

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 827 776**

51 Int. Cl.:

C07K 1/107 (2006.01)

A61K 47/60 (2007.01)

C07K 14/50 (2006.01)

C07K 14/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2016** **PCT/US2016/063313**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.06.2017** **WO17091568**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2016** **E 16816042 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2020** **EP 3380487**

54 Título: **Sistemas de aditivos para uso en la PEGilación de proteínas**

30 Prioridad:

23.11.2015 US 201562258644 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.05.2021

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

HICKEY, MATTHEW R. y
RAMIREZ, ANTONIO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 827 776 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistemas de aditivos para uso en la PEGilación de proteínas

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a un sistema de aditivos mejorado para su uso en la reacción de PEGilación de proteínas. En particular, la divulgación identifica un aditivo para la reacción de conjugación entre proteínas que contienen el resto de p-acetilfenilalanina y un compuesto de aminoxi-PEG.

10

Antecedentes

La PEGilación de proteínas es un proceso de conjugación que implica la unión de un derivado de polietilenglicol a una proteína terapéutica para mejorar su estabilidad y farmacocinética al reducir las tasas de eliminación y proporcionar un escudo estérico contra las enzimas proteolíticas y el reconocimiento del sistema inmunológico (Roberts, MJ *et al.*, Adv. Drug Delivery Rev, 54:459 (2002)). En general, las tecnologías de PEGilación se pueden clasificar en dos tipos, a saber, conjugaciones aleatorias y específicas del sitio. Las PEGilaciones aleatorias unen arbitrariamente el reactivo de PEGilación a aminoácidos reactivos tales como lisina o cisteína para producir una mezcla de productos PEGilados. Por el contrario, las conjugaciones específicas del sitio aprovechan la reactividad inequívoca de una funcionalidad natural (por ejemplo, los grupos N-terminal o C-terminal) o un aminoácido no natural (por ejemplo, p-acetilfenilalanina -pAcF) para controlar la ubicación y el número de restos de PEG unidos a la proteína. La reacción de conjugación específica del sitio que implica la formación de cetoxima entre un reactivo de PEGilación y un resto pAcF se incorpora en la proteína sustrato mediante la expansión del código genético (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", la Patente de Estados Unidos N.º 7.468.458 (23 de diciembre de 2008)). A pesar de su demostrada utilidad, las conjugaciones basadas en la formación de cetoximas sufren velocidades lentas y conversiones incompletas (Crisalli, P. *et al.*, J. Org. Chem., 78:1184 (2013)). Los intentos de mejorar la formación de cetoxima incluyen el uso de un exceso de reactivo de PEGilación, altas temperaturas o altas concentraciones de catalizadores tóxicos. Estas soluciones, sin embargo, introducen etapas adicionales para eliminar el exceso de reactivo de PEGilación o catalizador tóxico del producto y, a menudo, comprometen la estabilidad de la proteína. Además, los métodos antiguos no utilizan aditivos, usan un desnaturalizante (urea) y/o usan acetilhidrazida (AcNHNH₂) como aditivo. El AcNHNH₂ y las estructuras relacionadas se han definido en la publicación PCT N.º WO 2007/056448.

Lo que ahora se necesita en la técnica son nuevos métodos para mejorar el rendimiento y las velocidades de PEGilación de proteínas (Relaxina y FGF21) que contienen un resto de pAcF examinando los principios mecánicos que efectúan el estancamiento e identificando nuevos aditivos que aceleran la reacción y promueven las altas conversiones a bajas proporciones molares de PEG:proteína. Los métodos deben ser económicos, promover conversiones más altas con cantidades considerablemente más bajas de reactivo de PEGilación, promover reacciones más rápidas que evitan la necesidad de altas temperaturas de reacción y la eliminación de material genotóxico.

40

Sumario

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un sistema de aditivos mejorado para la reacción de PEGilación de proteínas, comprendiendo dicho sistema hidrazida p-aminobenzoica en combinación con una amina aromática o una sal de amonio, en donde dicha amina aromática se selecciona de un grupo que consiste en ácido 3,5-diaminobenzoico, o-fenilendiamina, 1-piridin-2-il-etilamina, 2-(dimetilamino)etilhidrazina, m-fenilendiamina y 2-picolilamina, y en el que dicha sal de amonio se selecciona de un grupo que consiste en acetato de amonio y cloruro de amonio.

En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de un sistema de aditivos mejorado para la reacción de PEGilación de proteínas mediante la formación de cetoxima, comprendiendo dicho sistema hidrazida p-aminobenzoica sola o en combinación con aminas aromáticas o sales de amonio.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la obtención de proteína PEGilada, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) identificar una proteína, reactivo PEG y un sistema de aditivos; (b) solubilizar la proteína seguido de combinar la proteína con el reactivo PEG en presencia del sistema aditivo, (c) hacer reaccionar la proteína con el reactivo PEG para obtener proteína PEGilada con alto rendimiento, en donde dicho sistema de aditivos incluye hidrazida p-aminobenzoica y en el que dicho reactivo de PEG se selecciona de un grupo que consiste en PEG-OA y otros derivados de PEG con un grupo aminoxi.

60

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Mecanismo general de formación de cetoximas.

Figura 2: Cromatograma para la PEGilación de relaxina (4 mg/ml en agua) con reactivo PEG-OA de 20 kDa.

Figura 3: Evolución temporal de la descomposición de PEG-OA de 20 kDa en agua cuando se expone a una corriente continua de aire.

65

Figura 4: Estudio de la estabilidad de la acetilhidrazida utilizando los espectros de IR *in situ* y ^1H RMN.

Figura 5: Modelo de reacción para el cribado de aditivos. Condiciones de la reacción: 1 (3,6 mmol) y 2 (3,6 mmol) en 1,0 ml de tampón acetato (20 mM, pH 4,0) a temperatura ambiente (23 °C).

Figura 6: Velocidades relativas (k_{rel}) observadas para diferentes aditivos. La acetil hidrazida ($k_{\text{rel}} \approx 2$) se muestra en un cuadro.

Figura 7: Evolución temporal para la reacción del dipéptido 1 con O-bencilhidroxilamina (2) en presencia de (a) 1 equiv de pirazolamina (rojo); (b) 1 equiv de MCH (azul); (c) 1 equivalente de pirazolamina y 1 equivalente de MCH (verde). El perfil de reacción obtenido en ausencia de aditivos se muestra en gris.

Figura 8: Región aromática de los espectros ^1H RMN de muestras que contienen dipéptido 1 (a) (azul) con (b) 1 equiv de MCH (verde); (c) 1 equiv de MCH y 1 equiv de pirazolamina (gris); (d) 1 equivalente de pirazolamina (rojo). El efecto sinérgico entre los aditivos MCH y pirazolamina produce mezclas con mayor concentración de intermediarios activos en comparación con las muestras que contienen solo un aditivo.

Figura 9: Izquierda: PEGilación del dipéptido 1 con 30 equivalentes de PABH y 1,2 equivalentes de PEG-OA de 20 kDa; el intermediario de hidrazona se registra como los puntos verdes. Derecha: Reacción de PEGilación en la que se añadieron 1,2 equivalentes de reactivo de PEGilación después de equilibrar el dipéptido con 30 equivalentes de PABH durante la noche.

Figura 10: Izquierda: Gráfico de la concentración de hidrazona frente a equivalentes de PABH para la PEGilación del dipéptido 1; los puntos azules indican la mezcla de reacción en la que se omitió la pirazolamina. Centro: Efecto de diferentes combinaciones de PABH y pirazolamina sobre las velocidades de reacción. Derecha: Concentración final del dipéptido 1 y su derivado de hidrazona en mezclas de reacción que contienen PABH y pirazolamina.

Figura 11: Gráfico del dipéptido 1 restante al final de la reacción, frente a los equivalentes totales de aditivos y la proporción de pirazolamina: PABH.

