(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월23일
(11) 등록번호 10-2688003
(24) 등록일자 2024년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/107 (2006.01) *A61K 47/60* (2017.01)
C07K 14/50 (2024.01) *C07K 14/64* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 1/1077 (2013.01)
A61K 47/60 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2018-7017508
(22) 출원일자(국제) 2016년11월22일
심사청구일자 2021년11월18일
(85) 번역문제출일자 2018년06월20일
(65) 공개번호 10-2018-0081610
(43) 공개일자 2018년07월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/063313
(87) 국제공개번호 WO 2017/091568
국제공개일자 2017년06월01일
(30) 우선권주장
62/258,644 2015년11월23일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080075498 A*
WO2007056448 A2
JP2009515881 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
브리스톨-마이어스 스퀩 컴퍼니
미국, 뉴저지 08543-4000, 프린스톤, 루트 206 앤드 프로빈스 라인 로드
(72) 발명자
히키, 매튜 알.
미국 08903 뉴저지주 뉴 브런즈윅 원 스퀩 드라이브 브리스톨-마이어스 스퀩 컴퍼니 내
라미레즈, 안토니오
미국 08903 뉴저지주 뉴 브런즈윅 원 스퀩 드라이브 브리스톨-마이어스 스퀩 컴퍼니 내
(74) 대리인
양영준, 이귀동

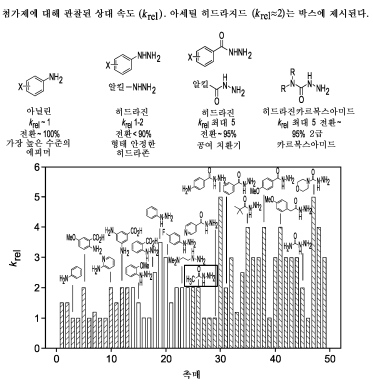
전체 청구항 수 : 총 21 항 심사관 : 윤미란

(54) 발명의 명칭 **단백질 PEG화에 사용하기 위한 첨가제 시스템**

(57) 요 약

본 개시내용은 단백질 PEG화에서 사용하기 위한 첨가제 시스템을 제공한다. 첨가제 시스템은 단독으로 또는 방향족 아민, 예컨대 3,5-디아미노벤조산과, 또는 암모늄 염 예컨대 염화암모늄 또는 아세트산암모늄과 조합하여 사용되는 p-아미노벤조산 히드라지드를 포함한다. 개시된 첨가제 조합은 증가된 반응 속도, 더 높은 수율 및 접합 반응을 완료하는데 요구되는 아민옥시-PEG 당량에서의 감소를 포함한 여러 이점을 제공한다. 전형적인 반응은 첨가제 또는 첨가제 시스템을 단백질 및 아민옥시-PEG 시약의 용액과 조합함으로써 실행될 수 있다. 용액은 pH 4로 조정되고, 완료까지, 전형적으로 24시간 내에, 교반 없이 20-25℃에서 유지된다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C07K 14/50 (2024.01)
C07K 14/64 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

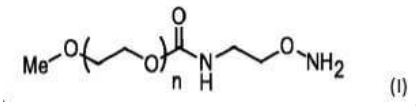
FGF21 단백질을 첨가제 시스템의 존재하에 PEG 시약과 반응시켜 PEG화된 FGF21 단백질을 수득하는 단계를 포함하는 PEG화된 FGF21 단백질을 수득하는 방법이며, 여기서 첨가제 시스템은 p-아미노벤조산 히드라지드를 포함하고, PEG 시약은 PEG-옥시아민인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, FGF21 단백질이 p-아세틸페닐알라닌 잔기를 갖는 것인 방법.

청구항 3

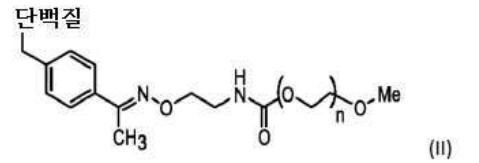
제2항에 있어서, PEG 시약이 화학식 (I)의 구조를 갖는 것인 방법:



(I)

청구항 4

제3항에 있어서, PEG화된 FGF21 단백질이 화학식 (II)의 구조를 갖는 것인 방법:



(II)

청구항 5

제4항에 있어서, FGF21 단백질이 pH 4에서 첨가제 시스템의 존재하에 PEG 시약과 반응하는 것인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, FGF21 단백질이 20℃내지 25℃ 범위의 온도에서 첨가제 시스템의 존재하에 PEG 시약과 반응하는 것인 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, FGF21 단백질이 pH 4에서 첨가제 시스템의 존재하에 PEG 시약과 반응하는 것인 방법.

청구항 8

제2항에 있어서, FGF21 단백질이 20℃내지 25℃ 범위의 온도에서 첨가제 시스템의 존재하에 PEG 시약과 반응하는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 첨가제 시스템이 p-아미노벤조산 히드라지드를 방향족 아민 또는 3,5-디아미노벤조산과 조합하여, 또는 암모늄 염, 아세트산암모늄 또는 염화암모늄과 조합하여 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제4항에 있어서, 첨가제 시스템의 존재 하에 FGF21 단백질을 PEG 시약과 반응시키기 전에, FGF21 단백질이 가용

화되는 것인 방법.

청구항 11

제2항에 있어서, 첨가제 시스템의 존재 하에 FGF21 단백질을 PEG 시약과 반응시키기 전에, FGF21 단백질이 가용화되는 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 첨가제 시스템의 존재 하에 FGF21 단백질을 PEG 시약과 반응시키기 전에, FGF21 단백질이 우레아에서 가용화되는 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 첨가제 시스템의 존재 하에 FGF21 단백질을 PEG 시약과 반응시키기 전에, FGF21 단백질이 우레아에서 가용화되는 것인 방법.

청구항 14

(a) 단백질, PEG 시약 및 첨가제 시스템을 확인하는 단계;

(b) 상기 단백질을 가용화시키고 이어서 첨가제 시스템의 존재 하에 단백질을 PEG 시약과 조합하는 단계; 및

(c) 상기 단백질을 PEG 시약과 반응시켜 케톡심을 형성하고 PEG화된 단백질을 수득하는 단계

를 포함하고,

여기서 상기 첨가제 시스템은 p-아미노벤조산 히드라지드를 포함하는 것인,

PEG화된 단백질을 수득하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 단백질은 p-아세틸페닐알라닌 잔기를 함유하는 것인 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 첨가제 시스템의 존재 하에 PEG 시약과 조합된 가용화된 단백질이 pH 4에서 유지되는 것인 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 첨가제 시스템의 존재 하에 PEG 시약과 조합된 가용화된 단백질이 20℃ 내지 25℃ 범위의 온도에서 유지되는 것인 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 첨가제 시스템이 p-아미노벤조산 히드라지드를 방향족 아민 또는 3,5-디아미노벤조산과 조합하여, 또는 암모늄 염, 아세트산암모늄 또는 염화암모늄과 조합하여 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 첨가제 시스템이 염화암모늄을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제14항에 있어서, 상기 PEG 시약이 PEG-옥시아민인 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 단백질이 렐락신 또는 FGF21인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 특허 출원은 2015년 11월 23일자로 출원된, 특허 가출원 62/258644의 이익을 주장하며, 그의 교시는 구체적으로 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 본 개시내용은 단백질 PEG화 반응에 사용하기 위한 개선된 첨가제 시스템에 관한 것이다. 특히, 본 개시내용은 p-아세틸페닐알라닌 잔기를 함유하는 단백질 및 아민옥시-PEG 화합물 사이의 접합 반응을 위한 첨가제를 확인한다.

배 경 기 술

[0004] 단백질의 PEG화는 치료 단백질에의 폴리에틸렌 글리콜 유도체의 부착을 수반하여, 클리어런스율을 감소시키고 단백질분해 효소 및 면역계 인식으로부터의 입체 차폐를 제공함으로써 그의 안정성 및 약동학을 개선시키는 접합 방법이다 (Roberts, M.J. et al., *Adv. Drug Delivery Rev*, 54:459 (2002)). 일반적으로, PEG화 기술은 2가지 유형, 즉 무작위 및 부위-특이적 접합으로 분류될 수 있다. 무작위 PEG화는 임의적으로 PEG화 시약을 반응성 아미노산 예컨대 리신 또는 시스테인에 연결하여 PEG화된 생성물의 혼합물을 제공한다. 대조적으로, 부위-특이적 접합은 천연 관능기 (예를 들어, N- 또는 C-말단 기) 또는 비천연 아미노산 (예를 들어, p-아세틸페닐알라닌 -pAcF)의 명백한 반응성을 활용하여 단백질에 부착된 PEG 잔기의 위치 및 수를 제어한다. PEG화 시약 및 pAcF 잔기 사이의 케톡심 형성을 수반하는 부위 특이적 접합 반응은 유전자 코드의 확장을 통해 기질 단백질에 혼입된다 (Liu, C.C. et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 79:413 (2010); Tian, F. et al., "Accelerants for the modification of non-natural amino acids and non-natural amino acid polypeptides", 미국 특허 번호 7,468,458 (2008년 12월 23일)). 그의 및 입증된 유용성에도 불구하고, 케톡심의 형성을 기반으로 하는 접합은 느린 속도 및 불완전한 전환을 겪는다 (Crisalli, P. et al., *J. Org. Chem.*, 78:1184 (2013)). 케톡심 형성을 개선시키기 위한 시도는 과량의 PEG화 시약, 고온, 또는 고농도의 독성 촉매의 사용을 포함한다. 그러나, 이들 해결책은 생성물로부터 과량의 PEG화 시약 또는 독성 촉매를 제거하기 위한 추가적인 단계를 도입하고 종종 단백질의 안정성을 손상시킨다. 추가적으로, 기존 방법은 첨가제를 사용하지 않고/거나, 변성제 (우레아)를 사용하고/거나, 첨가제로서 아세틸히드라지드 ($AcNHNH_2$)를 사용한다. $AcNHNH_2$ 및 관련된 구조는 PCT 공개 번호 WO 2007/056448에 정의된 바 있다.

[0005] 관련 기술분야에서 지금 필요한 것은 스톨링을 실시하는 기계론적 원리를 조사함으로써 및 반응을 가속화하고 낮은 PEG:단백질 몰 비에서 높은 전환을 촉진하는 새로운 첨가제를 확인함으로써 pAcF 잔기를 함유하는 단백질 (렐락신 및 FGF21)의 PEG화에 대한 수율 및 속도를 업그레이드하기 위한 새로운 방법이다. 상기 방법은 경제적이고, 상당히 더 적은 양의 PEG화 시약으로 더 높은 전환을 촉진하고, 높은 반응 온도 및 유전자독성 물질의 제거에 대한 필요를 회피하는 더 빠른 반응을 촉진하여야 한다.

발명의 내용

[0006] 제1 실시양태에서, 본 개시내용은 단백질 PEG화 반응을 위한 개선된 첨가제 시스템으로서, p-아미노벤조산 히드라지드를 단독으로 또는 방향족 아민 또는 암모늄 염과 조합하여 포함하는 시스템을 제공한다.

[0007] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 단백질, PEG 시약 및 첨가제 시스템을 확인하는 단계; 및 상기 단백질을 가용화시키고 이어서 첨가제 시스템의 존재 하에 PEG 시약과 조합하여 PEG화된 단백질을 높은 수율로 수득하는 단계를 포함하는, PEG화된 단백질을 수득하는 방법을 제공한다.

[0008] 추가 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 실시양태에 언급된 바와 같은 방법에 의해 수득된 PEG화된 단백질을 포함하는 제약 조성물로서, 그를 필요로 하는 대상체에 대한 요법에 사용하기 위한 제약 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0009] **도 1:** 케톡심의 형성에 대한 일반적인 메카니즘.

도 2: 렐락신 (물 중 4 mg/ml)의 20 kDa PEG-OA 시약으로의 PEG화에 대한 크로마토그램.

도 3: 공기의 연속 스트림에 대한 노출 시 물 중 20 kDa PEG-OA의 분해에 대한 시간 경과.

도 4: 계내 IR 및 ^{1}H NMR 스펙트럼을 사용한 아세틸 히드라지드의 안정성의 연구.

도 5: 첨가제의 스크리닝에 대한 모델 반응. 반응 조건: 실온 (23℃)에서 1.0 mL 아세테이트 완충제 (20 mM, pH 4.0) 중 1 (3.6 mmol) 및 2 (3.6 mmol).

도 6: 상이한 첨가제에 대해 관찰된 상대 속도 (k_{rel}). 아세틸 히드라지드 ($k_{rel} \approx 2$)는 박스에 제시된다.

도 7: (a) 1 당량 피라졸아민 (적색); (b) 1 당량 MCH (청색); (c) 1 당량 피라졸아민 및 1 당량 MCH (녹색)의 존재 하의 디펩티드 1과 O-벤질히드록실아민 (2)의 반응에 대한 시간 경과. 첨가제의 부재 하에 수득된 반응 프로파일은 회색으로 제시된다.

도 8: 디펩티드 1 (a) (청색)와 (b) 1 당량 MCH (녹색); (c) 1 당량 MCH, 및 1 당량 피라졸아민 (회색); (d) 1 당량 피라졸아민 (적색)을 함유하는 샘플의 ^{1}H NMR 스펙트럼의 방향족 영역. MCH 및 피라졸아민 첨가제 사이의 상승작용적 효과는 단지 1종의 첨가제를 함유하는 샘플에 비해 더 높은 농도의 활성 중간체를 갖는 혼합물을 산출한다.

도 9: 좌측: 디펩티드 1의 30 당량 PABH 및 1.2 당량 20 kDa PEG-OA로의 PEG화; 히드라존 중간체는 녹색 점으로서 추적된다. 우측: 디펩티드를 30 당량 PABH로 밤새 평형화시킨 후에 1.2 당량 PEG화 시약이 첨가된 PEG화 반응.

도 10: 좌측: 디펩티드 1의 PEG화에 대한 히드라존 농도 대 PABH의 당량의 플롯; 청색 점은 피라졸아민이 생략된 반응 혼합물을 나타낸다. 중앙: 반응 속도에 대한 PABH 및 피라졸아민의 상이한 조합의 효과. 우측: PABH 및 피라졸아민을 함유하는 반응 혼합물 중 디펩티드 1 및 그의 히드라존 유도체의 최종 농도.

도 11: 반응의 종료 시 남아있는 디펩티드 1 대 총 당량 첨가제 및 피라졸아민:PABH 비의 플롯.

도 12: 좌측: (a) 30 당량 아세틸 히드라지드 (청색); (b) 30 당량 MCH (적색)의 존재 하의 렐락신과 20 kDa PEG-OA (1.5 당량)의 반응에 대한 시간 경과; 첨가제의 부재 하에 수득된 반응 프로파일은 회색으로 제시된다. 중앙: (a) 30 당량 피라졸아민 (청색); (b) 30 당량 MCH (적색); (c) 10 당량 MCH (자주색); (d) 30 당량 피라졸아민 및 10 당량 MCH (녹색); (e) 30 당량 MCH 및 30 당량 피라졸아민의 존재 하의 렐락신과 PEG-OA (1.5 당량)의 반응에 대한 시간 경과. 우측: (a) 40℃; (b) 10℃; (c) 25℃에서 30 당량 피라졸아민 및 10 당량 MCH의 존재 하의 렐락신과 PEG-OA (1.5 당량)의 반응에 대한 시간 경과.

도 13: 좌측: (a) 30 당량 MPCH 및 30 당량 피라졸아민 (녹색); (b) 30 당량 PH 및 30 당량 피라졸아민 (청색); 및 (c) 우레아 6M 중 30 당량 MCH 및 30 당량 피라졸아민 (적색)의 존재 하의 렐락신과 20 kDa PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과. 우측: (a) 30 당량 PH 및 60 당량 피라졸아민 (청색); (b) 30 당량 아세틸 히드라지드 및 60 당량 피라졸아민 (녹색); 및 (c) 30 당량 PABH 및 60 당량 피라졸아민 (적색)의 존재 하의 렐락신과 PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과.

도 14: MCH에 의해 가속화된 렐락신의 PEG화의 그의 종점에서의 HRMS 분석. 옥심 피크는 잔여 렐락신과 중첩된다. 렐락신 피크에 대한 0.04분 지연은 후기-용리 불순물보다 오히려 크로마토그래피 거동에 대한 반응 매트릭스 효과로 인한 것이다.

도 15: 좌측: 우레아 6M과 (a) 30 당량 MCH 및 30 당량 피라졸아민 (적색); (b) 30 당량 MCH, 30 당량 피라졸아민, 및 30 당량 NH_2OH (청색)의 존재 하의 렐락신과 20 kDa PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과. 우측: 우레아 6M과 30 당량 MCH 및 30 당량 피라졸아민 (청색)의 존재 하의 렐락신과 PEG-OA (1.2 당량)의 감쇠에 대한 시간 경과; 옥심 피크 (적색)는 반응 동안 증대하며, 이는 PEG-OA 분해로부터의 히드록실아민의 병행 형성을 시사한다.

도 16: 좌측: 30 당량 PABH 및 (a) 60 당량 에틸렌디아민; (b) 60 당량 3,5-디아미노벤조산 (녹색); (c) 60 당량 m-페닐렌디아민 (청색); 및 60 당량 피라졸아민 (적색)의 존재 하의 렐락신과 20 kDa PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과. 우측: (a) 30 당량 PABH 및 60 당량 3,5-디아미노벤조산 (녹색); 및 (b) 60 당량 PABH 및 120 당량 NH_4Cl (청색)의 존재 하의 렐락신과 PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과.

