2}-$ и $-\{[(\text{CH}_2)_{n3}\text{E2}]_{m5}-[(\text{CHR}^4)_{l4}-\text{W}_5]_{m6}\}_{n4}-$, где E1 и E2 являются $-\text{O}-$, выбраны из:

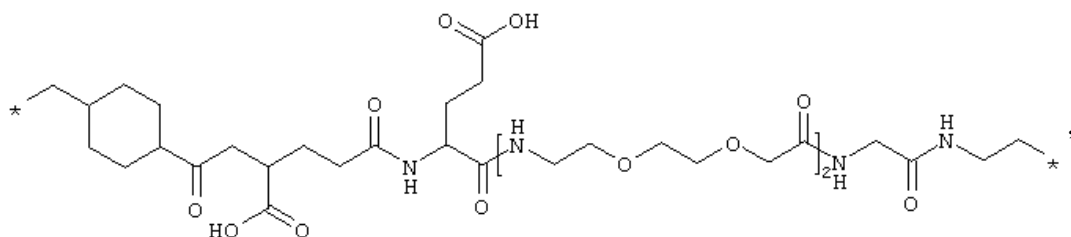
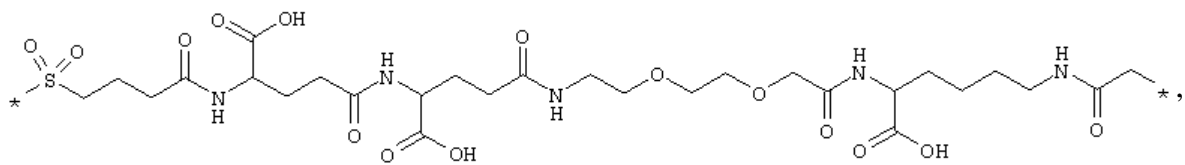
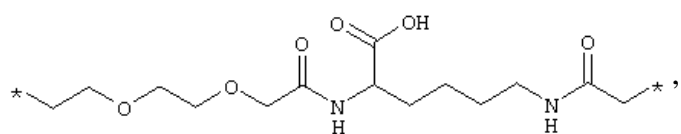
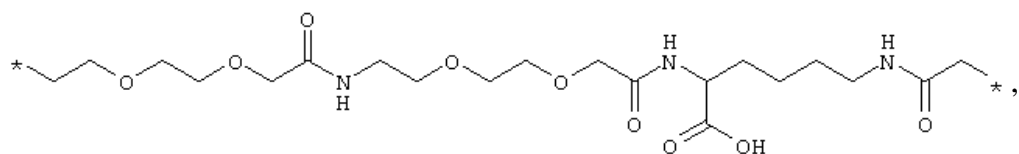
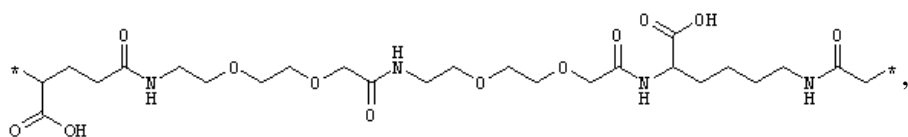
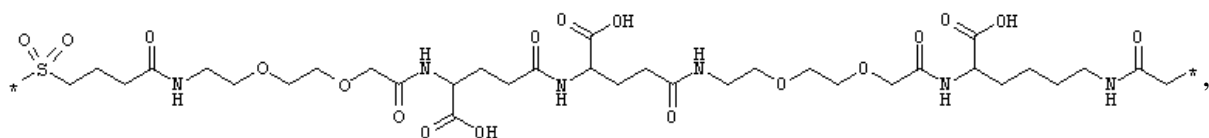
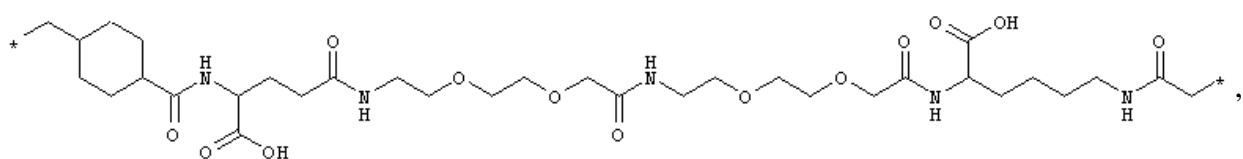
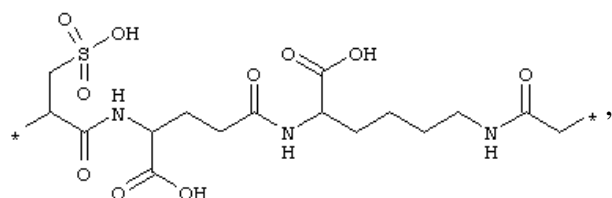
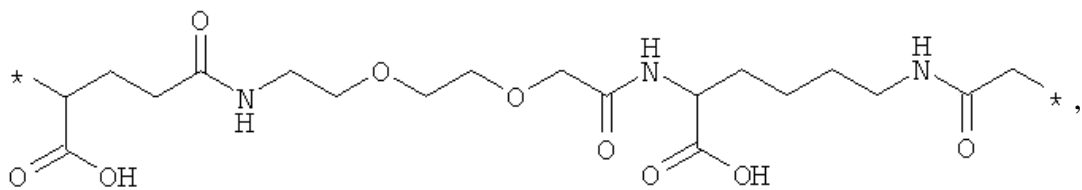
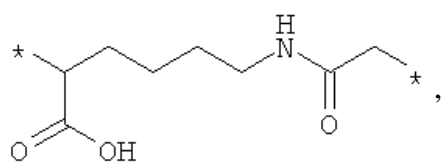


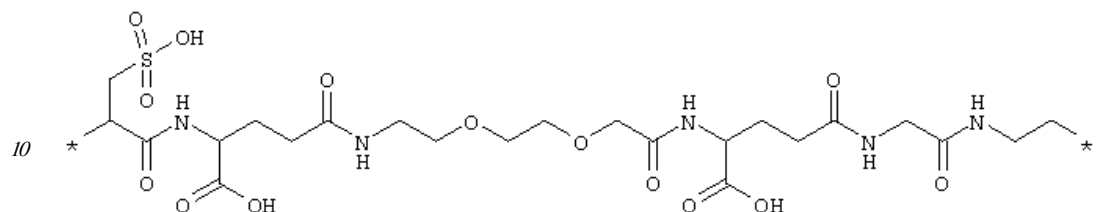
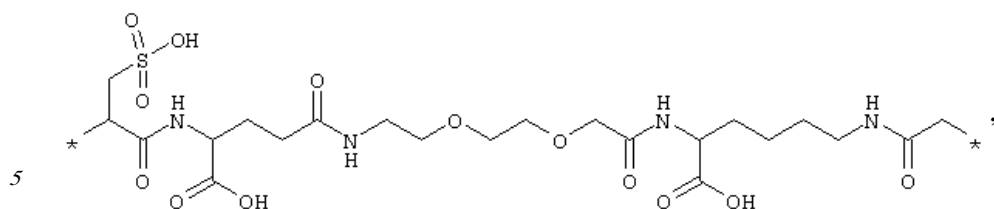
при этом предполагается, что * указывает точку присоединения, т.е., свободную связь.

82. Конъюгат по любому из воплощений 63-81, при этом X_4 является ковалентной связью и W_6 выбран из пирролидин-2,5-диона, $-NHC(O)CH^*CH_2COOH$ или $-NHC(O)CH_2CH^*COOH$; где (*) указывает место присоединения атома углерода в составе CH к GH .

83. Конъюгат по любому из воплощений 63-82, при этом B выбран из:

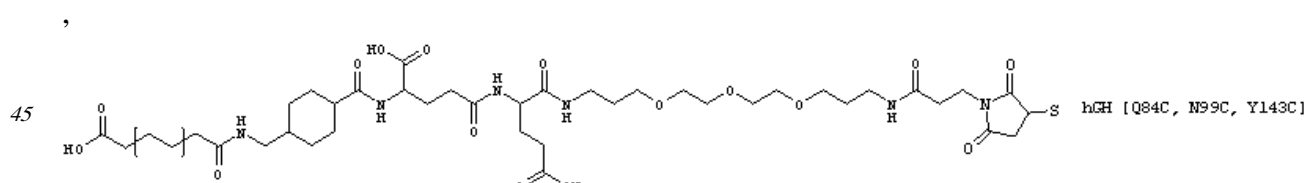
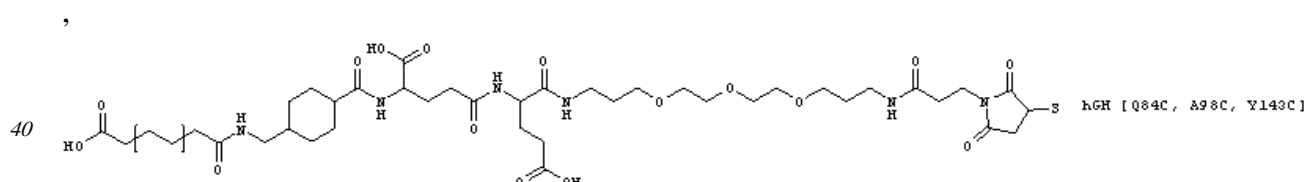
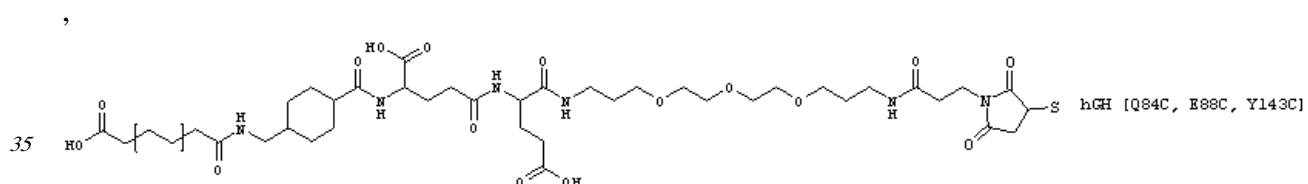
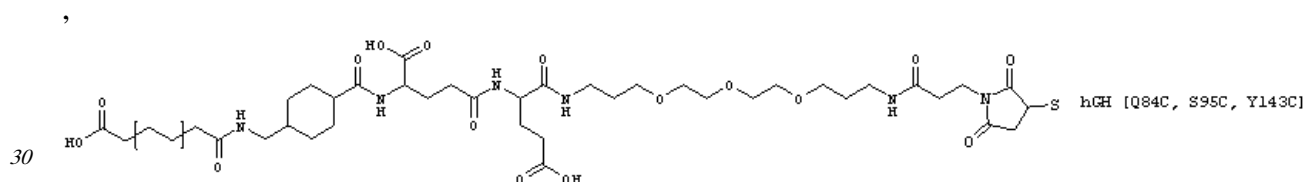
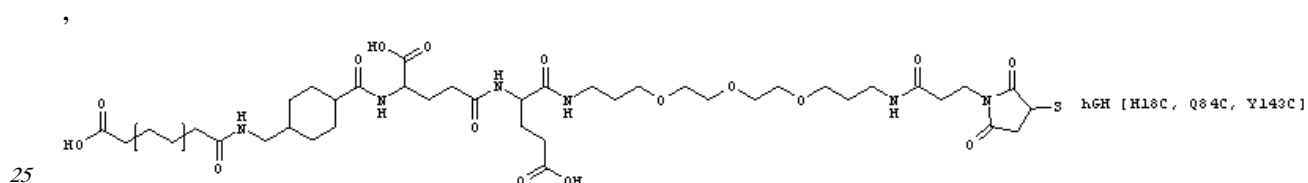
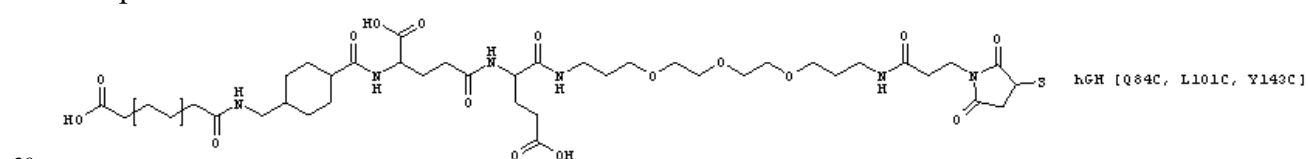


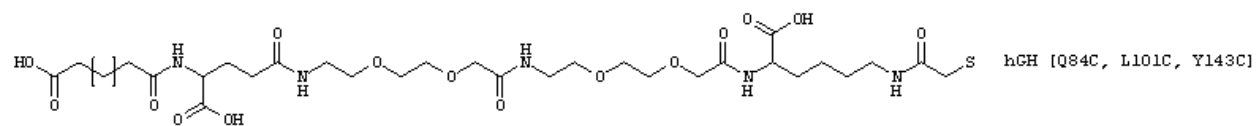
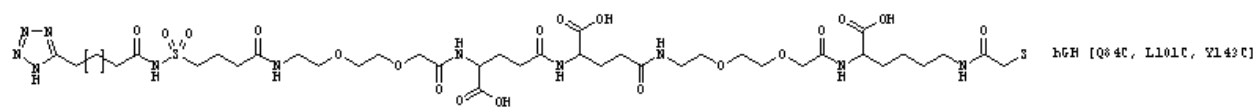
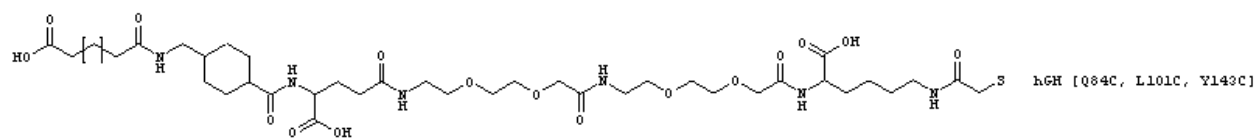
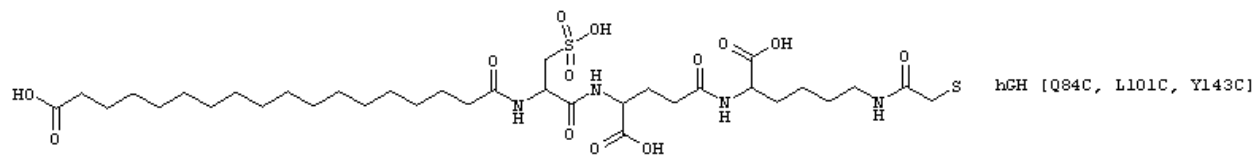
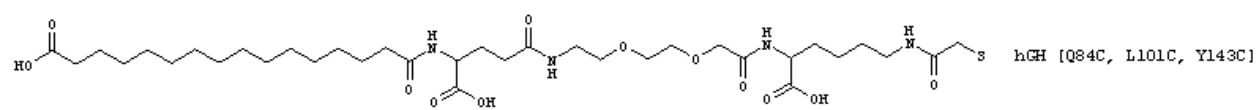
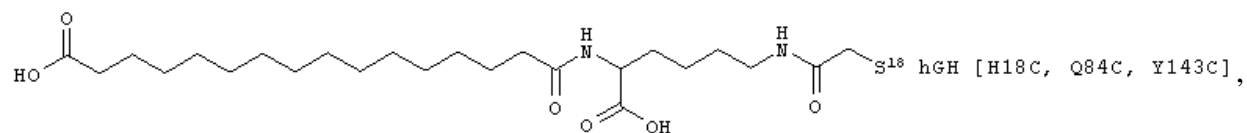
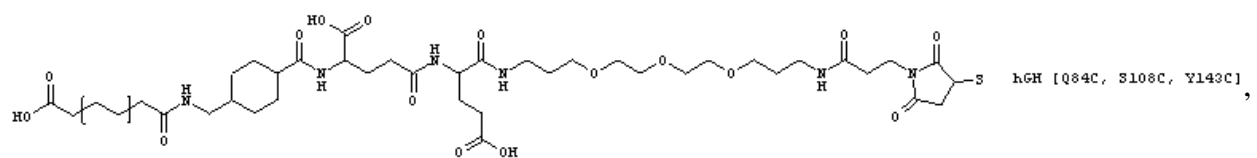
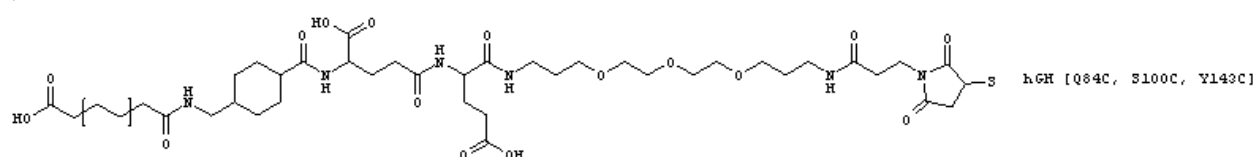
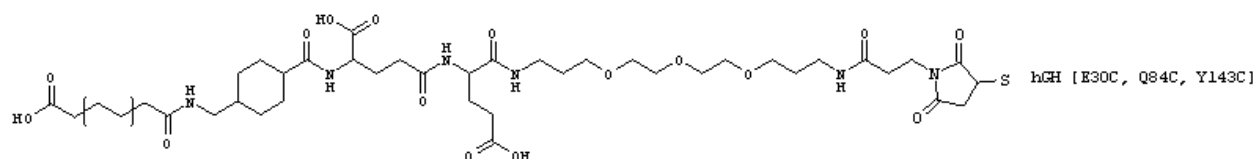
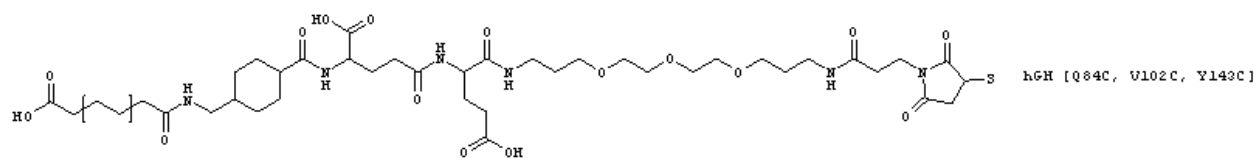


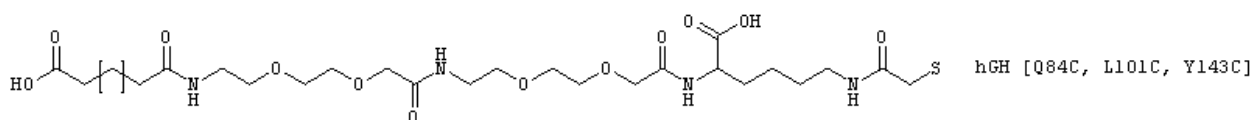


84. Конъюгат по любому из воплощений 1-83, при этом один альбумин-связывающий радикал (А) через гидрофильный спейсер (В) связан с указанным ГН.

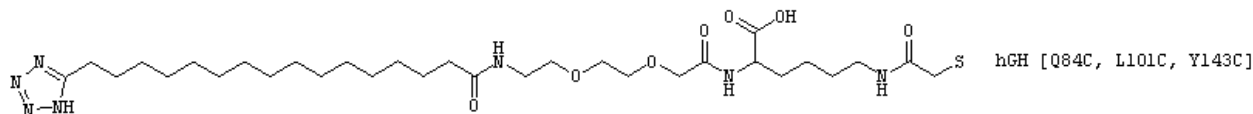
15 85. Конъюгат по любому из воплощений 63-84, при этом указанное соединение выбрано из:



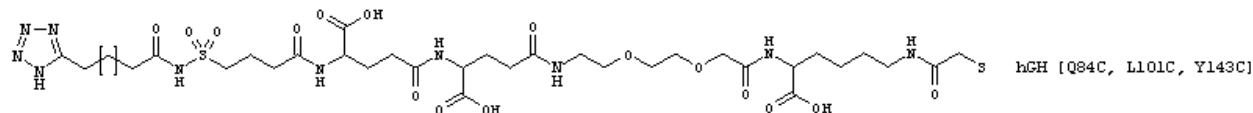




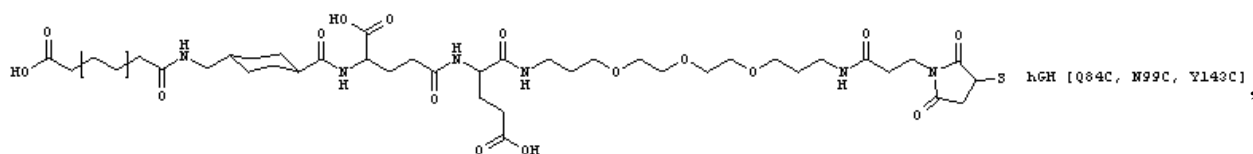
5 ,



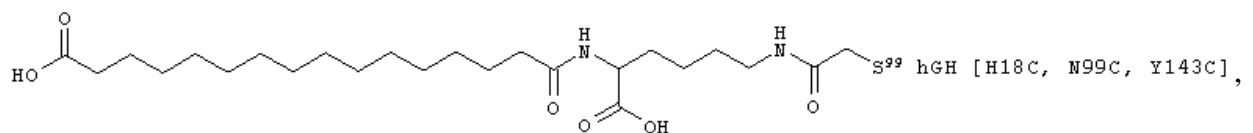
10 ,



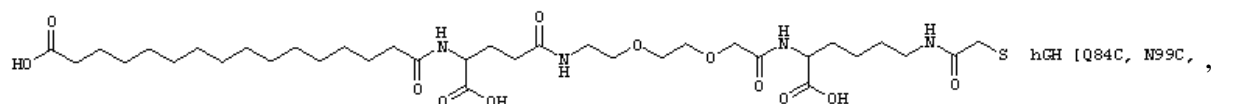
15 ,



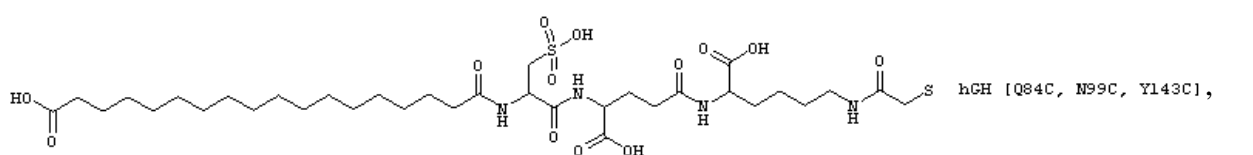
20 ,



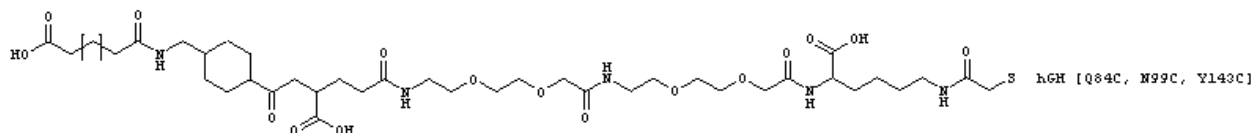
25 ,



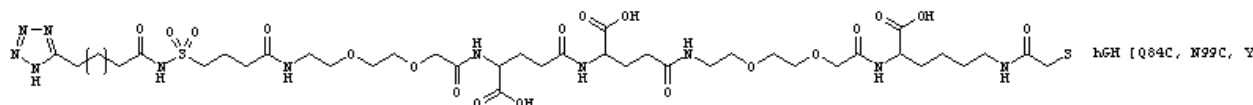
30 ,



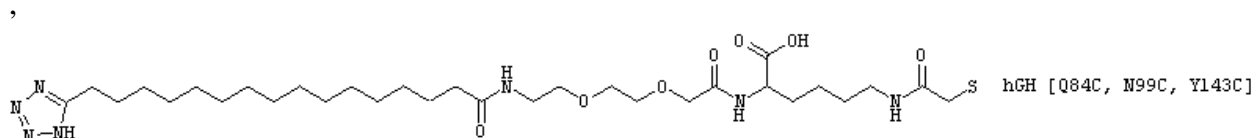
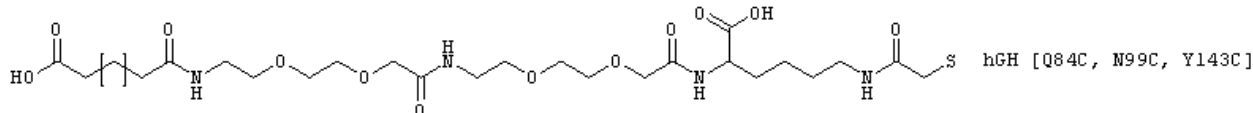
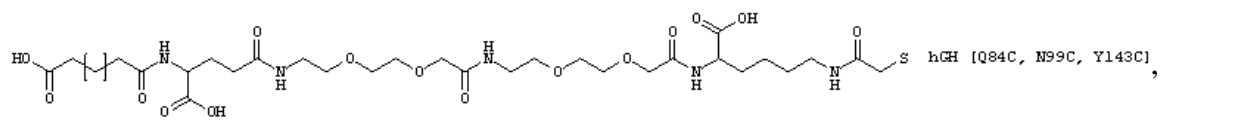
35 ,

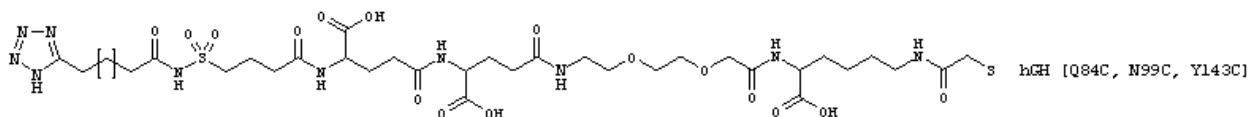


40 ,



45 ,





86. Конъюгат по любому из воплощений 1-85, при этом гидрофильный спейсер имеет показатель $mLogP < 0$.