Figura 12: Izquierda: Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,5 equiv) en presencia de (a) 30 equiv de acetil hidrazida (azul); (b) 30 equiv de MCH (rojo); el perfil de reacción obtenido en ausencia de aditivos se muestra en color gris. Centro: Evolución temporal de la reacción de relaxina con PEG-OA (1,5 equiv.) en presencia de (a) 30 equiv de pirazolamina (azul); (b) 30 equiv de MCH (rojo); (c) 10 equiv de MCH (violeta); (d) 30 equivalentes de pirazolamina y 10 equivalentes de MCH (verde); (e) 30 equivalentes de MCH y 30 equivalentes de pirazolamina. Derecha: Evolución temporal de la reacción de relaxina con PEG-OA (1,5 equiv) en presencia de 30 equiv de pirazolamina y 10 equiv de MCH a (a) 40 °C; (b) 10 °C; (c) 25 °C.

Figura 13: Izquierda: Evolución temporal de la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,2 equiv) en presencia de (a) 30 equiv de MPCH y 30 equiv de pirazolamina (verde); (b) 30 equivalentes de PH y 30 equivalentes de pirazolamina (azul); y (c) 30 equivalentes de MCH y 30 equivalentes de pirazolamina en urea 6M (rojo). Derecha: Evolución temporal de la reacción de relaxina con PEG-OA (1,2 equiv) en presencia de (a) 30 equiv de PH y 60 equiv de pirazolamina (azul); (b) 30 equivalentes de acetilhidrazida y 60 equivalentes de pirazolamina (verde); y (c) 30 equiv de PABH y 60 equiv de pirazolamina (rojo).

Figura 14: Análisis HRMS de una PEGilación de relaxina acelerada por MCH en su punto final. El pico de la oxima se superpone con la relaxina residual. El retraso de 0,04 min para el pico de relaxina se debe al efecto de la matriz de reacción sobre el comportamiento cromatográfico más que a una impureza de elución tardía.

Figura 15: Izquierda: Evolución temporal de la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,2 equiv) en presencia de urea 6 M con (a) 30 equiv de MCH y 30 equiv de pirazolamina (rojo); (b) 30 equiv de MCH, 30 equivalentes de pirazolamina y 30 equivalentes de NH_2OH (azul). Derecha: Evolución temporal de la desintegración de la relaxina con PEG-OA (1,2 equiv) en presencia de urea 6M con 30 equiv de MCH y 30 equiv de pirazolamina (azul); el pico de oxima (rojo) crece durante la reacción, lo que sugiere la formación paralela de hidroxilamina a partir de la descomposición de PEG-OA.

Figura 16: Izquierda: Evolución temporal de la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,2 equiv) en presencia de 30 equiv de PABH y (a) 60 equiv etilendiamina (gris); (b) 60 equiv de ácido 3,5-diaminobenzoico (verde); (c) 60 equiv de *m*-fenilendiamina (azul); y 60 equiv de pirazolamina (rojo). Derecha: Evolución temporal de la reacción de relaxina con PEG-OA (1,2 equiv.) en presencia de (a) 30 equiv de PABH y 60 equiv de ácido 3,5-diaminobenzoico (verde); y (b) 60 equiv de PABH y 120 equiv de NH_4Cl (azul).

Figura 17: Esquema para el cribado de PEGilación preliminar.

Figura 18: Esquema para la PEGilación de relaxina y FGF21 con diferentes aminas.

Figura 19: Resultados de PEGilación para *o*- y *m*-fenilendiamina que ilustran la curvatura del gráfico de equiv totales frente a la proporción de amina: PABH frente a la concentración final de FGF21. Izquierda: *o*-fenilendiamina. Derecha: *m*-fenilendiamina.

Figura 20: Gráficos de equivalentes totales de aditivos frente a la proporción de amina: PABH y conversión para PEGilaciones usando PABH y ácido 3,5-diaminobenzoico. Izquierda: FGF21 con PEG-OA de 30 kDa. Derecha: Relaxina con PEG-OA de 20 kDa.

Figura 21: Izquierda: Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,2 equiv) en presencia de 120 equiv de sal y 60 equiv de catalizador de PABH usando (a) urea 6 M (verde); (b) NH_4Cl (gris); y (c) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Figura 22: Evolución temporal de la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,2 equiv) en ausencia de aditivos (azul) y en presencia de: (a) 120 equiv de NH_4Cl (rojo), (b) 60 equiv de acetilhidrazida (gris), y (c) 60 equivalentes de acetilhidrazida y 120 equivalentes de NH_4Cl (verde).

Figura 23: Izquierda: Espectros UV de relaxina antes y después de la adición de 120 equiv de NH_4Cl (azul y rojo, respectivamente). Derecha: Secuencia de aminoácidos de relaxina destacando en rojo los restos aromáticos.

Figura 24: Izquierda: Espectros IR de relaxina antes y después de la adición de 120 equiv de NH_4Cl (azul y violeta,

respectivamente).

Derecha: Recuadro del espectro IR después de la adición de 120 equiv de NH_4Cl con asignaciones tentativas para los cambios estructurales.

Figura 25: Espectros ^{15}N RMN HSQC de relaxina antes y después de la adición de 120 equiv de NH_4Cl (rojo y azul, respectivamente).

Figura 26: Espectros UV cercano CD de relaxina antes (azul) y después de la adición de 120 equiv NH_4Cl (azul y verde, respectivamente).

Figura 27: Estructuras de posibles impurezas presentes en PABH comercial.

10 Descripción detallada

A menos que se exponga específicamente de otro modo en cualquier otra parte en la solicitud, los siguientes términos pueden usarse en el presente documento y tendrán los siguientes significados.

15 Abreviaturas

PEG: polietilenglicol

PEG-OA: polietilenglicol - oxiamina

mPEG: metoxipolietilenglicol

MCH: morfolina 4-carbohidrazida

MPCH: 4-metilpiperazina-1-carbohidrazida

PH: Hidrazida piválica

PABH: hidrazida p-aminobenzoica

PMBH: hidrazida p-metoxibenzoica

Se debe indicar que, tal como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por alguien con una habilidad habitual en la técnica. A menos que se indique otra cosa, todos los intervalos descritos en el presente documento incluyen los puntos finales específicos. A continuación se definen los siguientes términos.

Aproximadamente: El término "aproximadamente" como se utiliza en el presente documento significa de manera aproximada, más o menos, alrededor o en la región de. Cuando el término "aproximadamente" se utiliza junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo al extender los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término "aproximadamente" se usa en el presente documento para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido mediante una variación del 5 por ciento hacia arriba o hacia abajo (mayor o menor).

Sistema de aditivos: El término "sistema de aditivos" se usa en el presente documento para referirse a un "compuesto catalizador", ya sea solo o en combinación. Para, por ejemplo, hidrazida p-aminobenzoica sola o en combinación con aminas aromáticas, a saber, ácido 3,5-diaminobenzoico, O-fenilendiamina, 1-piridin-2-il-etilamina, 2-(dimetilamino)etilhidrazina, *m*-fenilendiamina y 2-picolilamina o sales de amonio, a saber, acetato de amonio y cloruro de amonio. Los compuestos catalizadores preferidos incluyen hidrazida p-aminobenzoica con ácido 3,5-diaminobenzoico o hidrazida p-aminobenzoica con cloruro de amonio.

Que comprende: La expresión "que comprende" significa "que incluye", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

PEG: El término "PEG" cuando se usa en el contexto de la presente divulgación se refiere a polietilenglicol o polietilenglicol derivatizado.

Proceso de PEGilación o pegilación: El término "PEGilación" o "proceso de pegilación" se refiere al proceso de unión de cadenas de polímero de polietilenglicol (PEG) a otra molécula, en el contexto de la presente divulgación, a proteínas que contienen el resto de p-acetilfenilalanina (pAcF), incluyendo, pero sin limitación, Relaxina y FGF21.