도 17: 예비 PEG화 스크리닝에 대한 반응식.

도 18: 렐락신 및 FGF21의 상이한 아민으로의 PEG화에 대한 반응식.

도 19: 총 당량 대 아민:PABH 비 대 최종 FGF21 농도의 플롯의 곡률을 예시하는 o- 및 m-페닐렌디아민에 대한 PEG화 결과. 좌측: o-페닐렌디아민. 우측: m-페닐렌디아민.

도 20: PABH 및 3,5-디아미노벤조산을 사용한 PEG화에 대한 총 첨가제 당량 대 아민:PABH 비 및 전환의 플롯. 좌측: FGF21과 30 kDa PEG-OA. 우측: 렐락신과 20 kDa PEG-OA.

도 21: 좌측: (a) 우레아 6 M (녹색); (b) NH_4Cl (회색); 및 (c) $(NH_4)_2SO_4$를 사용한 120 당량 염 및 60 당량 PABH 촉매의 존재 하의 렐락신과 20 kDa PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과.

도 22: 첨가제의 부재 (청색) 및 (a) 120 당량 NH_4Cl (적색), (b) 60 당량 아세틸 히드라지드 (회색), 및 (c) 60 당량 아세틸 히드라지드 및 120 당량 NH_4Cl (녹색)의 존재 하의 렐락신과 20 kDa PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과.

도 23: 좌측: 120 당량 NH_4Cl의 첨가 전 및 후의 렐락신의 UV 스펙트럼 (각각 청색 및 적색). 우측: 방향족 잔기를 적색으로 강조한 렐락신의 아미노산 서열.

도 24: 좌측: 120 당량 NH_4Cl의 첨가 전 및 후의 렐락신의 IR 스펙트럼 (각각 청색 및 자주색). 우측: 구조적 변화에 대한 잠정적인 할당을 갖는 120 당량 NH_4Cl의 첨가 후의 IR 스펙트럼의 삽도.

도 25: 120 당량 NH_4Cl의 첨가 전 및 후의 렐락신의 ^{15}N NMR HSQC 스펙트럼 (각각 적색 및 청색).

도 26: 120 당량 NH_4Cl의 첨가 전 (청색) 및 후의 렐락신의 근 UV CD 스펙트럼 (각각 청색 및 녹색).

도 27: 상업적 PABH에 존재하는 잠재적인 불순물의 구조.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 출원의 다른 곳에 달리 구체적으로 제시되지 않는 한, 하기 용어가 본원에 사용될 수 있고, 하기 의미를 가질 것이다.

[0011] 약어

[0012] PEG: 폴리에틸렌 글리콜

[0013] PEG-OA: 폴리에틸렌 글리콜 - 옥시아민

[0014] mPEG: 메톡시 폴리에틸렌 글리콜

[0015] MCH: 모르폴린 4-카르보히드라지드

[0016] MPCH: 4-메틸피페라진-1-카르보히드라지드

[0017] PH: 피발산 히드라지드

[0018] PABH: p-아미노 벤조산 히드라지드

[0019] PMBH: p-메톡시 벤조산 히드라지드

[0020] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다는 것을 주목해야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 달리 언급되지 않는 한, 본원에 기재된 모든 범위는 특정한 종점을 포함한다. 하기 용어가 아래에서 제공된다.

[0021] *약*: 용어 "약"은 대략, 대체로, 즈음, 또는 정도를 의미하기 위해 본원에 사용된다. 용어 "약"이 수치 범위와 함께 사용되는 경우에, 이는 경계를 제시된 수치 값 초과 및 미만으로 확장시킴으로써 그 범위를 변형시킨다. 일반적으로, 용어 "약"은 수치 값을 언급된 값의 초과 및 미만으로 5 퍼센트 위 또는 아래 (더 높거나 또는 더 낮은)의 변동치만큼 변형시키기 위해 본원에 사용된다.

[0022] *첨가제 시스템*: 용어 "첨가제 시스템"은 "촉매 화합물"을, 단독으로 또는 조합하여, 의미하기 위해 본원에 사용된다. 예를 들어 p-아미노벤조산 히드라지드를 단독으로 또는 방향족 아민 즉 3,5-디아미노벤조산, O-페닐렌디

아민, 1-피리딘-2-일-에틸아민, 2-(디메틸아미노)에틸히드라진, m-페닐렌디아민 및 2-피콜릴아민 또는 암모늄 염 즉 아세트산암모늄 및 염화암모늄과 조합하여. 바람직한 촉매 화합물은 3,5-디아미노벤조산과 p-아미노벤조산 히드라지드 또는 염화암모늄과 p-아미노벤조산 히드라지드를 포함한다.

[0023] *포함하는*: 용어 "포함하는"은 "포함한"을 의미하며, 예를 들어 X를 "포함하는" 조성물은 독점적으로 X로만 이루어질 수 있거나 또는 추가적인 것, 예를 들어 X + Y를 포함할 수 있다.

[0024] *PEG*: 용어 "PEG"는 본 개시내용의 문맥에 사용될 때 폴리에틸렌 글리콜 또는 유도체화된 폴리에틸렌 글리콜을 지칭한다.

[0025] *PEG화 또는 PEG화 방법*: 용어 "PEG화" 또는 "PEG화 방법"은, 또 다른 분자에 대한, 본 개시내용의 문맥에서, 렐락신 및 FGF21을 포함하나 이에 제한되지는 않는 p-아세틸페닐알라닌 (pAcF) 잔기를 함유하는 단백질에 대한 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 중합체 쇄의 부착 방법을 지칭한다.

[0026] *접합*: 본원에 사용된 바와 같은 용어 "접합"은 p-아세틸페닐알라닌 잔기를 함유하는 단백질 및 아민옥시-PEG 화합물 사이의 접합 반응을 지칭한다.

[0027] 이는 일반적으로 PEG의 활성화, 및 활성화된 PEG-중간체의 직접적으로 표적 단백질/펩티드에 대한 또는 후속적으로 활성화되고 표적 단백질/펩티드에 커플링되는 링커에 대한 커플링을 수반한다 (문헌 [Abuchowski, A. et al., *J. Biol. Chem.*, 252:3571 (1977) 및 *J. Biol. Chem.*, 252:3582 (1977), Zalipsky et al. in *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, Chapters 21 and 22, Harris, J.M., ed., Plenum Press, NY (1992)] 참조). PEG 분자를 함유하는 폴리펩티드가 접합된 또는 PEG화된 단백질로도 알려져 있지만, 부착된 PEG 분자가 결여된 단백질은 미접합 또는 무함유로서 지칭될 수 있음을 주목한다.

[0028] *PEG 시약 또는 PEG화 시약*: PEG화 반응에 도움을 주는 시약.

[0029] 임의의 주어진 예시적 실시양태가 하나 이상의 추가적인 예시적 실시양태와 조합될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0030] 제1 측면에서, 본 개시내용은 단백질 PEG화 반응을 위한 개선된 첨가제 시스템으로서, p-아미노벤조산 히드라지드를 단독으로 또는 방향족 아민 또는 암모늄 염과 조합하여 포함하는 시스템을 제공한다.

[0031] 제1 측면의 제1 실시양태에서, 방향족 아민은 3,5-디아미노벤조산, O-페닐렌디아민, 1-피리딘-2-일-에틸아민, 2-(디메틸아미노) 에틸히드라진, m-페닐렌디아민 및 2-피콜릴아민으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0032] 제1 측면의 제2 실시양태에서, 암모늄 염은 아세트산암모늄 및 염화암모늄으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0033] 제1 측면의 제3 실시양태에서, 바람직한 시스템 조합은 p-아미노벤조산 히드라지드와 3,5-디아미노벤조산 또는 p-아미노벤조산 히드라지드와 염화암모늄을 포함한다.

[0034] 제1 측면의 제4 실시양태에서, 반응은 p-아세틸페닐알라닌 잔기를 함유하는 단백질 및 아민옥시-PEG 화합물 사이의 접합 반응이다.

[0035] 제1 측면의 제5 실시양태에서, 첨가제 시스템은 접합 반응 속도를 증대시키고, 접합된 생성물의 높은 수율을 제공하고, 접합 반응을 완료하는데 요구되는 아민옥시-PEG 당량에서의 감소를 가능하게 한다.

[0036] 제2 측면에서, 본 개시내용은 단백질, PEG 시약 및 첨가제 시스템을 확인하는 단계; 및 상기 단백질을 가용화시키고 이어서 첨가제 시스템의 존재 하에 PEG 시약과 조합하여 PEG화된 단백질을 높은 수율로 수득하는 단계를 포함하는, PEG화된 단백질을 수득하는 방법을 제공한다.

[0037] 제2 측면의 제1 실시양태에서, 단백질은 pAcF 잔기를 함유하는 렐락신 또는 FGF21이다.

[0038] 제2 측면의 제2 실시양태에서, PEG 시약과 조합된 가용화된 단백질 용액은 약 4의 pH에서 유지된다.

[0039] 제2 측면의 제3 실시양태에서, 반응 혼합물은 약 20℃내지 약 25℃ 범위의 온도에서 유지된다.

[0040] 제2 측면의 제4 실시양태에서, 첨가제 시스템은 p-아미노벤조산 히드라지드를 단독으로 또는 방향족 아민, 예컨대 3,5-디아미노벤조산 또는 암모늄 염 예컨대 아세트산암모늄 또는 염화암모늄과 조합하여 포함한다.

[0041] 제2 측면의 제5 실시양태에서, 고품질 p-아미노벤조산 히드라지드와 염화암모늄의 첨가제 조합은 PEG화된 단백질의 대규모 생산에서 사용하기에 바람직하다.

[0042] 제2 측면의 제6 실시양태에서, PEG 시약은 PEG-OA 및 아민옥시 기를 갖는 다른 PEG 유도체를 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0043] 제3 측면에서, 본 개시내용은 제2 측면 및 그의 실시양태에 언급된 방법에 의해 수득된 PEG화된 단백질을 포함하는 제약 조성물로서, 그를 필요로 하는 대상체에 대한 요법에 사용하기 위한 제약 조성물을 제공한다.

[0044] **실시예**

[0045] 본 개시내용은 이제 특정 실시양태와 관련하여 기재될 것이며, 이는 그의 범주를 제한하는 것으로 의도되지는 않는다. 반대로, 본 개시내용은 청구범위의 범주 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형, 및 등가물을 포괄한다. 따라서, 구체적 실시양태를 포함하는 하기 실시예는, 본 개시내용의 하나의 실시를 예시할 것이며, 실시예는 특정 실시양태의 예시의 목적을 위한 것이고, 그의 절차 및 개념적 측면의 가장 유용하고 용이하게 이해되는 기재내용인 것으로 여겨지는 것을 제공하기 위해 제시되는 것으로 이해된다.

[0046] 카르보닐 기 및 히드록실아민 유도체 사이의 반응의 일반적인 메카니즘은 소분자 반응물에 대하여 널리 이해되어 있다 (Jencks, W.P., *Prog. Phys. Org. Chem.*, 2:63 (1964), 및 그에 인용된 참고문헌). 상기 방법은 산-촉매화되고, 전반적으로, 다단계 평형에 의해 선행된 탈수를 수반한다. 케티민이 알릴계 1,3-스트레인으로 인해 알디민보다 더 느린 속도로 형성되는 반면, 단순 알킬옥시아민의 경우에 케톤-케티민 평형은 크게 탈수 쪽으로 이동된다 (도 1).

[0047] 실시예 1

[0048] 반응 스톨링에 대한 잠재적인 원인으로서 PEG화 시약의 분해를 조사하기 위한 연구

[0049] PEG화의 스톨링에 대한 하나의 가능한 원인은 PEG화 시약의 분해로부터 유발될 수 있다. PEG 시약은 UV 활성이 아니므로 이는 반응 동안 그의 운명을 모니터링하기 위한 상이한 검출 방법을 요구한다. 증발 광 산란 검출은 용매를 제거하기 위해 네뷸라이저를 통해 HPLC 이동상을 통과시키는 것을 수반한다. 검출기에서 레이저 빔으로부터 회절 광을 형성하는 임의의 고체 입자는 신호를 유발한다. 이 방법은 광을 회절시킬 수 있는 고체를 형성하는 임의의 화합물의 검출을 허용한다. PEG화 시약은 고분자량 고체이므로, 이들은 ELS 검출을 사용하는 HPLC 분석을 위한 탁월한 후보이다. 이는 도 2에서 분명하다. UV 트레이스는 녹색으로 제시되고, ELS 트레이스는 흑색으로 제시된다. 상부 크로마토그램 (녹색)은 210 nm에서의 UV 트레이스이고, 흑색 크로마토그램은 UV 검출기로 직렬로 수득된 동일한 혼합물의 ELS 트레이스이다. 명백하게는 하부 흑색 트레이스는, 특히 보다 후기 용리 PEG-기반 화합물로, 더 많은 정보를 제공한다.

[0050] 가장 후기 용리 피크는 UV 활성이 아니고 반응의 출발 시에 존재하지 않았다. 이는 PEG화 시약의 경쟁적인 분해를 시사하였다. 실제로, 이 화합물은 PEG화 시약의 용액이 공기에 노출되었을 때 형성되었다 (도 3). 20 kDa PEG-OA 시약의 전환은 농도 $\approx$ 4 mg/ml에서 >97%였고 PEG화에서 반응성이지 않았던 부산물을 유발하였다.

[0051] 이러한 분해는 PEG화 시약과 용매 중에 용해된 기체의 반응의 결과이므로, 분해 속도 및 농도 사이의 역 상관관계가 있어야 한다. 이러한 가설은 30-40 mg/mL의 보다 반응 적절한 농도에서 20 kDa PEG-OA의 샘플이 상당히 안정적이었다 (< 5% 분해)는 관찰과 일치한다. 분석 동안 샘플의 안정성을 보장하는 이러한 프로젝트를 위한 분석 작업에 대한 일부 영향이 있을 수 있지만, 보다 반응 적절한 조건 하의 최소 분해는 공기에 의한 PEG 분해가 관찰된 반응 스톨링에 대한 강력한 이유가 아니라는 결론으로 이어진다. PEG화 시약의 안정성을 또한 PEG화를 가속화하기 위해 이용된 첨가제의 존재 하에 연구하였다. 이들 실험을 예상된 반응 농도에서 수행하였고, 이는 렐락신에 비해 1.2 당량의 표적 PEG 로딩을 가정한다. 모든 경우에, PEG화 시약의 분해는 최소였다.

[0052] PEG화 스톨링은 가속화 첨가제로서의 매우 과량의 아세틸 히드라지드의 존재 하에 발생하므로, 반응 조건 하의 이러한 히드라지드의 안정성을 계내 IR 및 ^{1}H NMR 분광분석법에 의해 시험하였다. 연구는 아세틸 히드라지드가 안정적이라는 것을 제시하였고, 이는 반응을 촉진하는데 요구되는 과량이 비촉매화된 배경기술 방법에 비해 평형 및 적당한 가속의 존재와 관련될 가능성이 가장 높다는 것을 시사한다 (도 4).

[0053] 실시예 2

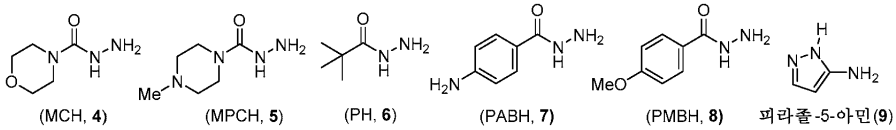
[0054] 디펩티드 모델 시스템 (DMS)을 사용한 스크리닝 첨가제에 대한 연구

[0055] 렐락신에서의 pAcF 케톤 핸들 및 알콕시아민 사이의 반응을 가속화한 첨가제를 찾기 위한 초기 노력은, 탈수를 통해 그의 상응하는 이미노 유도체의 형성을 촉진할 수 있는 활성화된 X-NH_2 모이어티를 함유한 상업적으로 입수

가능한 화합물의 스크리닝을 수반하였다. 이들 첨가제의 선택을 위한 최소 요건은 수성 매질에서의 실제 단백질의 PEG화를 촉진하는데 사용된 온도, 완충제 및 pH 조건 하의 그의 충분한 안정성 및 용해도였다. 분석 절차를 단순화하고 HPLC-UV 및 NMR 분광분석법에 의한 반응 모니터링을 가능하게 하기 위해, 디펩티드 Ala-pAcF (**1**) 및 O-페닐히드록실아민 (**2**, 도 5 참조) 사이의 축합을 첨가제 선택을 유도할 수 있었던 모델 변환으로서 선택하였다. 후속 단계에서, 모델 반응을 개선시켰던 첨가제를 렐락신 및 FGF21의 PEG화에서 시험할 것이다. 첨가제의 스크리닝을 위한 모델 반응은 도 5에 제공된다. 반응 조건: 실온 (23℃)에서 1.0 mL 아세테이트 완충제 (20 mM, pH 4.0) 중 **1** (3.6 mmol) 및 **2** (3.6 mmol).