87. Конъюгат по любому из воплощений 1-86, при этом молекулярная масса указанного гидрофильного спейсера находится в диапазоне от 80 Да до 1500 Да или в диапазоне от 300 Да до 1100 Да.

88. Конъюгат по любому из воплощений 1-87, при этом указанный альбумин-связывающий радикал является липофильным радикалом.

89. Конъюгат по любому из воплощений 1-88, при этом указанный альбумин-связывающий радикал нековалентно связывается с альбумином.

90. Конъюгат по любому из воплощений 1-89, при этом указанный альбумин-связывающий радикал отрицательно заряжен при физиологических значениях pH.

91. Конъюгат по любому из воплощений 1-90, при этом указанный альбумин-связывающий радикал обладает аффинностью связывания в отношении сывороточного альбумина человека, которая составляет менее чем примерно 10 мкМ или менее чем примерно 1 мкМ.

92. Конъюгат по любому из воплощений 1-91, при этом указанный альбумин-связывающий радикал выбран из алкильной группы с линейной цепочкой, разветвленной алкильной группы, группы, содержащей ω -карбоксильную группу или изостеру ω -карбоксильной группы.

93. Конъюгат по любому из воплощений 1-92, при этом указанный альбумин-связывающий радикал содержит от 6 до 40 атомов углерода, от 8 до 26 атомов углерода или от 8 до 20 атомов углерода.

94. Конъюгат по любому из воплощений 1-93, при этом указанный альбумин-связывающий радикал является пептидом, таким как пептид, содержащий менее чем 40 аминокислотных остатков.

95. Конъюгат по любому из воплощений 1-94, при этом два альбумин-связывающих радикала (A) через гидрофильный спейсер (B) связаны с указанным GH.

96. Конъюгат по любому из воплощений 1-95 для применения в терапии.

97. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из воплощений 1-95, возможно, в сочетании с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом.

98. Фармацевтическая композиция по воплощению 97, при этом указанную композицию можно вводить с применением лингвального, сублингвального, буккального путей, в ротовую полость, перорально, в желудок и в кишечник, интраназально, внутрилегочно, эпидермальным, дермальным, трансдермальным и парентеральным путем.

99. Способ лечения дефицита гормона роста (ДГР), при этом способ включает введение пациенту, которому это необходимо, эффективного количества от терапевтически эффективного количества конъюгата по любому из воплощений 1-95.

100. Способ лечения заболеваний, включающих синдром Шерешевского-Тернера; синдром Прадера-Вилли (PWS); Нунан синдром; синдром Дауна; хроническое заболевание почек; ювенильный ревматоидный артрит; муковисцидоз; ВИЧ-инфекция у детей, получающих ВААРТ лечение (детей с ВИЧ / ВИЧ-ассоциированным синдромом

липодистрофии); дети маленького роста, рожденные слишком маленькими для гестационного возраста (SGA); низкий рост у детей, родившихся с очень низкой массой тела при рождении (VLBW), кроме случаев SGA; скелетная дисплазия; гипохондроплазия; ахондроплазия; идиопатический низкий рост (ISS); ДГР у взрослых; переломы длинных костей, таких как большая берцовая кость, малоберцовая кость, бедренная кость, плечевая кость, лучевая кость, локтевая кость, ключицы, пястные кости, плюсневая кость и фаланги пальцев; переломы губчатых костей, таких как череп, кости запястья и предплюсны; пациенты после хирургической операции на сухожилиях или связках, например, руки, колена или плеча; пациенты, проходившие или проходящие процедуру остеогенеза для вытяжения кости; пациенты после замены тазобедренного сустава или диска, восстановления мениска, артродеза позвонков или имплантации протеза, например, в колено, бедро, плечо, локоть, запястье или челюсть; пациенты, которым были имплантированы материалы, используемые при остеосинтезе, такие как штифты, винты и пластины; пациенты с несросшимися или неправильно сросшимися переломами; пациенты после остеотомии, например, из большой берцовой кости или 1 пальца ноги; пациенты после имплантации трансплантата; дегенерация суставного хряща в колене, вызванная травмой или артритом; остеопороз у больных с синдромом Шерешевского-Тернера; остеопороз у мужчин; взрослые пациенты на постоянном диализе (APCD); ассоциированные с нарушением питания сердечно-сосудистое заболевание у APCD; возвратный случай кахексии у APCD; рак у APCD; хроническое обструктивное заболевание легких у APCD; ВИЧ-инфекция у APCD; пожилые пациенты APCD; хроническое заболевание печени у APCD; синдром усталости у APCD; болезнь Крона; нарушение функции печени; мужчины с ВИЧ-инфекцией; синдром короткой кишки; центральное ожирение; ВИЧ-ассоциированный синдромом липодистрофии (HALS); мужское бесплодие; пациенты после общей плановой операции, алкогольной / наркотической детоксикации или неврологической травмы; старение; ослабленные пожилые люди; остеоартрит; травматические повреждения хряща; эректильная дисфункция; фибромиалгия; расстройства памяти; депрессия; черепно-мозговая травма; субарахноидальное кровоизлияние; очень низкая масса тела при рождении; метаболический синдром; глюкокортикоидная миопатия; низкий рост из-за глюкокортикоидной терапии у детей, способ ускорения восстановления мышечной ткани, нервной ткани или заживления ран; ускорения или улучшения кровоснабжения поврежденной ткани; или снижения риска развития инфекции в поврежденной ткани, при этом способ включает введение пациенту, которому это необходимо, эффективного количества от терапевтически эффективного количества конъюгата по любому из воплощений 1-95.

101. Применение конъюгата по любому из воплощений 1-95 при изготовлении лекарства для лечения дефицита гормона роста (ДГР).

102. Применение конъюгата по любому из воплощений 1-95 при изготовлении лекарства для лечения заболеваний, включающих синдром Шерешевского-Тернера; синдром Прадера-Вилли (PWS); Нунан синдром; синдром Дауна; хроническое заболевание почек; ювенильный ревматоидный артрит; муковисцидоз; ВИЧ-инфекция у детей, получающих ВААРТ лечение (детей с ВИЧ / ВИЧ-ассоциированным синдромом липодистрофии); дети маленького роста, рожденные слишком маленькими для гестационного возраста (SGA); низкий рост у детей, родившихся с очень низкой массой тела при рождении (VLBW), кроме случаев SGA; скелетная дисплазия; гипохондроплазия; ахондроплазия; идиопатический низкий рост (ISS); ДГР у взрослых; переломы длинных костей, таких как большая берцовая кость, малоберцовая кость, бедренная кость,

плечевая кость, лучевая кость, локтевая кость, ключицы, пястные кости, плюсневая кость и фаланги пальцев; переломы губчатых костей, таких как череп, кости запястья и предплюсны; пациенты после хирургической операции на сухожилиях или связках, например, руки, колена или плеча; пациенты, проходившие или проходящие процедуру остеогенеза для вытяжения кости; пациенты после замены тазобедренного сустава или диска, восстановления мениска, артродеза позвонков или имплантации протеза, например, в колено, бедро, плечо, локоть, запястье или челюсть; пациенты, которым были имплантированы материалы, используемые при остеосинтезе, такие как штифты, винты и пластины; пациенты с несросшимися или неправильно сросшимися переломами; пациенты после остеотомии, например, из большой берцовой кости или 1 пальца ноги; пациенты после имплантации трансплантата; дегенерация суставного хряща в колене, вызванная травмой или артритом; остеопороз у больных с синдромом Шерешевского-Тернера; остеопороз у мужчин; взрослые пациенты на постоянном диализе (APCD); ассоциированные с нарушением питания сердечно-сосудистое заболевание у APCD; возвратный случай кахексии у APCD; рак у APCD; хроническое обструктивное заболевание легких у APCD; ВИЧ-инфекция у APCD; пожилые пациенты APCD; хроническое заболевание печени у APCD; синдром усталости у APCD; болезнь Крона; нарушение функции печени; мужчины с ВИЧ-инфекцией; синдром короткой кишки; центральное ожирение; ВИЧ-ассоциированный синдромом липодистрофии (HALS); мужское бесплодие; пациенты после общей плановой операции, алкогольной / наркотической детоксикации или неврологической травмы; старение; ослабленные пожилые люди; остеоартрит; травматические повреждения хряща; эректильная дисфункция; фибромиалгия; расстройства памяти; депрессия; черепно-мозговая травма; субарахноидальное кровоизлияние; очень низкая масса тела при рождении; метаболический синдром; глюкокортикоидная миопатия; низкий рост из-за глюкокортикоидной терапии у детей, способ ускорения восстановления мышечной ткани, нервной ткани или заживления ран; ускорения или улучшения кровоснабжения поврежденной ткани; или снижения риска развития инфекции в поврежденной ткани.

103. Соединение формулы (III) $A-W-B1-U$ (III)

где A представляет собой альбумин-связывающий радикал, B1 представляет собой гидрофильный спейсер,

W является химической группой, связывающей A и B1 и U представляет собой конъюгирующий фрагмент.

104. Соединение по воплощению 103, где A и W - как описано в любом из приведенных выше вариантов воплощения.

105. Соединение по любому из воплощений 103 или 104, где U содержит или состоит из арила, гетероарила, замещенного мальимида или пирролидин-2,5-диона, такого как $-NHC(O)CH_2CH_2-$ пирролидин-2.5-дион.

106. Соединение по любому из воплощений 103 или 104, где U содержит $D1-(CH_2)_{16}-D2$, где D1 и D2 независимо выбраны из $-O-$, $-N(R6)-$, $-NC(O)R7-$ или ковалентной связи; где R6 и R7 независимо представляют собой водород или C_{1-6} -алкил.

107. Соединение по любому из воплощений 103 или 104, где U содержит или состоит из уходящей группы, такой как Cl, Br, I, $-OH$, $-OS(O)_2Me$, $-OS(O)_2CF_3$, $-OTs$.

108. Соединение по воплощению 107, где уходящая группа является соединением галогена, выбранным из Cl, Br и I, предпочтительно Br.

109. Соединение по любому из воплощений 103 или 104, где U содержит или состоит из аллиламина ($H_2C=CH-CH_2-NH_2$), такого как $-C(O)NHCH_2-CH=CH_2$.

110. Соединение по любому из воплощений 103 или 104, где U содержит или состоит из амина, такого как $-\text{NH}_2$.

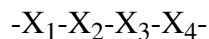
111. Соединение по любому из воплощений 103-110, при этом терапевтическое соединение является полипептидом.

112. Соединение по любому из воплощений 103-110, при этом терапевтическое соединение является полипептидом с одним свободным цистеином.

113. Соединение по любому из воплощений 103 или 104, где U содержит или состоит из альдегида, такого как $-\text{CHO}$.

114. Соединение по любому из воплощений 103-113, при этом гидрофильный спейсер

B1 имеет формулу:



где

X_1 является $-\text{W}_1-[(\text{CHR}^1)_{\text{I1}}-\text{W}_2]_{\text{m1}}-\{[(\text{CH}_2)_{\text{n1}}\text{E1}]_{\text{m2}}-[(\text{CHR}^2)_{\text{I2}}-\text{W}_3]_{\text{m3}}\}_{\text{n2}}-$, X_2 является $-(\text{CHR}^3)_{\text{I3}}-\text{W}_4]_{\text{m4}}-\{[(\text{CH}_2)_{\text{n3}}\text{E2}]_{\text{m5}}-[(\text{CHR}^4)_{\text{I4}}-\text{W}_5]_{\text{m6}}\}_{\text{n4}}-$,

X_3 является $-(\text{CHR}^5)_{\text{I5}}]_{\text{m7}}-$, X_4 является ковалентной связью,

I1 , I2 , I3 , I4 и I5 независимо выбраны из 0-16,

m1 , m3 , m4 , m6 и m7 независимо выбраны из 0-10,

m2 и m5 независимо выбраны из 0-25,

n1 , n2 , n3 и n4 независимо выбраны из 0-16,

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 и R^5 независимо выбраны из водорода, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$, $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$, C_{1-6} -алкила, арила или гетероарила; при этом алкильные, арильные и гетероарильные группы, возможно, содержат замещения галогеном, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$, $-\text{CN}$ или $-\text{OH}$,

E1 и E2 независимо выбраны из $-\text{O}-$, $-\text{N}(\text{R}^6)-$, $-\text{N}(\text{C}(\text{O})\text{R}^7)-$ или ковалентной связи; при этом R^6 и R^7 независимо представляют собой водород или C_{1-6} -алкил,

W_1 - W_5 независимо выбраны из $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHS}(\text{O})_2-$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_{\text{s2}}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$ или ковалентной связи; где s2 является 0 или 1.

Предполагается, что описание в этом документе любой особенности или воплощения изобретения с использованием таких терминов как «содержащий», «имеющий» или «включающий» по отношению к элементам или элементу обеспечивает поддержку схожих особенностей или воплощений изобретения, которые «состоят из», «в существенной степени состоят из», или «в значимой степени состоят из» этих конкретных элементов или элемента, если не указано иначе или если это не противоречит контексту (например, композиция, описываемая в этом документе как содержащая конкретный элемент, должна рассматриваться как описывающая также композицию, состоящую из этого элемента, если не указано иначе или если это не противоречит контексту).

Настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта, перечисленные среди особенностей или в формуле изобретения, представленной в этом документе, в максимальной степени, разрешенной применимыми законами.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими далее примерами, которые, однако, не должны рассматриваться как ограничивающие объем охраны. Особенности, раскрытые в предшествующем описании и в следующих далее

примерах, по отдельности или в любом их сочетании, могут служить исходным материалом для осуществления изобретения в различных его формах.

ПРИМЕРЫ

Сокращения:

- 5 а.е.м. = атомные единицы массы
CV = объем колонки
ч = час(ы)
Гц = Герц
л = литр(ы)
- 10 М = моль/л
мбар = миллибар
мг = миллиграмм(ы)
мин = минута (или минуты)
мл = миллилитр(ы)
- 15 mM = миллимоль/л
мм = миллиметр(ы)
ммоль = миллимоль (или миллимоли)
нмоль = наномоль (или наномоли)
моль = моль или моли
- 20 мкл = микролитр(ы)
н = нормальность
нм = нанометр(ы)
с = секунда (или секунды)
ppm = частиц на миллион
- 25 ESI = электро-спрей ионизация
в/в = внутривенный
m/z = соотношение массы к заряду
MS = масс-спектрометрия
ВЭЖХ = высокоэффективная жидкостная хроматография
- 30 ОФ = обращенно-фазовая
ВЭЖХ-MS = высокоэффективная жидкостная хроматография с последующей масс-спектрометрией
ЯМР = спектроскопия ядерного магнитного резонанса
п/о = пероральный
- 35 комн. темп. = комнатная температура
п/к = подкожный
Rt = время удерживания
Вос = трет бутилоксикарбонил
О-трет-Bu = трет-бутиловый сложный эфир
- 40 трет-Bu = трет-бутил
Вос-4-ABZ-ОН = 4-трет-бутоксикарбаниламинобензойная кислота
DCM = дихлорметан, CH₂Cl₂, метиленхлорид
DIC = диизопропилкарбодиимид
DIPEA = N,N-диизопропилэтиламин
- 45 DMF = N,N-диметилформамид
DMSO = диметилсульфоксид
DTT = дитиотреитол
EDAC = 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид

Et₂O = диэтиловый эфир

EtOAc = этилацетат

Fmoc = 9H-флуорен-9-илметоксикарбонил

Fmoc-Glu-O-трет-Bu = N-Fmoc-глутаминовой кислоты 1-трет-бутиловый сложный эфир

Fmoc-Lys(Mtt)-OH = (S)-6-[(дифенил-р-толилметил)-амино]-2-(9H-флуорен-9-ил метоксикарбониламино)-капроновая кислота

Fmoc-OEG-OH = (2[2-(Fmoc-амино)этокси]этокси)уксусная кислота OEG = (2[2-(амино) этокси]этокси)ацетил

Fmoc-Thx-OH = N-Fmoc-транс-4-аминаметилциклогексанкарбоновая кислота

H₂O = вода

HOBT = 1-гидроксibenзотриазол

MeCN = ацетонитрил

MeOH = метанол

MTP = 3-метилтио-1-пропанол

NaCl = хлорид натрия

NaOH = гидроксид натрия

NMP = N-метилпирролидин-2-он

OEG = (2[2-(амино)этокси]этокси)уксусная кислота

TFA = трифторуксусная кислота

THF = тетрагидрофуран

TIS = триизопропилсилан

CDCl₃ = хлороформ, обогащенный дейтерием

CD₃OD = метанол с тремя атомами дейтерия

DMSO-d₆ = диметилсульфоксид с шестью атомами дейтерия

TNBS = тринитробензолсульфоновая кислота

TSTU = O-(N-сукцинимидил)-1,1,3,3-тетраметилурана тетрафторборат

В примерах также применяются описанные далее общие способы.

Общий способ получения соединений hGH.

Ген, кодирующий соединение гормона роста, вставили рекомбинантными методами в плазмидный вектор. Далее пригодный штамм E.coli трансформировали с применением плазмидного вектора. Можно экспрессировать варианты hGH или GH с N-концевым метионином или в виде химерного белка с MEAE, от которого впоследствии отщепляют последовательность MEAE.

Исходную суспензию клеток приготовили в 25% глицерине и хранили при -80°C. Исходную суспензию штамма в глицерине инокулировали на чашки с агаром LB и затем инкубировали при 37°C в течение ночи. Содержимое каждой чашки промыли средой LB и разбавили в 500 мл среды LB для проведения экспрессии. Культуру инкубировали при 37°C при встряхивании 220 об/мин до достижения показателя OD₆₀₀=0,6. Последующую индукцию проводили с помощью 0,2 mM IPTG при 25°C в течение 6 ч. После этого клетки собрали центрифугированием.

Далее клетки суспендировали в 10 mM трис-HCl, pH 9,0, содержащем 0,05% Твин 20, 2,5 mM ЭДТА, 10 mM цистамин и 4 M мочевины, и разрушили с помощью дезинтегратора клеток при давлении 30 тыс. фунтов на квадратный дюйм. Супернатант собрали центрифугированием и далее провели его хроматографическую очистку.

Очистку проводили с применением ионообменной и гидрофобной хроматографии с последующим удалением пептидной метки с помощью дипептидилпептидазы I человека

(hDPPI), экспрессированной в клетках CHO. Окончательную очистку проводили с применением изоосаждения и ионообменной хроматографии. Очистку также можно проводить с применением, в качестве неограничивающих примеров, ионообменной хроматографии, гидрофобной хроматографии, аффинной хроматографии, эксклюзионной хроматографии и разделения с помощью мембран, известных специалистам в данной области.

Определение химических характеристик белка в составе очищенных соединений гормона роста.

Интактный очищенный белок анализировали с применением MALDI масс-спектрометрии. (MALDI-MS). Наблюдаемые массы соответствовали теоретическим массам, выведенным на основании аминокислотной последовательности.

Ожидаемое замыкание дисульфидных связей можно продемонстрировать с помощью пептидного картирования с применением расщепления трипсином и AspN с последующим анализом посредством MALDI-MS продуктов расщепления до и после восстановления дисульфидных связей с помощью ДТТ.

Количественное определение скорости деградации протеазой конъюгатов соединений GH и hGH

Исследуемое соединение расщепляют соответствующей протеазой (трипсином, химотрипсином, пепсином, эластазой, фактором VIIa, фактором Ха, протеиназой К, карбоксипептидазой, DPPIV, нейтральной эндопептидазой, гранзимом В, пролин-эндопептидазой, пептидазой I из стафилококка, термолизином, тромбином, протеиназой Arg-C, эндопептидазой Asp-N, каспазой 1-10, кlostрипаном, энтерокиназой, глутамил-эндопептидазой, гранзимом В, LysC, LysN, пролин-эндопептидазой и, пептидазой I из стафилококка или тканевыми экстрактами) в подходящем буферном растворе (например PBS или растворе бикарбоната аммония) при 37°C в течение периода времени до 24 ч. Протеолитическую деградацию оценивают с применением анализа ВЭЖХ.

Протеолитическое расщепление:

100 мкл раствора исследуемого соединения в концентрации 1 мг/мл в буферном растворе бикарбоната аммония подвергают деградации ферментом в течение периода времени до 24 ч при 37°C. В различных временных точках отбирают промежуточные пробы и останавливают реакцию протеолиза подкислением пробы путем 10-кратного разбавления с помощью 1% ТФУ. Эти разведенные пробы анализируют обратной фазой ВЭЖХ для оценки степени протеолитического расщепления.

Метод ВЭЖХ:

10 мкл вышеуказанного раствора вводят в колонку с обращенной фазой Vydac C4 2×150 мм и элюируют линейным градиентом от 0,1% ТФУ в воде до 100% ацетонитрила, содержащего 0,1% ТТФУ в течение периода времени 30 мин при скорости потока 0,2 мл/мин. Детекцию пиков производят по УФ поглощению при 214 нм. Процентную (%) долю интактного соединения во временной точке $t=T$ вычисляют по площади пика во временной точке $t=T$ (A_T) и площади пика во временной точке $t=0$ (A_0) по формуле:

$(A_T/A_0) \times 100\%$. Зависимость процентной (%) доли интактного соединения от времени строят с применением программного обеспечения GraphPad Prims, версия 5.01. Период полувыведения ($T_{1/2}$) также вычисляют с помощью опции «Однофазное снижение»

программного обеспечения GraphPad Prism. Примерами ферментов, которые можно применять, являются эластаза (Sigma, из поджелудочной железы свиньи) и химотрипсин (Roche, степень чистоты - для секвенирования). Пример буферного раствора: 50 мМ бикарбонат аммония, pH 8,5.