Conjugación: El término "conjugación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una reacción de conjugación entre proteínas que contienen un resto de p-acetilfenilalanina y un compuesto de amino-PEG.

Por lo general, implica la activación de PEG y el acoplamiento de los intermediarios de PEG activados directamente a proteínas/péptidos diana o a un enlazador, que posteriormente se activa y se acopla a proteínas/péptidos diana (véase Abuchowski, A. *et al.*, J. Biol. Chem., 252:3571 (1977) y J. Biol. Chem., 252:3582 (1977), Zalipsky *et al.* en Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Capítulos 21 y 22, Harris, J.M., ed., Plenum Press, NY (1992)). Se observa que un polipéptido que contiene una molécula de PEG también se conoce como proteína conjugada o PEGilada, mientras que la proteína que carece de una molécula de PEG unida puede denominarse no conjugada o libre.

Reactivo de PEG o reactivo de PEGilación: Reactivos que ayudan en la reacción de PEGilación.

Se entenderá que cualquier realización de ejemplo proporcionada puede combinarse con una o más realizaciones de ejemplo adicionales.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un sistema de aditivos mejorado para la reacción de PEGilación de proteínas, comprendiendo dicho sistema hidrazida p-aminobenzoica en combinación con aminos aromáticas o sales de amonio, en donde dichas aminos aromáticas se seleccionan de un grupo que consiste en ácido 3,5-diaminobenzoico, o-fenilendiamina, 1-piridin-2-il-etilamina, 2-(dimetilamino)etilhidrazina, m-fenilendiamina y 2-picolilamina, y en el que dichas sales de amonio se seleccionan de un grupo que consiste en acetato de amonio y cloruro de amonio.

En una primera realización del primer aspecto de la invención, la combinación de sistema preferida incluye hidrazida p-aminobenzoica con ácido 3,5-diaminobenzoico o hidrazida p-aminobenzoica con cloruro de amonio.

En una segunda forma de realización del primer aspecto de la invención, la reacción es una reacción de conjugación entre proteínas que contienen el resto de p-acetilfenilalanina y un compuesto aminoxi-PEG.

En una tercera realización del primer aspecto de la invención, el sistema de aditivos aumenta las velocidades de reacción de conjugación, proporciona un alto rendimiento de producto conjugado y facilita la reducción de los equivalentes de aminoxi-PEG necesarios para completar la reacción de conjugación.

En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de un sistema de aditivos mejorado para la reacción de PEGilación de proteínas mediante la formación de cetoxima, comprendiendo dicho sistema hidrazida p-aminobenzoica sola o en combinación con aminos aromáticas o sales de amonio.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la obtención de proteína PEGilada, comprendiendo dicho proceso las etapas de: (a) identificar una proteína, reactivo PEG y un sistema de aditivos; (b) solubilizar la proteína seguido de combinar la proteína con el reactivo PEG en presencia del sistema aditivo, (c) hacer reaccionar la proteína con el reactivo PEG para obtener proteína PEGilada con alto rendimiento, en donde dicho sistema de aditivos incluye hidrazida p-aminobenzoica y en el que dicho reactivo de PEG se selecciona de un grupo que comprende PEG-OA y otros derivados de PEG con un grupo aminoxi.

En una primera realización del tercer aspecto de la invención, la proteína es Relaxina o FGF21 que contiene un resto pAcF.

En una segunda realización del tercer aspecto de la invención, la proteína solubilizada combinada con el reactivo PEG en presencia del sistema aditivo se mantiene a un pH de aproximadamente 4.

En una tercera realización del tercer aspecto de la invención, la proteína solubilizada combinada con el reactivo PEG en presencia del sistema de aditivos se mantiene a una temperatura que varía de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C.

En una cuarta realización del tercer aspecto de la invención, el sistema de aditivos incluye hidrazida p-aminobenzoica sola o en combinación con aminos aromáticas, tales como el ácido 3,5-diaminobenzoico o las sales de amonio, tales como acetato de amonio o cloruro de amonio.

En una quinta realización del tercer aspecto de la invención, el sistema de aditivos incluye además una combinación de hidrazida p-aminobenzoica de alta calidad con cloruro de amonio que se prefiere para su uso a gran escala en la producción de proteínas PEGiladas.

Ejemplos

La presente divulgación se describirá ahora en relación con determinadas realizaciones que no pretenden limitar su alcance. Por el contrario, la presente divulgación abarca todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que puedan incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones. Por lo tanto, los siguientes Ejemplos, que incluyen realizaciones específicas, ilustrarán una práctica de la presente divulgación, entendiéndose que los Ejemplos son para los propósitos de ilustración de determinadas realizaciones y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de sus procedimientos y aspectos conceptuales.

El mecanismo general de la reacción entre un grupo carbonilo y un derivado de hidroxilamina es bien conocido para los reactivos de moléculas pequeñas (Jencks, W.P., Prog. Phys. Org. Chem., 2:63 (1964), and referencias citadas en ese documento). El proceso es catalizado por ácido y, en su conjunto, implica una deshidratación precedida por un equilibrio de varias etapas. Mientras que las cetiminas se forman a velocidades más lentas que las aldimitas debido a la cepa 1,3 alílica, para las alquiloaminas simples, el equilibrio cetona-cetimina se desplaza en gran medida hacia

la deshidratación (Figura 1).

Ejemplo 1

- 5 Estudio para investigar la descomposición del reactivo de PEGilación como posible causa de estancamiento de la reacción

Una posible causa del estancamiento de la PEGilación podría resultar de la descomposición del reactivo de PEGilación. Como el reactivo PEG no es activo en UV, requiere un método de detección diferente para controlar su destino durante la reacción. La detección de dispersión de luz por evaporación implica pasar la fase móvil de HPLC a través de un nebulizador para eliminar el disolvente. Cualquier partícula sólida que forme luz difractada de un rayo láser en el detector, resultando en una señal. Este método permite la detección de cualquier compuesto que forme un sólido que pueda difractar la luz. Como los reactivos de PEGilación son sólidos de alto peso molecular, son excelentes candidatos para el análisis de HPLC mediante detección de ELS. Esto es evidente en la Figura 2. La traza UV se muestra en verde, la traza ELS se muestra en negro. El cromatograma superior (verde) es la traza UV a 210 nm, el cromatograma negro es la traza ELS de la misma mezcla obtenida en serie con el detector de UV. Claramente, el trazo negro inferior proporciona más información, particularmente con los compuestos basados en PEG que eluyen más tarde.

- 20 El último pico de elución no es UV activo y no estaba presente al comienzo de la reacción. Esto sugirió una descomposición competitiva del reactivo de PEGilación. De hecho, este compuesto se formó cuando la solución de reactivo de PEGilación se expuso al aire (Figura 3). La conversión del reactivo PEG-OA de 20 kDa fue > 97 % a concentraciones \approx 4 mg/ml y dio como resultado subproductos que no eran reactivos en la PEGilación.

- 25 Como esta descomposición es el resultado de la reacción del reactivo de PEGilación con gas disuelto en el disolvente, debe haber una correlación inversa entre las velocidades de descomposición y las concentraciones. Esta hipótesis coincide con la observación de que las muestras de PEG-OA de 20 kDa a concentraciones más relevantes para la reacción de 30-40 mg/ml eran bastante estables (< 5 % de descomposición). Si bien puede haber algún impacto en el trabajo analítico de este proyecto para garantizar la estabilidad de la muestra durante el análisis, la descomposición mínima en condiciones más relevantes para la reacción lleva a la conclusión de que la descomposición del PEG por el aire no es una causa importante del estancamiento observado de la reacción. También se estudió la estabilidad del reactivo de PEGilación en presencia de aditivos empleados para acelerar la PEGilación. Estos experimentos se llevaron a cabo a las concentraciones de reacción esperadas, asumiendo la carga de PEG diana de 1,2 equivalentes en relación con la relaxina. En todos los casos, la descomposición del reactivo de PEGilación fue mínima.