[0056] 반응 속도 및 퍼센트 전환을 X-NH_2 모이어티 상의 X 치환기의 성질에 따라 4개의 일반적인 카테고리, 즉: 아닐린, 히드라진, 히드라지드 및 히드라진카르복스아민으로 분류된 50종의 첨가제에 대해 평가하였다. 관찰된 속도를 첨가제의 부재 하에 측정된 속도 (k_{rel} = 1)에 대해 정규화하였다. 아세틸 히드라지드 (k_{rel} ≈ 2)는 기준선 허용가능한 성능을 달성하기 위한 참조 첨가제였고; k_{rel} > 2 및 높은 전환 (>95%)을 제공하였던 그러한 첨가제만이 렐락신 및 FGF21의 PEG화에서 후속 적용 및 최적화에 대해 고려될 것이다. 결과의 개요는 도 6에 제시된다. 반응을 단백질 PEG화 조건을 모방하기 위해 교반하지 않으면서 실온에서 HPLC 바이알에서 수행하였고, 분취물을 추가의 샘플 조작을 피하기 위해 HPLC 오토 샘플러에 의해 정기적으로 배출하였다.

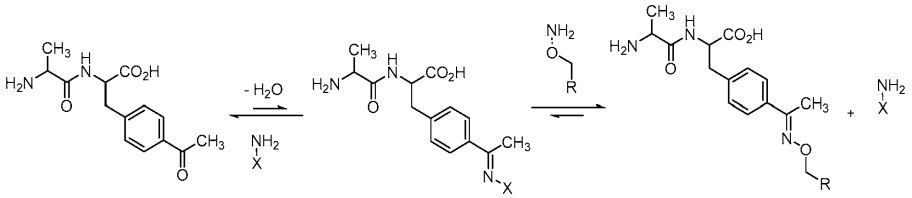
[0057] 히드라지드 (청색으로 착색됨) 및 히드라진카르복스아미드 (녹색)는 최상의 결과를 제공하였다. 일반적으로, 아닐린 (적색)은 완전한 디펩티드 전환을 제공하였지만 반응을 가속화하지는 않았다. 더욱이, 대부분의 아닐린은 목적하지 않은 에피머화의 높은 수준을 촉진하였다. 히드라진 (황색)은 반응 조건 하에 다량의 히드라존을 형성하였고 추가의 연구를 위해 폐기하였다. 방향족 히드라지드 및 2급 히드라진카르복스아민은 최대 5배 속도 가속 뿐만 아니라 디펩티드 소비의 대략 95%에서 스톨링된 높은 전환을 산출하였다. 특히, 스크리닝은 변환을 촉진하기 위한 최적의 시약으로서의 모르폴린-4-카르보히드라지드 (MCH, **4**) 및 p-아미노벤조산 히드라지드 (PABH, **7**)의 발견으로 이어졌다. 그의 성능, pH 4에서의 용해도, 상업적 이용가능성 및 비용을 기반으로, PABH 및 MCH를 렐락신 및 FGF21의 PEG화에서 추가로 평가하였다 (하기 참조).

[0058] 

[0059] 당면한 이러한 정보로, 반응 스톨링을 회피하려는 시도는 3개의 측면: (a) 다양한 양의 첨가제의 첨가, (b) 카오트로픽제의 효과, 및 (c) 첨가제의 조합에 집중하였다. 초기에, 연구를 반응성에서의 내인성 트렌드를 확인하기 위해 모델 디펩티드 및 아세틸 히드라지드로 수행하였다. 다양한 양의 아세틸 히드라지드에서의 반응 속도를 모니터링하는 것으로 첨가제에서의 포화 동역학을 밝혀냈고, 이는 속도 증진이 높은 농도의 시약에서 역치값에 도달한다는 것을 나타낸다 (반응식 1).

[0060] 반응식 1

[0061] NMR 분광분석법에 의해 결정된 케톤-케톡심 평형

[0062] 

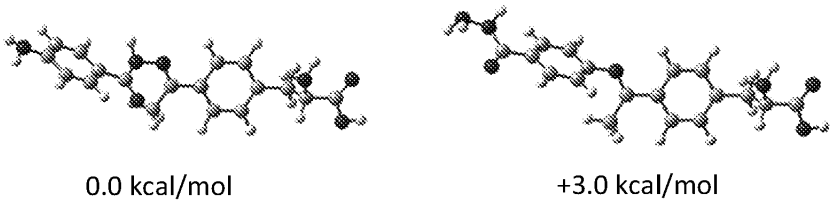
[0063] 더욱이, 아세틸 히드라지드의 증대하는 농도는 가역적 이민 전달 반응의 다단계 순서를 수반하는 일반적인 메카니즘과 일치하는 더 높은 스톨링 수준을 촉진하였다. 가속화 첨가제의 존재 하에, 이러한 메카니즘은 탈수 쪽으로 겉보기 평형을 이동시킴으로써 더 우수한 전환을 달성하는 가능성을 암시하였다. 반응 매질에서의 변화를 통해 이러한 평형을 변형시키려는 경험적인 시도는 성공하지 못하였다. 예를 들어, 6M 우레아 또는 NH_4Cl의 첨가는 반응을 가속화하지도 원래 전환 수준에 영향을 미치지도 않았다. 특정 아닐린의 스크리닝은 가속 없이 완전 전환을 유발하였고, 이들 아닐린과 가속화 첨가제의 조합을 기질 전환을 확장하는데 도움을 줄 수 있는 것을

고려하였다. 실제로, 아세틸 히드라지드 및 피라졸아민 9의 혼합물의 사용은 더 빠른 반응 프로파일 및 거의 완전한 전환으로 이어졌다 (도 6). 등몰량의 디펩티드, 피라졸아민, MCH 첨가제, 또는 MCH 및 피라졸아민의 혼합물을 함유하는 혼합물의 ^{1}H NMR 분석은 혼합물을 함유하는 샘플에 대한 이민 및 히드라존 중간체의 상승작용적 증대를 밝혀냈고, 이는 가속화 첨가제 및 아닐린을 조합하는 것의 긍정적인 효과가 반응 중간체에 대한 경로의 평형의 이동과 상관관계가 있다는 것을 시사하였다 (도 8).

[0064] 히드라지드 및 아닐린 모이어티 둘 다를 함유하는 첨가제인 PABH를 사용하는 유사한 ^{1}H NMR 분광학적 연구는, DFT 계산과 일치하는 단일 히드라존 중간체의 보편적인 형성을 제시한다. 중성 조건 하에, 이론의 B3LYP/6-31G(d) 수준에서의 계산은 ≈ 3 kcal/mol만큼 그의 등구조 이민보다 오히려 pAcF 및 PABH 사이의 히드라존의 형성에 유리하다 (반응식 2).

[0065] 반응식 2

[0066] 중성 조건 하의 pAcF의 히드라존 및 이민 중간체의 형성에 대한 B3LYP/6-31G(d) 기하구조 및 에너지





[0067]

[0068] 아미노산 -NH_2의 양성자화 (pK_a ≈ 9)는, ≈ 9 kcal/mol만큼 히드라존 형성을 지지한다. 이중 양성자화 (pKa: 아닐린 ≈ 2.5, 히드라지드 < 2)는 ≈ 1.0 kcal/mol만큼 이민 형성에 유리하다. 반응이 이러한 낮은 pH 값에서 실행되지 않을지라도, DFT 계산은 탈수가 pH 변이 및 H-결합 효과에 고도로 민감하다는 것을 나타낸다.

[0069] 히드라존 중간체는 디펩티드 1과 PABH의 PEG화 동안 모니터링될 수 있다 (도 9). PEG화 시약의 부재 하에 밤새 디펩티드 1과 PABH의 혼합물을 평형화시켰던 대조군 실험은 목적하는 생성물을 제공하기 위해 20 kDa PEG-OA의 첨가 시 히드라존의 형성 뿐만 아니라 그의 빠른 소비를 제시하였다. 아민 첨가제 (예를 들어, 피라졸아민, 도 10)의 존재 하의 히드라존 형성의 추가의 실험은 히드라존 형성의 정도가 반응에 사용된 피라졸아민:PABH 비와 연관된다는 것을 시사하였다. 흥미롭게도, 히드라존 형성의 정도는 단순한 방식으로 반응 속도 또는 전환과 상관관계가 없다. 모델 디펩티드 시스템에서, 1:1의 피라졸아민:PABH 비는 히드라존의 형성에 대해 최적이었다. 그러나, 반응 속도의 경우에, 최적 조건은 1:2 비 아민:히드라지드와 상응하였다. 아민에 비해 더 많은 양의 히드라지드에 대한 필요는 히드라지드가 아민 첨가제보다 훨씬 더 높은 반응 속도를 제공하는 것으로 관찰되었던 예비 스크리닝에 의해 지지된다. 다른 한편으로는, 3:1 비의 아민:히드라지드는 (a) 낮은 아민:히드라지드 비로 반응의 종료에서 남아있는 상당한 양의 히드라존 중간체의 관찰 및 (b) 히드라지드 첨가제의 "키커 충전"의 첨가 시 검출된 반응의 역전과 일치하는 디펩티드 전환에 대해 최적이었다. 상기 제시된 실험에서, 총 당량은 PBAH 및 피라졸아민의 합계이다. 첨가제의 총 당량에서의 변화의 효과는 아민:히드라지드 비 뿐만 아니라 조합된 첨가제의 총 당량 둘 다를 변경시키는 실험 실행의 시리즈를 통해 해결하였다. 결과는 도 11에 요약된다. 도면에서의 곡률은 아민 및 히드라지드 사이의 협동 효과가 복잡하고 반응 조건의 최적화가 첨가제의 총 당량, 뿐만 아니라 2종 사이의 비의 고려사항을 요구할 수 있다는 것을 시사한다.

[0070] 실시예 3

[0071] 단백질 - 렐락신 및 FGF21의 첨가제 가속화된 PEG화

[0072] 렐락신 및 FGF21의 PEG화에 대한 모델 시스템에서 학습된 레슨의 적용은 반응 수율 또는 생성물의 품질의 손상 없이 최대 1.2 당량까지 20 kDa PEG-OA의 당량의 수를 감소시키는 것 뿐만 아니라 실온에서 반응 시간을 단축하는 것을 목적으로 한다. 이를 위해, 피상적인 조사로부터 초기에 발생된 반응 조건 하에 렐락신으로의 모델 반응에서 확인된 첨가제를 시험하였다. 렐락신 (pH 4.0에서 20 mM AcONa 중 21 mg/mL)의 1.5 당량 PEG-OA로의 PEG화는 30 당량 아세틸 히드라지드 또는 MCH의 존재 하에 실온에서 24시간 후에 우수한 전환 (≈ 90%)을 제공하였다. 촉매의 부재 하에, 동일한 조건 하에, 반응은 유의하게 더 낮은 전환 (≈ 75%)을 제공하였다. 모델 시스템 연구와 일치하게, PEG화는 첨가제에 의해 가속화되었고, MCH와의 반응은 아세틸 히드라지드와의 반응보다 2배 더 빨랐다. 더욱이, 도 6에 제안된 평형은 하기 관찰을 지지한다: (a) 촉매화된 반응은 필적할만한 전환에서 스톨링되었음, (b) 스톨링되면, 30 당량 가외의 첨가제의 첨가는 전환 수준을 감소시켰음, 및 (c) 스톨링되면, 0.5 당량 PEG-OA의 첨가는 반응을 더 높은 전환 (≈ 95%)에 이르게 하였음. 트렌드는 렐락신의 PEG화로 옮겨진 모델 반응에서 아닐린에 대해 주목하였다: 30 당량 피라졸아민의 첨가는 가속화 없이 대부분의 렐락신 출발 물질을 변형시키고, MCH와 피라졸아민을 조합하는 것은 단지 8시간 내에 95% 전환을 산출하였다. 반응 조건을 최적화하려는 노력은 변수 사이의 복잡한 상호작용을 노출시켰고 더 깊은 통찰력을 수득하도록 DoE 연구의 적용을 권장하였다 (실시예 4). 예를 들어, 30 당량 피라졸아민과 혼합된 더 많거나 또는 더 적은 양의 MCH는 전환을 개선시키지 않았고, 더 높은 온도의 사용은 더 빠른 반응을 촉진하지 않았다 (도 12). PEG-OA의 충전을 1.2 당량까지 감소시키는 것은 첨가제 MCH, MPCH (5) 또는 PH (6)의 존재 하에 1.5 당량에 대해 최적화된 조건 하에 ≈ 85-90% 전환에서 스톨링을 유발하였다. 그러나, 모델 시스템에서의 그의 무시할만한 효과와 대조적으로, 우레아 6M 중 MCH의 사용은 최대 ≈ 95% 반응 완료를 진행시켰다 (도 12).

[0073] 그러나, PEG화의 완료로의 진행은 렐락신 출발 물질과 동일한 체류 시간을 갖지만 PEG화 시약의 존재 하에 비반응성인 불순물의 형성을 밝혔다. HRMS 연구는 불순물이 pAcF N-말단 잔기에서 옥심에 상응하다는 것을 나타냈고 NH_2OH를 스파이킹하는 것은 불순물이 PEG화 쪽으로 비생산적이었다는 것을 확증하였다 (도 13). 2가지 가설은 NH_2OH의 공급원을 설명하도록 상정되었다, 즉: (a) PEG화 시약 중 유입 불순물로서의 그의 존재, 및 (b) PEG화 반응의 경과 동안 그의 형성. PEG-OA의 신중한 분석은 출발 물질에서의 NH_2OH 수준이 <0.05 ppm이었다는 것을 입증하였고 제1 가설을 반증하였다. 반응 동안 PEG화 시약의 열화와 일치하게, 옥심 불순물의 형성을 모니터링하는 것은 PEG화에 걸쳐 그의 분명한 증대를 제시하였다 (도 14). 첨가제 4-9의 시스템적 HRMS 연구는 MCH 및 MPCH가 PEG-OA의 분해를 촉진하였던 반면, 아세틸 히드라지드, PH, PABH, PMBH, 및 피라졸아민은 그렇지 않았다는 것을 나타내었. 따라서, PABH에 의해 매개된 PEG화의 최적화에서 이후 PABH는 MCH의 것들과 필적할만한 전환을 제공하고 (도 6) 그의 비용은 후자보다 훨씬 더 적다 (1 U$/g 대 60 U$/g). 최적화된 조건은 30 당량 PABH 및 60 당량 피라졸아민의 사용을 수반하였다. 이들 결과는 후속적으로 DoE 연구에 의해 확증될 것이다.

[0074] 모델 시스템에서 스크리닝 동안 관찰된 반응 전환 시 아닐린의 효과의 검토는, 피라졸아민 이외에, 3종의 아민이 완료 수준을 진행할 수 있었다는 것을 제시하였다. 이들은 m-페닐렌디아민, 에틸렌디아민, 및 3,5-디아미노벤조산이었다. 1.2 당량 PEG-OA 및 30 당량 PABH를 사용하여, 60 당량 아민의 첨가는 전환 ≈ 95%를 제공하였다 (도 19). 더 낮은 첨가제 화학량론은 짧은 시간에 더 낮은 전환 (≈ 90%)을 유발하였지만 24시간에서 더 높은 전환을 서서히 달성하였다.

[0075] 실시예 4

[0076] 상이한 첨가제 조합 사이의 상호작용을 평가하기 위한 DoE 연구

[0077] 아민 및 히드라지드 첨가제 사이의 상호작용은 4가지 변수, 즉 (a) 히드라지드의 아이덴티티; (b) 아민의 아이덴티티; (c) 첨가제의 총 당량, 및 (d) 사용된 첨가제의 아민:히드라지드 비를 고려한 DOE 접근법을 사용하여 렐락신 및 FGF21의 PEG화에 대해 추가로 조사하였다. 연구는 렐락신 및 FGF21로 수행하여 속도 및 전환에 대한 아민:히드라지드 몰비 및 PEG-OA 로딩에 대한 효과를 조사하였고, 모델 시스템에서 이전에 확인된 다양한 아민을 분석하였다 (도 6). 이들 실험의 결과는 아민:히드라지드 비 사이의 복잡한 상호작용을 암시하였고 이는 반응 최적화가 아민의 유형 뿐만 아니라 기질 단백질의 신중한 고려사항을 요구한다는 것을 나타내었다.

[0078] 스크리닝의 제1 라운드에서 (표 1), 본 발명자들은 렐락신 및 FGF21 둘 다의 PEG화를 위해 PABH, 아세틸 히드라지드, 및 피발산 히드라지드를 피라졸아민과 조합하여 활용하였다 (도 17). PEG-OA 당량 및 우레아 농도가 또한 고려되었다. 이러한 스크린에서 대부분의 첨가제 시스템은 우수한 성능을 제공하였다. 이전 연구와 일치하

게 (도 7 및 12), 2:1 아민:히드라지드 시스템은 높은 전환을 촉진하는데 가장 적합하였다. 피발산 히드라지드가 높은 전환 및 빠른 반응 속도를 촉진할 수 있는 탁월한 히드라지드 첨가제였을지라도, PABH가 사용되었을 때 존재하지 않았던 새로운 불순물이 반응 혼합물에서 관찰되었다.