Капиллярный гель-электрофорез:

Капиллярный электрофорез проводили с использованием системы Agilent Technologies 3DCE (Agilent Technologies). Сбор данных и обработку сигнала осуществляли с помощью программного обеспечения Agilent Technologies 3DCE ChemStation. В качестве капилляра использовали «Extended Light Path Capillary» с длиной 64,5 см (эффективная длина 56,0 см), внутренним диаметром 50 мкм, от компании Agilent. УФ-детекцию проводили при длине волны 200 нм (ширина полосы пропускания 16 нм, эталон: 380 нм и ширина полосы пропускания 50 нм). В качестве электролита (электродного буфера) использовали фосфатный буфер: 50 мМ, pH 7 (способ А). Капилляр уравнивали с помощью 0,1 М NaOH в течение 3 мин, затем с помощью воды Milli-Q в течение 2 мин и электролитом в течение 3 мин. После каждого прогона капилляр промывали водой milli-Q в течение 2 мин, затем фосфорной кислотой в течение 2 мин и водой milli-Q в течение 2 мин. Гидродинамические введения производили при давлении 50 мбар в течение 4,0 с. Напряжение поддерживали на уровне +25 кВ. Температура капилляра составляла 30°C, а время прогона - 10,5 мин.

MALDI-TOF масс-спектрометрия:

Молекулярные массы определяли с помощью прибора Autoflex Maldi-Tof (Bruker). Пробы подготавливали с применением в качестве матрикса альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты.

ОФ-ВЭЖХ (обратнофазовая ВЭЖХ):

Анализ с помощью ОФ-ВЭЖХ проводили с применением системы Agilent 1100 на колонке с кремнеземным наполнителем Vydac 218TP54 4,6 мм × 250 мм, 5 мкм C-18 (The Separations Group, Гесперия). Детекцию осуществляли при помощи УФ с длиной волны 214 нм, 254 нм, 280 нм и 301 нм. Колонку уравнивали с помощью 0,1% трифторуксусной кислоты в H₂O и проводили элюцию проб подходящим градиентом от 0-90% ацетонитрила до 0,1% трифторуксусной кислоты в H₂O.

ЖХ-МС (жидкостная хроматография с последующей масс-спектрометрией):

Анализ с помощью ЖХ-МС проводили на масс-спектрометре PE-Sciex API 100 или 150, оборудованном двумя микронасосами Perkin Elmer Series 200, автодозатором Perkin Elmer Series 200, детектором УФ Applied Biosystems 785A UV и испарительным детектором светорассеяния Sedex 75. Элюцию с колонки с кремнеземным наполнителем Waters Xterra 3,0 мм × 50 мм, 5 мкм C-18 проводили со скоростью 1,5 мл/мин, при комнатной температуре. Колонку уравнивали с помощью 5% MeCN / 0,1% TFA / H₂O и провели элюцию в течение 1,0 мин с помощью 5% MeCN / 0,1% TFA / H₂O, а затем - с помощью линейного градиента до 90% MeCN / 0,1% TFA / H₂O в течение 7 мин. Детекцию проводили по поглощению УФ излучения при 214 нм и с применением испарительного детектора светорассеяния. Фракцию колоночного элюата вносили в распылитель ионов масс-спектрометра PE-Sciex API 100. Сканирование масс в диапазоне 300-2000 а.е.м. проводили через каждые 2 с во время прогона.

Количественное определение белка:

Концентрации белков оценивали путем измерения поглощения при длине волны 280 нм, используя УФ-спектрофотометр NanoDrop ND-1000.

Ферментативное картирование пептидов для определения сайта (или сайтов) модификации при получении производных:

Пептидное картирование проводили с применением переваривания протеазой Asp-N восстановленных и алкилированных белков. Сначала белок обрабатывали с помощью DTT и йодацетамида в соответствии со стандартными методиками. Алкилированный

продукт очистили с применением ВЭЖХ. Далее очищенный алкилированный продукт переваривали в течение ночи эндопротеазой Asp-N (Boehringer) при соотношении фермент: субстрат, равном 1:100. Смесь продуктов переваривания разделяли с помощью ВЭЖХ, используя колонку C-18 и стандартную буферную систему TFA/MeCN.

- 5 Полученную в результате пептидную карту сравнили с картой hGH, не подвергавшегося модификациям с целью получения производных, и фракции с различающимися значениями времени удержания собрали и дополнительно проанализировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.

ДСН-ПААГ:

- 10 Электрофорез в полиакриламидном геле с ДСН проводили с использованием гелей NuPAGE 4%-12% на буфере бис-трис (Invitrogen NP0321BOX). Гели окрашивали серебром (Invitrogen LC6100) или кумасси (Invitrogen LC6065) и, в случаях, когда это требовалось, также окрашивали на присутствие ПЭГ с помощью йодида бария, как описано в публикации: M.M. Kurfurst in Anal. Biochem. 200(2), 244-248, (1992).

- 15 Хроматография белков:

- Хроматографию белков проводили с помощью хроматографической системы Äkta Explorer и колонок от компании GE Health Care. Анионообменную Хроматографию проводили на колонке Q-Sepharose HP 26/10. В качестве стартового буфера использовали 20 mM триэтаноламиновый буфер с pH 8,5, а в качестве элюирующего буфера
20 использовали стартовый буфер с добавлением 0,2 M NaCl. В типичном случае соединения элюировали градиентом 0-75% элюирующего буфера в объеме, равном 15 объемам колонки. Обессоливание и замену буфера проводили с использованием колонки HiPrep 26/10.

Тест с TNBS

- 25 Приготовили раствор 10% DIPEA в DMF (раствор 1) и водный раствор 1 M TNBS (раствор 2). Несколько гранул наполнителя поместили в маленькую пробирку и добавили по 1-3 капли каждого раствора (1 и 2). После непродолжительного перемешивания смесь оставили при комнатной температуре на 10 мин и исследовали гранулы. Интенсивно окрашенные в оранжевый или красный цвет гранул
30 свидетельствуют о положительном результате (т.е., о присутствии свободных аминов); желтое или бледно-оранжевое окрашивание гранул свидетельствует о слабом положительном результате, а отсутствие окраски гранул дает отрицательный результат.

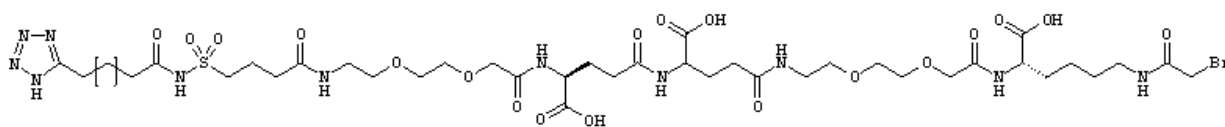
Вычисление LogP

- LogP можно вычислить как mLogP и/или cLogP для альбумин-связывающей части и/
35 или части, соответствующей гидрофильному спейсеру, применяя опубликованные алгоритмы (J. Am. Chem. Soc., 86, 5175-5180, (1964) «A New Substituent Constant, Derived from Partition Coefficients», C.A. Lipinski et al. Advanced Drug Delivery Reviews, 23, 3-25 (1997), «Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings» и I. Moriguchi, S. Hirono, I. Nakagome, H. Hirano,
40 Chem. and Pharm. Bull., 42, 976-978, (1994) «Comparison of Reliability of logP Values for Drugs Calculated by Several Methods». В этом документе clogP, logP, предложенный в колледже Помона (коэффициент распределения в смеси октанол/вода), вычисляют с помощью программы Sybyl 7.0 от компании Tripos (<http://www.tripos.com>), версии 4.2 алгоритма для вычисления clogP и версии 22 ассоциированной базы данных по фрагментам,
45 предоставляемой компанией BioByte Corp (<http://www.biobyte.com/>).

Получение связывающихся с альбумином фрагментов

Пример 1

4-(1H-Тетразол-16-ил-гексадеканойлсульсрамоил)бутаноил-OEG-γGlu-γGlu-OEG-N^e

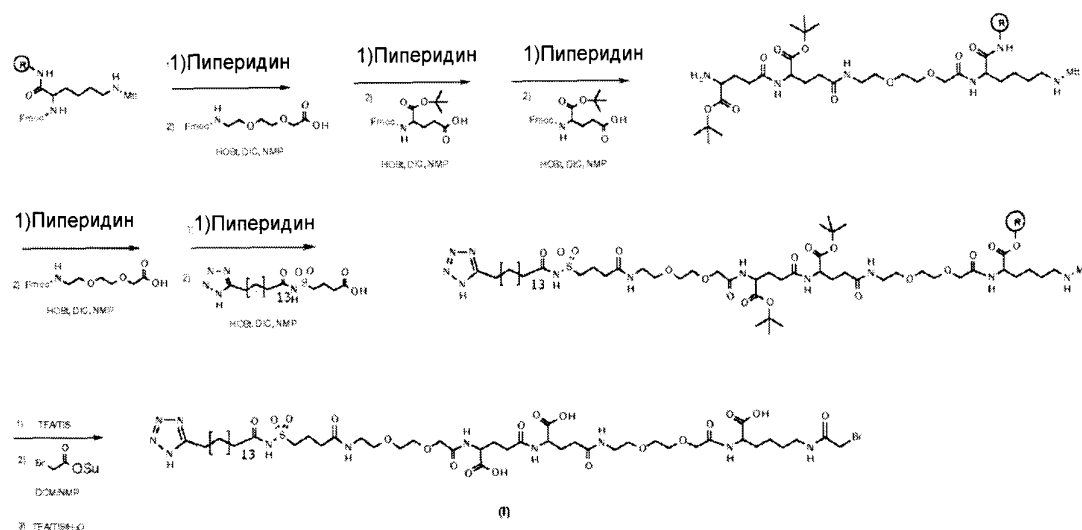
(C(O)CH₂Br)Lys-OH (I):

(I)

Соединение (I) синтезировали на твердой подложке согласно схеме 1, в концентрации 1 мМ, с применением стандартной стратегии синтеза пептидов с участием Fmoc на синтезаторе ABI433. Пептид был собран на смоле Fmoc-Lys(MTT)-Wang с применением Fmoc-OEG-OH- и Fmoc-Glu-O-трет-Bu-защищенных аминокислот. В ручном режиме провели в течение ночи присоединение 4-(16-1Н-тетразол-5-ил-гексадеканоилсульфамоил)масляной кислоты с использованием 2 эквивалентов DIC/NHS в DCM/NMP; тест с TNBS подтвердил, что реакция прошла полностью. Затем смолу обрабатывали с помощью 50 мл смеси DCM/TFA/TIS/вода (94:2:2:2) в проточном режиме до исчезновения желтого окрашивания, примерно в течение 20 мин, с последующей промывкой и нейтрализацией с использованием смеси DIPEA/DMF. Бромуксусную кислоту (4 мМ) в DCM/NMP (1:1) активировали с помощью смеси 1 мМ NHS и DIC, профильтровали и добавили к смоле с дополнительным добавлением 1 мМ DIPEA. Через 1 ч реакция прошла полностью. Смолу обрабатывали с применением 80 мл смеси TFA/TIS/вода (95:2,5:2,5) в течение 1 ч. Выпарили с помощью струи N₂, осадили добавлением Et₂O, промыли с помощью Et₂O и высушили. Неочищенный продукт очистили с помощью препаративной ВЭЖХ (2 прогона), с градиентом от 30-80% 0,1 TFA в MeCN до 0,1% TFA в воде. Фракции собрали и лиофилизировали с ~50% MeCN, получив в результате соединение (I).

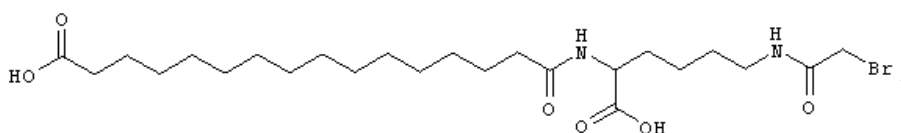
TOF-MS: масса 1272,52 (M+1)

Схема 1



Пример 2

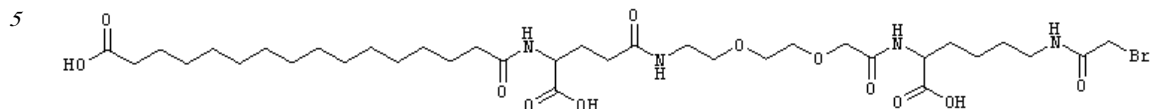
Способом, схожим с описанным в примере 1 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Wang.



TOF-MS: масса 536,52 (M+1)

Пример 3

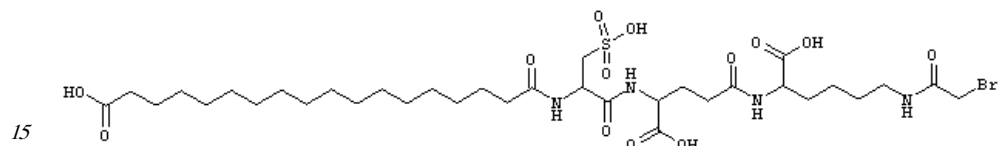
Способом, схожим с описанным в примере 1 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Wang.



TOF-MS: масса 810,80 (M+1)

Пример 4

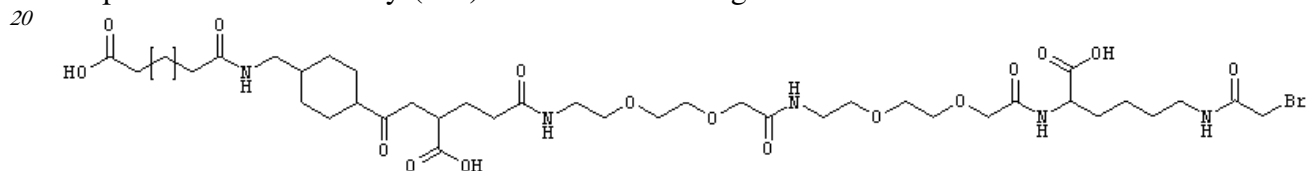
10 Способом, схожим с описанным в примере 1 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Wang.



TOF-MS: масса 844,84 (M+1)

Пример 5

Способом, схожим с описанным в примере 1 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Wang.

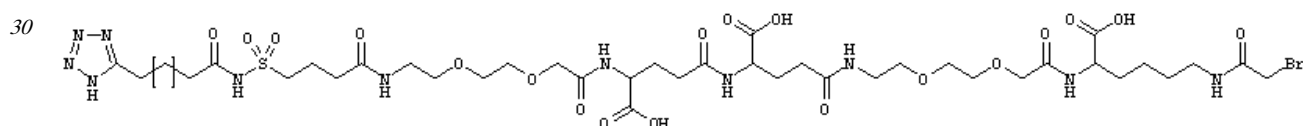


25 ,

TOF-MS: масса 1151,27 (M+1)

Пример 6

Способом, схожим с описанным в примере 1 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Wang.

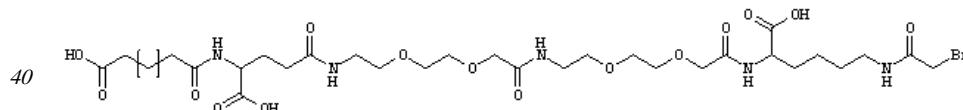


35 ,

TOF-MS: масса 1272,30 (M+1)

Пример 7

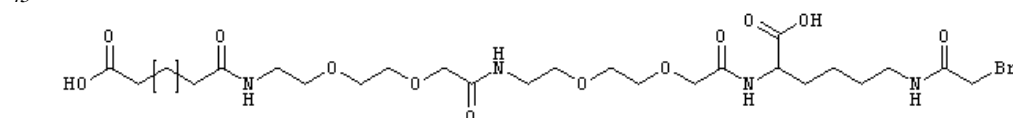
Способом, схожим с описанным в примере 1 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Wang.



TOF-MS: масса 984,01 (M+1)

Пример 8

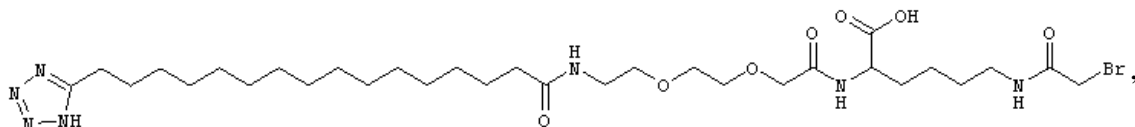
Способом, схожим с описанным в примере 1 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Wang.



TOF-MS: масса 882,95 (M+1)

Пример 9

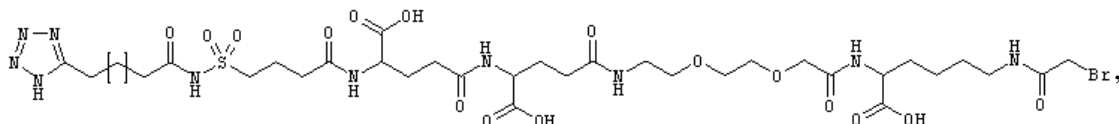
Способом, схожим с описанным в примере 1 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Wang.



TOF-MS: масса 782,74 (M+1)

Пример 10

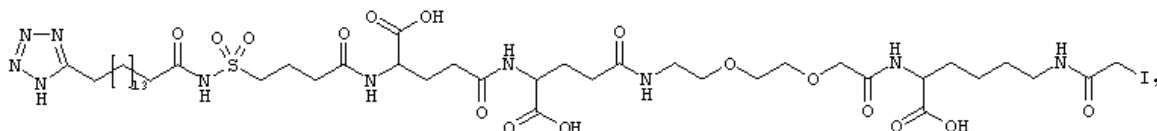
Способом, схожим с описанным в примере 1 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Wang.



TOF-MS: масса 1127,14 (M+1)

Пример 11

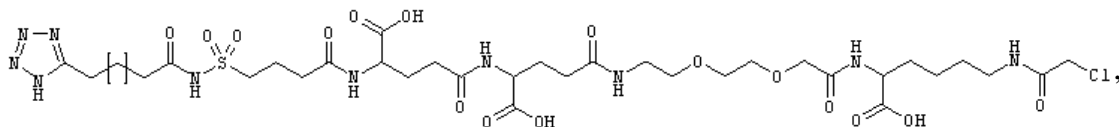
Способом, схожим с описанным в примере 1 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH, йодоуксусной кислоты и смолы Wang.



TOF-MS: масса 1174,14 (M+1)

Пример 12

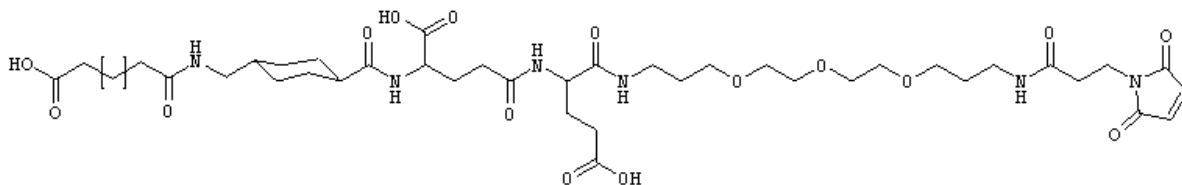
Способом, схожим с описанным в примере 1 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH, хлоруксусной кислоты и смолы Wang.



TOF-MS: масса 1061,89 (M+1)

Пример 13

(19-Карбоксинонадеcanoил)-Thx-Glu-Glu-N-{3-[2-(2-{3-[3-малъимидо-пропиониламино]пропоксиу}этокси)этокси]пропил}амид (II)



(II)

Смоле 2-хлортритила (2,0 г, 2,6 ммоль) дали набухнуть в DCM в течение 0,5 ч. Добавили раствор 4,7,10-триокса-1,13-диамина в DCM (30 мл). Смолу перемешивали при комн. темп. в течение 1 ч. Один раз промыли смолу DCM, затем добавили раствор DIPEA:MeOH:DCM (15 мл : 15 мл : 20 мл). Встряхивали смолу в течение 0,5 ч, затем промыли три раза с помощью DCM. После этого последовательно присоединили Fmoc-Glu(O-трет-Bu)-OH, Fmoc-Glu-O-трет-Bu и FmocThexOH с помощью стандартных методик пептидной химии, как описано далее. Раствор с 0,5 М каждого из соединений Fmoc-AA-

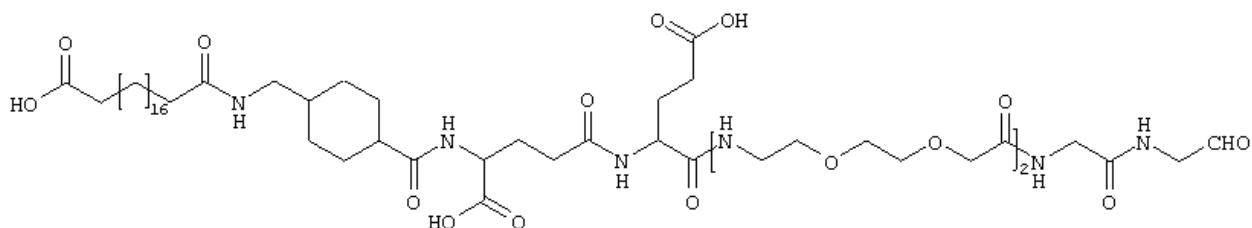
ОН/DIC/HOBt в NMP (11,7 mL) перемешали и через 2 мин добавили к смоле. Смолу встряхивали в течение 45 мин при комн. темп., а затем промыли с помощью NMP (5 раз) и DCM (5 раз). Добавили раствор $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIPEA}/\text{NMP}$ (1:1:5) и перемешивали смолу при комн. темп. в течение 10 мин. Промыли смолу (5 раз NMP и 5 раз DCM). Затем смолу обработали 30% пиперидином в NMP, 2 раза по 10 мин, и потом промыли 5 раз NMP и 5 раз DCM. Потом добавили к пептиду раствор 0,25 М эйкозандикислоты (6 экв.), содержащий 0,125 М HOAt (3 экв.), 0,125 М DIC (3 экв.) и 0,125 М лутидин (3 экв.). Смолу встряхивали при комн. темп. в течение 2 ч, после чего промыли 5 раз NMP и 8 раз DCM. Продукт отщепляли от смолы с помощью 10% TFA-DCM в течение 20 мин. Смолу отфильтровали и еще раз обработали с помощью 10% TFA-DCM в течение дополнительных 20 мин. Собрали объединенные фильтраты и провели выпаривание до сухого состояния.

Вышеуказанный сухой продукт растворили в DMF (6 мл) и добавили TSTU-активированную 3-мальмидпропионовую кислоту (приготовленную заранее с помощью проведения реакции TSTU с 3-мальмидпропионовой кислотой в DMF (2 мл) в течение 45 мин) и DIPEA (200 мкл). Смесь перемешивали при комн. темп. в течение 1 ч. Реакционную смесь выпарили до сухого состояния, а остаток растворили в 95% TFA в воде MilliQ и перемешивали при комн. темп. в течение 20 мин. Смесь выпарили до сухого состояния. К остатку добавили минимальное количество воды для осаждения твердого вещества. Осадок отфильтровали и провели повторную кристаллизацию из MeCM. Кристаллы собрали и энергично промыли с помощью Et_2O , получив соединение (II) в виде белого твердого вещества.

TOF-MS: масса 1094,39 (M+1).