- 35 Dado que el estancamiento de la PEGilación se produce en presencia de un gran exceso de acetilhidrazida como aditivo acelerador, la estabilidad de esta hidrazida en las condiciones de reacción se probó por espectroscopías IR *in situ* y ^1H RMN. Los estudios mostraron que la acetilhidrazida es estable y sugieren que el exceso requerido para promover la reacción probablemente esté relacionado con la existencia de equilibrio y una aceleración moderada en relación con el proceso de fondo no catalizado (Figura 4).

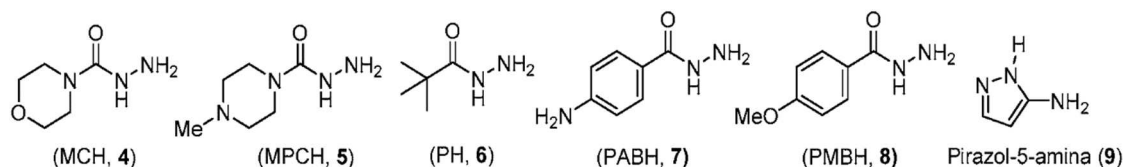
Ejemplo 2

Estudios sobre cribado de aditivos utilizando el sistema modelo de dipéptidos (DMS)

- 45 Los esfuerzos iniciales para encontrar aditivos que aceleraran la reacción entre el control de la cetona pAcF en la relaxina y una alcoxiamina involucraron el cribado de compuestos disponibles comercialmente que contenían restos X-NH₂ activados capaces de promover la formación de sus correspondientes derivados imino mediante deshidratación. Los requisitos mínimos para el cribado de estos aditivos fueron su suficiente estabilidad y solubilidad a la temperatura, condiciones de tampón y pH utilizadas para promover la PEGilación de la proteína real en medio acuoso. Para simplificar los procedimientos analíticos y facilitar el control de la reacción mediante espectroscopía HPLC-UV y RMN, la condensación entre dipéptido Ala-pAcF (**1**) y O-fenilhidroxilamina (**2**, consulte la Figura 5) se eligió como una transformación del modelo que podría orientar la elección aditiva. En una etapa posterior, los aditivos que mejoraron la reacción del modelo se probarían en la PEGilación de Relaxina y FGF21. En la Figura 5 se proporciona un modelo de reacción para el cribado de aditivos. Condiciones de la reacción: **1** (3,6 mmol) y **2** (3,6 mmol) en 1,0 ml de tampón acetato (20 mM, pH 4,0) a temperatura ambiente (23 °C).

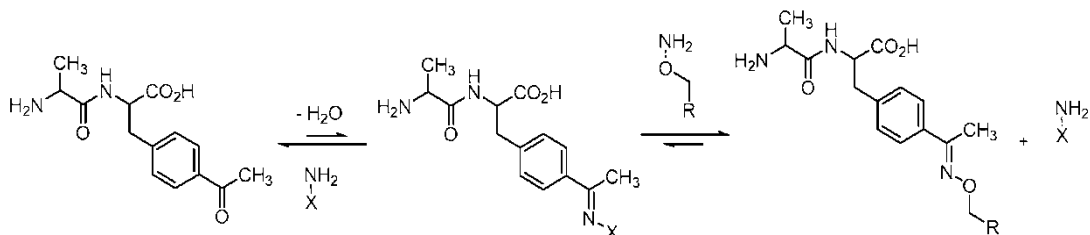
- Se evaluaron las velocidades de reacción y el porcentaje de conversión para cincuenta aditivos clasificados en cuatro categorías generales, en concreto: anilinas, hidrazinas, hidrazidas e hidrazinacarboxaminas dependiendo de la naturaleza del sustituyente X en el resto X-NH₂. Las velocidades observadas se normalizaron a la velocidad medida en ausencia de aditivos ($k_{\text{rel}} = 1$). La acetil hidrazida ($k_{\text{rel}} \approx 2$) fue un aditivo de referencia para establecer un rendimiento aceptable de referencia; solo aquellos aditivos que permitieron $k_{\text{rel}} > 2$ y altas conversiones (> 95%) se considerarían para su posterior aplicación y optimización en la PEGilación de Relaxina y FGF21. En la Figura 6 se muestra un resumen de los resultados. Las reacciones se llevaron a cabo en viales de HPLC a temperatura ambiente sin agitar para imitar las condiciones de PEGilación de proteínas, y el muestreador automático de HPLC extrajo periódicamente alícuotas para evitar una mayor manipulación de la muestra.

Las hidrazidas (coloreadas en azul) y las hidrazinacarboxamidas (verde) proporcionaron los mejores resultados. En general, las anilinas (rojo) proporcionaron una conversión completa de dipéptidos pero no aceleraron la reacción. Además, la mayoría de las anilinas promovieron altos niveles de epimerización no deseada. Las hidrazinas (amarillas) formaron grandes cantidades de hidrazona en las condiciones de reacción y se descartaron para estudios posteriores. Las hidrazidas aromáticas y las hidrazinacarboxaminas secundarias produjeron aceleraciones de hasta cinco veces, así como altas conversiones que se estancaron en aproximadamente el 95 % del consumo de dipéptidos. En particular, el cribado llevó al descubrimiento de morfolina-4-carbohidrazida (MCH, 4) e hidrazida p-aminobenzoica (PABH, 7) como reactivos óptimos para promover la transformación. Según su rendimiento, solubilidad a pH 4, disponibilidad comercial y coste, se evaluaron adicionalmente PABH y MCH en la PEGilación de Relaxina y FGF21 (vide infra).



Con esta información en la mano, los intentos de eludir el estancamiento de la reacción se centraron en tres aspectos: (a) la adición de cantidades variables de aditivo, (b) el efecto de los agentes caotrópicos, y (c) la combinación de aditivos. Inicialmente, Se realizaron estudios con dipéptido modelo y acetilhidrazida para determinar las tendencias intrínsecas en la reactividad. El seguimiento de las velocidades de reacción en cantidades variables de acetilhidrazida reveló la cinética de saturación en el aditivo, lo que indica que la mejora de la velocidad alcanza un valor umbral a altas concentraciones de reactivo (Esquema 1).

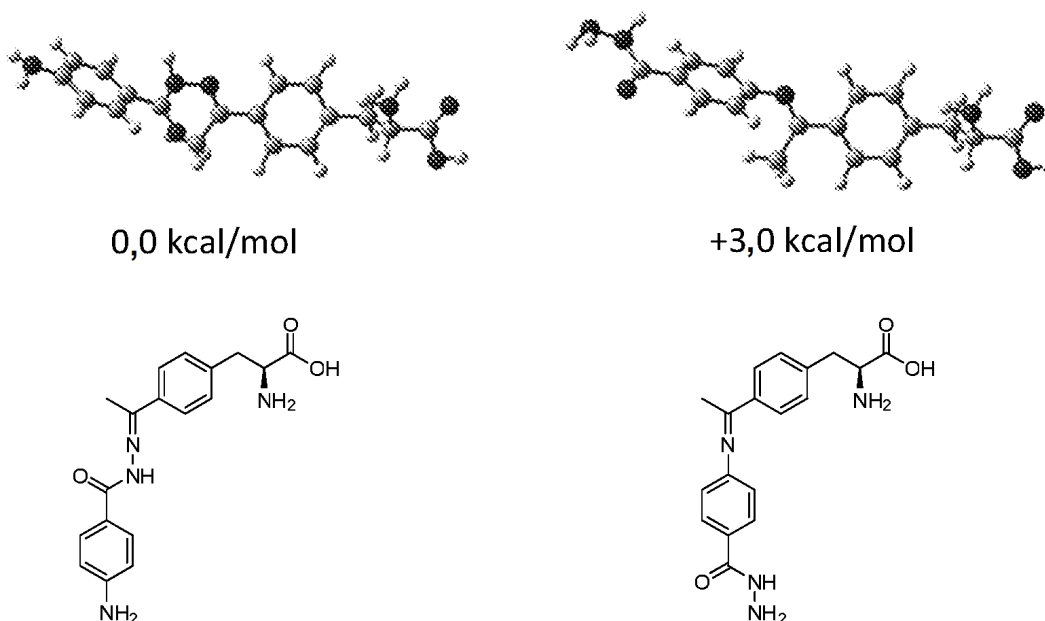
Esquema 1
Equilibrio cetona-cetoxima determinado por espectroscopía de RMN