[0079] 표 1

[0080] 렐락신의 PEG화의 예비 스크리닝으로부터의 결과

피라졸아민 (당량)	히드라지드	히드라지드 (당량)	전환 (%)
60	피발산 히드라지드	30	98
60	PABH	30	96
0	피발산 히드라지드	60	96
30	아세틸 히드라지드	10	96

[0081]

[0082] 이러한 스크린은 FGF21을 사용하여 유사한 결과로 반복되었다 (표 2). PABH는 반응을 가속화하기 위한 아주 뛰어난 첨가제인 것으로 입증되었고, 이러한 계획의 목표 중 하나는 단백질 시스템의 광범위한 범위에 적용될 수 있는 일반적인 PEG화 방법을 개발하는 것이었으므로, PABH는 추가의 연구를 위해 선택되었다. 히드라지드 구성 성분으로서의 PABH의 사용에 대한 추가적인 지지는 알려진 강력한 돌연변이유발원인 아세틸 히드라지드와 달리 AMES 시험에서 음성이라는 사실이었다 (Bhide, S.V. et al., *Cancer Lett.*, 23:235 (1984)).

[0083] 표 2

[0084] FGF21의 PEG화의 예비 스크리닝으로부터의 결과

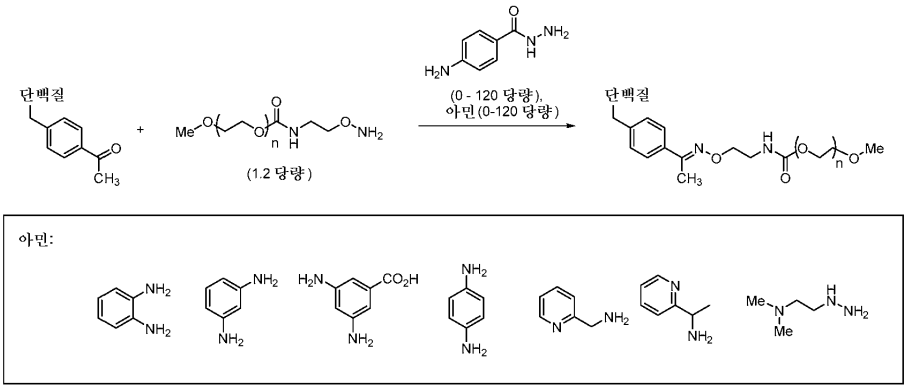
피라졸아민 (당량)	히드라지드	히드라지드 (당량)	전환 (%)
0	PABH	30	91
60	PABH	60	89
30	PABH	30	88
30	피발산 히드라지드	60	83
10	아세틸 히드라지드	60	82
60	피발산 히드라지드	10	80
0	아세틸 히드라지드	10	77
10	피발산 히드라지드	10	73
0	아세틸 히드라지드	30	69

[0085]

[0086] 히드라지드로서 PABH를 선택했다면, 이를, 렐락신 및 FGF21 단백질 둘 다를 사용하여, 더 넓은 범주의 아민과 조합하여 스크리닝하였다 (반응식 3). 이들 실험을 위해 하기 고려사항이 이루어졌다: (a) 모델 시스템에서 이전에 시험된 아민 (도 5)이 스크리닝될 것임, (b) 총 첨가제 당량 (히드라지드 및 아민의 합계)은 20 내지 120 범위일 것임, 및 (c) 반응 시간은 24시간으로 제한될 것임.

[0087] 반응식 3

[0088] 렐락신 및 FGF21의 상이한 아민으로의 PEG화에 대한 반응식



[0089]

[0090] 제1 DOE 스크리닝은 PABH 및 피라졸아민을 사용하여 수행되었으므로, 아민 (또는 아민의 부류)이 PABH를 갖는 첨가제 시스템에 사용하기에 최적이었는지 결정하는 것이 주요 관심사였다. 렐락신 및 FGF21로의 스크리닝으로부터의 실험 결과는 하기 요약된다 (각각 표 3 및 4).

[0091] 표 3

[0092] 렐락신 DoE 라운드 2로부터의 데이터

아민 첨가제	아민:PABH 비	총 당량	시간 (h)	전환 (%)
o-페닐렌디아민	0.6	20	22.7	96
o-페닐렌디아민	1.7	50	21.0	96
o-페닐렌디아민	0.3	85	18.5	94
o-페닐렌디아민	0.6	120	18.4	94
1-피리딘-2-일-에틸아민	0.3	20	22.2	94
1-피리딘-2-일-에틸아민	3.0	20	23.7	93
1-피리딘-2-일-에틸아민	0.3	120	22.6	91
1-피리딘-2-일-에틸아민	3.0	120	23.5	88
2-(디메틸아미노)에틸히드라진	0.3	20	23.1	94
2-(디메틸아미노)에틸히드라진	3.0	20	23.1	88
2-(디메틸아미노)에틸히드라진	1.0	85	21.4	84
2-(디메틸아미노)에틸히드라진	3.0	120	19.7	55
3,5-디아미노벤조산	3.0	20	18.8	94
3,5-디아미노벤조산	1.0	50	20.1	95
3,5-디아미노벤조산	3.0	120	21.8	94
3,5-디아미노벤조산	0.3	120	23.5	94
m-페닐렌디아민	3.0	20	19.3	94
m-페닐렌디아민	0.6	85	18.9	94
m-페닐렌디아민	3.0	120	23.1	96
m-페닐렌디아민	0.3	120	19.7	93
p-페닐렌디아민	1.0	20	19.3	96
p-페닐렌디아민	3.0	50	18.9	96
p-페닐렌디아민	1.6	120	20.6	94

[0093]

[0094] 표 4

[0095] FGF21 라운드 2로부터의 데이터

아민 첨가제	아민:PABH 비	총 당량	시간 (h)	전환 (%)
o-페닐렌디아민	0.64	120	23.5	60
o-페닐렌디아민	3.00	85	23.7	70
o-페닐렌디아민	0.33	85	24.3	57
o-페닐렌디아민	1.74	50	20.9	67
o-페닐렌디아민	0.64	20	20.5	64
m-페닐렌디아민	3.00	20	24.4	48
m-페닐렌디아민	0.33	120	24.9	55
m-페닐렌디아민	0.33	20	24.1	70
m-페닐렌디아민	0.64	85	24.7	37
m-페닐렌디아민	3.00	120	20.9	75
3,5-디아미노벤조산	3.00	20	23.9	55
3,5-디아미노벤조산	0.33	120	23.2	58
3,5-디아미노벤조산	0.33	20	22.3	70
3,5-디아미노벤조산	1.00	50	20.1	76
3,5-디아미노벤조산	3.00	120	19.7	77
에틸렌디아민	1.00	20	24.3	59
에틸렌디아민	3.00	50	24.0	55
에틸렌디아민	0.33	50	22.7	73
에틸렌디아민	0.33	120	21.4	77
에틸렌디아민	1.57	120	20.5	52
2-피콜릴아민	0.33	85	23.6	65
2-피콜릴아민	3.00	85	23.1	74
2-피콜릴아민	1.00	120	22.4	68
2-피콜릴아민	1.57	20	24.5	58

[0096]

아민 첨가제	아민:PABH 비	총 당량	시간 (h)	전환 (%)
2-피콜릴아민	0.33	20	19.2	54
1-피리딘-2-일-에틸아민	0.33	120	22.2	58
1-피리딘-2-일-에틸아민	3.00	120	23.1	42
1-피리딘-2-일-에틸아민	3.00	20	24.0	24
1-피리딘-2-일-에틸아민	1.57	85	21.8	70
1-피리딘-2-일-에틸아민	0.64	50	23.2	68
1-피리딘-2-일-에틸아민	0.33	20	20.1	53
2-(디메틸아미노)에틸히드라지드	3.00	20	22.7	52
2-(디메틸아미노)에틸히드라지드	0.33	20	22.8	48
2-(디메틸아미노)에틸히드라지드	0.33	120	22.8	70
2-(디메틸아미노)에틸히드라지드	3.00	120	19.7	20
2-(디메틸아미노)에틸히드라지드	1.00	85	19.3	49

[0097]

[0098] 렐락신의 PEG화에 대한 결과는 다양한 아민 사이에 일치하고, 전환은 일반적으로 상당히 높다. 다른 한편으로는, FGF21의 경우에 3,5-디아미노벤조산은 1.0 및 3.0의 아민:PABH 비 둘 다에서 PEG화의 우수한 촉진제인 것으로 보인다. 총 당량 및 비 상수를 유지하면 본 발명자들은 아민이 전환에 미치는 영향을 더 잘 파악한다. 렐락신의 경우에 이러한 데이터는 표 5에 제시된다.

[0099] 표 5

[0100] 렐락신의 PEG화에 대한 전환에 대한 아민의 선택의 효과

아민 첨가제	아민:PABH 비	총 당량	시간 (h)	전환 (%)
1-피리딘-2-일-에틸아민	0.33	120	28.1	91
m-페닐렌디아민	0.33	120	25.2	94
1-피리딘-2-일-에틸아민	0.33	120	22.6	91
p-페닐렌디아민	0.33	120	25.0	94
3,5-디아미노벤조산	0.33	120	23.5	93
2-(디메틸아미노)에틸히드라진	0.33	120	32.1	88

[0101]

[0102] 렐락신의 경우에, 아민 첨가제의 영향은 분명하지만, 관찰된 높은 전체 전환을 고려하면, 이러한 영향은 다시 낮다. FGF21의 경우에, 영향은 더 높다 (표 6).

[0103] 표 6

[0104] FGF21의 PEG화에 대한 전환에 대한 아민의 선택의 효과

아민 첨가제	아민:PABH 비	총 당량	시간 (h)	전환 (%)
m-페닐렌디아민	0.33	120	24.9	55
3,5-디아미노벤조산	0.33	120	23.2	58
에틸렌디아민	0.33	120	21.4	77
1-피리딘-2-일-에틸아민	0.33	120	22.2	58
2-(디메틸아미노)에틸히드라지드	0.33	120	22.8	70

[0105]

[0106] 이들 데이터로부터 전환이 PABH와 조합하여 사용된 아민의 아이덴티티에 고도로 의존한다는 것은 명백하다. 이들 조건이 반드시 PEG화 반응을 위한 최적 조건을 반영하지 않는다는 것을 인식하면서, 본 발명자들은 FGF21에 대한 상위 5개의 수행능 첨가제 조합의 목록에 도달하는 전환에 의해 분류하였다 (표 7).

[0107] 표 7

[0108] FGF21의 PEG화에 대한 상위 5개 수행능 첨가제 시스템

아민 첨가제	총 당량	아민:PABH 비	시간 (h)	전환 (%)
m-페닐렌디아민	120	3.00	20.9	75
3,5-디아미노벤조산	50	1.00	20.1	76
3,5-디아미노벤조산	120	3.00	19.7	77
에틸렌디아민	120	0.33	21.4	77
2-피콜릴아민	85	3.00	23.1	74

[0109]

[0110] 에틸렌디아민 및 3,5-디아미노벤조산은 스크리닝된 조건 하의 FGF21의 PEG화에 대한 2개의 상위 수행자였다. 3,5-디아미노벤조산은 비교적 값이 싸고 용이하게 이용가능한 결정질 고체이므로, 이는 아민:PABH 조합에 대한 우수한 첨가제인 것으로 간주되었다. 추가의 지지는 총 당량 대 아민:PABH 비의 상세한 분석으로부터 유래할 것이다. 모델 시스템에서 관찰된 바와 같이, 2종의 첨가제의 협동 효과는 상당히 복잡하다. 실제로, 모델 시스템에서 관찰된 곡률은 렐락신 및 FGF21의 PEG화에 대해 보다 현저하였다. FGF21에 대한 데이터 및 트렌드는 도 19에 제시된다. 아닐린 *o*- 및 *m*-페닐렌디아민은 FGF21의 PEG화에 사용될 때 우수한 첨가제였다. 흥미롭게도, 남아있는 단백질의 최종 농도 대 총 당량 및 아민:PABH 비의 플롯은 완전히 상이한 결과를 제공하였다. 이들 2종의 첨가제 사이의 유일한 구조적 차이는 아미노 기의 배향이다.

[0111] z-축은 반응 혼합물 중 FGF21의 최종 농도이므로, 이상적 조건은 플롯에서의 가장 낮은 z-축 값을 가질 것이다. 시약 충전에서의 사소한 차이를 가능하게 할 수 있는 강건한 방법의 경우에, 편평 플롯 또는 밸리 또는 웰을 갖는 플롯이 이상적이다. 이러한 전제를 충족하는 1종의 첨가제는 3,5-디아미노벤조산이다 (도 20).

[0112] 렐락신의 PEG화에 사용될 때, 3,5-디아미노벤조산은 또한 합리적인 반응 시간에서 높은 전환을 생성하였다. 도 20 (좌측 및 우측)의 비교는 증가된 전환이 또한 단백질의 아이덴티티에도 관련된다는 것을 입증한다.

[0113] 실시예 5

[0114] 단순 암모늄 염의 사용

[0115] pH 4에서의 아민 첨가제의 유익한 효과를 고려하여, 본 발명자들은 단순 암모늄 염이 또한 렐락신의 PEG화를 개선시킬 수 있었다는 것을 추산하였다. 이러한 목표를 위해, 다양한 양의 PABH 및 NH_4OAc 또는 NH_4Cl로 실험의

시리즈를 수행하여 10시간에서 지금까지 관찰된 가장 우수한 전환을 수득하는 60 당량 PABH 및 120 당량 NH_4Cl의 조합의 우월성을 밝혀내었다 (97%, 표 8). 흥미롭게도, NH_4Cl의 존재 하의 모델 디펩티드의 반응의 재-실험은 NH_4Cl 없이 관찰된 프로파일과 동일한 프로파일을 제공하였고, 이는 NH_4Cl의 효과가 렐락신의 구조에서의 변화와 연관될 수 있다는 것을 시사한다. 실제로, 알려진 카오트로픽 시약 예컨대 우레아 또는 $(NH_4)_2SO_4$의 첨가는 필적할만한 결과를 제공하였다 (도 21). NH_4Cl의 긍정적인 효과는 일반적인 듯 하고 히드라지드 첨가제 없이 또는 아세틸 히드라지드의 존재 하에 렐락신의 PEG화에서 다시 나타난다 (도 22).

[0116] 표 8

[0117] 첨가제 양 및 단순 암모늄 염의 스크리닝에 대한 전환

[0118]

반응	첨가제	염	전환(10 h)
1	30 당량 pNHPh히드라지드	60 당량 NH_4OAc	90 %
2	30 당량 pNHPh히드라지드	120 당량 NH_4OAc	94 % (x3)
3	60 당량 pNHPh히드라지드	60 당량 NH_4OAc	95 %
4	60 당량 pNHPh히드라지드	120 당량 NH_4OAc	92 %
5	60 당량 pNHPh히드라지드	120 당량 NH_4Cl	97 %
6	30 당량 pNHPh히드라지드	60 당량 NH_4Cl	95 %

[0119] NH_4Cl 효과의 기원의 더 나은 이해를 추구하는 분광학적 연구는 염이 용액 중 렐락신의 입체형태를 변형시킨다는 것을 시사하였다. UV 분광학적 분석은 120 당량 NH_4Cl의 첨가 시 방향족 잔기의 흡광도 (260-290 nm)에서 변이를 검출할 수 없었지만 (도 23), IR 분광분석법은 아미드 II 밴드 H-결합 상의 구조적 변형의 존재를 나타낸다 (도 24). 아마, 방향족 잔기 상의 변화를 검출하기 위한 UV 분석의 실패는, 잔기를 용매에 크게 노출시키는, 렐락신에서의 아미노산 Tyr(Y), Phe(F), 및 Trp(W)의 원위 위치로 트레이싱되고 임의의 유의한 분자내 상호작용이 결여될 수 있다.

[0120] 렐락신의 구조 상의 미묘한 변형은 NH_4Cl의 첨가 시 더 높은 백분율의 무작위 코일로 진행중인 단백질 폴딩과 일치하는 ^{15}N NMR HSQC 분광학적 연구 (도 25) 및 아마도 이량체화 계면 변화로 인한 렐락신의 3차 구조의 핑거프린트 영역에서의 작은 차이를 제시하였던 근 UV CD 조사 (도 26)에 대한 추가의 지지를 발견하였다.

[0121] 실시예 6

[0122] 전형적인 절차 및 결과

[0123] 이러한 메모랜덤에 보고된 연구를 기반으로, PABH 및 NH_4Cl의 조합이 보다 대규모에서의 사용에 대해 권고되었다. 다양한 단백질 시스템으로부터의 결과는 하기 표에 주어진다.

[0124] 표 9

[0125]

단백질 / PEG-OA	조건[1]	전환 (%)
렐락신 / 20 kDa PEG-OA	30 당량 PABH, 120 당량 NH_4Cl, 20 ℃	94
렐락신 / dPEG36-OA	30 당량 PABH, 30 ℃	90
FGF21 G1 / 30 kDa PEG-OA	30 당량 PABH, 120 당량 NH_4Cl, 20 ℃	88
FGF21 G2 / 30 kDa PEG-OA	30 당량 PABH, 120 당량 NH_4Cl, 20 ℃	98

[0126] [1]조건: 달리 나타내지 않는 한, 1.2 당량 PEG-OA 시약, 20℃. 전환은 18-24시간의 반응 시간 후에 HPLC 검정에 의해 결정되었음.