Пример 14

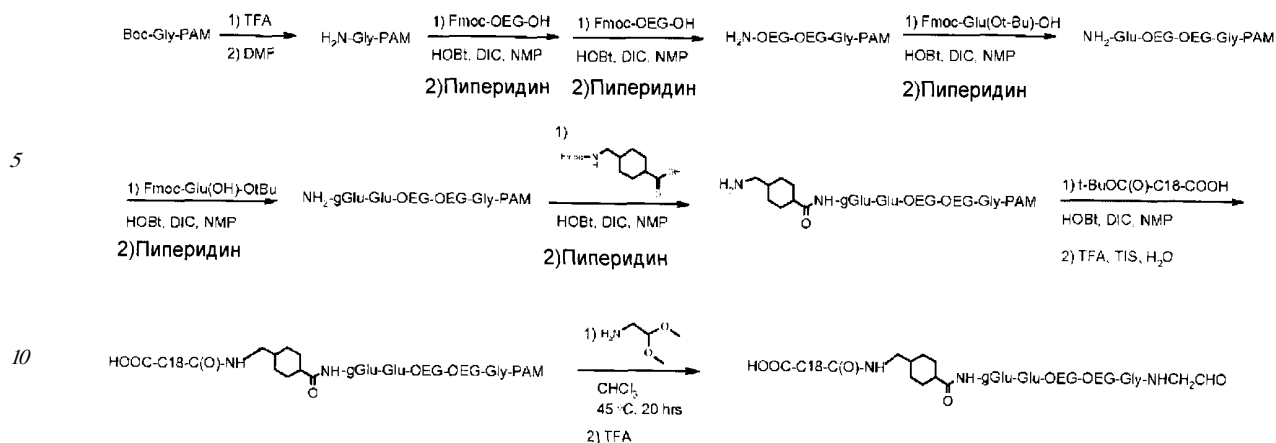
Способом, схожим с описанным в примере 1 выше и изображенным на схеме 2 ниже, получили следующее соединение с применением смолы Boc-Gly-PAM в качестве исходного материала и моно-трет-бутил-арахиновой кислоты, 4-Бос-амиобензойной кислоты, Fmoc-Thx-ОН-, Fmoc-OEG-ОН-, Fmoc-Glu(О-трет-Bu)-ОН-, Fmoc-Glu(ОН)-трет-Bu-защищенных аминокислот. После мягкого снятия защитных групп пептидный продукт отщепили от смолы с помощью 2,2-диметоксиэтиламина с последующим удалением ацетильных групп с помощью TFA, что привело в результате к получению фрагмента, связывающегося с альбумином (IV).



(IV)

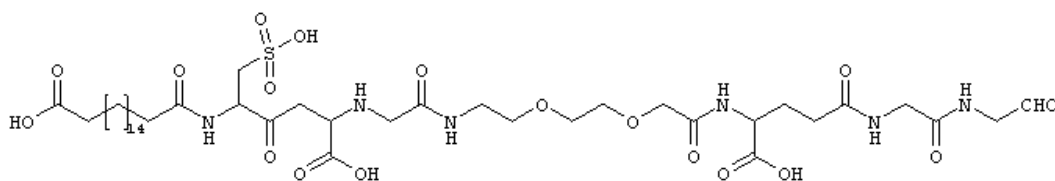
TOF-MS: масса 1128,38 (M+1)

Схема 2:



Пример 15

Способом, схожим с описанным в примере 14 выше, получили следующее соединение с применением смолы Boc-Gly-PAM в качестве исходного материала и моно-трет-бутил-арахиновой кислоты, 4-Бос-амиобензойной кислоты, Fmoc-Thx-OH-, Fmoc-OEG-OH-, Fmoc-Glu(O-трет-Bu)-OH-, Fmoc-Glu(OH)-трет-Bu-защищенных аминокислот. После мягкого снятия защитных групп пептидный продукт отщепили от смолы с помощью 2,2-диметоксиэтиламина с последующим удалением ацетильных групп с помощью TFA, что привело в результате к получению фрагмента, связывающегося с альбумином (V).


$$\{V\}$$

TOF-MS: $R_t = 15,2$ мин, масса = 967,11 (M+1)

Пример 16

Способом, схожим с описанным в примере 14 выше, получили соединение (VI) с применением смолы Fmoc-Lys(Mtt)-Wang в качестве исходного материала и моно-трет-бутил-октадекандикарбоновой кислоты, Boc-Ser(трет-Bu)-ОН-, Fmoc-OEG-ОН, Fmoc-Glu(О-трет-Bu)-ОН- и окисленным Fmoc-Cys-ОН-защищенных аминокислот. Пептидный продукт отщепили от смолы с помощью 2,5% TIS, 2,5% H₂O в THF в течение 3 ч и

очистили с применением препаративной ВЭЖХ:

Колонка: 2 см, C18

Элюент А: 0,1% TFA в воде Milli-Q

Элюент В: 0,1% TFA в MeCN

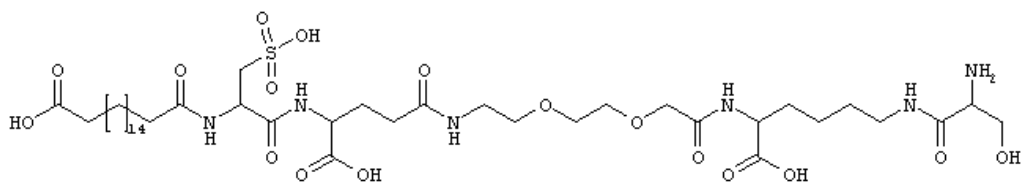
Стартовое количество (в %) элюента В: 40%

Конечное количество (в %) элюента В: 75%

Градиент: 5 мин - 10% MeCN, 5-10 мин повышение до стартового количества (в %) элюента В в течение 51 мин, 5 мин при конечном количестве (в %) элюента В +10% MeCN в течение примерно 1 ч

Фракции анализировали с помощью ЖХ-MS-TOF.

Требуемые фракции собирали, объединяли и лиофилизировали с получением соединения (VI).



(VI)

TOF-MS: Rt = 6,3 мин, масса = 955,1 (M+1)

Окисление соединения (VI):

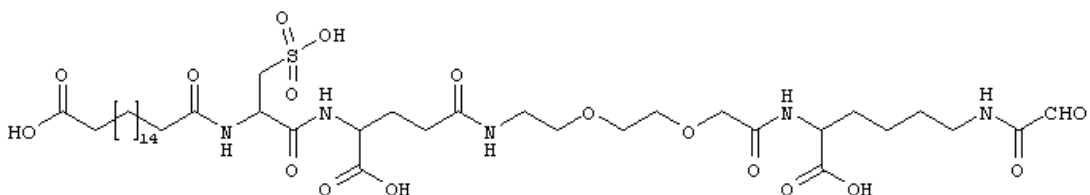
МТР - раствор:

3-метилтио-1-пропанол (290 мг) растворили в 4 мл 25 мМ HEPES, pH 7,00. Раствор перйодата:

96 мг NaIO₄ растворили в 2 мл воды Milli-Q.

К раствору соединения (VI) в воде Milli-Q (1 мл) добавили МТР-раствор (3,6 мл) и раствор перйодата (560 мкл) и подвели до pH 9,5 с помощью одной капли 1 н NaOH. Реакционную колбу накрыли оловянной фольгой и перемешивали в течение 1 ч при комн. темп. Добавили еще одну порцию раствора перйодата (560 мкл) и оставили реакционную смесь на 4,5 ч при температуре окружающей среды. Полученную в результате смесь пропустили через две колонки NAP, чтобы освободиться от NaIO₄.

Колонки были предварительно промыты 25 мМ HEPES (5×2,5 мл), pH 7,0. Пробу (2,5 мл) наносили на каждую колонку и элюировали с помощью 3,5 м раствора 25 мМ HEPES, Ph 7,00. Элюция 2×3,5 мл позволила собрать в сумме фракцию примерно 10,5 мл, содержащую кетоальдегид (VII), который применяли непосредственно для конъюгации с аналогом GH.

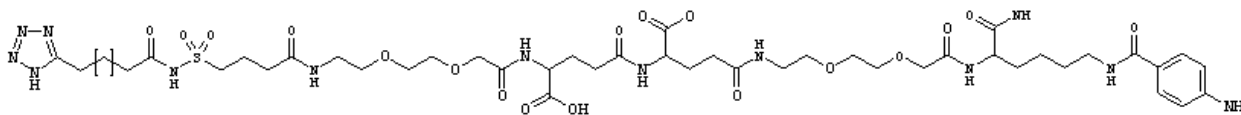


(VII)

TOF-MS: масса = 924,08 (M+1)

Пример 17

4-(1Н-Тетразол-16-ил-гексадеканоилсульфамоил)бутаноил-OEG-γGlu-γGlu-OEG-N^ε (4-аминобензоил)Lys-NH₂ (VIII):



(VIII)

(VIII)

Соединение (VIII) синтезировали на твердой подложке в соответствии со схемой 3. Fmoc-защищенную смолу Rink-Amide (2,2 г, 0,6 ммоль/г) отвесили в колбу. Дали смоле набухнуть в NMP (3×30 м) в течение 2 ч. Встряхивали смолу с 25% пиперидином в NMP (30 мл) в течение 10 мин. Слили со смолы жидкость и обработали 25% пиперидином в NMP (30 мл) в течение 1 ч, после чего слили жидкость и промыли с помощью NMP (6×30 мл). Fmoc-Lys(Mtt)-ОН и HOBT отвесили в колбу, растворили в растворе бромфенолового синего в NMP (30 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавили к осушенной ранее смоле, после чего добавили DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей

среды в течение 21 ч. Слили со смолы жидкость и промыли с помощью NMP (6×30 мл), а затем промыли с помощью DCM (3×30 мл). Обработали смолу гексафторизопропанолом (20 мл) в течение 10 мин. Встряхивали в течение 10 мин. Слили со смолы жидкость и промыли с помощью DCM (3×30 мл). Смолу обработали гексафторизопропанолом (20 мл) в течение 10 мин еще раз и встряхивали в течение 10 мин. Слили со смолы жидкость и промыли с помощью DCM (3×30 мл), после чего слили со смолы жидкость и промыли с помощью NMP (3×30 мл). 4-(Вос-амино)бензойную кислоту и HOBt отвесили в колбу, растворили в растворе бромфенолового синего в NMP (30 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавили к осушенной ранее смоле, после чего добавили DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды. Слили со смолы жидкость и промыли с помощью NMP (6×30 мл). Встряхивали смолу с 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 10 мин. Слили со смолы жидкость и обработали 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 1 ч, после чего слили жидкость и промыли с помощью NMP (6×15 мл). Fmoc-OEG-OH и HOBt отвесили в колбу, растворили в растворе бромфенолового синего в NMP (15 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавили к осушенной смоле, после чего добавили DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды в течение 23 ч. Слили со смолы жидкость и промыли с помощью NMP (6×15 мл). Встряхивали смолу с 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 10 мин. Слили со смолы жидкость и обработали 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 1 ч, после чего слили жидкость и промыли с помощью NMP (6×15 мл). Fmoc-Glu-O-трет-Bu и HOBt отвесили в колбу, растворили в растворе бромфенолового синего в NMP (15 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавили к осушенной смоле, после чего добавили DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды в течение 18 ч. Слили со смолы жидкость и промыли с помощью NMP (6×15 мл). Встряхивали смолу с 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 10 мин. Слили со смолы жидкость и обработали 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 1 ч, после чего слили жидкость и промыли с помощью NMP (6×15 мл). Fmoc-Glu-O-трет-Bu и HOBt отвесили в колбу, растворили в 15 мл 0,5 мМ раствора бромфенолового синего в NMP. Этот раствор добавили к осушенной смоле, после чего добавили DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды в течение 18 ч. Слили со смолы жидкость и промыли с помощью NMP (6×15 мл). Встряхивали смолу с 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 10 мин. Слили со смолы жидкость и обработали 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 1 ч, после чего слили жидкость и промыли с помощью NMP (6×15 мл). Fmoc-OEG-OH и HOBt отвесили в колбу, растворили в растворе бромфенолового синего в NMP (15 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавили к осушенной смоле, после чего добавили DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды. Слили со смолы жидкость и промыли с помощью NMP (6×15 мл). Встряхивали смолу с 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 10 мин. Слили со смолы жидкость и обработали 25% пиперидином в NMP (10 мл) в течение 1 ч, после чего слили жидкость и промыли с помощью NMP (6×15 мл).

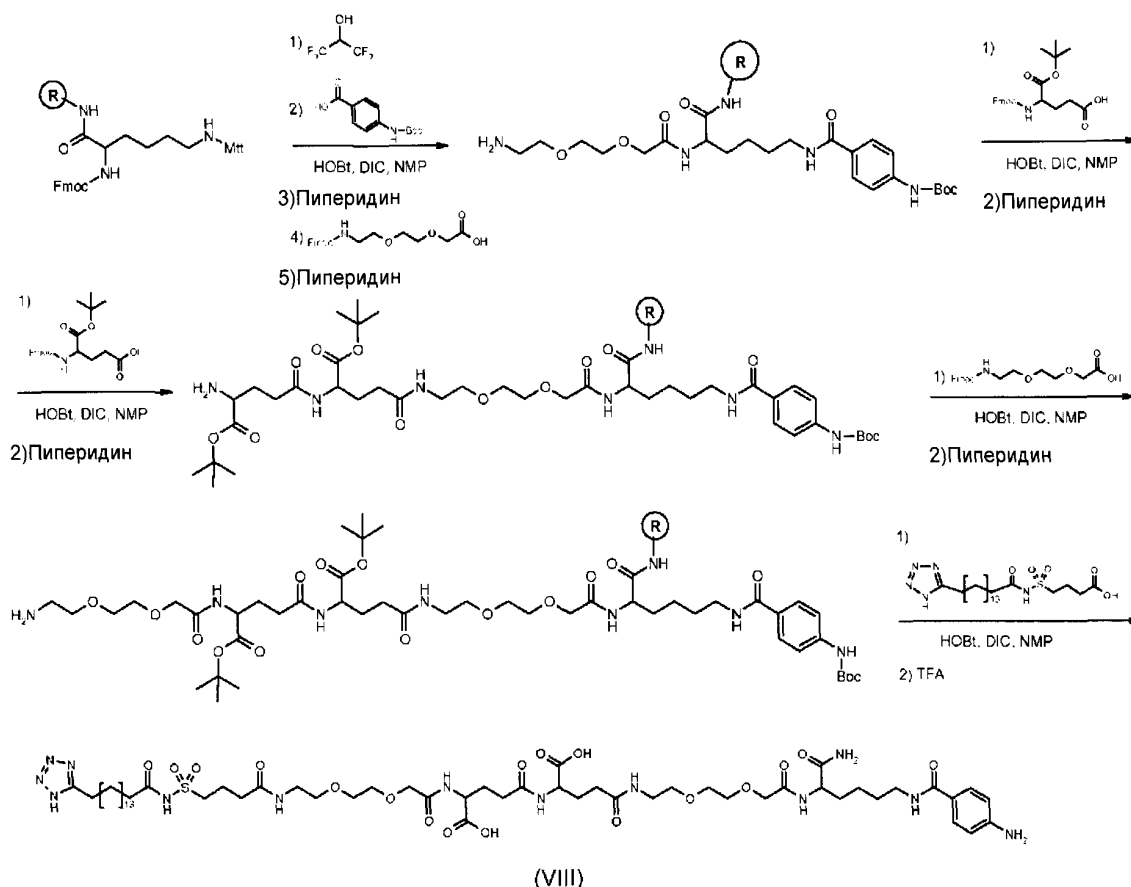
4-(16-1Н-Тетразол-5-ил-гексадеканоилсульфамоил)масляную кислоту и HOBt отвесили в колбу, растворили в растворе бромфенолового синего в NMP (15 мл, 0,5 мМ). Этот раствор добавили к осушенной смоле, после чего добавили DIC. Реакционную смесь встряхивали при температуре окружающей среды в течение 21 ч. Слили со смолы жидкость и промыли с помощью NMP (6×15 мл), а затем слили жидкость и промыли с помощью DCM (6×15 мл). Подвергли смолу расщеплению с помощью смеси 95% TFA в воде (10 мл) с добавлением DCM (0,25 мл) и TIS (0,25 мл). Встряхивали смолу в течение 2 ч при температуре окружающей среды и профильтровали в охлажденный на льду

Et₂O (75 мл). Полученный в результате осадок отделили центрифугированием с последующей промывкой с помощью Et₂O (3х) и вакуумной сушкой в течение 48 ч, в результате чего было получено 300 мг неочищенного соединения (VIII).

Неочищенное соединение (VIII) очистили с применением препаративной ВЭЖХ (GILSON), 30->80% MeCN. Объединенные фракции выпарили до сухого состояния, а остаток растворили в смеси H₂O/MeCN (1:1) и лиофилизировали в течение ночи с получением 170 мг соединения (VII).

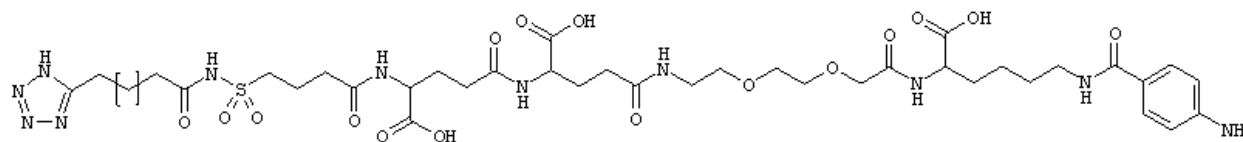
TOF-MS: Rt = 4,7 мин, масса 1268,71 (M+1)

Схема 3.



Пример 18

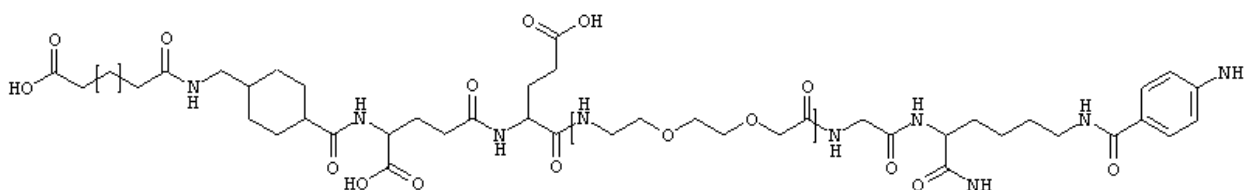
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-ОН и смолы Wang.



TOF-MS: macca 1124,33 (M+1)

Пример 19

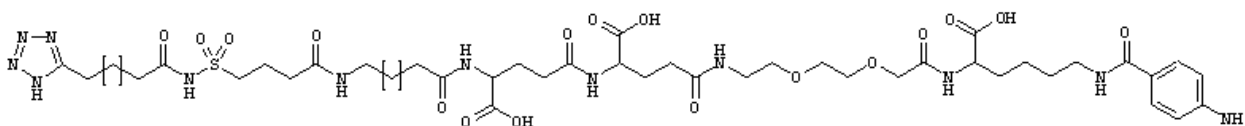
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-ОН и смолы Rink-Amid.



TOF-MS: macca 1333,64 (M+1)

Пример 20

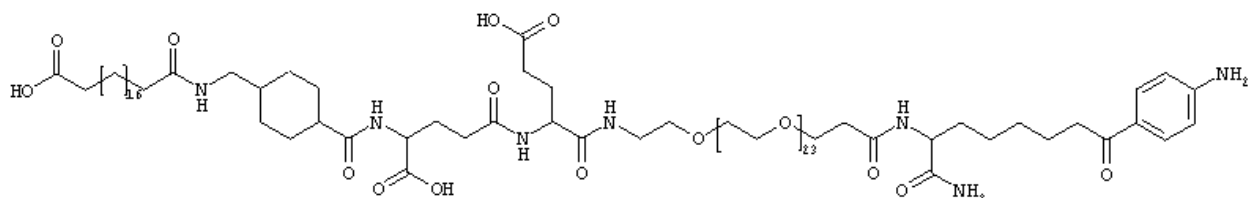
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-ОН и смолы Rink-Amid.



TOF-MS: macca 1320,67 (M+1)

Пример 21

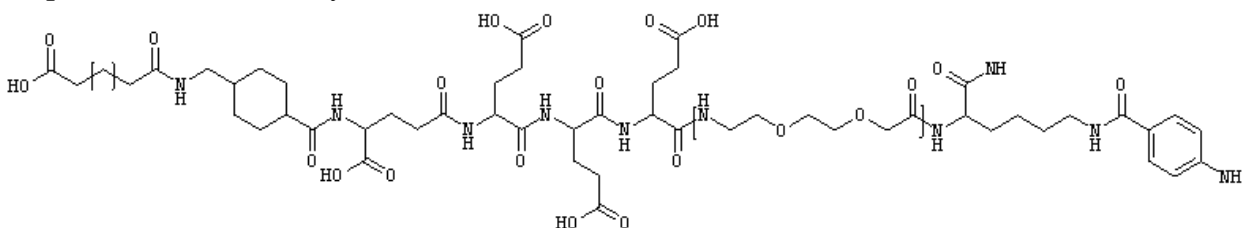
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-ОН и смолы Rink-Amid.



TOF-MS: macca 2114,64 (M+1)

Пример 22

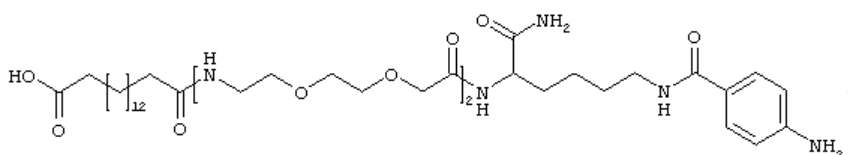
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-ОН и смолы Rink-Amid.



TOF-MS: macca 1534,82 (M+1)

Пример 23

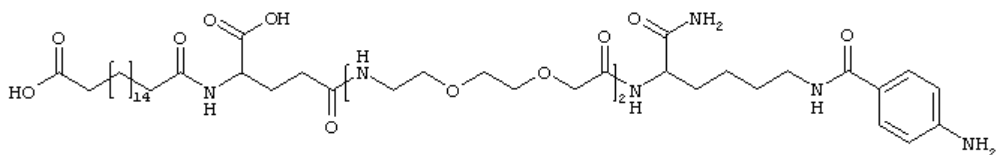
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-ОН и смолы Rink-Amid.



TOF-MS: macca 823,05 (M+1)

Пример 24

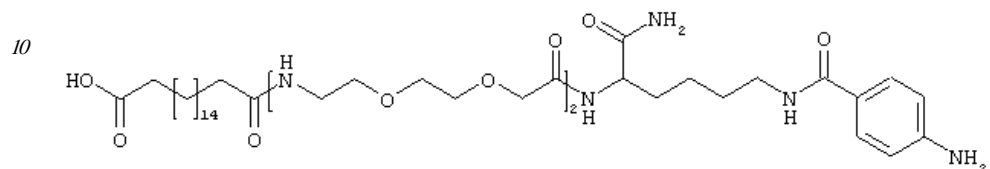
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-ОН и смолы Wang.



5 TOF-MS: масса 980,22 (M+1)

Пример 25

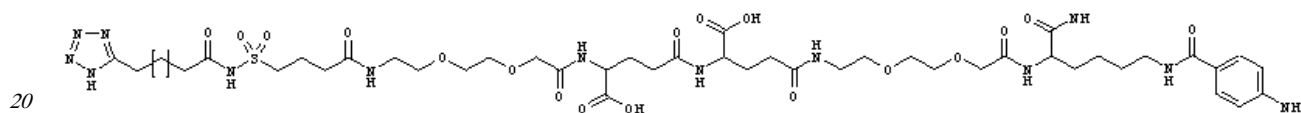
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.



10 TOF-MS: масса 851,10 (M+1)

Пример 26

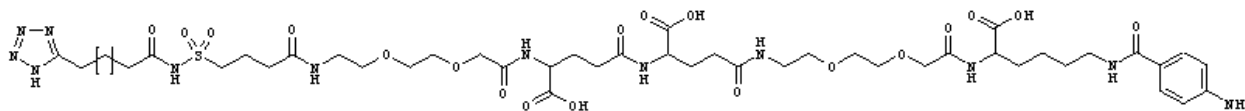
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.