Además, concentraciones crecientes de acetilhidrazida promovieron niveles de estancamiento más altos de acuerdo con un mecanismo general que involucra una secuencia de múltiples etapas de reacciones de transferencia de imina reversibles. En presencia de un aditivo acelerador, dicho mecanismo apuntaba a la posibilidad de lograr mejores conversiones desplazando el aparente equilibrio hacia la deshidratación. Los intentos empíricos de modificar este equilibrio mediante cambios en el medio de reacción fueron infructuosos. Por ejemplo, la adición de urea 6 M o NH_4Cl no aceleró la reacción ni afectó a los niveles de conversión originales. El cribado de ciertas anilinas dio como resultado una conversión completa sin aceleración y previó que la combinación de estas anilinas con un aditivo acelerador podría ayudar a extender la conversión del sustrato. De hecho, el uso de una mezcla de acetilhidrazida y pirazolamina 9 condujo a perfiles de reacción más rápidos y conversiones casi completas (Figura 6). El análisis ^1H NMR de mezclas que contienen cantidades equimolares de dipéptido, pirazolamina, el aditivo MCH, o una mezcla de MCH y pirazolamina, reveló un crecimiento sinérgico de los intermediarios de imina e hidrazona para las muestras que contienen la mezcla y sugirió que el efecto positivo de combinar un aditivo acelerador y una anilina se correlaciona con un cambio del equilibrio en el camino hacia los intermediarios de reacción (Figura 8).

Los estudios espectroscópicos análogos de ^1H RMN utilizando PABH, un aditivo que contiene los restos de hidrazida y anilina, muestran la formación predominante de un único intermediario de hidrazona de acuerdo con los cálculos de DFT. En condiciones neutras, los cálculos al nivel de teoría B3LYP/6-31G(d) favorecen la formación de la hidrazona entre pAcF y PABH en lugar de su imina isoestructural en ≈ 3 kcal/mol (Esquema 2).

Esquema 2
Geometrías y energías de B3LYP/6-31G(d) para la formación de los intermediarios de hidrazona e imina de pAcF en condiciones neutrales



La protonación del aminoácido -NH_2 ($\text{pK}_a \approx 9$), apoya la formación de hidrazona en ≈ 9 kcal/mol. La doble protonación (pK_a : anilina $\approx 2,5$, hidrazida <2) favorece la formación de iminas en $\approx 1,0$ kcal/mol. Aunque la reacción no se realiza a valores de pH tan bajos, los cálculos de DFT indican que la deshidratación es muy sensible a las variaciones de pH y los efectos de enlace de H.

El intermediario de hidrazona se podría controlar durante la PEGilación del dipéptido **1** con PABH (Figura 9). Los experimentos de control que equilibraron mezclas de dipéptido **1** con PABH durante la noche en ausencia de reactivo de PEGilación mostró la formación de la hidrazona así como su consumo rápido tras la adición de PEG-OA de 20 kDa para dar el producto deseado. Un examen más detallado de la formación de hidrazona en presencia de aditivos de amina (por ejemplo, pirazolamina, Figura 10) sugirió que el grado de formación de hidrazona está relacionado con la proporción de pirazolamina: PABH utilizada en la reacción. Curiosamente, el grado de formación de hidrazona no se correlaciona con las velocidades de reacción o conversiones de una manera simple. En el sistema dipéptido modelo, una proporción de pirazolamina: PABH de 1:1 fue óptima para la formación de la hidrazona. Sin embargo, en el caso de las velocidades de reacción, las condiciones óptimas correspondieron con una proporción de amina: hidrazida de 1:2. La necesidad de mayores cantidades de hidrazida en relación con la amina está respaldada por el cribado preliminar en la que se observó que las hidrazidas proporcionan velocidades de reacción mucho más altas que los aditivos de amina. Por otro lado, una proporción de amina: hidrazida de 3:1 fue óptima para la conversión de dipéptidos de acuerdo con (a) la observación de cantidades significativas de intermediario de hidrazona que permanecen al final de la reacción a baja proporción de amina: hidrazida y (b) la inversión de la reacción detectada tras la adición de "cargas estimulantes" del aditivo de hidrazida. En los experimentos presentados anteriormente, los equivalentes totales son la suma de PBAH y la pirazolamina. El efecto de los cambios en los equivalentes totales de aditivo se abordó mediante una serie de experimentos realizados variando tanto la proporción de amina:hidrazida como los equivalentes totales de aditivos combinados. Los resultados se resumen en la Figura 11. La curvatura en la figura sugiere que el efecto de cooperación entre la amina y la hidrazida es complejo y la optimización de las condiciones de reacción puede requerir la consideración no solo de los equivalentes totales de los aditivos, sino de la proporción entre los dos.

Ejemplo 3

PEGilaciones de proteínas aceleradas con aditivos - Relaxina y FGF21

La aplicación de las lecciones aprendidas en el sistema modelo a la PEGilación de Relaxina y FGF21 tuvo como objetivo disminuir el número de equivalentes de PEG-OA de 20 kDa a un máximo de 1,2 equiv, así como acortar los tiempos de reacción a temperatura ambiente sin comprometer el rendimiento o la calidad de la reacción del producto. A fin de conseguir esto, se probaron los aditivos identificados en el modelo de reacción con relaxina en las condiciones de reacción desarrolladas inicialmente a partir de investigaciones superficiales. La PEGilación de relaxina (21 mg/ml en AcONa 20 mM a pH 4,0) con 1,5 equivalentes de PEG-OA proporcionó buenas conversiones ($\approx 90\%$) después de 24 h a temperatura ambiente en presencia de 30 equivalentes de acetilhidrazida o MCH. En ausencia de catalizador, en condiciones idénticas, la reacción dio conversiones significativamente más bajas ($\approx 75\%$). De acuerdo con los estudios del sistema modelo, la PEGilación se aceleró con los aditivos y la reacción con MCH fue dos veces más rápida que la reacción con acetilhidrazida. Además, el equilibrio propuesto en la Figura 6 encontró apoyo en las

siguientes observaciones: (a) reacciones catalizadas estancadas en conversiones comparables, (b) una vez estancado, la adición de 30 equivalentes adicionales de aditivos redujo los niveles de conversión, y (c) una vez estancado, la adición de 0,5 equivalentes de PEG-OA llevó la reacción a una conversión más alta ($\approx 95\%$). Las tendencias observadas para las anilinas en la reacción del modelo traducidas a la PEGilación de la Relaxina: la adición de 30 equiv pirazolamina transformó la mayor parte del material de relaxina de partida sin aceleración y, la combinación de MCH con pirazolamina produjo una conversión del 95 % en solo 8 h. Los esfuerzos para optimizar las condiciones de reacción expusieron una interacción compleja entre las variables y alentaron la aplicación de estudios de DdE para obtener una comprensión más profunda (Ejemplo 4). Por ejemplo, cantidades mayores o menores de MCH mezcladas con 30 equiv de pirazolamina no mejoraron la conversión y el uso de temperaturas más altas no promovió reacciones más rápidas (Figura 12). La reducción de la carga de PEG-OA a 1,2 equiv provocó un estancamiento en $\approx 85-90\%$ de conversión en las condiciones optimizadas para 1,5 equiv en presencia de los aditivos MCH, MPCH (5) o PH (6). Sin embargo, en contraste con su efecto insignificante en el sistema modelo, el uso de MCH en la finalización de la reacción avanzada de urea 6M hasta $\approx 95\%$ (Figura 12).