[0127] PEG화 반응에서 PABH를 사용할 때의 하나의 고려사항은 상업적으로 입수가능한 시약의 순도가 공급업체 간에 동일하지 않다는 것이다. 대규모에서의 98% PABH의 사용은 크로마토그래피 동안 목적하는 생성물로 공동-용리하는 불순물 피크를 유발하였다. 이들 불순물의 단리는 그의 구조를 PABH에 존재하는 히드라지드 및 아미드 불순

물인 것으로 확증하였다 (도 27).

[0128] 반응에 사용된 높은 당량으로 인해, 이러한 시약 중 심지어 낮은 수준 불순물도 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 이용가능한 가장 높은 품질 PABH를 추구하도록 권고된다.

[0129] 실시예 7

[0130] 전형적인 스크리닝 절차

[0131] 첨가제의 사용은 작동적으로 단순하다. FGF21 G1의 30 kDa PEG-OA로의 PEG화는 대표적인 예로서 제공된다.

[0132] 표 10

[0133] 시약 및 그의 농도

항목	양 (mg)	Vol(mL)	MW	μmol
FGF21 용액	20.3	1.0	19585	1.04
PABH	4.7		151.17	31.2
NH_4Cl	6.7		53.49	125
30 kDa PEG-OA	39.0		31000	1.26

[0134]

[0135] 절차

[0136] pH 4를 갖는, 20 mM NaOAc, 6M 우레아 중 FGF21 (1.0 mL, 20.3 mg/mL, 1.04 μmol)의 용액을 깨끗한 1.5 mL 바이알에서 고체 NH_4Cl (6.7 mg, 124.8 μmol)에 첨가하였다. 혼합물을 모든 고체가 용해될 때까지 완만하게 교반하였다. 별개의 바이알에서, MPEG 30 kDa (39.0 mg, 1.26 μmol) 및 PABH (4.7 mg, 31.2 μmol)를 조합하였다. 제1 바이알로부터의 단백질 용액을 PEG화 시약 및 PABH를 함유하는 제2 바이알로 옮기고, 혼합물을, 고체가 용해될 때까지 (약 20분) 완만하게 교반하였다. pH를 측정하고, 필요한 경우에 혼합물을 0.1M HCl을 사용하여 pH 4로 조정하였다.

[0137] 전형적인 반응 혼합물은 균질 용액이고, 따라서 반응 용액을 교반 없이 20-25℃에서 유지하였다. 반응 진행을 280 nm에서의 ELS 또는 UV 검출을 사용하여 HPLC에 의해 모니터링한다. 반응 완료를 외부 표준 대비 HPLC 분석에 의해 평가한다.

[0138] 실시예 8

[0139] PEG화 조건의 비교

[0140] 본 계획의 최종 목표는 프로젝트의 출발의 시간에 가동 중인 절차, 뿐만 아니라 문헌에서의 "최신 기술" 조건 대비 이러한 새로운 PEG화 절차의 유용성을 입증하는 것이었다. 이는 주로 권고된 첨가제 조합의 사용에 의해 이용가능한 값비싼 PEG화 시약의 절감을 정량화하는 것이다. 표 11은 렐락신 및 FGF21 G1 PEG화 뿐만 아니라 PABH 첨가제에 의해 매개된 PEG화에 대한 원래 조건을 포함한다.

[0141] 표 11

[0142] 잠재적인 비용 절감에 역점을 둔 PEG화 조건의 비교

단백질	PEG	PEG (당량)	T (℃)	PABH (당량)	NH_4Cl (당량)	전환 (%)	주석
렐락신	20 kDa PEG-OA	1.5	50	N/A	N/A	96	원래 조건.
렐락신	20 kDa PEG-OA	1.2	20	30	120	94	유사한 수율로 PEG에서 20% 감소.
FGF21 G1	30 kDa PEG-OA	2.5	20	N/A	N/A	75	원래 조건.
FGF21 G1	30 kDa PEG-OA	1.2	20	30	120	88	PEG에서 58% 감소 플러스 수율에서 13% 증가.

[0143]

[0144] 렐락신 화합물에 대한 비용의 잠재적인 감소는, 양쪽 방법의 전환 및 수율이 필적할만하므로, 사용된 PEG 20 kDa 시약의 양과 순수하게 관련된다. 그러나, 1 세대 FGF21 에셋의 PEG화의 경우에, 절감은 상당히 극적이다. 반응 수율에서의 13% 증가와 조합된 PEG 로딩에서의 50% 초과의 감소는 그의 생산과 연관된 비용에서의 전체 70% 감소를 유발한다. PABH와 NH_4Cl의 비용은 둘 다 PEG화 시약에 비해 극도로 낮기 때문에, 그의 사용은 생산의 전체 비용에 최소한으로 기여한다. 하기 표에서 본 발명자들은 PABH 조건을 아세틸 히드라지드를 사용하는 조건과 비교한다.

[0145] 표 12

[0146] 다양한 단백질 시스템의 PEG화 및 아세틸 히드라지드와의 비교의 결과의 개요

단백질	조건[1]	전환 (%)
렐락신 G1	[2]첨가제 없음, 50 ℃	97
	[2]첨가제 없음, 20 ℃	75
	[2]30 당량 $AcNHNH_2$, 공동-첨가제 없음, 20 ℃	90
	30 당량 PABH, 공동-첨가제 없음, 20 ℃	86
	30 당량 PABH, 120 당량 NH_4Cl, 20 ℃	94
렐락신 G2	첨가제 없음, 40 ℃	70
	첨가제 없음, 30 ℃	70
	30 당량 $AcNHNH_2$, 공동-첨가제 없음, 30 ℃	80
	30 당량 PABH, 공동-첨가제 없음, 30 ℃	95
	30 당량 PABH, NH_4Cl, 30 ℃	90
FGF21 G1	첨가제 없음, 20 ℃	53
	30 당량 $AcNHNH_2$, 공동-첨가제 없음, 20 ℃	80
	30 당량 $AcNHNH_2$, 120 당량 NH_4Cl	82
	30 당량 PABH, 120 당량 NH_4Cl, 20 ℃	88
FGF21 G2	30 당량 PABH, 120 당량 NH_4Cl, 20 ℃	98

[0147]

[0148] [1]모든 반응은 20℃에서 비교반된 1.2 당량의 PEG화 시약을 사용하여 실행되었음.

[0149] [2]반응은 1.5 당량 PEG화 시약을 사용하여 실행되었음.

[0150] 본 개시내용에서의 첨가제 시스템의 이점의 일부는 하기 열거된다:

[0151] 1) 극도로 값비싼, PEG화 시약의 상당히 더 낮은 양 (1.5-2.5 당량에 비해 1.2 당량)으로 더 높은 전환의 촉진. 하기 표는 기존 방법 (표준 조건)에 비해 개선을 강조하는 비교를 제공한다.

분자	표준 조건	전환	첨가제 존재 하의 조건	첨가제 존재 하의 전환
렐락신	1.5 당량 PEG 50 ℃, 48 h	96 %	1.2 당량 PEG 60 당량 *p*-$NHBzNHNH_2$ 120 당량 NH_4Cl 20 ℃, 10 h	96 %
FGF21	2.5 당량 PEG 우레아 6M 20 ℃, 24 h	75 %	1.2 당량 PEG 30 당량 *p*-$NHBzNHNH_2$ 120 당량 NH_4Cl 20 ℃, 24 h	82 %
FGF21-GEN2	1.6 당량 PEG 30 당량 $AcNHNH_2$ 20 ℃, 24 h	88 %	1.2 당량 PEG 60 당량 *p*-$NHBzNHNH_2$ 120 당량 NH_4Cl 20 ℃, 24 h	89 %

[0152]

[0153] 2종의 첨가제의 조합은 반응 속도 및 전환을 대단히 증가시키고, 원래 조건 대비 PEG 로딩의 극적인 감소를 가능하게 한다.

[0154] 2) 높은 반응 온도에 대한 필요를 회피하는 더 빠른 반응의 촉진. 고온을 피하는 것은 반응에서 단백질 구조적

변형 및 안정성에 관한 연관된 우려를 저하시킨다.

[0155] 3) PABH (예비 연구에서 Ames 음성)에 의한 아세틸히드라지드 (Ames 양성)의 치환. 최종 생성물에서의 유전자 독성 물질 및 연관된 대조군의 사용을 제거한다.

[0156] 제약 조성물

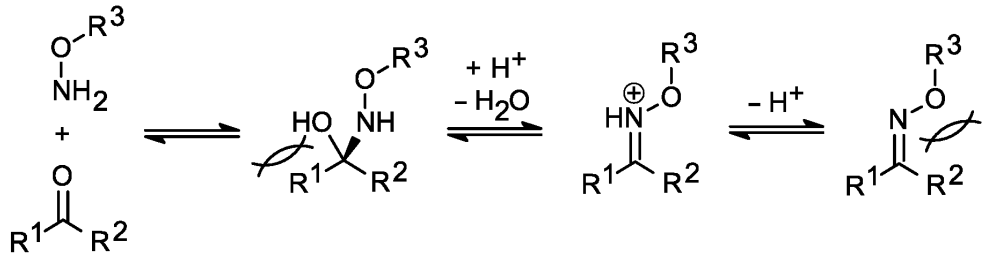
[0157] 본 개시내용에 따라 제조된 PEG화된 단백질은 관련 기술분야에 알려진 방법에 의해 추가적인 제약상 허용되는 담체 또는 비히클과의 혼합물 또는 조합에 의해 주사하기에 적합하도록 추가로 만들어질 수 있다. 본 발명의 생성물을 제제화하기 위한 제약상 허용되는 담체 중에는 염수, 인간 혈청 알부민, 인간 혈장 단백질 등이 있다. 본 발명은 또한 상기 기재된 바와 같은 접합체 및 제약상 허용되는 부형제 및/또는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 이러한 제약상 허용되는 담체는 수성 또는 비-수성 용액, 현탁액, 및 에멀젼일 수 있다. 비-수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일 예컨대 올리브 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르 예컨대 에틸 올레에이트이다. 수성 담체는 염수 및 완충 매질을 포함한, 물, 알콜성/수성 용액, 에멀젼 또는 현탁액을 포함한다. 비경구 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 덱스트로스, 덱스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화 링거 또는 고정 오일을 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양 보충제, 전해질 보충제 예컨대 링거 덱스트로스를 기반으로 한 것들 등을 포함한다. 보존제 및 다른 첨가제, 예컨대, 예를 들어, 항미생물제, 항산화제, 킬레이트화제, 불활성 기체 등이 또한 존재할 수 있다. 본 개시내용에 따라 제조된 단백질 접합체는 관련 기술분야에 알려진 방법에 의해 제약상 허용되는 담체 또는 비히클과 함께 주사하기에 적합한 제약 조성물로 제제화될 수 있다. 예를 들어, WO 97/09996, WO 97/40850, WO 98/58660, 및 WO 99/07401 (이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨) 참조.

[0158] 본 개시내용은 상기 개시내용으로 제한되지 않고 이는 그의 본질적인 속성으로부터 벗어나지 않으면서 다른 구체적 형태로 구현될 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 따라서, 본 개시내용은 모든 측면에서 제한적인 것이 아니라 예시적인 것으로 고려되며, 상기 개시내용보다는 오히려 첨부된 청구범위를 참조하고, 따라서 청구범위의 등가의 의미 및 범위 내에 있는 모든 변화는 그 안에 포괄되는 것으로 의도되는 것이 바람직하다.

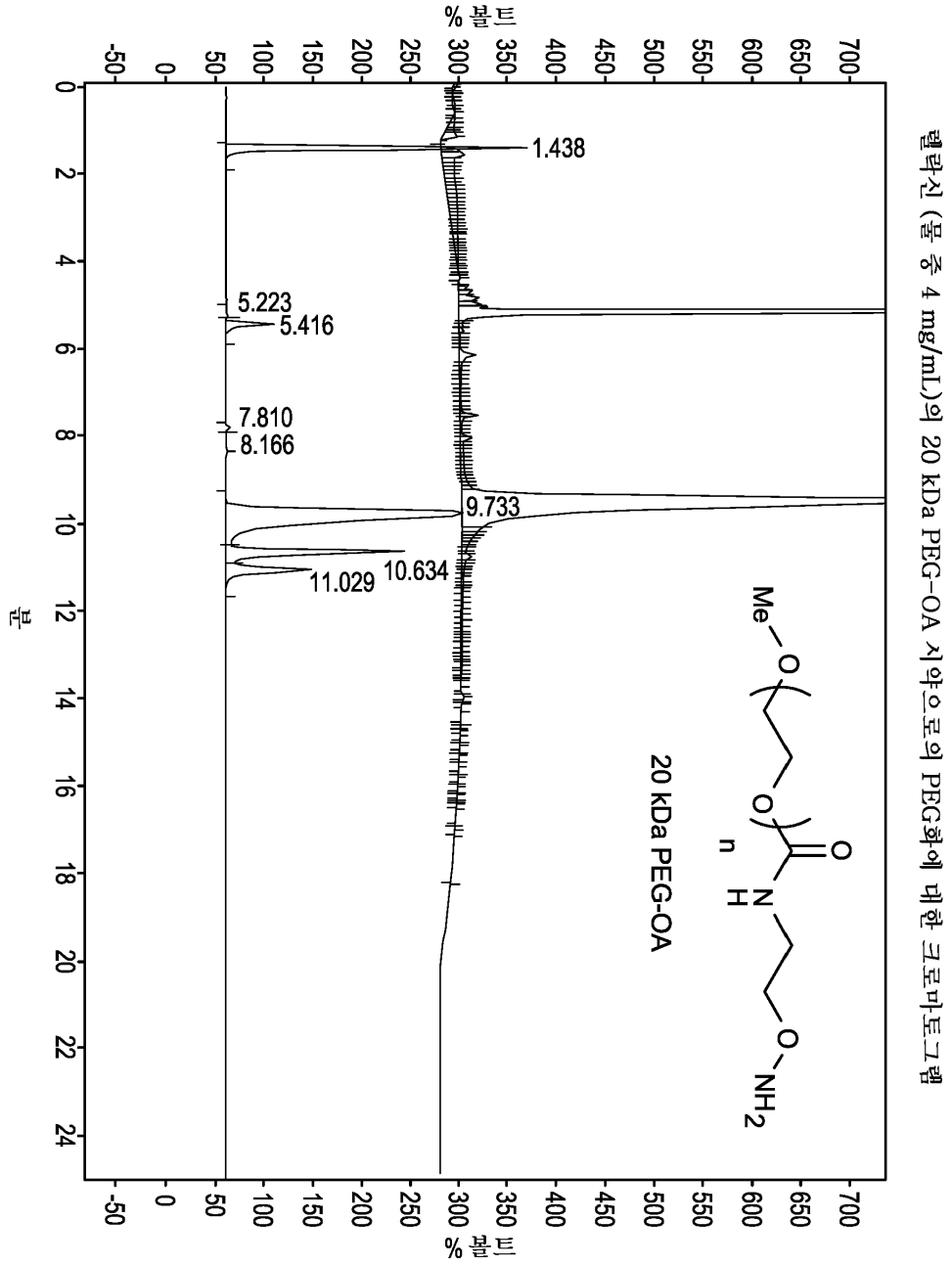
도면

도면1

케톡심의 형성에 대한 일반적인 메카니즘

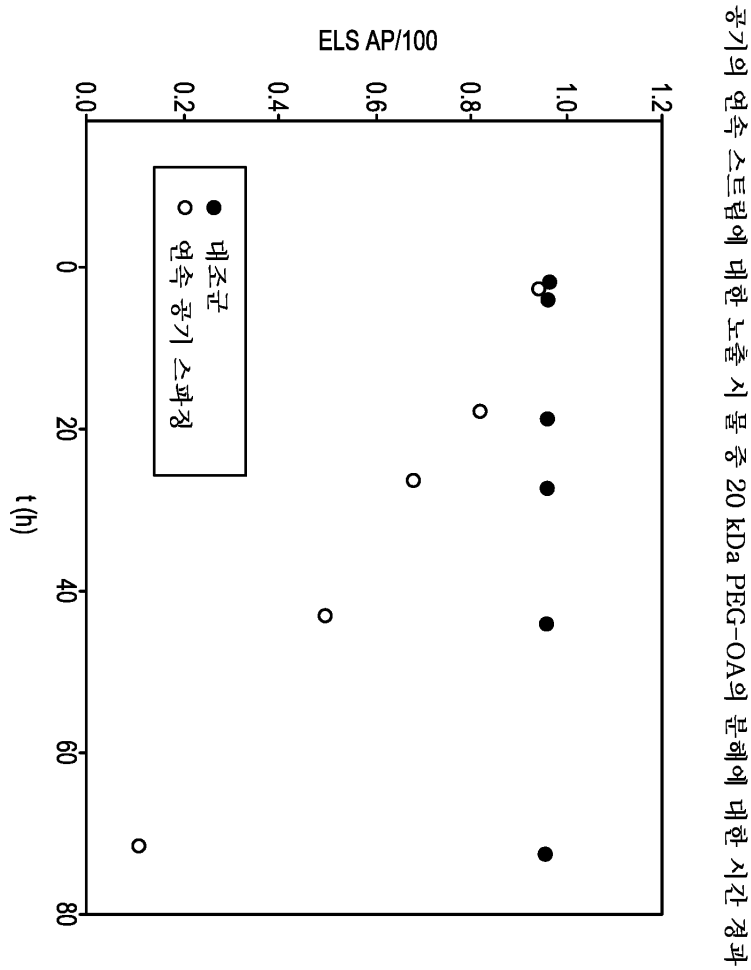


도면2



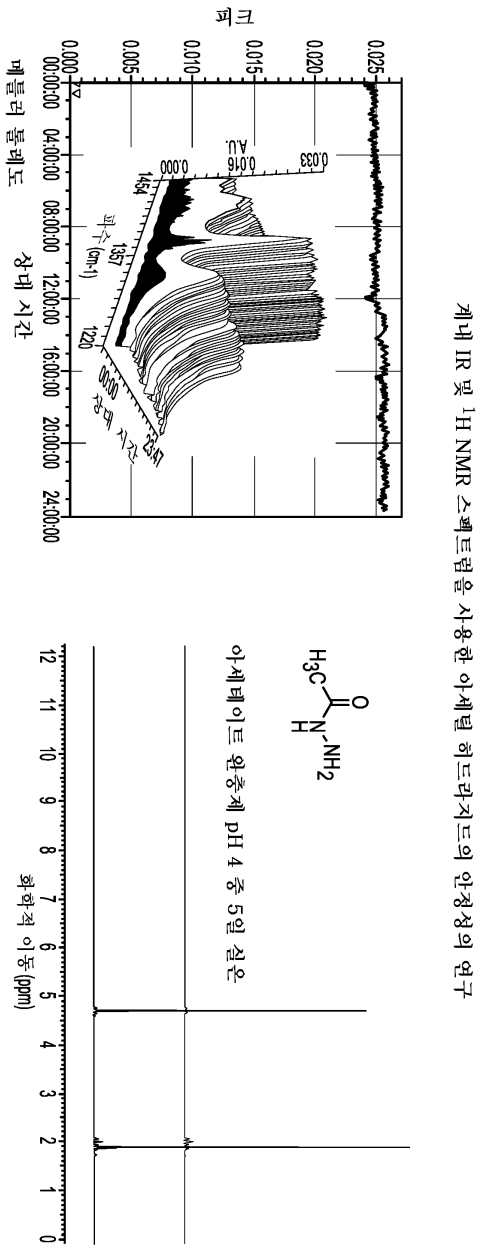
렐락신 (물 중 4 mg/mL)의 20 kDa PEG-OA 시약으로의 PEG화에 대한 크로마토그램