15 TOF-MS: масса 1258,51 (M+1)

Пример 27

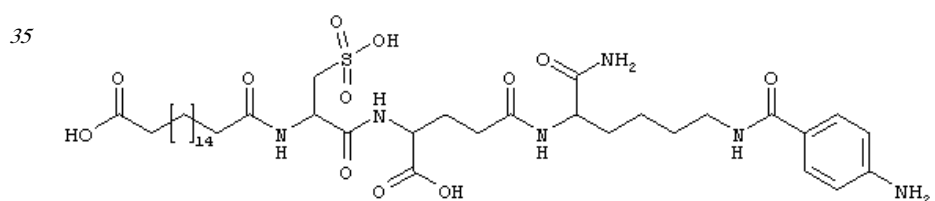
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Wang.



20 TOF-MS: масса 1269,49 (M+1)

Пример 28

Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.

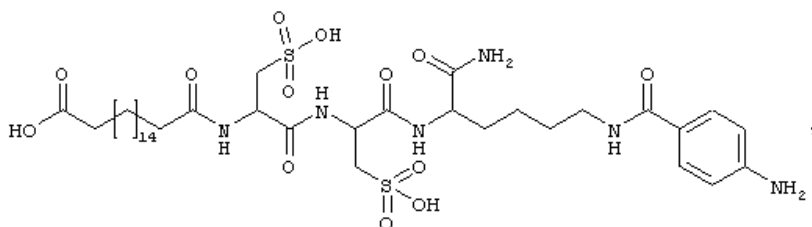


25 TOF-MS: масса 841,04 (M+1)

Пример 29

Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.

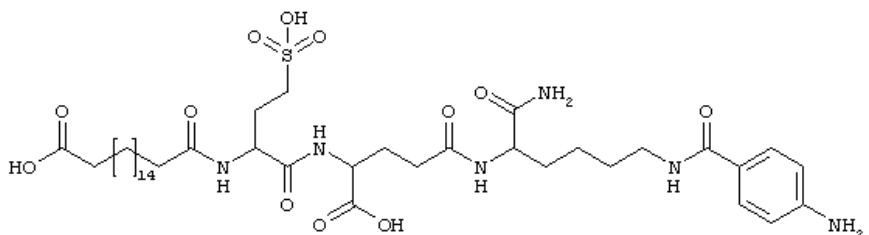
40



TOF-MS: масса 863,07 (M+1)

Пример 30

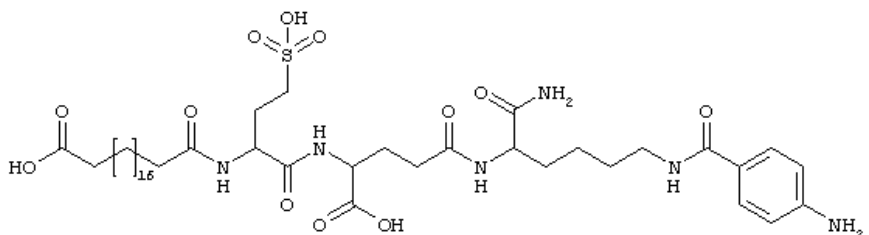
10 Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.



TOF-MS: масса 855,07 (M+1)

Пример 31

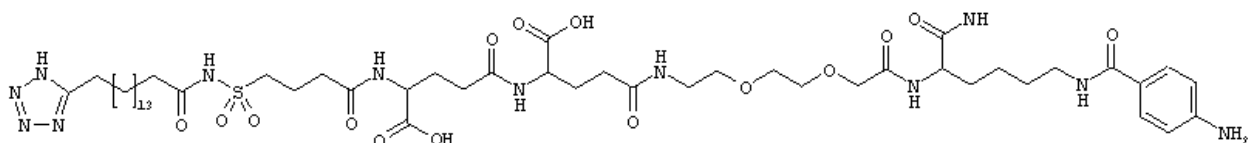
20 Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.



TOF-MS: масса 883,12 (M+1)

Пример 32

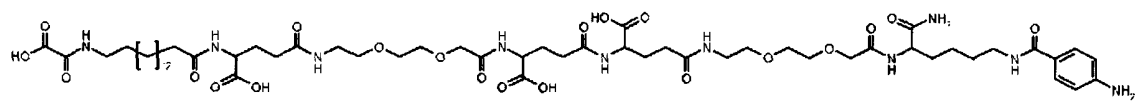
30 Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.



TOF-MS: масса 1123,35 (M+1)

Пример 33

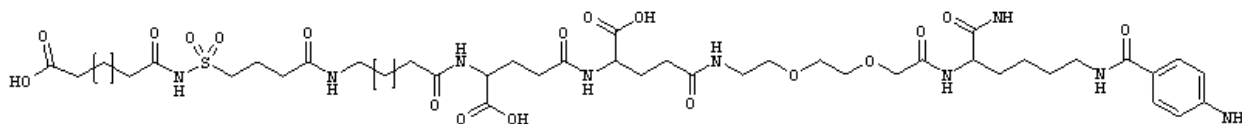
40 Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.



TOF-MS: Rt = 4,7 мин, масса 1267,45 (M+1)

Пример 34

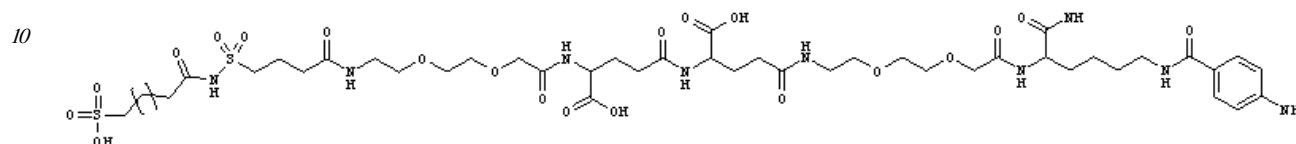
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее 20 соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.



5 ,
TOF-MS: масса 1310,67 (M+1)

Пример 35

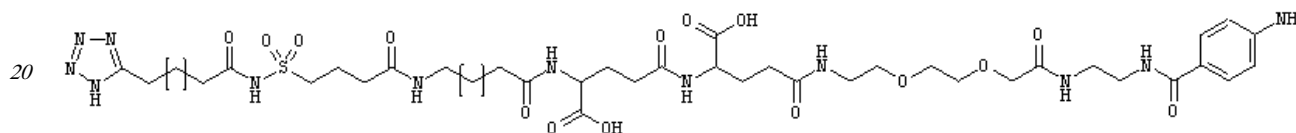
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.



15 ,
TOF-MS: масса 1308,58 (M+1)

Пример 36

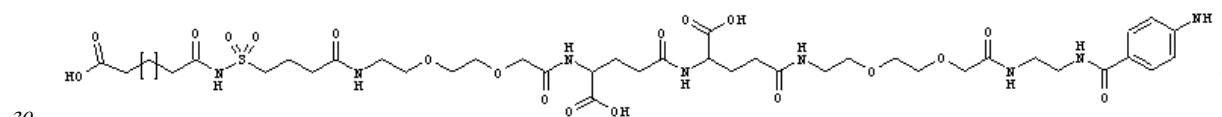
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Glu(ODmab)-OH и смолы 2-хлортритилхлорида.



25 ,
TOF-MS: масса 1235,56 (M+1)

Пример 37

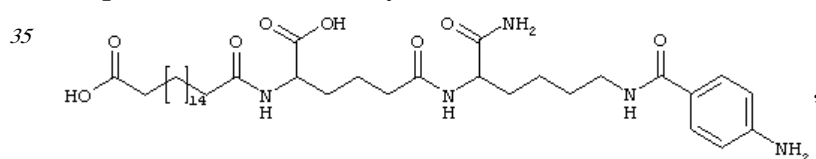
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Glu(ODmab)-OH и смолы 2-хлортритилхлорида.



30 ,
TOF-MS: масса 1173,40 (M+1)

Пример 38

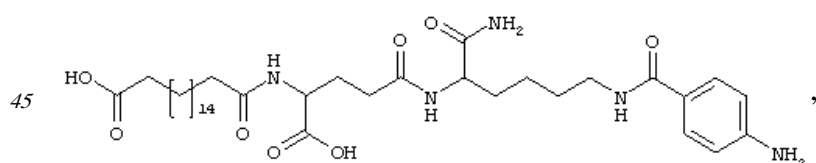
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.



35 ,
TOF-MS: масса 703,93 (M+1)

Пример 39

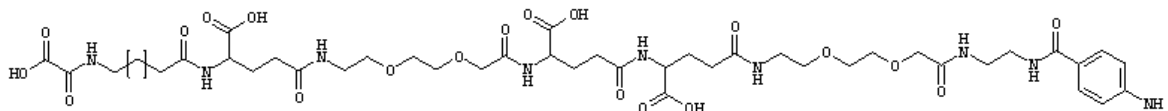
Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Lys(Mtt)-OH и смолы Rink-Amid.



40 ,
TOF-MS: масса 689,90 (M+1)

Пример 40

Способом, схожим с описанным в примере 17 выше, получили следующее соединение с применением Fmoc-Glu(ODmab)-OH и смолы 2-хлортритилхлорида.



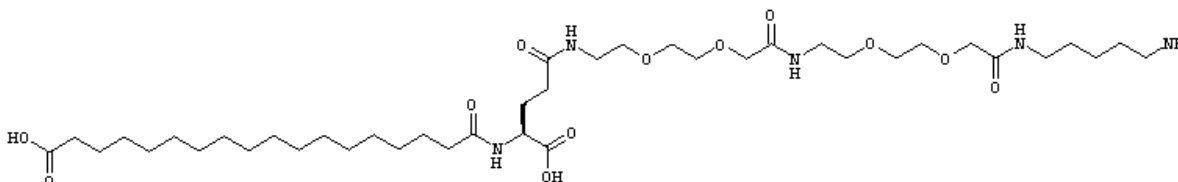
TOF-MS: масса 1182,34 (M+1)

Пример 41

17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{2-[(5-

Аминопентилкарбамоил)метокси]этокси}этилкарбамоил)-метокси]этокси}

этилкарбамоил)-1-карбоксипропилкарбамоил]-гептадекановая кислота:



N-трет-бутоксикарбонил кадаверина (24,3 мг; 0,12 ммоль) добавили в раствор 17-[(S)-1-карбокси-3-{2-[2-[(2-{2-(2,5-диоксопирролидин-1-ил-оксикарбонилметокси)-этокси}этилкарбамоил)метокси]этокси}этилкарбамоил)пропилкарбамоил]-гептадекановой кислоты (100 мг; 0,12 ммоль) и DIPEA (46,68 мг; 0,36 ммоль) в THF (2,0 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, а затем сконцентрировали в вакууме. Остаток растворили в смеси воды (5 мл) и THF (2 мл) и провели очистку с помощью препаративной ВЭЖХ (на колонке RP18). Фракции, содержащие Вос-защищенный продукт конденсации, объединили и высушили до сухого состояния. Остаток растворили в 50% TFA-DCM (4 мл) и перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем сконцентрировали в вакууме с получением 54 мг (55%) указанного в заголовке материала в форме соли трифторуксусной кислоты.

TOF-MS: масса 815,5 (M+1)

Получение соединений GH, связывающихся с альбумином:

Пример 42

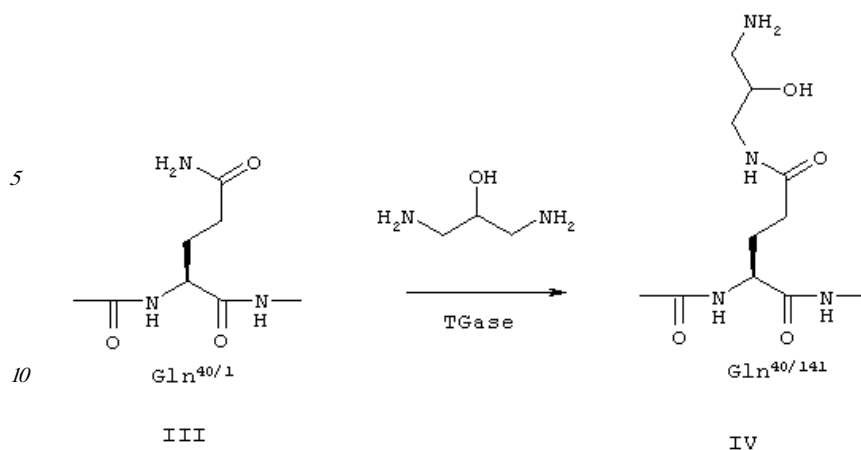
Применение транслугтаминазы для присоединения фрагмента молекулы к GH было описано ранее в WO 2005/070468 и может применяться в соответствии с настоящим изобретением для присоединения фрагмента, связывающегося с альбумином. Применяемая транслугтаминаза является транслугтаминазой микробного происхождения из *Streptoverticillium mobaraense*, в соответствии с US5156956. Общий способ описан в разделе «Механизм химической реакции I» выше.

1. Конденсация подвергнутого транслугтаминированию и окислению соединения GH (I) с фрагментом, связывающимся с альбумином (II).

Приготовили следующие растворы.

Буферный раствор А: Триэтанолламин (119 мг, 0,8 ммоль) растворили в воде (40 мл) и подвели до pH 8,5.

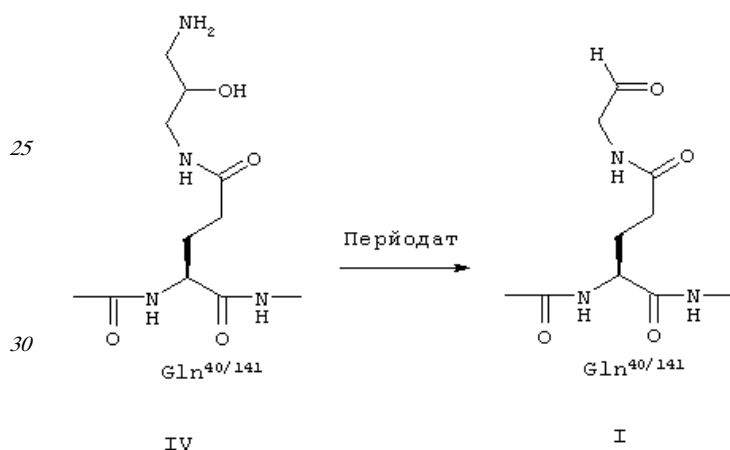
(А) Трансаминирование hGH (III) с 1,3-диамино-2-пропанолом



На следующем этапе к подвергнутому трансаминированию GH (III) добавили
 15 периодат. Окисление в типичном случае проводят при низкой температуре, такой как
 4-10°C, в течение 30 мин, возможно, в темноте. Периодат способен окислять остатки
 метионина в составе GH до соответствующих остатков сульфоксида метионина. Для
 сведения к минимуму риска такого окисления на этапе окисления периодатом можно
 добавить низкомолекулярные органические тиоэфиры.

Пригодным органическим тиоэфиром является 3-метилтиопропан-1-ол, но специалист
 20 в данной области может предложить и другие примеры.

Окисление подвергнутого трансаминированию соединения GH (IV):



Можно провести замену буфера с целью получения раствора с кислой средой,
 35 необходимого для эффективного восстановления с помощью цианоборгидрида натрия.
 В типичном случае применяют избыток A-W-B1-NH₂, и можно добавлять
 цианоборгидрид натрия маленькими порциями в течение некоторого периода времени.

Приготовили следующие растворы:

Буферный раствор А: Триэтаноламин (119 мг, 0,8 ммоль) растворили в воде (40 мл)
 40 и подвели до pH 8,5.

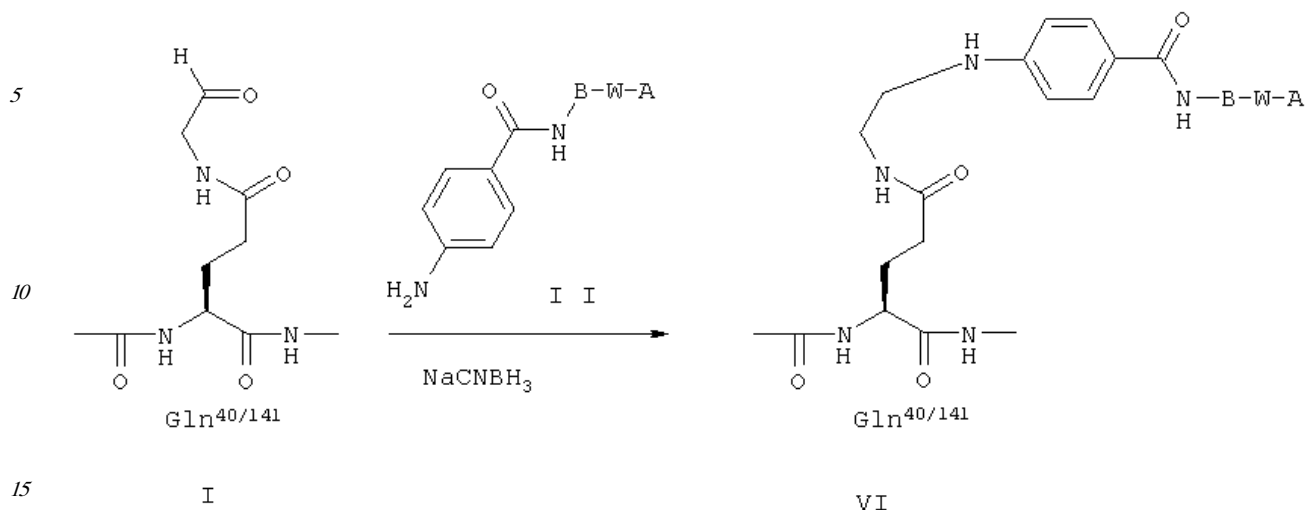
Буферный раствор В: 3-метилтиопропанол (725 мг, 7,1 ммоль) растворили в буферном
 растворе А (10 мл).

Буферный раствор С: HEPES (5,96 г) растворили в воде (1,0 мл) и подвели до pH 7,0.

Периодат: NaIO₄ (48,1 мг, 0,225 ммоль) растворили в воде (1,0 мл).

45 К раствору соединения (IV) (10 мг, 0,5 мкмоль) добавили буферный раствор В (0,2
 мл), а затем раствор периодата (0,03 мл). После инкубации в холоде в течение 20 мин
 смесь диализовали против 4 объемов буферного раствора С. Остаток сконцентрировали
 до 1 мл.

(С) Восстановительное аминирование соединения (I) с участием фрагмента, связывающегося с альбумином (II)



Можно применять такие фрагменты, связывающиеся с альбумином, как описаны в примерах 17-40.

Конечный раствор, полученный на этапе В (1 мл, 10 мг, 0,45 мкмоль (I)) смешали с раствором фрагмента, связывающегося с альбумином, (II) (2 мл, 0,3 мкмоль) в 25 мМ HEPES-буфере, pH 7,0, и полученную в результате смесь медленно вращали при комнатной температуре в течение 1 ч. Спустя 1 ч добавили NaCNBH₃ (100 мкл раствора NaCNBH₃ (20 мг) в воде (0,5 мл)) по частям. Смесь хранят при комнатной температуре в темноте в течение 18-24 ч.

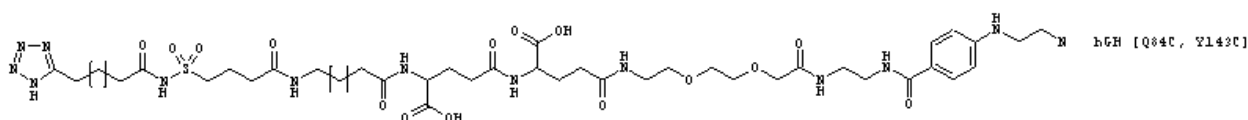
Последнюю реакцию можно провести следующим образом:

К раствору подвергнутого окислению и трансаминированию GH добавляют раствор альбумин-связывающего линкера в смеси с AcOH (1,5 мл) и 50 мМ MES (0,5 мл) при pH 6,00. Полученную в результате реакцию смесь осторожно встряхивают при комн. темп. в течение 30 мин, и в течение этого времени добавляют раствор NaCNBH₃ (15 мкл (22 мг NaCNBH₃ растворить в 500 мкл воды Milli-Q и добавить AcOH (15 мкл))). Пробу накрывают оловянной фольгой и перемешивают в течение ночи при комн. темп.

Конъюгат можно выделить с применением анионообменной хроматографии следующим образом: уксусную кислоту удаляют с помощью замены буферного раствора на чистую воду (3X) с применением устройств Amicon Ultra15 (пробирки Ultracel 10K) и центрифугирования при 4000 об/мин в течение 8 мин (3 раза). Затем производят замену буфера на 20 мМ TEA, pH 8,50 с применением устройств Amicon Filter и разбавляют до конечного объема 50 мл с помощью 20 мМ TEA, после чего наносят на колонку HiLoad Q Sepharose, 26/10. На первом этапе колонку промывают с помощью 20 мМ TEA, pH 8,50 (буферный раствор А), а затем проводят элюцию с помощью 20 мМ TEA, 500 мМ NaCl, pH 8,50 (буферный раствор В), применяя градиент 0-100% (В) с общим объемом, равным 20 CV, со скоростью потока 2 мл/мин. В объединенных фракциях провели 5-кратную замену буфера на буфер с 10 мМ аммония бикарбоната в чистой воде с помощью устройств Amicon Ultra15 (пробирки Ultracel 10K) и центрифугирования при 4000 об/мин в течение 8 мин (3 раза).

Применение фрагмента, связывающегося с альбумином, из примера 18 приведет к получению следующего соединения:

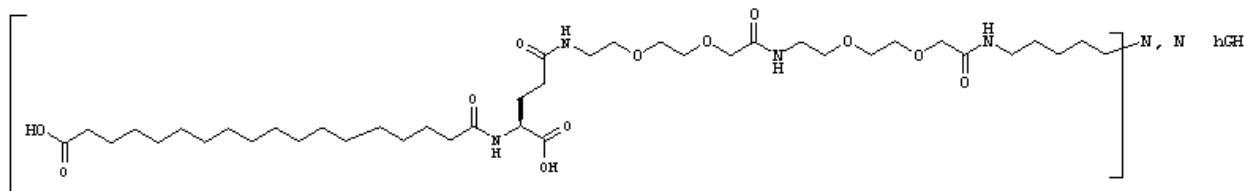
42.1



TOF-MS: масса 23301,63

Следующее соединение получили с применением фрагмента, связывающегося с альбумином, из примера 41:

42.2



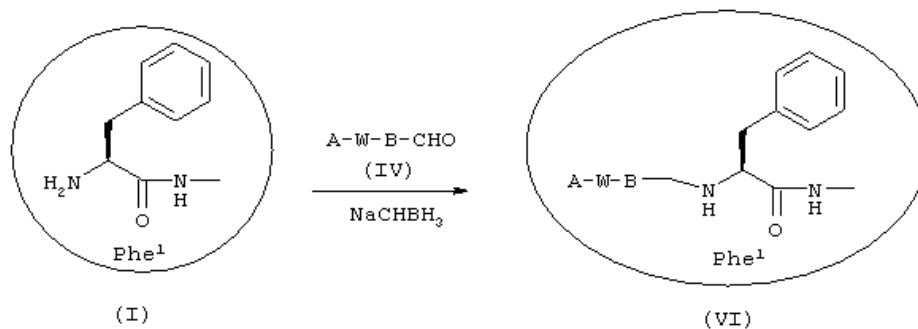
TOF-MS: масса 23727,6245

К раствору hGH (1 мг, 45 нмоль) и 17-[(S)-3-(2-{2-[(2-{(5-аминопентилкарбамоил) метокси}этоксид)этилкарбамоил]-метокси}этилкарбамоил)-1-карбоксипропилкарбамоил]-гептадекановой кислоты (2,10 мг; 2250 нмоль) в 20 мМ триэтаноламине (1000 мкл; pH 8,5) добавили трансклутаминазу (0,12 нмоль; Streptovercillium mobaraense). Реакционную смесь инкубировали при 25°C в течение 146 ч, и в результате был получен аналог hGH, являющийся производным с двойной модификацией и имеющий указанную выше формулу.