El avance de la PEGilación hasta su finalización, sin embargo, descubrió la formación de una impureza con el mismo tiempo de retención que el material de partida de Relaxina pero no reactiva en presencia de reactivo de PEGilación. Los estudios de HRMS indicaron que la impureza correspondía a la oxima en el resto N-terminal de pAcF y NH_2OH confirmó que la impureza no era productiva para la PEGilación (Figura 13). Se postularon dos hipótesis para explicar la fuente de NH_2OH , en concreto: (a) su presencia como impureza de entrada en el reactivo de PEGilación, y (b) su formación durante el transcurso de la reacción de PEGilación. Un análisis cuidadoso del PEG-OA demostró que los niveles de NH_2OH en los materiales de partida fueron $<0,05$ ppm y refutaron la primera hipótesis. De acuerdo con la degradación del reactivo de PEGilación durante la reacción, el seguimiento de la formación de la impureza de la oxima mostró su crecimiento inequívoco a lo largo de la PEGilación (Figura 14). Un estudio sistemático HRMS de los aditivos 4-9 indicó que MCH y MPCH promovieron la descomposición del PEG-OA, mientras que la acetilhidrazida, PH, PABH, PMBH y pirazolamina no lo hicieron. Consecuentemente, en la optimización de PEGilaciones mediadas por PABH ya que PABH permite conversiones comparables a las de MCH (Figura 6) y su costo es mucho menor que este último (1 U\$/g frente a 60 U\$/g). Las condiciones optimizadas implicaron el uso de 30 equiv de PABH y 60 equiv de pirazolamina. Estos resultados serían posteriormente confirmados por estudios de DdE.

Una revisión del efecto de las anilinas sobre la conversión de la reacción observada durante el cribado en el sistema modelo mostró que, además de pirazolamina, tres aminas pudieron avanzar en los niveles de finalización. Éstas eran *m*-fenilendiamina, etilendiamina y ácido 3,5-diaminobenzoico. Usando 1,2 equiv de PEG-OA y 30 equiv de PABH, la adición de 60 equiv de amina produjo conversiones $\approx 95\%$ (Figura 19). Las estequiometría de aditivos más bajas dieron como resultado conversiones más bajas en tiempos cortos ($\approx 90\%$) pero lentamente lograron conversiones más altas a las 24 h.

Ejemplo 4

Estudios de DdE para evaluar las interacciones entre diferentes combinaciones de aditivos

La interacción entre los aditivos de amina e hidrazida se exploró más a fondo para la PEGilación de Relaxina y FGF21 utilizando un enfoque de DdE que tuvo en cuenta cuatro variables, a saber (a) la identidad de la hidrazida, (b) la identidad de la amina, (c) equivalentes totales de aditivos, y (d) proporción de amina: hidrazida de los aditivos utilizados. Los estudios se realizaron con Relaxina y FGF21 para examinar el efecto de la proporción molar de amina: hidrazida y las cargas de PEG-OA en velocidades y conversiones, y analizar varias aminas previamente identificadas en el sistema modelo (Figura 6). Los resultados de estos experimentos apuntaron a una interacción compleja entre la proporción de amina:hidrazida e indicaron que la optimización de la reacción requiere una consideración cuidadosa del tipo de amina así como de la proteína sustrato.

En la primera ronda de cribado (Tabla 1), los presentes inventores utilizaron PABH, acetilhidrazida e hidrazida piválica en combinación con pirazolamina para la PEGilación de Relaxina y FGF21 (Figura 17). También se consideraron los equivalentes de PEG-OA y la concentración de urea. La mayoría de los sistemas de aditivos en esta cribado dieron un buen rendimiento. De acuerdo con estudios previos (Figuras 7 y 12), el sistema de amina: hidrazida a 2:1 se encontraba entre los mejores para promover una alta conversión. Aunque la hidrazida piválica era un excelente aditivo de hidrazida que podía promover una alta conversión y velocidades de reacción rápidas, se observaron nuevas impurezas en las mezclas de reacción que no estaban presentes cuando se usó PABH.

Tabla 1

Resultados del cribado preliminar de la PEGilación de la relaxina			
Pirazolamina (equiv)	Hidrazida	Hidrazida (equiv.)	Conversión (%)
60	Hidrazida piválica	30	98
60	PABH	30	96
0	Hidrazida piválica	60	96
30	Acetil hidrazida	10	96

Esta cribado se repitió usando FGF21 con resultados similares (Tabla 2). PABH demostró ser el aditivo destacado para acelerar la reacción y, ya que uno de los objetivos de esta iniciativa era desarrollar un método de PEGilación general que se pueda aplicar a una amplia variedad de sistemas de proteínas, se seleccionó PABH para estudios posteriores. Un apoyo adicional para el uso de PABH como componente de hidrazida fue el hecho de que es negativo en las pruebas de AMES a diferencia de la acetilhidrazida, que es un potente mutágeno conocido (Bhide, S.V. *et al.*, Cancer Lett., 23:235 (1984)).

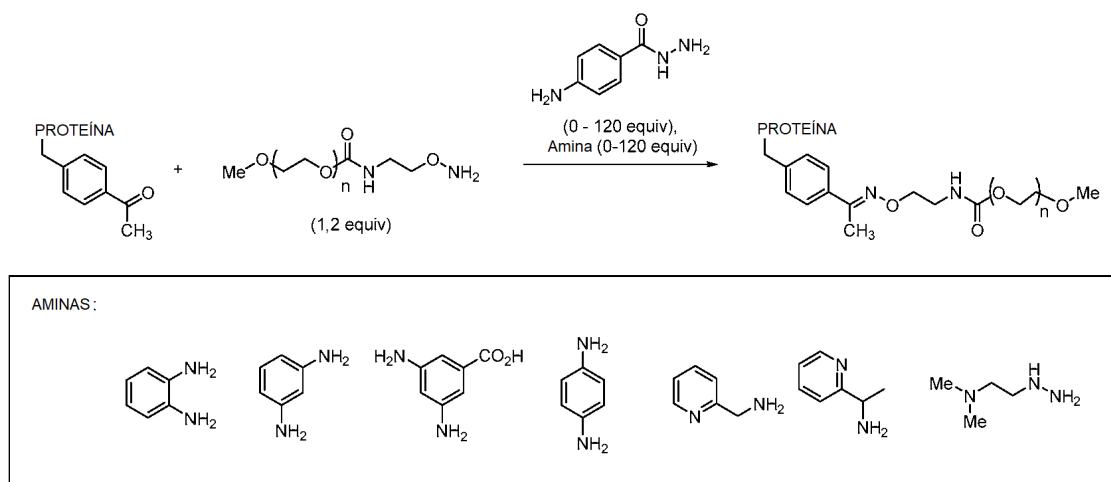
Tabla 2

Resultados del cribado preliminar de la PEGilación de FGF21			
Pirazolamina (equiv)	Hidrazida	Hidrazida (equiv.)	Conversión (%)
0	PABH	30	91
60	PABH	60	89
30	PABH	30	88
30	Hidrazida piválica	60	83
10	Acetil hidrazida	60	82
60	Hidrazida piválica	10	80
0	Acetil hidrazida	10	77
10	Hidrazida piválica	10	73
0	Acetil hidrazida	30	69

Habiendo elegido PABH como hidrazida, se cribó en combinación con un alcance más amplio de aminas, utilizando las proteínas tanto relaxina como FGF21 (Esquema 3). Para estos experimentos se hicieron las siguientes consideraciones: (a) las aminas previamente probadas en el sistema modelo (Figura 5) serían seleccionadas, (b) los equivalentes totales de aditivos (suma de hidrazida y amina) variarían de 20 a 120, y (c) los tiempos de reacción se limitarían a 24 h.