도면3



공기의 연속 스트림에 대한 노출 시 물 중 20 kDa PEG-OA의 분해에 대한 시간 경과

도면4



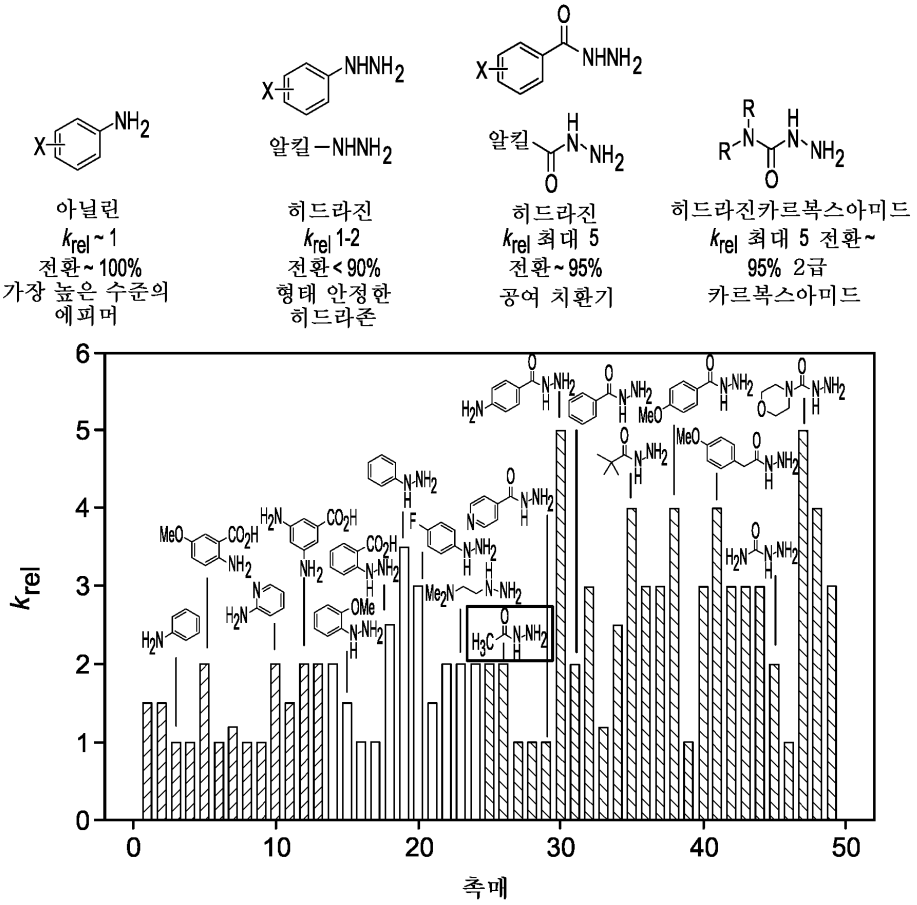
캐내 IR 및 ^{1}H NMR 스펙트럼을 사용한 아세틸 히드라지드의 안정성의 연구

도면5

첨가제의 스크리닝에 대한 모델 반응. 반응 조건: 실온 (23℃)에서 1.0 mL 아세테이트 완충제 (20 mM, pH 4.0) 중 1 (3.6 mmol) 및 2 (3.6 mmol).

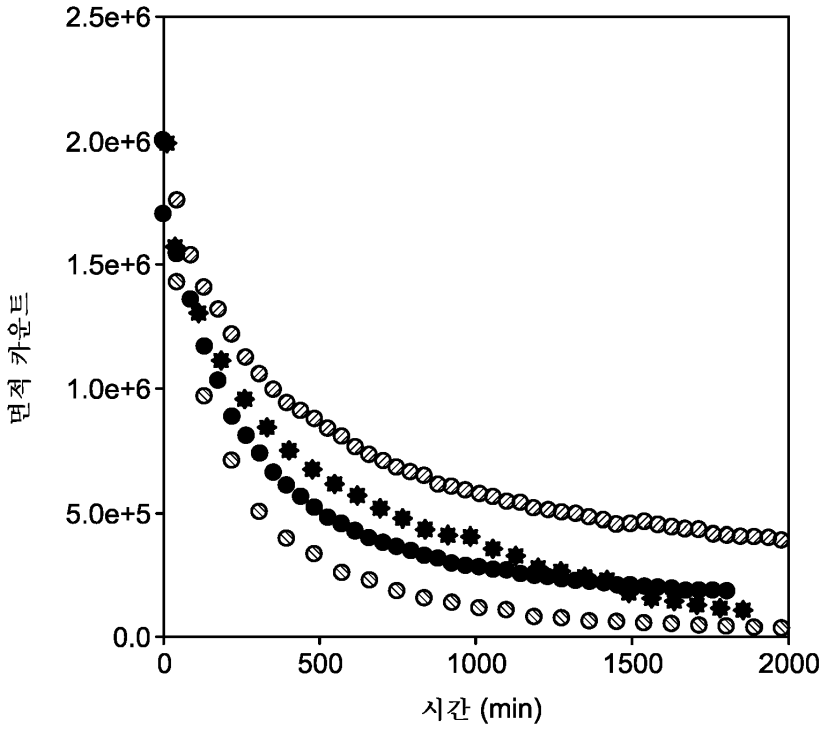
도면6

상이한 첨가제에 대해 관찰된 상대 속도 (k_{rel}). 아세틸 히드라지드 (k_{rel}≈2)는 박스에 제시된다.

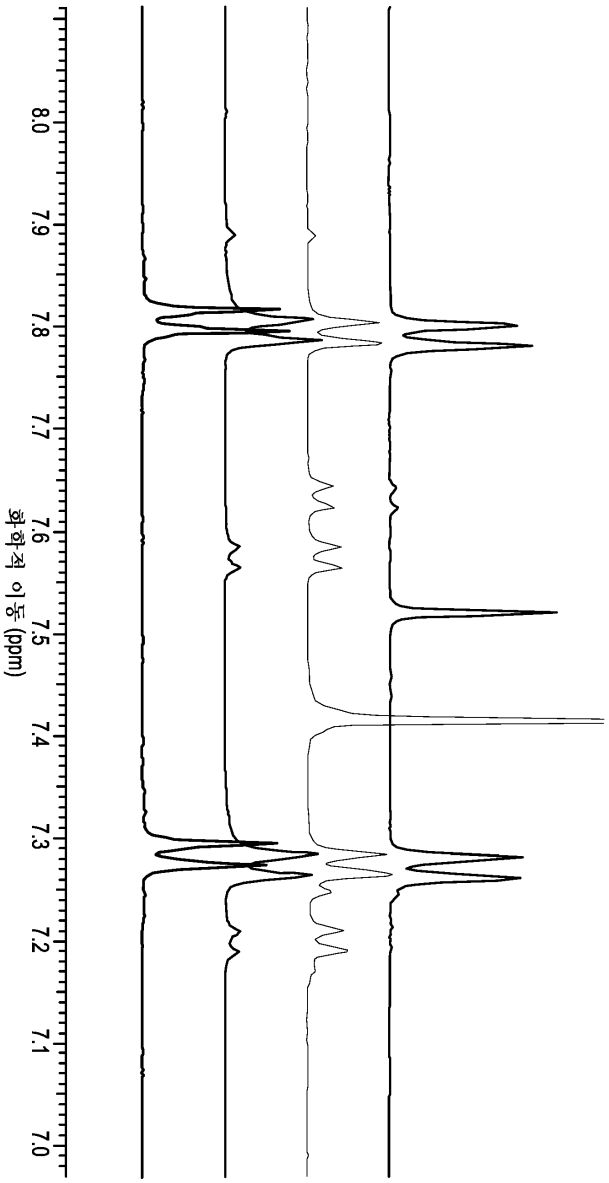


도면7

(a) 1 당량 피라졸아민 (적색); (b) 1 당량 MCH (청색); (c) 1 당량 피라졸아민 및 1 당량 MCH (녹색)의 존재 하의 디펩티드 1과 O-벤질히드록실아민 (2)의 반응에 대한 시간 경과. 첨가제의 부재 하에 수득된 반응 프로파일은 회색으로 제시된다.



도면8

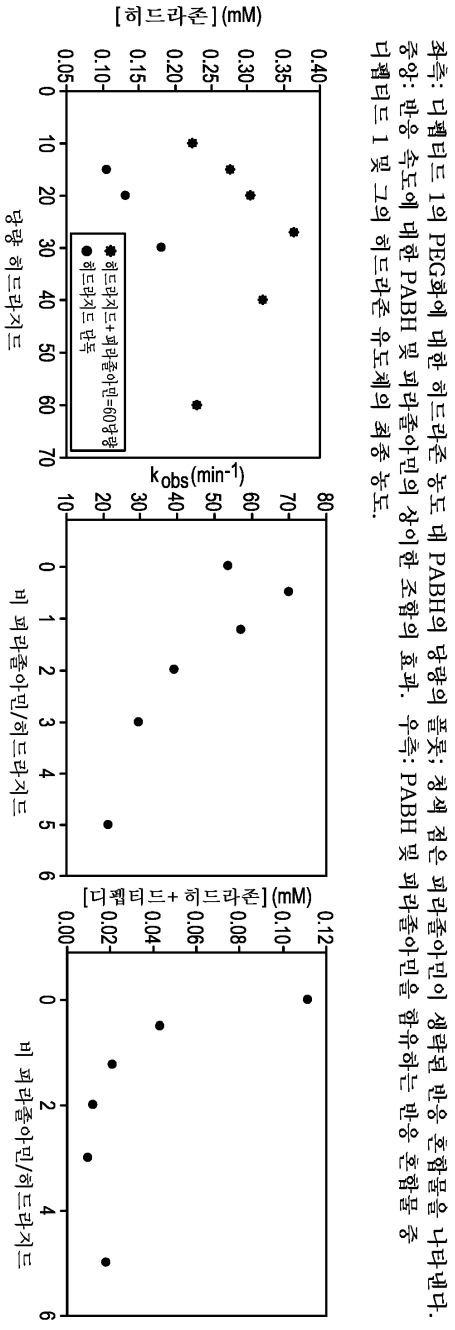


디웹티드 1 (a) (청색)와 (b) 1 당량 MCH (녹색); (c) 1 당량 MCH, 및 1 당량 피라졸아민 (회색); (d) 1 당량 피라졸아민 (적색)을 함유하는 샘플의 1H NMR 스펙트럼의 방향족 영역. MCH 및 피라졸아민 첨가제 사이의 상승작용적 효과는 단지 1종의 첨가제를 함유하는 샘플에 비해 더 높은 농도의 활성 중간체를 갖는 혼합물을 산출한다.

도면9

좌측: 디펩티드 1의 30 당량 PABH 및 1.2 당량 20 kDa PEG-OA로의 PEG화; 히드라존 중간체는 녹색 점으로서 추적된다.
우측: 디펩티드를 30 당량 PABH로 밤새 평형화시킨 후에 1.2 당량 PEG화 시약이 첨가된 PEG화 반응.

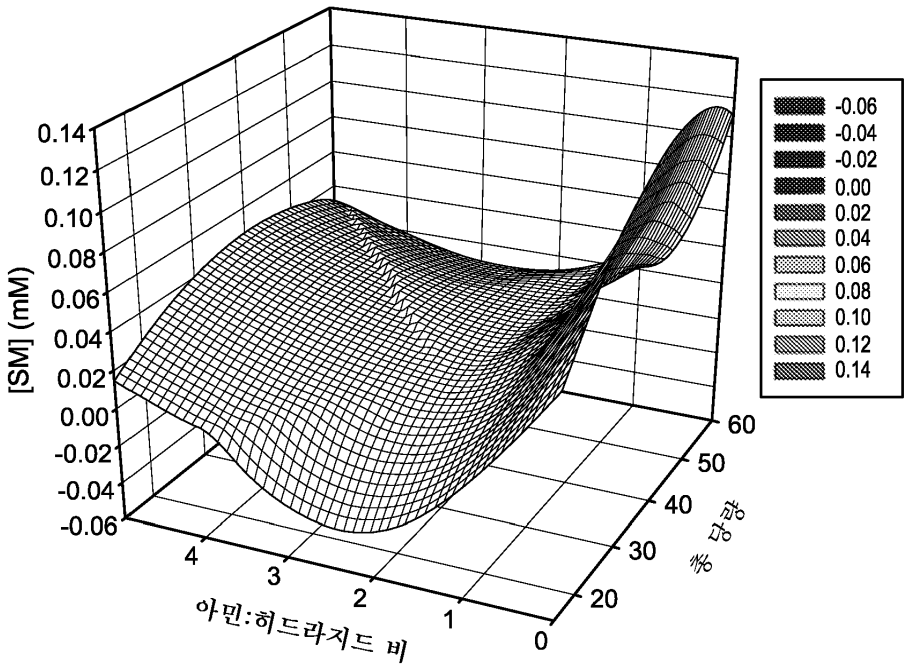
도면10



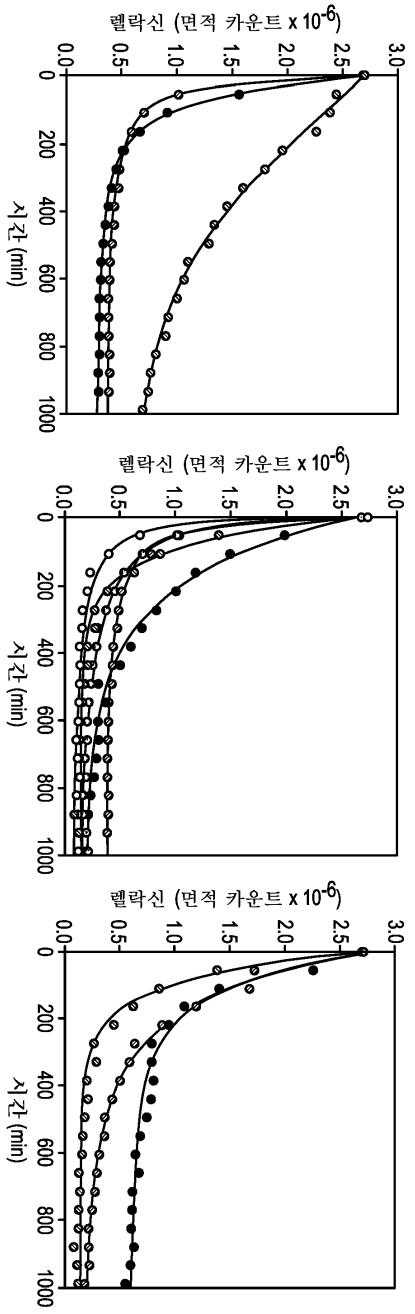
좌측: 디펩티드 1의 PEG화에 대한 히드라존 농도 대 PABH의 당량의 플롯; 청색 점은 피라졸아민이 생략된 반응 혼합물을 나타낸다. 중앙: 반응 속도에 대한 PABH 및 피라졸아민의 상이한 조합의 효과. 우측: PABH 및 피라졸아민을 함유하는 반응 혼합물 중 디펩티드 1 및 그의 히드라존 유도체의 최종 농도.