Пример 43

1. Конденсация соединения GH (I) по N-концу с фрагментом, связывающимся с альбумином (IV).

(A) Восстановительное алкилирование соединения (I) с участием альдегида фрагмента, связывающегося с альбумином (IV)



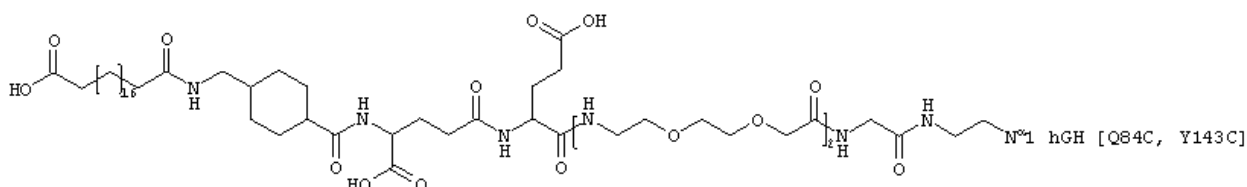
В процессе получения производных, таком как показан выше, применяют альбумин-связывающий линкер A-W-B, где B содержит на конце альдегидную группу.

Конъюгирование DGH с A-W-B-CHO происходит посредством восстановительного алкилирования (hGH → VI). Восстановительное алкилирование приводится в этом документе в качестве примера и хорошо известно специалистам в данной области, оно приводит к получению соединения hGH, несущему модификацию по N-концевому положению.

Фрагмент, связывающийся с альбумином, (IV) получали как описано в примере 14.

Синтез соединения: 2-(C₂₀дискислота-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-глицинамид)-этил-N^αhGH [Q84C, Y143C]

43.0



hGH [Q84C, Y143C] (23 мг) растворили в буферном растворе HEPES (2,3 мл, 0,25 мМ, pH 7,0).

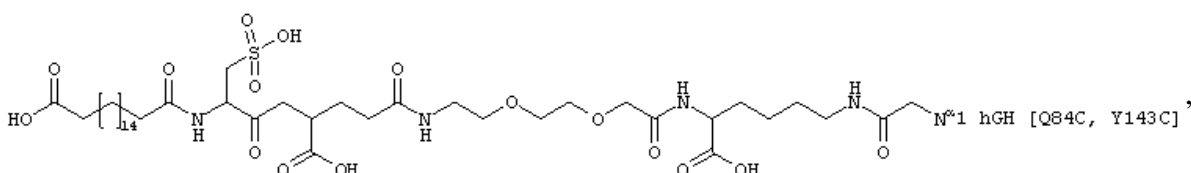
C₂₀дикислота-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-Gly-диметилацетат (2 мг, см. пример 14 выше) обрабатывали с помощью TFA (50 мкл) в течение 6 мин и выпарили до сухого состояния в вакууме. Остаток промыли с помощью EtOH (200 мкл) и выпарили до сухого состояния в вакууме. Остаток растворили в DMF (100 мкл) и добавили к раствору hGH. Образовался осадок, который растворили повторным добавлением DMF (1 мл). Через 1 ч по частям добавили раствор NaCNBH₃ (20 мг в 0,5 мл MeCN (230 мкл)) и оставили на 20 ч. Провели остановку реакции добавлением AcOH (2 мл) и разбавили водой до суммарного объема 20 мл и очистили с применением препаративной ВЭЖХ на колонке C18 с использованием градиента от 0,1% TFA в MeCN, 40-80%, до 0,1% TFA в воде. Сбрали фракции самого последнего элюировавшегося пика, разбавили от 70% MeCN до 10% с помощью воды и лиофилизировали с получением 4,51 мг 2-

(C₂₀дикислота-Trx-γGlu-Glu-OEG-OEG-Gly-глицинамид)-этил-N^α1 hGH [Q84C, Y143C]

TOF-MS: Rt = 15,25 мин, масса = 23150

Способом, схожим с описанным выше, получили следующее соединение с применением фрагмента, связывающегося с альбумином, из примера 16:

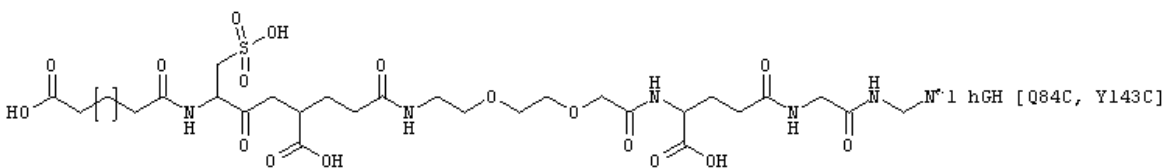
43.1



TOF-MS: Rt = 15,2 мин, масса = 23033

Способом, схожим с описанным выше, получили следующее соединение с применением фрагмента, связывающегося с альбумином, из примера 15:

43.2



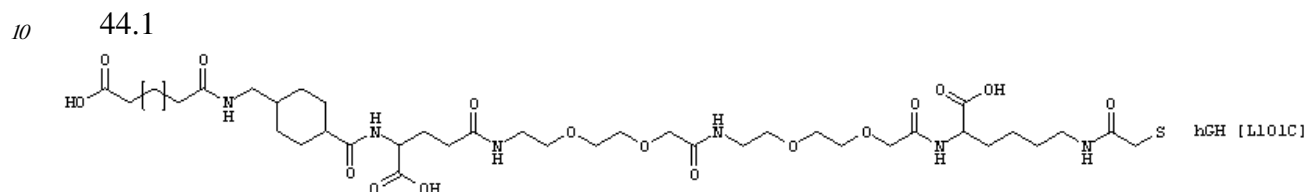
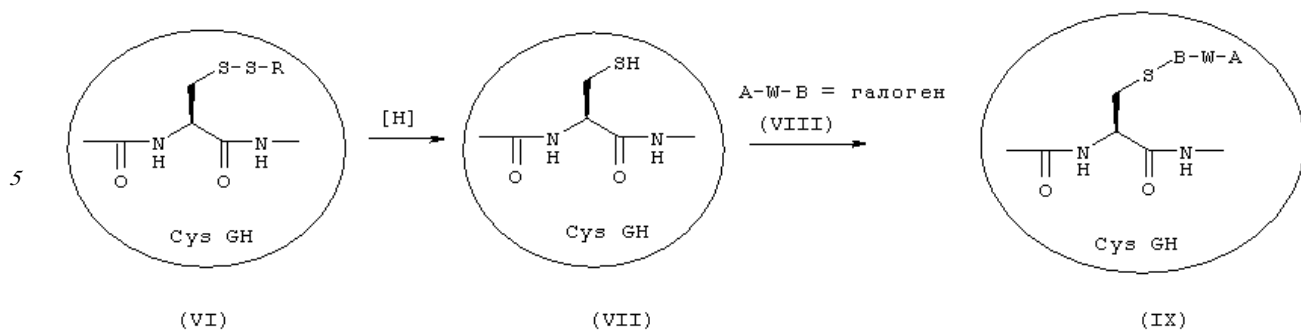
TOF-MS: Rt = 15 мин, масса = 22989,1

Пример 44

1. Конденсация соединения GH (VII), содержащего внутренний свободный одиночный Cys, с фрагментом, связывающимся с альбумином (VIII):

1) Высвобождение GH (VII) со свободным остатком Cys посредством восстановления дисульфида (VI) с помощью пригодного селективного восстанавливающего агента:

2) Алкилирование GH (VII) со свободным остатком Cys (VII) с участием галоген-активированного фрагмента, связывающегося с альбумином (VIII) с получением GH (VII) с конъюгацией через остаток Cys (IX)



15

2-(C₂₀дискислота-Trx-γGlu-OEG-OEG-δLys)-карбонилметилен-S¹⁰¹-hGH [L101C]

Получение hGH [L101C] (VII):

hGH [L101C], полученный как описано выше, содержал часть входящих в его состав свободных цистеинов в заблокированном глутатионом и цистамином виде. Провели ферментативное снятие блокировки, применяя глутаредоксин II (Grx2) в уравнивающем буфере, содержащем GSH и GSSG. hGH [L101C] со снятой блокировкой отделили от низкомолекулярных GSH/GSSG с помощью замены буфера на колонке Sephadex G25.

25 Конъюгация фрагмента, связывающегося с альбумином, (VIII) с hGH [L101C] (VII):

Фрагмент, связывающийся с альбумином, из примера 5 (78 мг, 5 экв.) растворили в 170 мл буфера HEPES/ЭДТА, содержащего 5% гидроксипропил-β-циклодекстрин, и добавили МТР (2,1 мл, 1%) и 0,5 М NaCl (6,34 г). К этой смеси добавили концентрированный раствор hGH [L101C] (1 экв., 46 мл) и ставили смесь в течение ночи при комн. темп. За ночь раствор стал мутным. Так как ВЭЖХ показала наличие непрореагировавшего исходного материала, добавили еще 5 экв. фрагмента, связывающегося с альбумином, из примера 5, растворенного в минимальном количестве NMP. Полученную в результате смесь дополнительно перемешивали при комн. темп. в течение 16 ч.

35 Очистка:

Применяемые буферные растворы:

Буферный раствор А:

20 мМ триэтанолламин (ТЕА) + 10% этиленгликоль

5,96 г триэтанолламина;

40 200 мл этиленгликоля;

вода MQ - до 2 л.

Подвести до pH 8,5 с помощью 1 н HCl.

Буферный раствор В:

20 мМ триэтанолламин (ТЕА) + 10 М NaCl + 10% этиленгликоль

45 5,96 г триэтанолламина;

116,88 г NaCl;

200 мл этиленгликоля;

вода MQ - до 2 л.

Подвести до pH 8,5 с помощью 1 н HCl.

Реакционный буфер заменили на ТЕА-буферный раствор А с этиленгликолем на колонке Sephadex за 3 прогона:

Колонка: 50/30 Sephadex G25 fine

Буферный раствор А:

Скорость потока: 10 мл/мин.

Температура: комн. темп. (собранные фракции - при 12°C)

Объем фракций: 30 мл/фракция

Требуемые фракции собрали, объединили и затем очистили на колонке Q Sepharose:

Колонка: 26/10 Q Sepharose HP

Буферный раствор А:

Буферный раствор В:

Градиент 1: 0-10% буфера В более 1 CV

Градиент 2: 10-40% буфера В более 20 CV

Градиент 3: 40-100% буфера В более 1 CV

Скорость потока: 8 мл/мин.

Температура: комн. темп. (собранные фракции - при комн. темп.)

Объем фракций: 5 мл/фракция

Требуемые фракции собрали, объединили и провели замену буфера на 10 mM аммония бикарбонат, pH 8,0, на колонке Sephadex G25:

Колонка: 50/30 Sephadex G25 fine

Буферный раствор А: 10 mM аммония бикарбонат, pH 8,0

Скорость потока: 10 мл/мин.

Температура: комн. темп. (собранные фракции - при 12°C)

Объем фракций: 30 мл/фракция

Пять фракций объединили и лиофилизировали.

Объединенные фракции проанализировали с помощью масс-спектрометрии и наблюдали присутствие большого количества димеров (масса 44491,7).

Лиюфилизированное содержимое флаконов растворили в буферном растворе А и провели еще одну очистку на новой колонке Q Sepharose:

Колонка: 26/10 Q Sepharose HP

Буферный раствор А:

Буферный раствор В:

Градиент 1: 0-10% буфера В более 1 CV

Градиент 2: 10-40% буфера В более 20 CV

Градиент 3: 40-100% буфера В более 1 CV

Скорость потока: 8 мл/мин.

Температура: комн. темп. (собранные фракции - при комн. темп.)

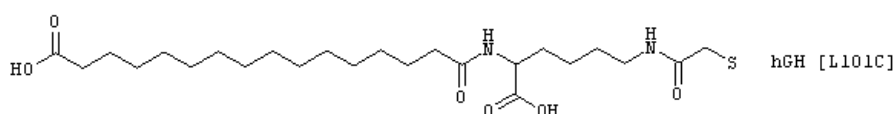
Объем фракций: 5 мл/фракция

Фракции объединили и провели обессоливание и замену буфера на 10 mM аммония бикарбонат с помощью ультрафильтрации. Объединенные фракции сконцентрировали до 25 мл и провели количественное определение с помощью ОФ-ВЭЖХ и MS-TOF:

TOF-MS: Rt = 16,15 мин, масса = 23315,96

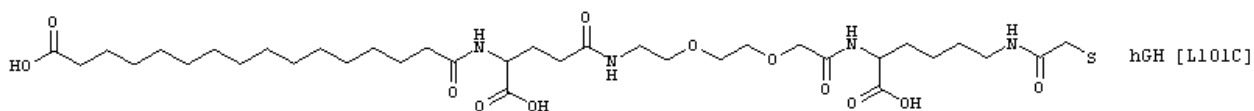
С применением этого же способа были получены следующие соединения:

44.2



TOF-MS: Rt = 15,24 мин, масса = 22676,8

44.3

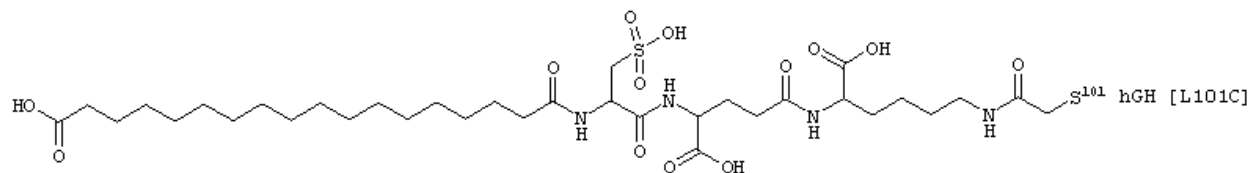


5

TOF-MS: Rt = 10,5 мин, масса = 22975,1

44.4

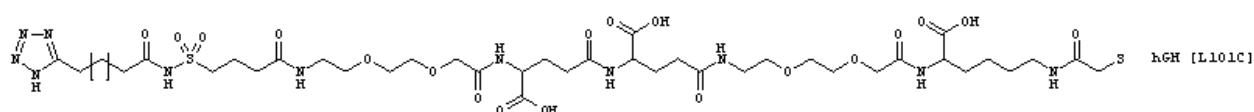
10



TOF-MS: Rt = 15,5 мин, масса = 23009

44.5

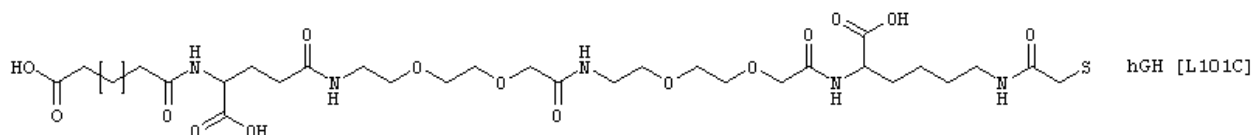
15



TOF-MS: Rt = 14,0 мин, масса = 23305,5

44.6

20

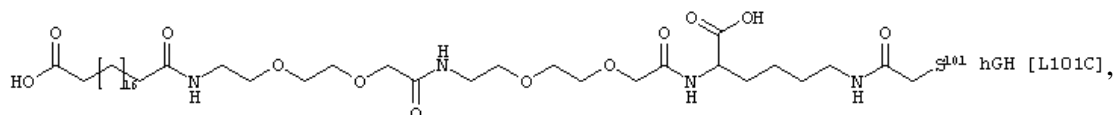


25

TOF-MS: Rt = 15,27 мин, масса = 23148

44.7

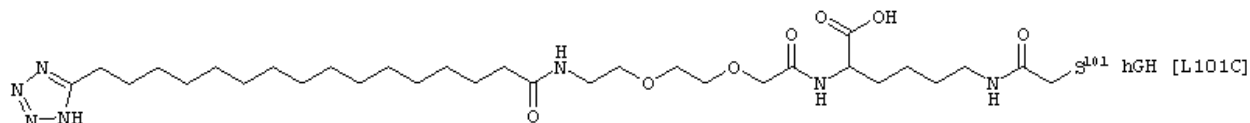
30



TOF-MS: Rt = 16,40 мин, масса = 23048

44.8

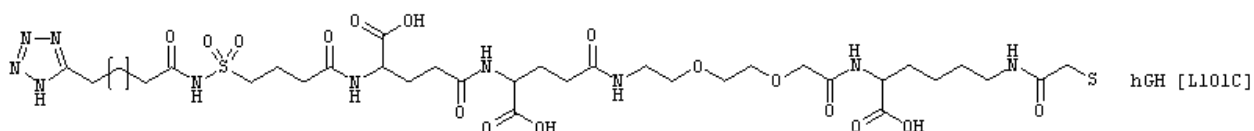
35



TOF-MS: Rt = 15,3 мин, масса = 22884,4

44.9

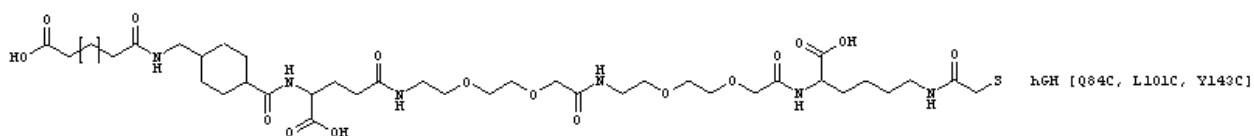
40



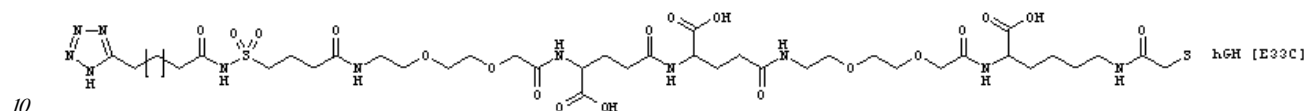
TOF-MS: Rt = 14,6 мин, масса = 23291,4

44.10

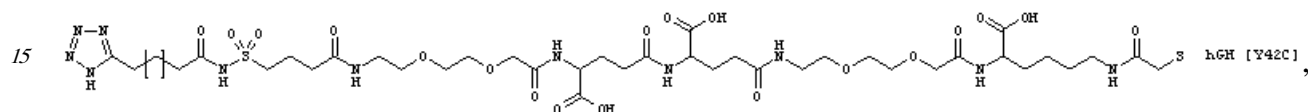
45



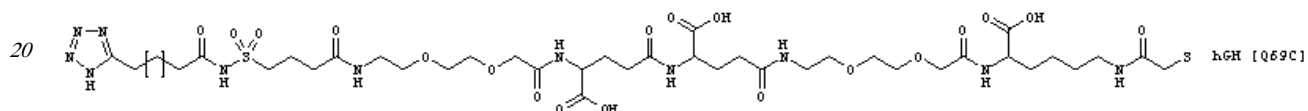
5 ,
TOF-MS: Rt = 15,05 мин, масса = 23097,76
44.11



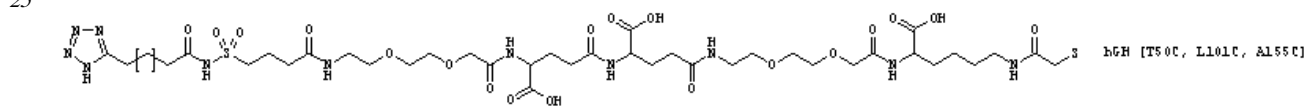
10 ,
TOF-MS: Rt = 14,2 мин, масса = 23420,83
44.12



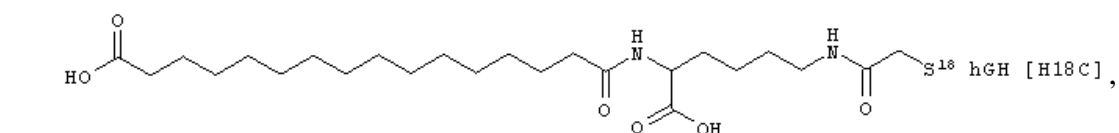
15 ,
TOF-MS: Rt = 15,7 мин, масса = 23289,6
44.13



20 ,
TOF-MS: Rt = 17,0 мин, масса = 23324,55
44.15



25 ,
TOF-MS: Rt = 12,85 мин, масса = 23337,5
44.16

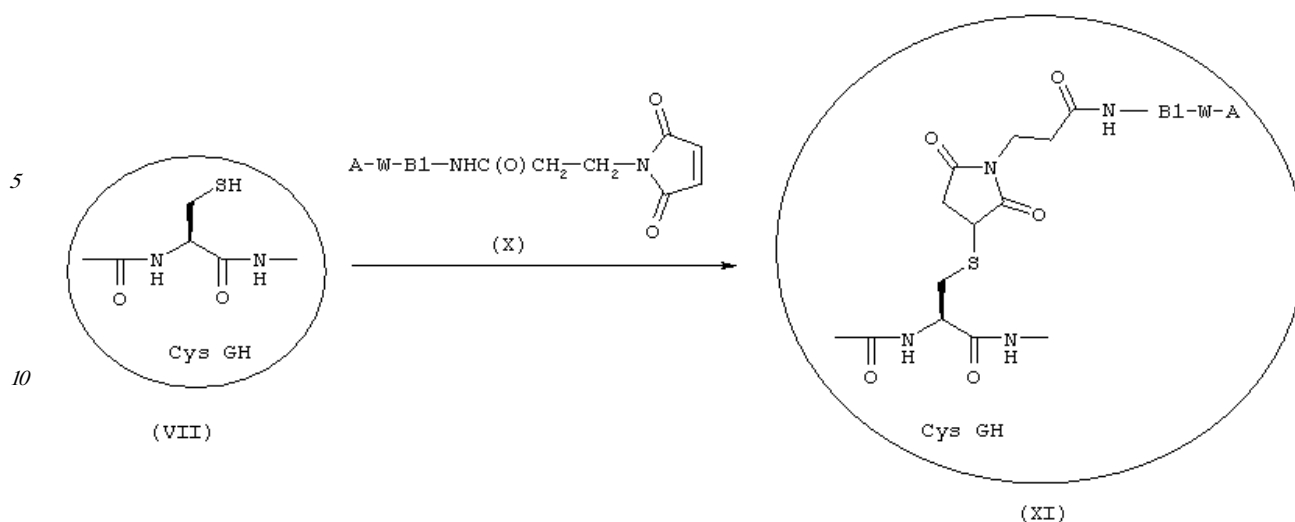


30 ,
TOF-MS: Rt = 15,24 мин, масса = 22676,8
Пример 45

1. Конденсация соединения GH (VII), содержащего внутренний свободный одиночный Cys, с фрагментом, связывающимся с альбумином (X):

40 1) Алкилирование GH (VII) со свободным остатком Cys (VII) с участием замещенного мальмидом фрагмента, связывающегося с альбумином (X) с получением GH (VII) с конъюгацией через остаток Cys (XI)

45



15 Соединение GH, у которого с Cys снята защита, (VII), такое как полученное в примере 44 выше, может вступать в реакцию с замещенным мальмидом линкером, связывающимся с альбумином, (X) с образованием конъюгата GH: A-W-B1-NHC(O)CH₂CH₂-пирролидин-2,5-дион-3-hGH (XI), где B1 - как указано в разделе «Механизм химической реакции IV» выше.

20 Конъюгирование замещенного мальмидом фрагмента, связывающегося с альбумином (X) с hGH L101C

Этап (а): снятие блокировки с остатка цистеина

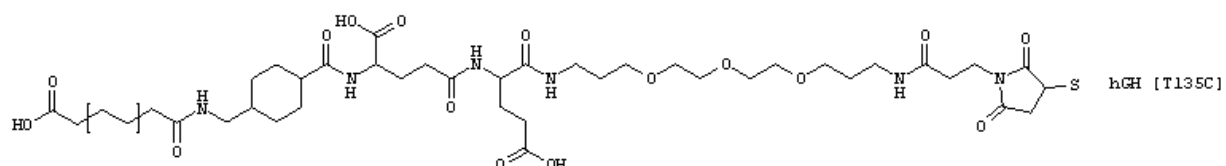
С заблокированного глутатионом или цистамином остатка Cys в соединении hGH (VI) ферментативно снимали блокировку, применяя глутаредоксин II (Grx2) в уравнивающем буфере, содержащем GSH и GSSG. hGH с Cys блокировкой (VII) 25 отделили от низкомолекулярных GSH/GSSG с помощью замены буфера на колонке Sephadex G25.