Esquema 3

Esquema para la PEGilación de Relaxina y FGF21 con diferentes aminas



Como la primera cribado del DDE se realizó con PABH y pirazolamina, era de interés primordial determinar cuál de las aminas (o clase de aminas) era óptima para su uso en sistemas de aditivos con PABH. Los resultados experimentales del cribado con relaxina y FGF21 se resumen a continuación (Tablas 3 y 4, respectivamente).

Tabla 3

Datos del DdE de relaxina ronda 2				
Aditivo de amina	Proporción de amina: PABH	Equiv totales	Tiempo (h)	Conversión (%)
o-Fenilendiamina	0,6	20	22,7	96
o-Fenilendiamina	1,7	50	21,0	96
o-Fenilendiamina	0,3	85	18,5	94

(continuación)

Datos del DdE de relaxina ronda 2				
Aditivo de amina	Proporción de amina: PABH	Equiv totales	Tiempo (h)	Conversión (%)
o-Fenilendiamina	0,6	120	18,4	94
1-piridin-2-il-etilamina	0,3	20	22,2	94
1-piridin-2-il-etilamina	3,0	20	23,7	93
1-piridin-2-il-etilamina	0,3	120	22,6	91
1-piridin-2-il-etilamina	3,0	120	23,5	88
2-(Dimetilamino)etilhidrazina	0,3	20	23,1	94
2-(Dimetilamino)etilhidrazina	3,0	20	23,1	88
2-(Dimetilamino)etilhidrazina	1,0	85	21,4	84
2-(Dimetilamino)etilhidrazina	3,0	120	19,7	55
Ácido 3,5-diaminobenzoico	3,0	20	18,8	94
Ácido 3,5-diaminobenzoico	1,0	50	20,1	95
Ácido 3,5-diaminobenzoico	3,0	120	21,8	94
Ácido 3,5-diaminobenzoico	0,3	120	23,5	94
m-Fenilendiamina	3,0	20	19,3	94
m-Fenilendiamina	0,6	85	18,9	94
m-Fenilendiamina	3,0	120	23,1	96
m-Fenilendiamina	0,3	120	19,7	93
p-Fenilendiamina	1,0	20	19,3	96
p-Fenilendiamina	3,0	50	18,9	96
p-Fenilendiamina	1,6	120	20,6	94

Tabla 4

Datos de FGF21 Ronda 2				
Aditivo de amina	Proporción de amina:PABH	Equiv totales	Tiempo (h)	Conversión (%)
o-Fenilendiamina	0,64	120	23,5	60
o-Fenilendiamina	3,00	85	23,7	70
o-Fenilendiamina	0,33	85	24,3	57
o-Fenilendiamina	1,74	50	20,9	67
o-Fenilendiamina	0,64	20	20,5	64
m-Fenilendiamina	3,00	20	24,4	48
m-Fenilendiamina	0,33	120	24,9	55
m-Fenilendiamina	0,33	20	24,1	70
m-Fenilendiamina	0,64	85	24,7	37
m-Fenilendiamina	3,00	120	20,9	75
Ácido 3,5-diaminobenzoico	3,00	20	23,9	55
Ácido 3,5-diaminobenzoico	0,33	120	23,2	58
Ácido 3,5-diaminobenzoico	0,33	20	22,3	70
Ácido 3,5-diaminobenzoico	1,00	50	20,1	76
Ácido 3,5-diaminobenzoico	3,00	120	19,7	77
Etilendiamina	1,00	20	24,3	59
Etilendiamina	3,00	50	24,0	55
Etilendiamina	0,33	50	22,7	73
Etilendiamina	0,33	120	21,4	77
Etilendiamina	1,57	120	20,5	52
2-Picolilamina	0,33	85	23,6	65
2-Picolilamina	3,00	85	23,1	74
2-Picolilamina	1,00	120	22,4	68
2-Picolilamina	1,57	20	24,5	58

(continuación)

Datos de FGF21 Ronda 2				
Aditivo de amina	Proporción de amina:PABH	Equiv totales	Tiempo (h)	Conversión (%)
2-Picolilamina	0,33	20	19,2	54
1-piridin-2-il-etilamina	0,33	120	22,2	58
1-piridin-2-il-etilamina	3,00	120	23,1	42
1-piridin-2-il-etilamina	3,00	20	24,0	24
1-piridin-2-il-etilamina	1,57	85	21,8	70
1-piridin-2-il-etilamina	0,64	50	23,2	68
1-piridin-2-il-etilamina	0,33	20	20,1	53
2-(dimetilamino)etilhidrazida	3,00	20	22,7	52
2-(dimetilamino)etilhidrazida	0,33	20	22,8	48
2-(dimetilamino)etilhidrazida	0,33	120	22,8	70
2-(dimetilamino)etilhidrazida	3,00	120	19,7	20
2-(dimetilamino)etilhidrazida	1,00	85	19,3	49

Los resultados de la PEGilación de Relaxina son consistentes entre las diversas aminas y las conversiones en general son razonablemente altas. Por otro lado, para FGF21, el ácido 3,5-diaminobenzoico parece ser un buen promotor de la PEGilación tanto en las proporciones de amina:PABH de 1,0 como de 3,0. Manteniendo constantes los equivalentes totales y la proporción, los presentes inventores obtienen una mejor imagen del impacto que tiene la amina en las conversiones. Para la relaxina, estos datos se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5

Efecto de la elección de la amina en la conversión para la PEGilación de relaxina				
Aditivo de amina	Proporción de amina: PABH	Equiv totales	Tiempo (h)	Conversión (%)
1-piridin-2-il-etilamina	0,33	120	28,1	91
<i>m</i> -Fenilendiamina	0,33	120	25,2	94
1-piridin-2-il-etilamina	0,33	120	22,6	91
<i>p</i> -fenilendiamina	0,33	120	25,0	94
Ácido 3,5-diaminobenzoico	0,33	120	23,5	93
2-(Dimetilamino)etilhidrazina	0,33	120	32,1	88

- 10 Para la relaxina, el impacto del aditivo de amina es evidente, pero dadas las altas conversiones generales observadas, este impacto es nuevamente bajo. Para FGF21, el impacto es mayor (Tabla 6).

Tabla 6

Efecto de la elección de la amina en la conversión para la PEGilación de FGF21				
Aditivo de amina	Proporción de amina:PABH	Equiv totales	Tiempo (h)	Conversión (%)
<i>m</i> -Fenilendiamina	0,33	120	24,9	55
Ácido 3,5-diaminobenzoico	0,33	120	23,2	58
Etilendiamina	0,33	120	21,4	77
1-piridin-2-il-etilamina	0,33	120	22,2	58
2-(dimetilamino)etilhidrazida	0,33	120	22,8	70

- 15 A partir de estos datos, está claro que la conversión depende en gran medida de la identidad de la amina utilizada en combinación con PABH. Al darse cuenta de que estas condiciones no reflejan necesariamente las condiciones óptimas para la reacción de PEGilación, los presentes inventores clasificaron por conversión para llegar a la lista de las cinco combinaciones de aditivos con mejores resultados para FGF21 (Tabla 7).