도면11

반응의 종료 시 남아있는 디펩티드 1 대 총 당량 첨가제 및 피라졸아민:PABH 비의 플롯.



도면12

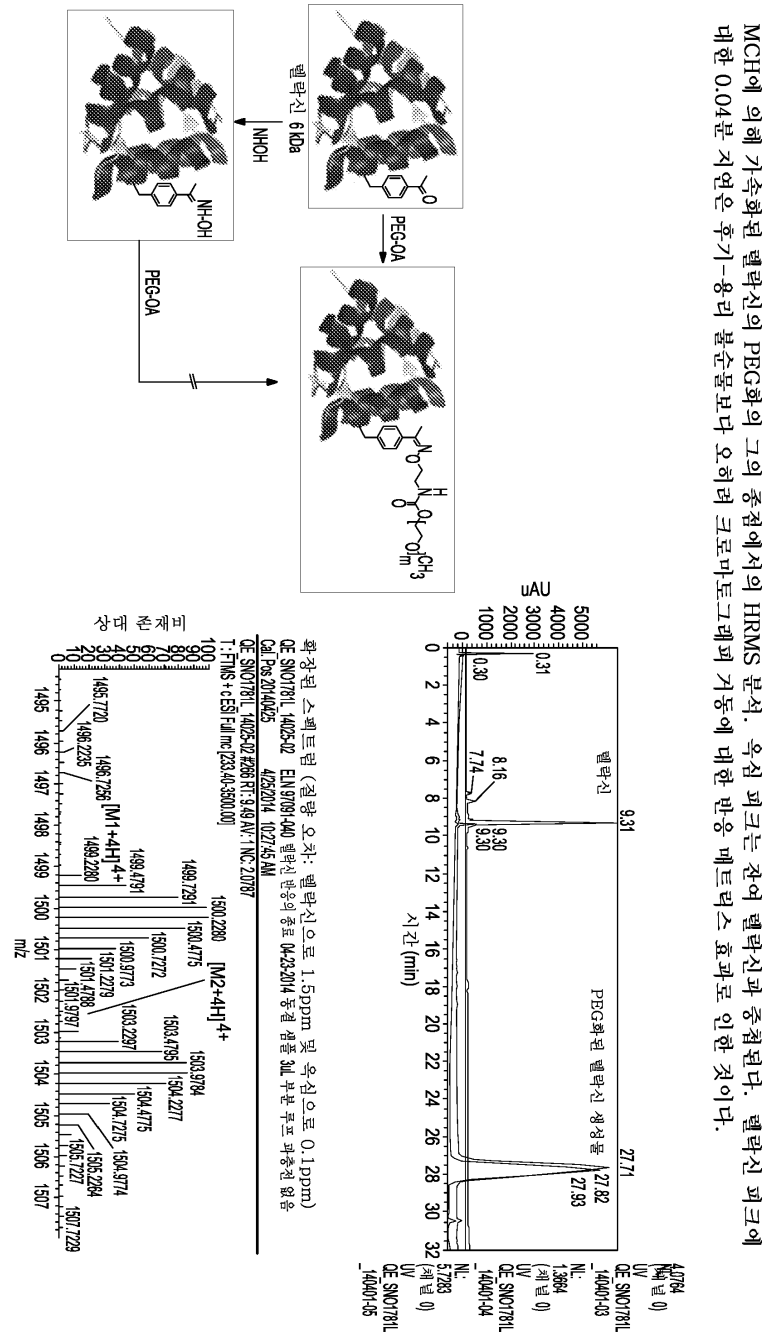


좌측: (a) 30 당량 아세틸 히드라지드 (청색); (b) 30 당량 MCH (적색)의 존재 하의 렐락신과 20 kDa PEG-OA (1.5 당량)의 반응에 대한 시간 경과; 칡가체의 부재 하에 수득된 반응 프로파일은 회색으로 제시된다. 중앙: (a) 30 당량 피라졸아민 (청색); (b) 30 당량 MCH (적색); (c) 10 당량 MCH (자주색); (d) 30 당량 피라졸아민 및 10 당량 MCH (녹색); (e) 30 당량 MCH 및 30 당량 피라졸아민의 존재 하의 렐락신과 PEG-OA (1.5 당량)의 반응에 대한 시간 경과. 우측: (a) 40℃; (b) 10℃; (c) 25℃에서 30 당량 피라졸아민 및 10 당량 MCH의 존재 하의 렐락신과 PEG-OA (1.5 당량)의 반응에 대한 시간 경과.

도면13

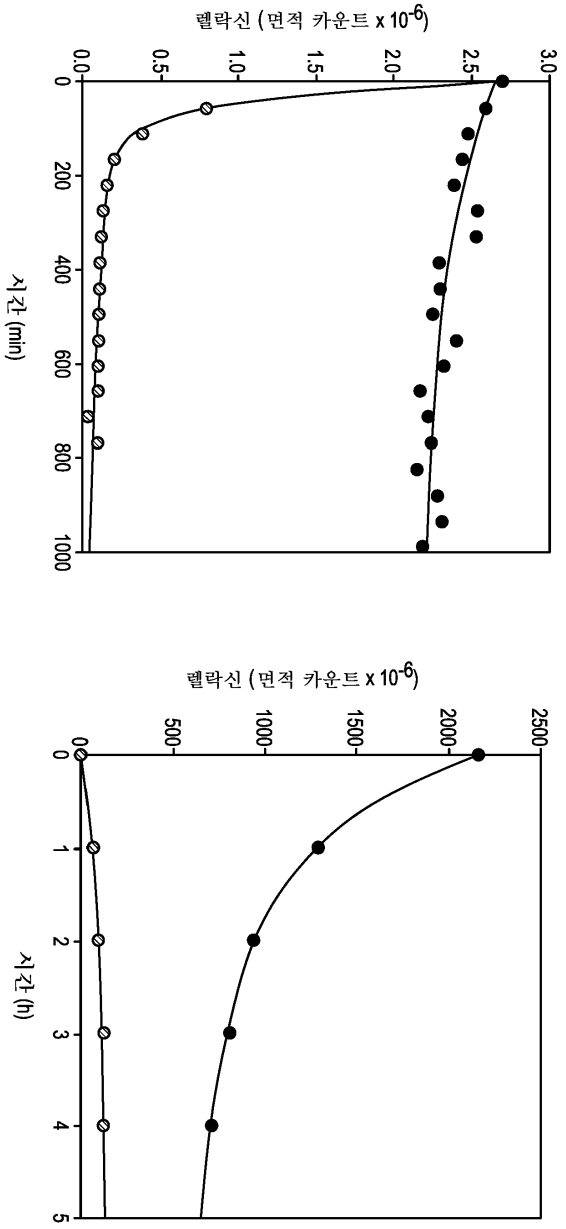
좌측: (a) 30 당량 MPCH 및 30 당량 피라졸아민 (녹색); (b) 30 당량 PH 및 30 당량 피라졸아민 (청색); 및 (c) 우레아 6M 중 30 당량 MCH 및 30 당량 피라졸아민 (적색)의 존재 하의 렐락신과 20 kDa PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과.
우측: (a) 30 당량 PH 및 60 당량 피라졸아민 (청색); (b) 30 당량 아세틸 히드라지드 및 60 당량 피라졸아민 (녹색); 및 (c) 30 당량 PABH 및 60 당량 피라졸아민 (적색)의 존재 하의 렐락신과 PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과.

도면14



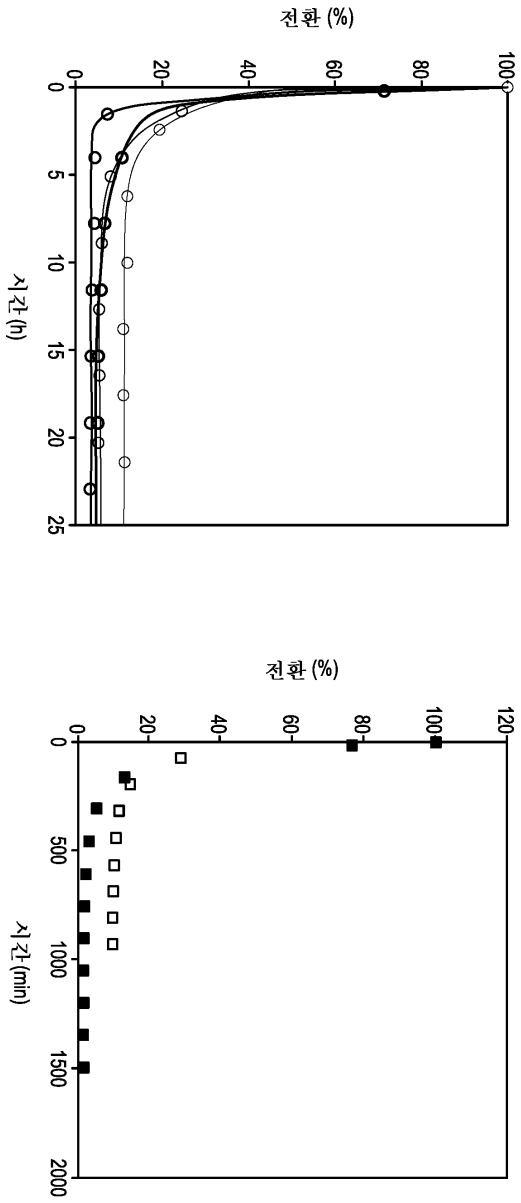
MCH에 의해 가속화된 렐락신의 PEG화의 그의 증점에서의 HRMS 분석. 옥심 피크는 잔여 렐락신과 증점된다. 렐락신 피크에 대한 0.04분 지연은 후기-용리 불순물보다 오히려 크로마토그래피 거동에 대한 반응 메트릭스 효과로 인한 것이다.

도면15



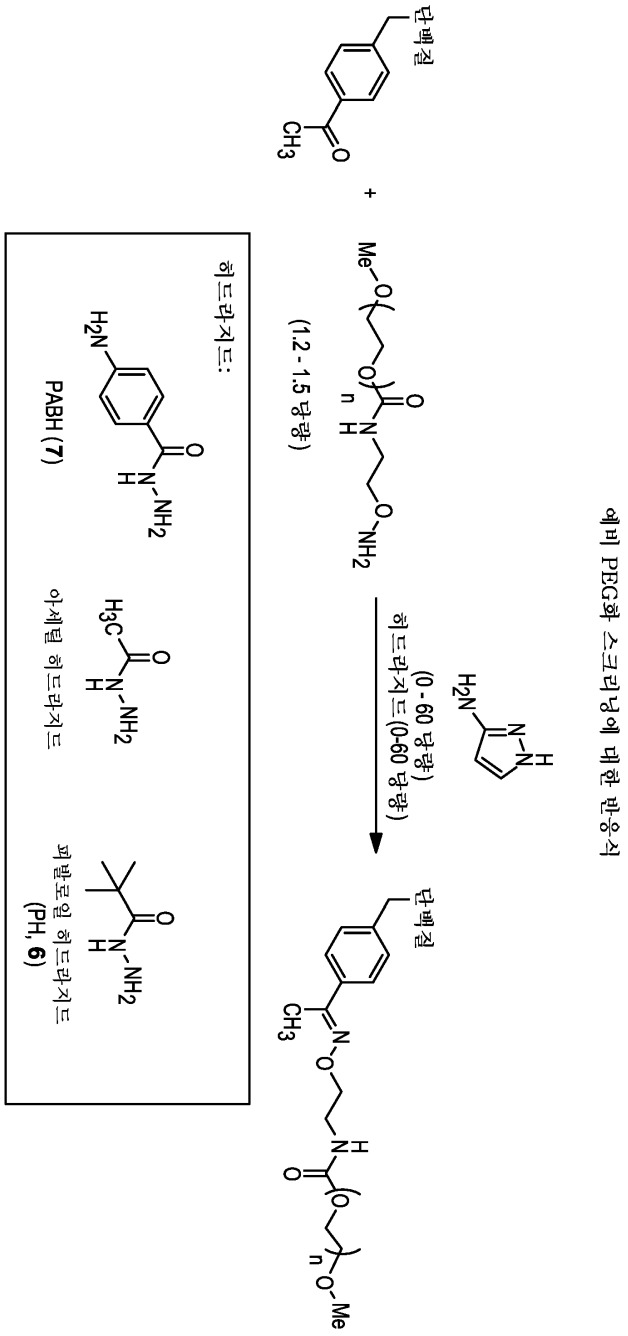
좌측: 우레아 6M과 (a) 30 당량 MCH 및 30 당량 피라졸아민 (적색); (b) 30 당량 MCH, 30 당량 피라졸아민, 및 30 당량 NH_2OH (청색)의 존재 하의 렐락신과 20 kDa PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과. 우측: 우레아 6M과 30 당량 MCH 및 30 당량 피라졸아민 (청색)의 존재 하의 렐락신과 PEG-OA (1.2 당량)의 감쇠에 대한 시간 경과; 옥심 피크 (적색)는 반응 동안 증대하며, 이는 PEG-OA 분해로부터의 히드록실아민의 병행 형성을 시사한다.

도면16

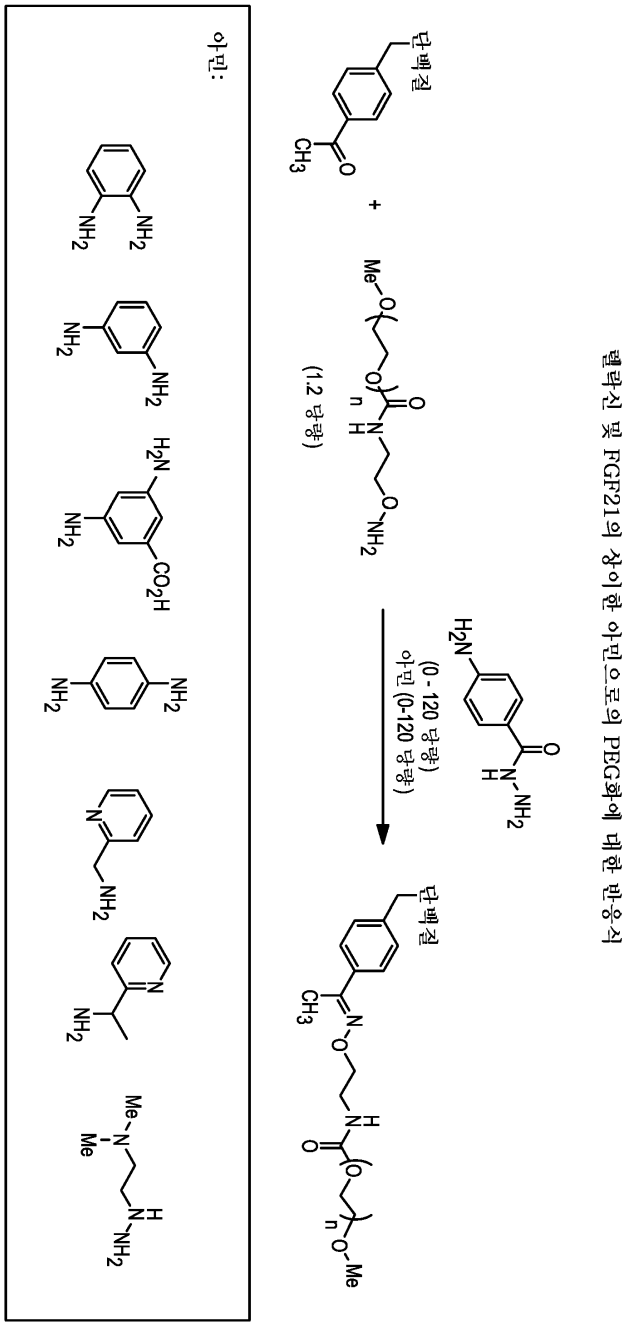


좌측: 30 당량 PABH 및 (a) 60 당량 에틸렌디아민; (b) 60 당량 3,5-디아미노벤조산 (녹색); (c) 60 당량 m-페닐렌디아민 (청색); 및 60 당량 피라졸아민 (적색)의 존재 하의 텔라신과 20 kDa PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과.
우측: (a) 30 당량 PABH 및 60 당량 3,5-디아미노벤조산 (녹색); 및 (b) 60 당량 PABH 및 120 당량 NH_4Cl (청색)의 존재 하의 텔라신과 PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과.