Этап (b): конъюгация активированного мальмидом фрагмента, связывающегося с альбумином (X)

30 Активированный мальмидом фрагмент, связывающийся с альбумином, (X) растворили в буфере, содержащем 5% гидроксипропил-β-циклодекстрин. Затем добавили этот раствор к hGH со снятой с Cys блокировкой (VII) и проводили реакцию в течение ночи при комнатной температуре.

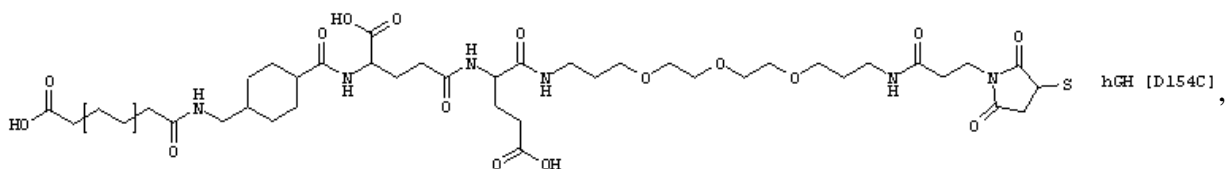
После проведения конъюгации конъюгированный белок очистили на колонке Q Sepharose HiLoad в буфере с 20 mM триэтаноламином, содержащим 10% этиленгликоль, при pH 8,5, используя градиент хлорида натрия. Собранные фракции объединили и 35 сменили буфер на 10 mM аммония бикарбонат, используя колонку G25, и лиофилизировали.

45.1

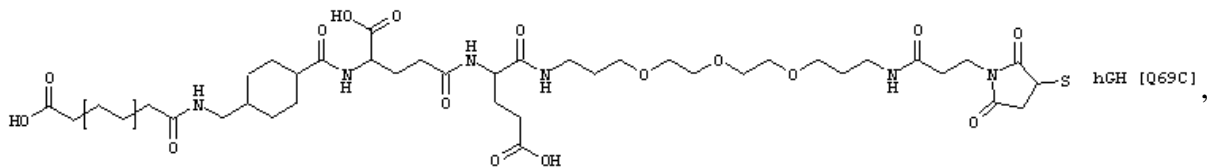


TOF-MS: Rt = 16,0 мин, масса = 23352

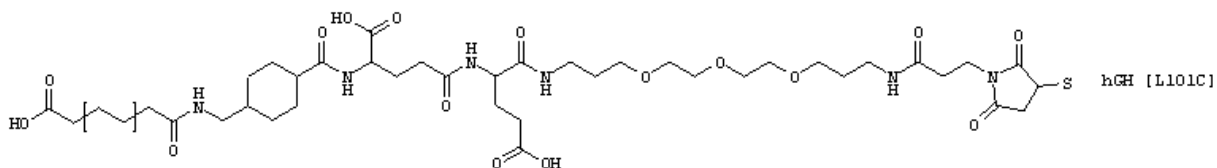
45.2



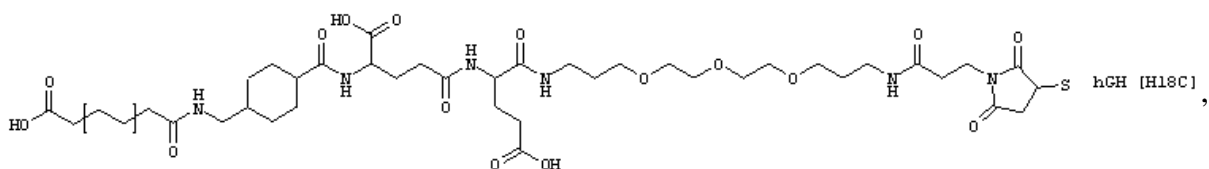
TOF-MS: Rt = 15,98 мин, масса = 23338
45.3



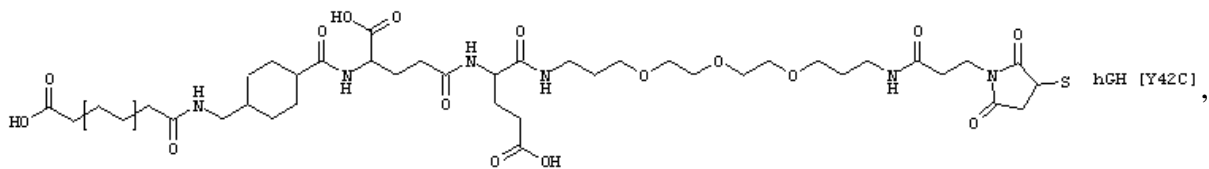
TOF-MS: Rt = 16,62 мин, масса = 23324,6
45.4



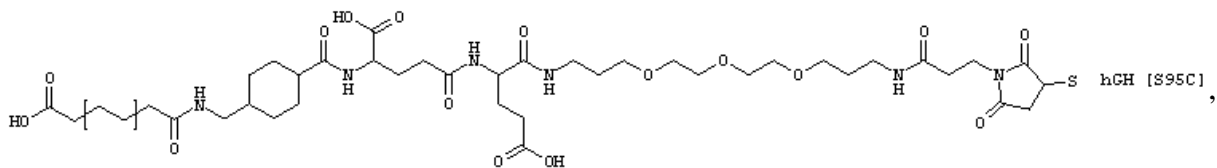
TOF-MS: Rt = 16,20 мин, масса = 23339,7
45.5



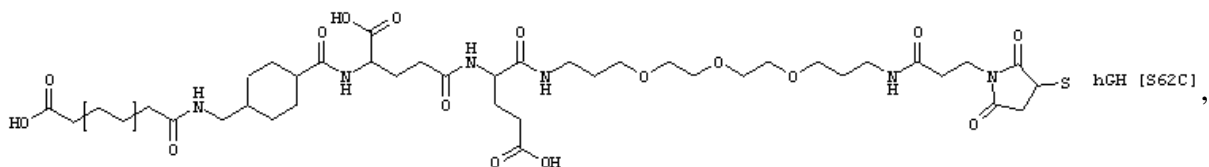
TOF-MS: Rt = 15,72 мин, масса = 23316,35
45.6



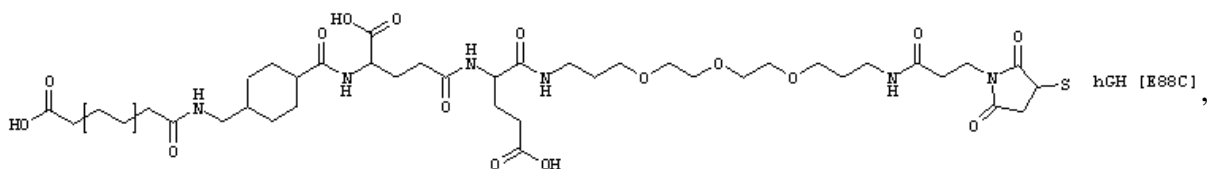
TOF-MS: Rt = 17,2 мин, масса = 23365,9
45.7



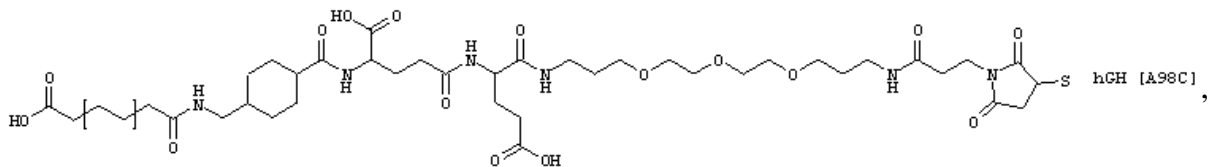
TOF-MS: Rt = 17,2 мин, масса = 23366
45.8



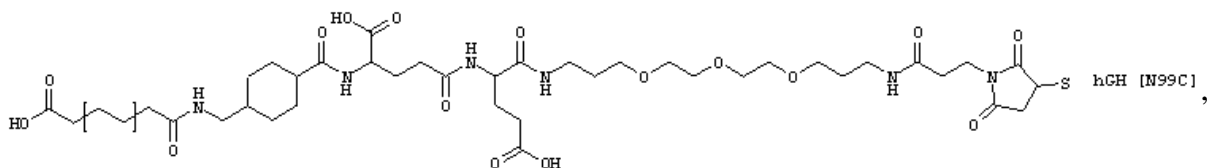
TOF-MS: Rt = 16,5 мин, масса = 23366
45.9



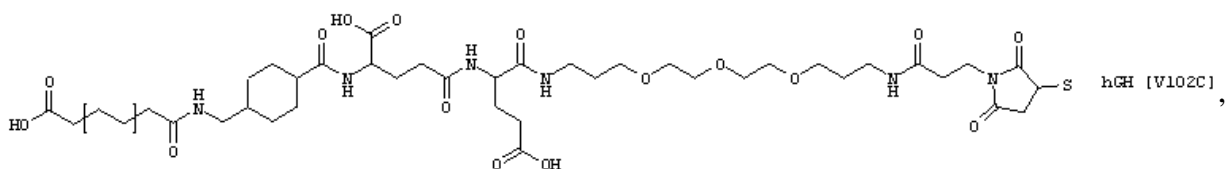
TOF-MS: Rt = 16,8 мин, масса = 23323,8
45.10



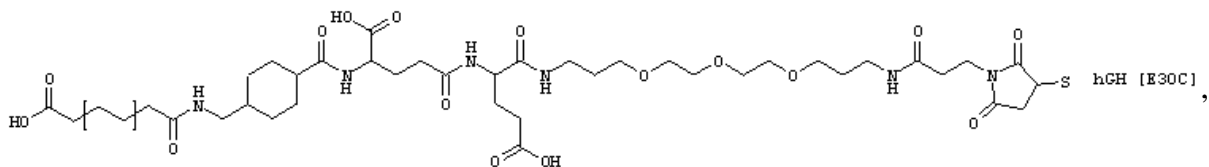
TOF-MS: Rt = 17,1 мин, масса = 23382
45.11



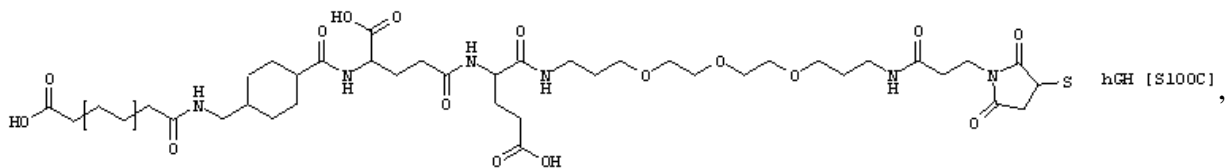
TOF-MS: Rt = 17,2 мин, масса = 23338,8
45.12



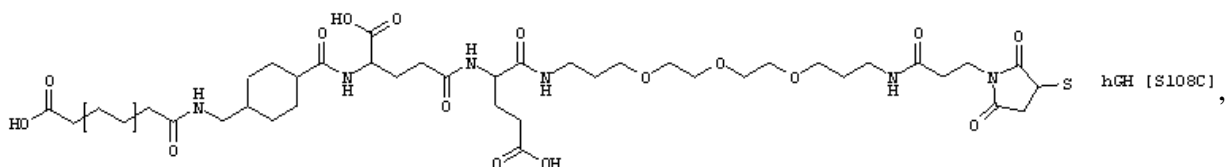
TOF-MS: Rt = 17 мин, масса = 23353,9
45.13



TOF-MS: Rt = 15,65 мин, масса = 23323,7
45.14



TOF-MS: Rt = 16,5 мин, масса = 23365,8
45.15



TOF-MS: Rt = 17,2 мин, масса = 23365,9
Пример 46

Тест (I): тест ВАF-3GHR для определения активности гормона роста

Исходно клеткам ВАF-3 (линия про-В-лимфоидных клеток мыши, полученная из костного мозга) для роста и выживания был необходим IL-3. IL-3 активирует белки

ЈАК-2 и СТАТ, которые представляют собой те же посредники, которые активирует при стимуляции гормон роста. После трансфекции геном рецептора гормона роста человека клеточная линия стала клеточной линией, зависящей от присутствия гормона роста. Этот клон можно применять для оценки влияния различных проб гормона роста на выживание клеток BAF-3GHR.

Клетки BAF-3GHR выращивают в обедненной среде (культуральной среде без гормона роста) в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂.

Клетки промывают и ресуспендируют в обедненной среде и высеивают в планшеты. Добавляют к клеткам по 10 мкл соединения гормона роста или гормона роста человека в различных концентрациях или контрольные растворы, а затем планшеты инкубируют в течение 68 ч при 37°C, 5% CO₂.

В каждую лунку добавляют краситель AlamarBlue[®] и затем инкубируют клетки еще в течение 4 ч. Краситель AlamarBlue[®] представляет собой окислительно-восстановительный индикатор, который восстанавливается в результате реакций клеточного метаболизма и, следовательно, предоставляет возможность опосредованного определения количества живых клеток.

Наконец, измеряют метаболическую активность клеток во флуоресцентном спектрофотометре для прочтения многолуночных планшетов. Поглощение в пробах выражают в % клеток, которые не были стимулированы соединением гормона роста или контрольным раствором, и из кривых зависимости отклика от концентрации можно вычислить активность (количество соединения, которое стимулирует 50% клеток).

Эффективность *in vitro* для соединения 45.4 при измерении с помощью теста на клетках BAF-3 с рецептором hGH продемонстрирована в таблице 1 ниже.

Стабильность соединения 45.5 в отношении действия протеаз определяли, как описано в общем способе, инкубируя соединение в течение 4 ч с химотрипсином или эластазой. Измеряли процентную долю интактного соединения GH, и результаты включены в таблицу 1.

Таблица 1

Данные, относящиеся к соединению 45.4					
Соединение	EC ₅₀ (нМ)	Соотношение (EC ₅₀ соед./ EC ₅₀ hGH)	n	Химотрипсин (% интактного соединения GH)	Эластаза (% интактного соединения GH)
hGH	0,026±0,012	1	6	40	25
45,4	0,09±0,043	3,5	6	75	65

Пример 47

Фармакокинетика

Фармакокинетику приведенных в примерах соединений исследуют на самцах крыс Спрейг-Даули после внутривенного (в/в) и подкожного (п/к) введения разовой дозы.

Испытуемые соединения разводят до конечной концентрации 1 мг/мл в буфере для разведения, состоящем из: 20 мг/мл глицина, 2 мг/мл маннитола, 2,5 мг/мл NaHCO₃, с подведением до pH 8,2.

Испытуемые соединения исследуют на самцах крыс Спрейг-Даули с массой тела 250 г. Испытуемые соединения вводят в виде одиночной инъекции либо в/в в хвостовую вену, либо п/к в шею, применяя иглу размера 25 G, в дозировке 60 нмоль/кг массы тела.

Для каждого соединения производят отбор проб крови в соответствии со следующим графиком, представленным в таблице 2.

Таблица 2

График отбора проб крови для каждого соединения														
№ Жи- вотно- го	Способ введения	Время отбора пробы (ч)												
		До дозы	0,08	0,25	0,5	1	2	4	6	8	18	24	48	72
5	1							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			
10	7				X	X			X	X		X	X	X
	8				X	X			X	X		X	X	X
	9	X	X								X			
	10	X	X								X			

В каждой временной точке отбора проб берут кровь (0,25 мл) из хвостовой вены с помощью иглы размером 25 G. Пробы крови отбирают в пробирки с покрытием из ЭДТА и хранят на льду до проведения центрифугирования при 1200×g в течение 10 мин при 4°C. Плазму переносят в пробирку Micronic и хранят при -20°C до проведения анализа.

Концентрации испытуемых соединений определяют с применением сэндвич-формат анализа ELISA с поликлональным антителом морской свинки против hGH в качестве иммобилизованного антитела и биотинилированным белком, связывающимся с hGH, (растворимой частью рецептора GH человека) в качестве детектирующей молекулы. Предел обнаружения для данного анализа составлял 0,2 нМ.

Некомпаратментный фармакокинетический анализ проводят с использованием профилей зависимости средних концентраций от времени для каждого испытуемого соединения с применением программного обеспечения WinNonlin Professional (Pharsight Inc., Маунтин-Вью, Калифорния, США). Вычисляют значения фармакокинетических параметров: терминального периода полувыведения ($t_{1/2}$) и среднего времени удержания (MRT) Таблица 3.

Таблица 3 Период полувыведения ($t_{1/2}$) и среднее время удержания (MRT) соединений GH из примеров, определенные у крыс Спрейг-Даули после в/в и п/к введения разовой дозы			
Соединение (№ примера)	Способ введения	$T_{1/2}$ (ч)	MRT (ч)
43.0	в/в	7,2	9,8
43.2	в/в	4,4	7,4
44.1	в/в	5,6	7,2
44.3	в/в	1,3	0,9
44.4	в/в	2,5	2,7
44.5	в/в	4,1	6,8
44.6	в/в	3,2	4,0
44.7	в/в	3,8	6,0
44.9	в/в	4,2	6,5
44.10	в/в	4,1	7,1
45.4	в/в	8,6	9,8
45.4	п/к	19,8	31,2
45.12	в/в	5,8	6,8

Биодоступность соединения из примера 45.4 была определена как 48,3%. Время до максимальной концентрации в плазме (t_{max}) после подкожного введения составило 8,0 ч. Концентрация C_{max} составила 1670 и 151 нМ после в/в и п/к введения, соответственно.

Экстраполяция концентрации в плазме к нулевому времени после в/в введения дала значение 1710 мМ.

Пример 48

Эффективность in vitro и периоды полувыведения серий соединений определяли как описано выше. Конъюгаты соединений являются идентичными, но присоединение происходило через разные остатки цистеина, внесенные с помощью мутации, как описано в таблице 4.

Таблица 4				
Эффективность in vitro и периоды полувыведения ($t_{1/2}$)				
Соединение	Эффективность in vitro	$T_{1/2}$, (в/в крыса) (ч)	MRT (ч)	Сайт присоединения (вариант)
hGH	1.0 (исходи.)	0,23		-
45.1		2,6	3,8	T135C
45.2		2,8	8,7	D154C
45.3		2,1	3,1	Q69C
45.4	2,9	6,3/8,6	7,8/9,8	L101C
45.5		4,1	4,5	L18C
45.6		4,1	5,5	Y42C
45.7		0,72	6,5	S95C
45.8		0,59	2,0	S62C
45.9		1,8	4,1	E88C
45.10	2,6	3,4	4,3	A98C
45.11	3,1	5,8	6,8	N99C
45.12	2,5	1,9	3,0	V102C
45.13	16,5	1,9	2,6	E30C
45.14	4,4	1,5	2,0	S100C

Пример 49

Исследование зависимости доза-ответ in vivo у крыс Спрейг-Даули с удаленным гипофизом

Зависимость «доза-ответ» in vivo исследуют у самцов крыс Спрейг-Даули с удаленным гипофизом. Крыса с удаленным гипофизом является хорошо изученной и признанной животной моделью дефицита гормона роста, в которой после хирургического удаления гипофиза не вырабатывается гормон роста. Это также приводит к снижению уровней циркулирующего инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), что является еще одной важной клинической характеристикой дефицита гормона роста у человека.

Удаление гипофиза проводят у 4-недельных самцов крыс, имеющих массу тела 90-100 г. На момент начала исследования через 3-4 недели после хирургического вмешательства масса тела животных составляет 100-110 г. Животных, у которых за время 3-4 недель после хирургического вмешательства прибавка массы тела составит более 10%, не допускают к участию в исследовании.

Исследования дозозависимого эффекта проводят с использованием пяти уровней дозы соединения 45.4: от 1 до 150 нмоль/крысу.

Исходные уровни содержания в плазме IGF-1 у крыс Спрейг-Даули с удаленным гипофизом составляли примерно 80-100 нг/мл во всех группах, получавших различные дозы. После разовой дозы уровни IGF-1 быстро повысились до 800-1000 нг/мл в 1 день, практически независимо от дозы. Уровни содержания в плазме IGF-1 снова снизились в течение последующих дней дозозависимым образом, при этом самое быстрое снижение наблюдалось при самой низкой дозе, а самое медленное снижение - при самой высокой дозе. При самой высокой дозе уровень IGF-1 в плазме поддерживался на уровне 800-900 нг/мл в течение 3 дней до того, как он начал снижаться с более высокой скоростью.

Уровни концентраций IGF-1 в плазме были повышенными, по сравнению с контрольной группой, которой вводили носитель, во всех группах с разными дозировками вплоть до 3 дня. В случае групп с дозировками 10 нмоль, 50 нмоль и 150 нмоль они были повышенными в течение всего времени проведения исследования (7 дней).

Пример 50

Элиминирование

Высказана гипотеза о том, что скорость всасывания связана со способностью молекулы проникать через плотные контакты подкожных капилляров, а это свойство связано с размером молекулы. Соединение ПЭГ-hGH, где молекулярная масса ПЭГ составляет 40 кДа, имеет кажущуюся молекулярную массу (ММ) 150-250 кДа. Молекула DGH с ковалентно связанным альбумином обладает молекулярной массой 87 кДа, тогда как молекула hGH с нековалентно связанным альбумином будет часть времени находиться в диссоциированном от альбумина состоянии и, следовательно, иметь молекулярную массу 22 кДа. Время, в течение которого сохраняется диссоциированное состояние, будет зависеть от аффинности альбумин-связывающего фрагмента. Таким образом, скорость всасывания таких соединений должна быть выше, чем у ПЭГ-hGH, и эта скорость должна возрастать при применении альбумин-связывающих фрагментов, имеющих более низкую аффинность к альбумину.

Испытуемые растворы разводили в стандартном буфере, состоящем из: 20 мг/мл глицина, 2 мг/мл маннитола, 2,4 мг/мл NaHCO₃, с подведением до pH 8,2.

Йодирование с помощью ¹²⁵I производилось в компании Chemistry & Isotope Lab. Novo Nordisk A/S. Конечная радиоактивно меченая композиция имела удельную радиоактивность 3 мКи/мл и поставлялась в картриджах PenFill вместимостью 3 мл.

Растворы хранили при 2-8°C до применения.

Скорость элиминирования для избранных соединений измеряли у пяти самок кроссбредных свиней LYD. Свиней перед началом исследования взвешивают и надевают на них специальное «пальто для свиней» для закрепления счетчика гамма-излучения и передатчика и помещают в одиночные загоны.

Все свиньи перед началом исследования голодают в течение 18 ч.

Животным вводили дозу (60 нмоль) подкожно с левой и с правой стороны шеи, соответственно, используя иглу Novopen3[®] и NovoFine[®] 28G с фиксированным черным ограничителем иглы. Глубина инъекции составляла 5 мм.

Элиминирование радиоактивно меченых соединений измеряли с применением портативного оборудования в течение примерно 24-48 ч.

Для каждого отдельного животного результаты представляли в виде показателя AUC (0-45 ч), как показано в таблице 5.

Эффективность in vitro, периоды полувыведения и дополнительные характеристики серий соединений определяли, как описано выше, и они приведены в таблице 5.

Таблица 5

Характеристики соединений				
Соединение	Эффективность in vitro	T _{1/2} (в/в крыса) (ч)	Элиминирование: AUC (0-45 ч)	Длительность повышения уровня IGF-1 (ч)
hGH	1.0 (исходи.)	0,23	519	-
44.9	8,2	4,2	2259	>48
44.8	1,8	2,6	1490	>24
44.1	4,7	5,6	1750	>48
44.3	1,5	1,3	2152	<24
44.6	4,7	3,2	1558	<24
44.7	4,5	3,8	2039	<24

44.5	5,8	4,1	1599	>48
44.4	3,9	2,5	1588	>48

Пример 51

Исследование in vivo на свиньях

5 С целью дополнительного подтверждения функциональной активности конъюгатов hGH с альбумин-связывающим радикалом по изобретению три соединения были выбраны для проведения дополнительных фармакокинетических исследований на свиньях. Соединения, соответствующие соединениям 44.1, 44.4 и 44.5, получили путем конъюгирования фрагментов, связывающихся с альбумином, с вариантом hGH после
10 удаления необходимой на этапе очистки МАЕА-метки.

Испытуемые соединения разбавили до конечной концентрации 100 нмоль/мл в стандартном буферном растворе (20 мг/мл глицина, 2 мг/мл маннитола, 2,4 мг/мл NaHCO₃, с подведением до pH 8,2). В исследовании использовали 24 самца карликовой свиньи геттингенской породы в возрасте 5 мес и с массой тела 9-12 кг. Дозу каждого
15 испытуемого соединения вводили восьми животным, при этом четыре карликовые свиньи получали дозу при внутривенном введении ударной дозы, а четверо животных - при подкожном введении. Внутривенные инъекции проводили через иглу 24 G Venflon в ухо. Дозу вводили в виде ударной дозы в течение не более чем 5 с, а затем вводили 2
20 мл раствора 0,9% NaCl. Подкожные инъекции проводили с правой стороны шеи, на расстоянии примерно 5-7 см от уха и 7-9 см от средней линии шеи. Каждое животное получило разовую дозу испытуемого соединения, равную 10 нмоль/кг. У каждого животного отбирали пробы крови в следующих временных точках: до введения дозы, через 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 18, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 240 и 336 ч после инъекции. Из
25 каждой пробы крови отделяли плазму и хранили ее при -20°C до проведения анализа испытуемого соединения. Данные зависимости концентрации в плазме от времени анализировали с помощью некомпартментного фармакокинетического метода.

Таблица 6						
Значения фармакокинетических параметров после подкожного введения разовой дозы 10 нмоль/кг						
Соединение	Соединение А-В-В-галоген в соответствии с	AUC/дозу (ч*кг/л)	T _{1/2} (ч)	MRT (ч)	MAT (ч)	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

Среднее значение ± Станд. Откл. (в скобках)

35 В таблице 6 представлены основные фармакокинетические параметры для трех испытуемых соединений. Показатель AUC/дозу - это оценка воздействия испытуемых соединений с поправкой на размер дозы. T_{1/2} - это терминальный период полувыведения испытуемых соединений после завершения фазы всасывания. MRT - среднее время удержания испытуемых соединений, соответствующее времени, в течение которого в
40 среднем молекула соединения находится в организме. MAT - соответствующее среднее время всасывания, которое является показателем среднего времени, в течение которого молекула находится в фазе всасывания. F - это абсолютное значение биодоступности испытуемых соединений, относящееся к внутривенному введению.

Формула изобретения

1. Конъюгат гормона роста, содержащий соединение гормона роста (GH), включающее одиночную мутацию с внесением Cys, выбранную из A98C, N99C, L101C и V102C, и альбумин-связывающий радикал, присоединенный через гидрофильный

спейсер к атому серы этого одиночного Cys указанного GH, и где GH обладает по меньшей мере 95% идентичностью с hGH (SEQ ID: 1), или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Конъюгат по п.1, где конъюгат гормона роста имеет формулу (I):

A-W-B-GH (I)

где

GH представляет собой соединение гормона роста,

W представляет собой гидрофильный спейсер, присоединенный к атому серы в области этой мутации с внесением Cys,

B является химической группой, соединяющей A и GH, и A представляет собой альбумин-связывающий радикал.

3. Конъюгат по п.1, где гидрофильный спейсер связан с внесенным Cys, присутствующим в соединении гормона роста в результате одной из следующих одиночных мутаций: N99C, L101C и V102C.

4. Конъюгат по п.1, где гидрофильный спейсер связан с внесенным Cys, присутствующим в соединении гормона роста в результате одной из следующих одиночных мутаций: N99C и L101C.

5. Конъюгат по п.1, где одиночная мутация с внесением Cys представляет собой L101C и гидрофильный спейсер связан с атомом серы L101C.

6. Конъюгат по п.1, где соединение GH, содержит дополнительный дисульфидный мостик.

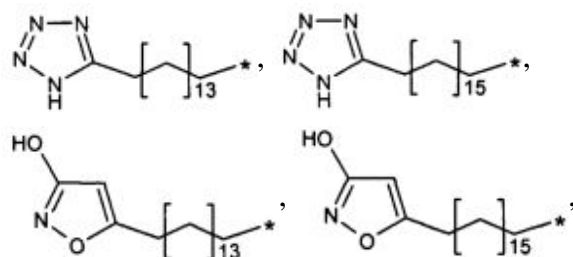
7. Конъюгат по п.6, где указанный дополнительный дисульфидный мостик находится между по меньшей мере одной из пар аминокислот в положениях, соответствующих R16C/L117C, A17C/E174C, H21C/M170C, D26C/V102C, D26C/Y103C, N47C/T50C, Q49C/G161C, F54C/Y143C, F54C/S144C, F54C/F146C, S55C/Y143C, S57C/Y143C, I58C/Q141C, 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 и/или V185C/S188C в hGH, как показано в SEQ ID NO: 1.

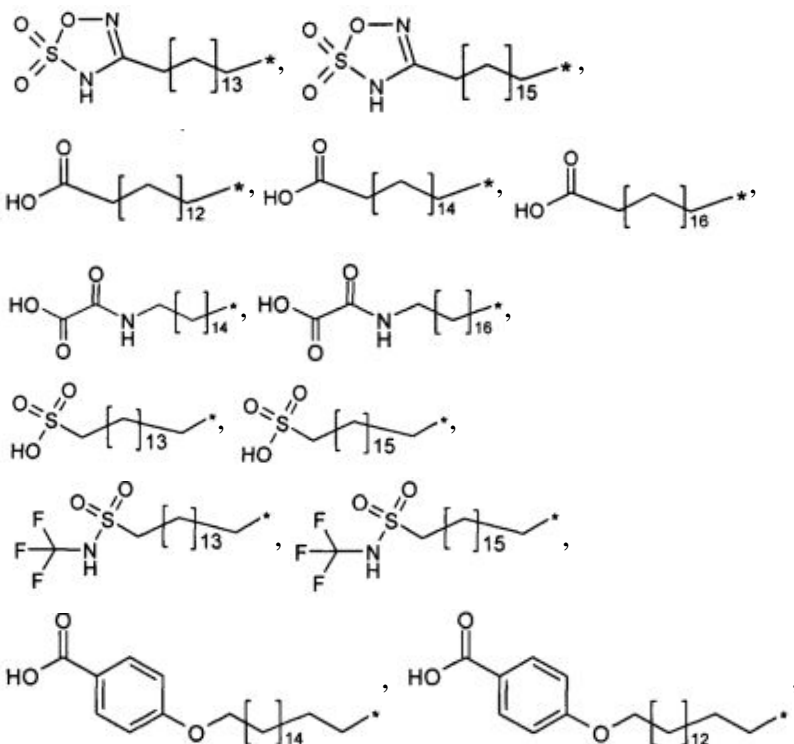
8. Конъюгат по п.6 или п.7, где по меньшей мере один из цистеинов указанного дополнительного дисульфидного мостика находится внутри петлевого сегмента, например в сегменте, ограниченном аминокислотными остатками 128-154 (L3).

9. Конъюгат по п.8, где указанный дополнительный дисульфидный мостик соединяет L3 со спиралью 2.

10. Конъюгат по п.8, где указанный дополнительный дисульфидный мостик образуется между парами аминокислот в положениях, соответствующих Q84C/Y143C, Q84C/S144C, S85C/Y143C или S85C/S144C, как показано в SEQ ID NO: 1.

11. Конъюгат по п.2, при этом A выбран из:





где * указывает место присоединения к В через W.

12. Конъюгат по п.2, при этом W имеет формулу:

-W₇-Y-,

где

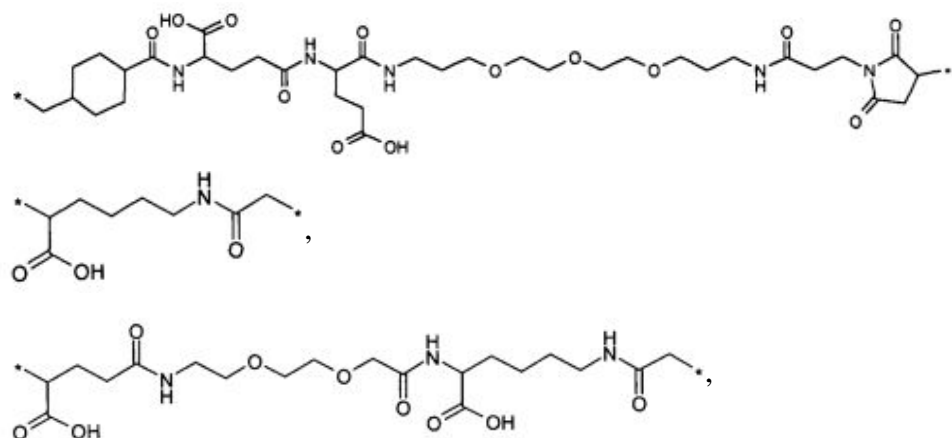
Y является -(CH₂)_{I7}-C₃₋₁₀-циклоалкил-W₈- или ковалентной связью,

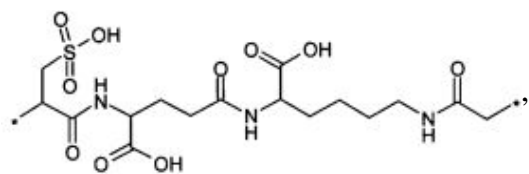
I7 является 0-6,

W₇ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s3}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s3 является 0 или 1,

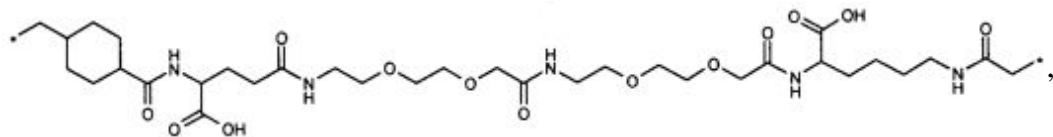
W₈ выбран из -C(O)NH-, -NHC(O)-, -C(O)NHCH₂-, -CH₂NHC(O)-, -C(O)NHS(O)₂-, -S(O)₂NHC(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, -C(O)CH₂-, -CH₂C(O)-, -C(O)CH=CH-, -CH=CHC(O)-, -(CH₂)_{s4}-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)- или ковалентной связи; где s4 является 0 или 1.

13. Конъюгат по п.2, при этом В выбран из:

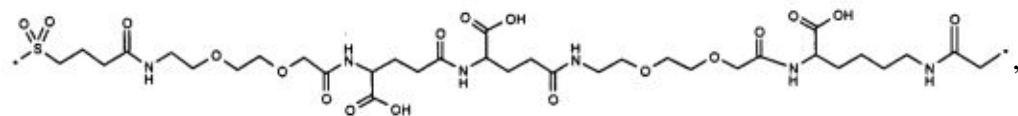




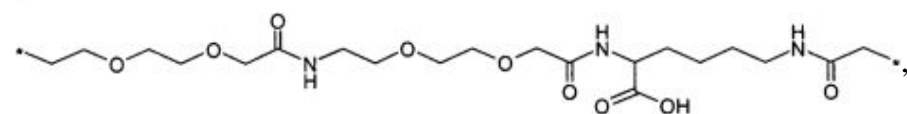
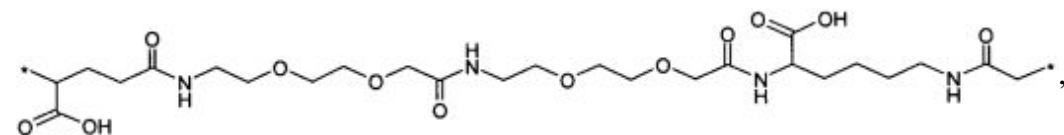
5



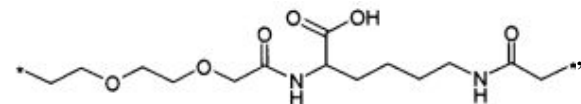
10



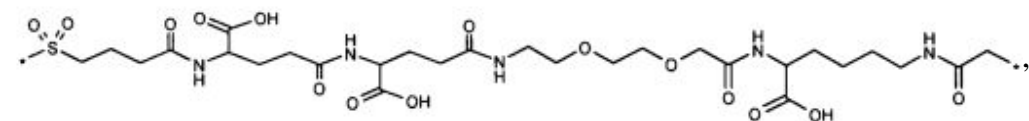
15



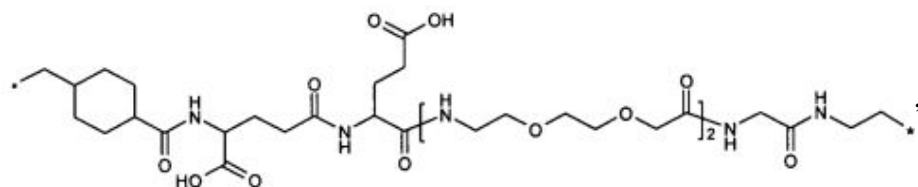
20



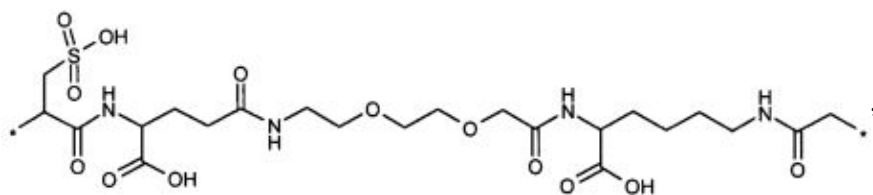
25



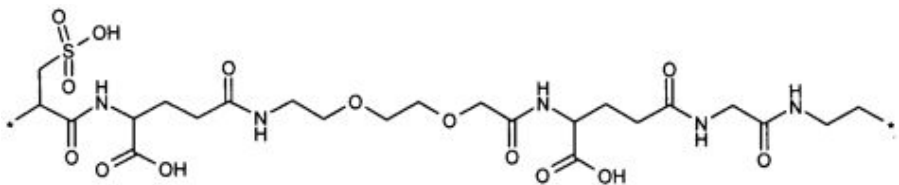
30



35

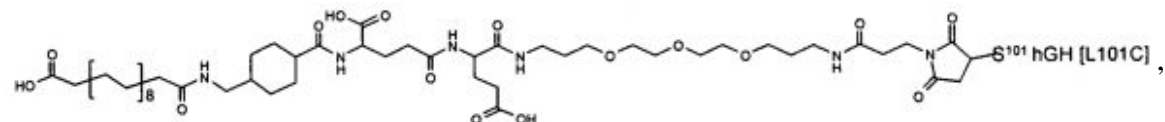


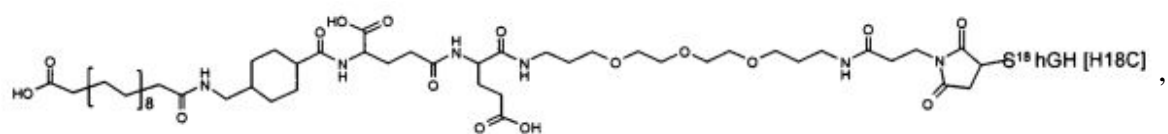
40



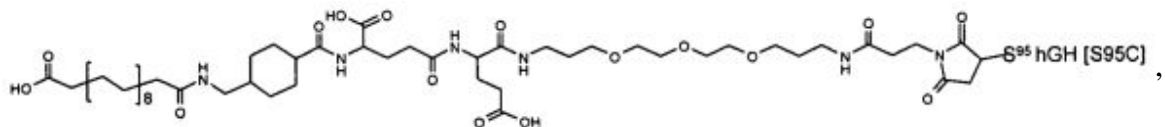
14. Конъюгат гормона роста, при этом указанное соединение выбрано из:

45

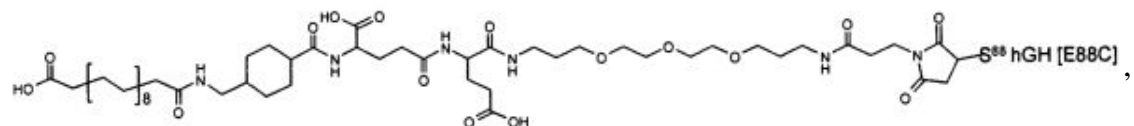




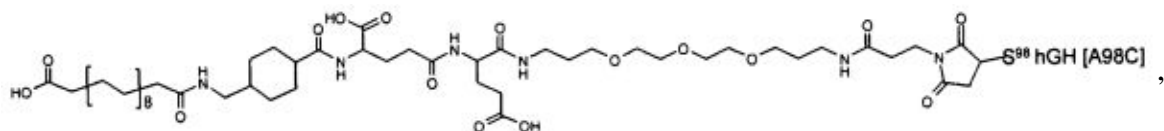
5



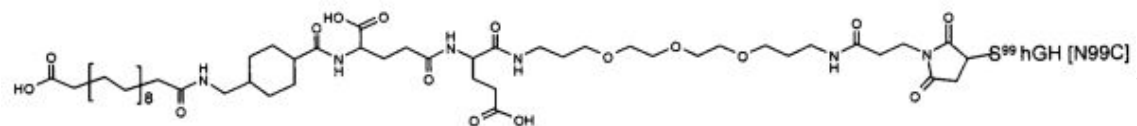
10



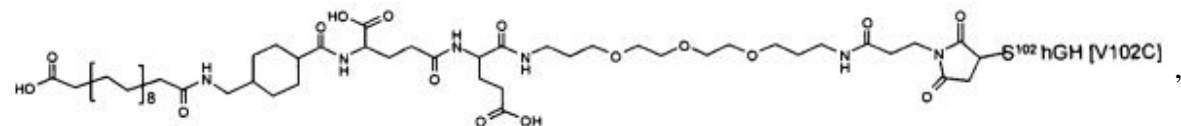
15



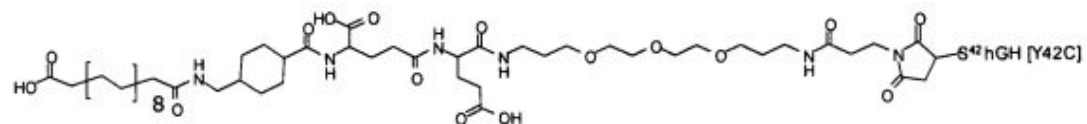
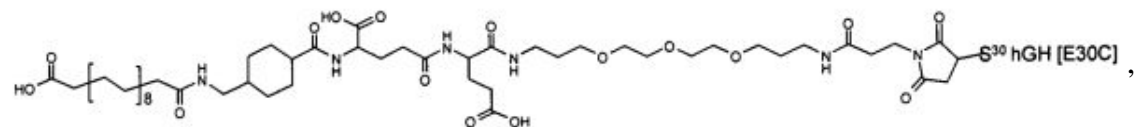
20



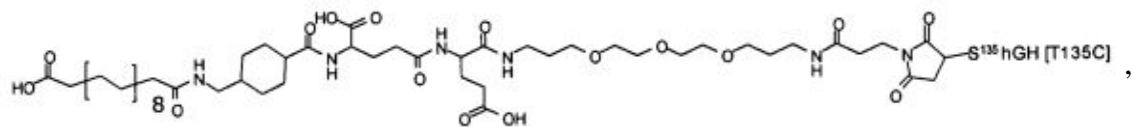
25



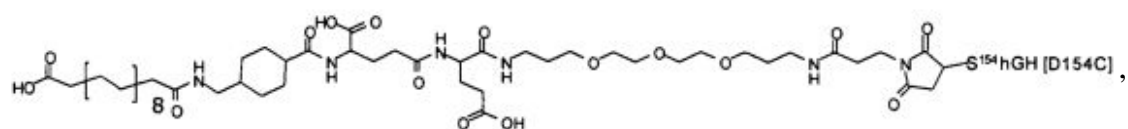
30



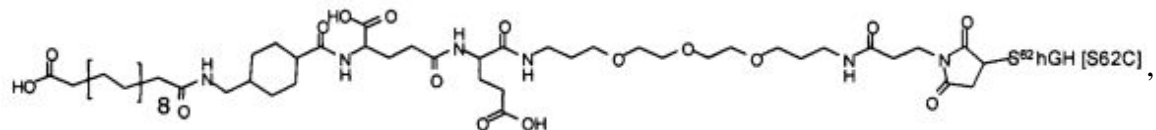
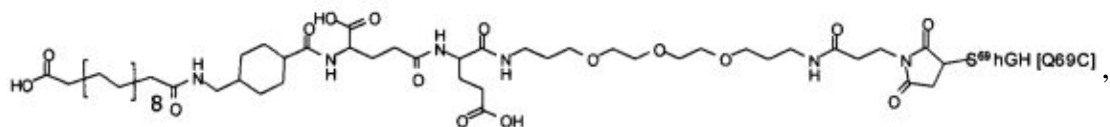
35



40



45





ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Novo Nordisk A/S
Behrens, Carsten
Buchardt, Jens
Nmrskov-Lauritsen, Leif
Andersen, Henrik S
Johansen, Nils L

<120> GROWTH HORMONES WITH PROLONGED IN-VIVO EFFICACY

<130> 8069.204-WO

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 191
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
1 5 10 15

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
20 25 30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
35 40 45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
50 55 60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu
65 70 75 80

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val
85 90 95

Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp
100 105 110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
115 120 125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser
130 135 140

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr

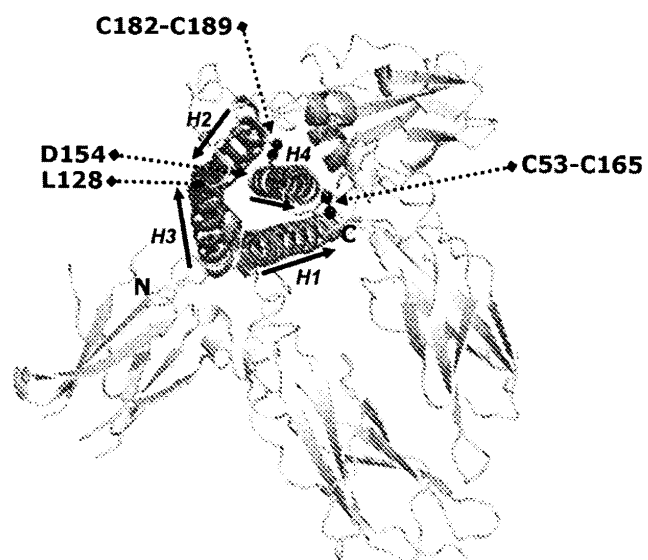
2

145 150 155 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe
 165 170 175

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
 180 185 190

Фигура 1



Фигура 2

1	FPTIPLSLFL	DNAMLRARHL	HQLAFDTYQE	FEEAYIPKEQ	KYSFLQNPQT	SLCFSES IPT
		H1			L1	
61	PSNREETQOK	SNLELLRISL	LLIQSNLEPV	QFLRSVFANS	LVYGASDCNV	YDLLKDL EEG
		H2		L2	H3	
121	IQTLMGRL ED	GSPRTGQIFK	QTYSKFD TNS	HNDDALLK NY	GLLYCFRK DM	DKVETELR IV
		L3			H4	
181	QCRSVEGSCG	F				