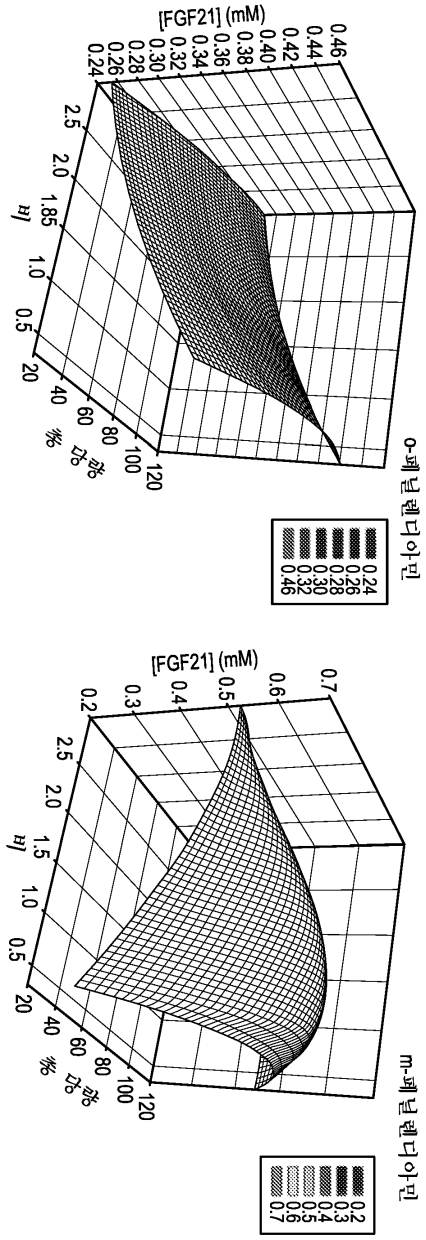
도면17


예비 PEG화 스크리닝에 대한 반응식
단백질
CH3
O
+
Me
O
n
N
H
O
NH2
(1.2 - 1.5 당량)
H2N
N
N
H
(0 - 60 당량)
히드라지드(0-60 당량)
단백질
CH3
N
O
N
H
O
O
n
Me
히드라지드:
H2N
O
N
H
NH2
PABH (7)
H3C
O
N
H
NH2
아세틸 히드라지드
O
N
H
NH2
피발로일 히드라지드
(PH, 6)

도면18

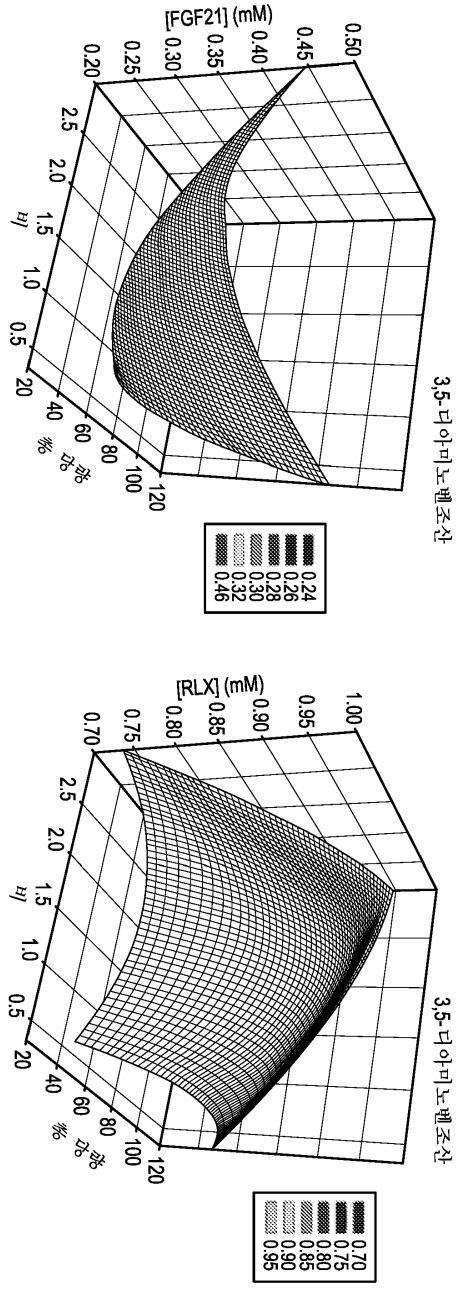

펙틴산 및 FGF21의 상이한 아민으로의 PEG화에 대한 반응식
단백질
(1.2 당량)
(0 - 120 당량)
아민 (0-120 당량)
아민:

도면19



총 당량 대 아민:PABH 비 대 최종 FGF21 농도의 플롯의 곡률을 예시하는 o- 및 m-페닐렌디아민에 대한 PEG화 결과. 좌측: o-페닐렌디아민. 우측: m-페닐렌디아민.

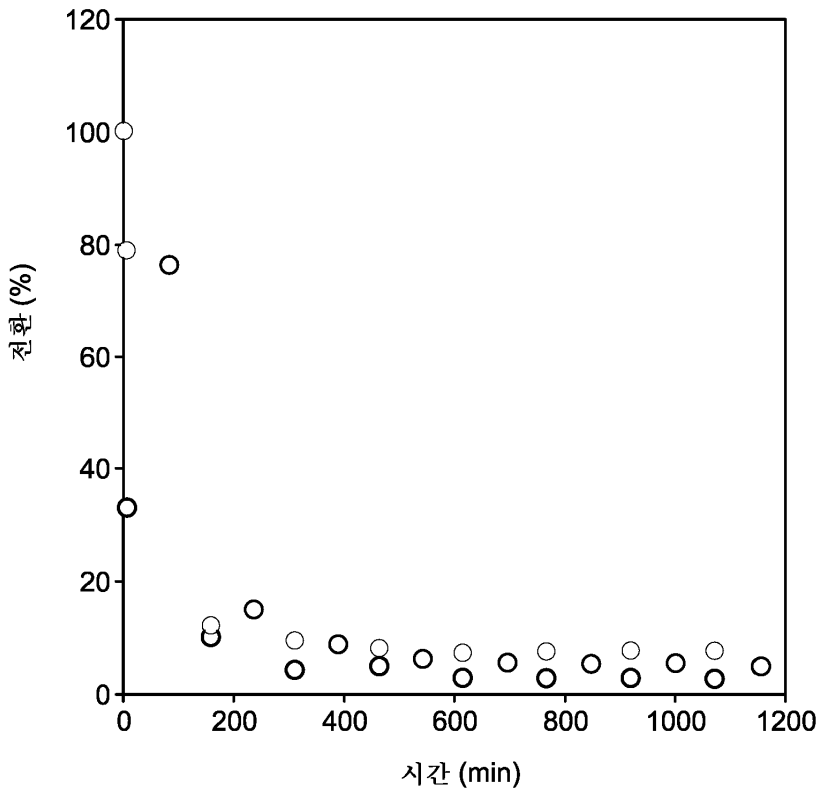
도면20



PABH 및 3,5-디아미노벤조산을 사용한 PEG화에 대한 총 첨가제 당량 대 아민:PABH 비 및 전환의 플롯. 좌측: FGF21과 30 kDa PEG-OA. 우측: 렐락신과 20 kDa PEG-OA.

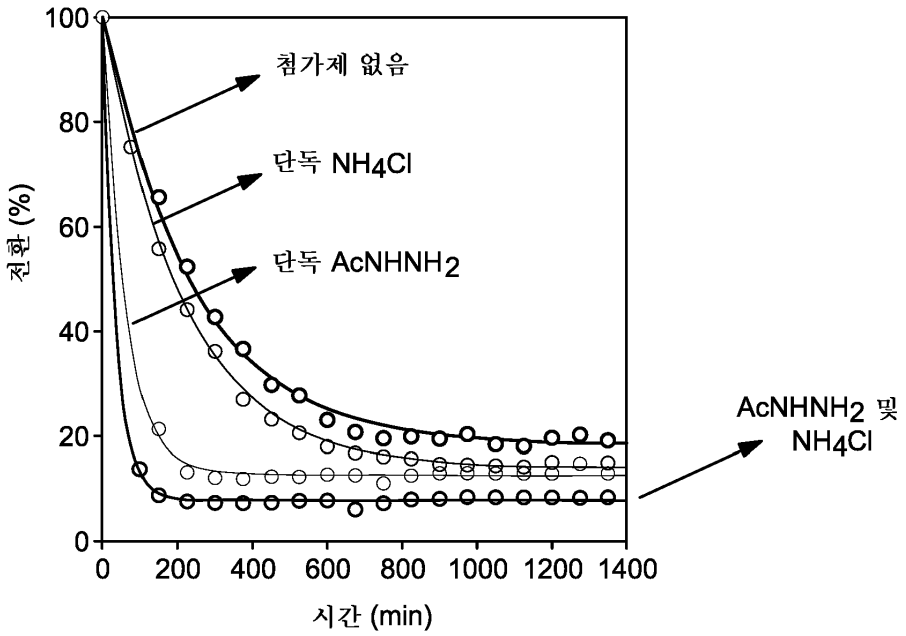
도면21

좌측: (a) 우레아 6 M (녹색); (b) NH_4Cl (회색); 및 (c) $(NH_4)_2SO_4$를 사용한 120 당량 염 및 60 당량 PABH 촉매의 존재 하의 렐락신과 20 kDa PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과.



도면22

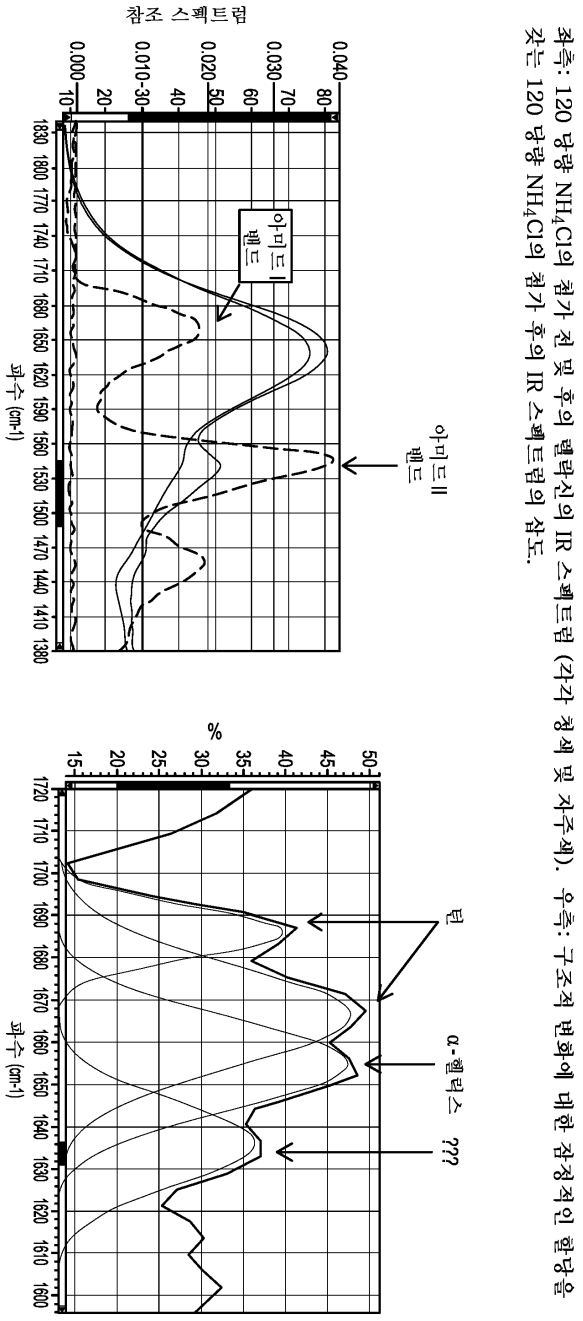
첨가제의 부재 (청색) 및 (a) 120 당량 NH_4Cl (적색), (b) 60 당량 아세틸 히드라지드 (회색), 및 (c) 60 당량 아세틸 히드라지드 및 120 당량 NH_4Cl (녹색)의 존재 하의 렐락신과 20 kDa PEG-OA (1.2 당량)의 반응에 대한 시간 경과.



도면23

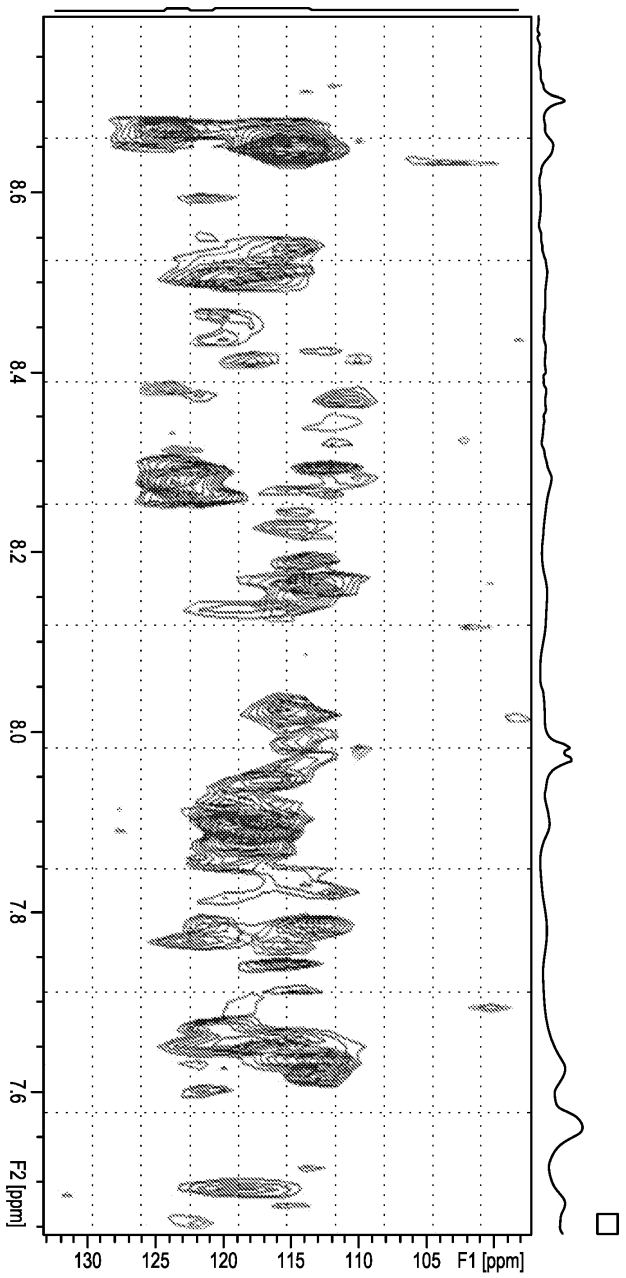
좌측: 120 당량 NH_4Cl의 첨가 전 및 후의 렐락신의 UV 스펙트럼 (각각 청색 및 적색). 우측: 방향족 잔기를 적색으로 강조한 렐락신의 아미노산 서열.

도면24



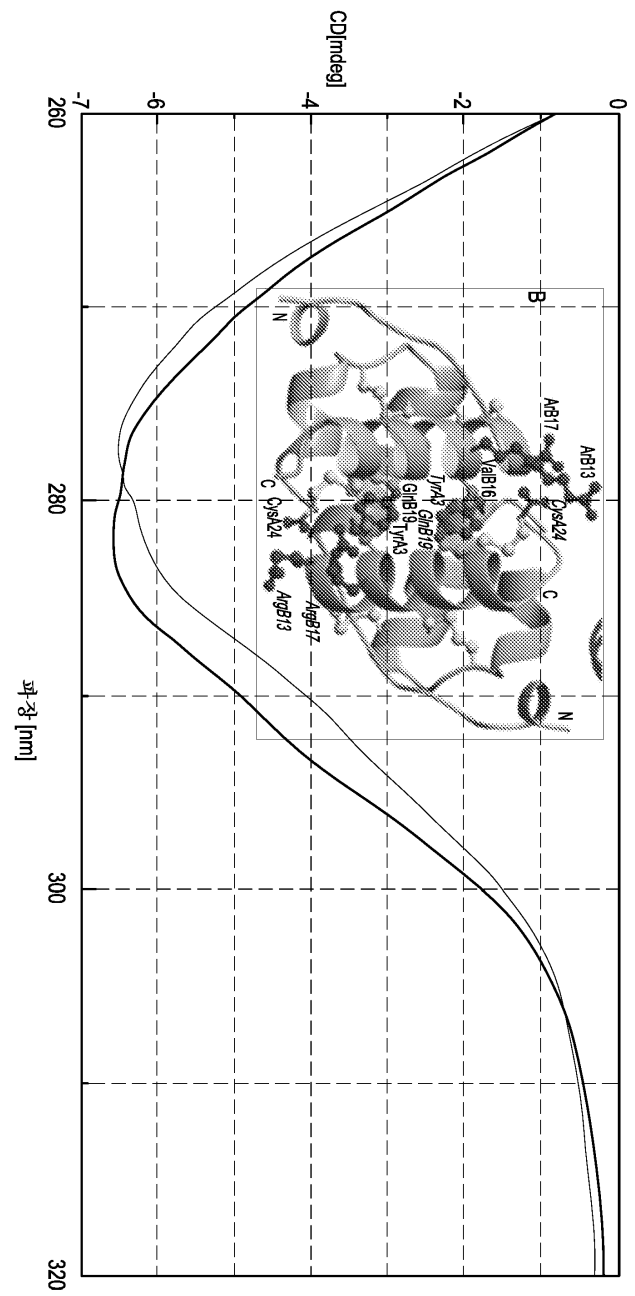
좌측: 120 당량 NH_4Cl의 첨가 전 및 후의 멜라신의 IR 스펙트럼 (각각 청색 및 자주색). 우측: 구조적 변화에 대한 잠정적인 할당을 갖는 120 당량 NH_4Cl의 첨가 후의 IR 스펙트럼의 삽도.

도면25



120 냉량 NH_4Cl의 첨가 전 및 후의 텔락신의 ^{15}N NMR HSQC 스펙트럼 (각각 적색 및 청색)

도면26



120 당량 NH_4Cl의 첨가 전 (청색) 및 후의 텔라신의 근 UV CD 스펙트럼 (각각 청색 및 녹색)

도면27

상업적 PABH에 존재하는 잠재적인 불순물의 구조