20

Tabla 7

Los 5 mejores sistemas de aditivos para la PEGilación de FGF21				
Aditivo de amina	Equiv totales	Proporción de amina: PABH	Tiempo (h)	Conversión (%)
<i>m</i> -Fenilendiamina	120	3,00	20,9	75
Ácido 3,5-diaminobenzoico	50	1,00	20,1	76
Ácido 3,5-diaminobenzoico	120	3,00	19,7	77

(continuación)

Los 5 mejores sistemas de aditivos para la PEGilación de FGF21				
Aditivo de amina	Equiv totales	Proporción de amina: PABH	Tiempo (h)	Conversión (%)
Etilendiamina	120	0,33	21,4	77
2-Picolilamina	85	3,00	23,1	74

La etilendiamina y el ácido 3,5-diaminobenzoico fueron los dos de mayor rendimiento para la PEGilación de FGF21 en las condiciones seleccionadas. Como el ácido 3,5-diaminobenzoico es un sólido cristalino relativamente económico y fácilmente disponible, se consideró un aditivo favorito para la combinación amina: PABH. El apoyo adicional vendrá del análisis detallado de equivalentes totales frente a las proporciones de amina:PABH. Tal como se observa en el sistema modelo, el efecto cooperativo de los dos aditivos es bastante complejo. De hecho, la curvatura observada en el sistema modelo fue más pronunciada para la PEGilación de Relaxina y FGF21. Los datos y las tendencias de FGF21 se muestran en la Figura 19. Las anilinas *o*- y *m*-fenilendiamina eran buenos aditivos cuando se usaban en la PEGilación de FGF21. Curiosamente, un gráfico de la concentración final de proteína restante frente a los equivalentes totales y la relación amina: PABH proporcionó resultados completamente diferentes. La única diferencia estructural entre estos dos aditivos es la orientación de los grupos amino.

Como el eje z es la concentración final de FGF21 en la mezcla de reacción, las condiciones ideales tendrán el valor del eje z más bajo en el gráfico. Para un proceso robusto que puede permitir pequeñas diferencias en las cargas de reactivo, una gráfico plano o un gráfico con un valle o pozo es ideal. Un aditivo que cumplió con esta premisa es el ácido 3,5-diaminobenzoico (Figura 20).

Cuando se usa en la PEGilación de Relaxina, el ácido 3,5-diaminobenzoico también produjo altas conversiones en tiempos de reacción razonables. La comparación de las Figuras 20 (izquierda y derecha) demuestra que el aumento de las conversiones también está vinculado a la identidad de la proteína.

Ejemplo 5

Uso de sales de amonio simples

En vista del efecto beneficioso de los aditivos de amina a pH 4, los presentes inventores estimaron que las sales de amonio simples también podrían mejorar la PEGilación de la relaxina. A fin de conseguir esto, se realizaron una serie de experimentos con cantidades variables de PABH y NH₄OAc o NH₄Cl que revelaron la superioridad de la combinación de 60 equiv de PABH y 120 equiv de NH₄Cl para producir la mejor conversión observada hasta ahora a las 10 h (97%, Tabla 8). Curiosamente, el reexamen de la reacción del dipéptido modelo en presencia de NH₄Cl proporcionó un perfil idéntico al perfil observado sin NH₄Cl, sugiriendo que el efecto del NH₄Cl puede estar asociado a cambios en la estructura de la Relaxina. De hecho, la adición de reactivos caotrópicos conocidos como urea o (NH₄)₂SO₄ proporcionó resultados comparables (Figura 21). El efecto positivo del NH₄Cl parece generalizado y reaparece en la PEGilación de Relaxina sin aditivo de hidrazida o en presencia de acetilhidrazida (Figura 22).

Tabla 8
Conversiones para el cribado de cantidades de aditivos y sales de amonio simples

Reacción	Aditivo	Sal	Conversión (10 h)
1	30 equiv de pNHPHidrazida	60 equiv de NH ₄ OAc	90 %
2	30 equiv de pNHPHidrazida	120 equiv de NH ₄ OAc	94 % (x3)
3	60 equiv de pNHPHidrazida	60 equiv de NH ₄ OAc	95 %
4	60 equiv de pNHPHidrazida	120 equiv de NH ₄ OAc	92 %
5	60 equiv de pNHPHidrazida	120 equiv de NH ₄ Cl	97 %
6	30 equiv de pNHPHidrazida	60 equiv de NH ₄ Cl	95 %

Estudios espectroscópicos que buscan un mejor conocimiento de los orígenes del NH₄Cl sugirió que la sal modifica la conformación de la Relaxina en solución. Si bien el análisis espectroscópico UV no pudo detectar variaciones en la absorbancia de los restos aromáticos (260-290 nm) tras la adición de 120 equiv de NH₄Cl (Figura 23), la espectroscopia IR indicó la existencia de modificaciones estructurales en el enlace H de la banda amida II (Figura 24). Presumiblemente, el fallo del análisis UV para detectar cambios en los restos aromáticos se puede rastrear hasta la ubicación distal de los aminoácidos Tyr (Y), Phe (F) y Trp (W) en relaxina, que expone en gran medida los restos al disolvente y carece de interacciones intramoleculares significativas.

Las modificaciones sutiles en la estructura de Relaxina encontraron más apoyo en estudios espectroscópicos de ¹⁵N RMN HSQC consistentes con el plegamiento de proteínas que van a un mayor porcentaje de hélice aleatoria al agregar NH₄Cl (Figura 25) y las investigaciones con CD UV cercano que mostraron pequeñas diferencias en la región de

huellas dactilares de la estructura terciaria de relaxina posiblemente debido a cambios en la interfaz de dimerización (Figura 26).

Ejemplo 6

Procedimiento y resultados típicos

Basándose en los estudios informados en este memorando, se recomendó el uso de la combinación de PABH y NH_4Cl a mayor escala. Los resultados de diversos sistemas de proteínas se dan en la siguiente tabla.

Tabla 9

Proteína/PEG-OA	Condiciones ¹	Conversión (%)
Relaxina/PEG-OA de 20 kDa	30 equiv de PABH, 120 equiv de NH_4Cl , 20 °C	94
Relaxina/dPEG36-OA	30 equiv de PABH, 30 °C	90
FGF21 G1 / PEG-OA de 30 kDa	30 equiv de PABH, 120 equiv de NH_4Cl , 20 °C	88
FGF21 G2 / PEG-OA de 30 kDa	30 equiv de PABH, 120 equiv de NH_4Cl , 20 °C	98

¹Condiciones: 1,2 equivalentes de reactivo PEG-OA, 20 °C a menos que se indique lo contrario. Las conversiones se determinaron mediante un ensayo de HPLC después de un tiempo de reacción de 18-24 h.

Una consideración al usar PABH en reacciones de PEGilación es que la pureza de los reactivos disponibles comercialmente no es igual entre los proveedores. El uso de PABH al 98 % a gran escala dio como resultado un pico de impureza que coeluyó con el producto deseado durante la cromatografía. El aislamiento de estas impurezas confirmó que sus estructuras eran las impurezas de hidrazida y amida presentes en el PABH (Figura 27).

Debido a los altos equivalentes utilizados en la reacción, incluso las impurezas de bajo nivel en este reactivo pueden tener un impacto. Por lo tanto, se recomienda buscar el PABH de la más alta calidad disponible.

Ejemplo 7

Procedimiento de cribado típico

El uso de los aditivos es funcionalmente sencillo. La PEGilación de FGF21 G1 con PEG-OA de 30 kDa se da como ejemplo representativo.

Tabla 10

Reactivos y sus concentraciones				
Artículos	Amt (mg)	Vol(ml)	PM	μmol
Solución de FGF21	20,3	1,0	19585	1,04
PABH	4,7		151,17	31,2
NH_4Cl	6,7		53,49	125
PEG-OA de 30 kDa	39,0		31000	1,26

Procedimiento

Una solución de FGF21 (1,0 ml, 20,3 mg/ml, 1,04 μmol) en NaOAc 20 mM, urea 6M, con pH 4 se añadió a NH_4Cl sólida (6,7 mg, 124,8 μmol) en un vial limpio de 1,5 ml. La mezcla se agitó suavemente hasta que todo el sólido se disolvió. En un vial separado, se combinaron MPEG 30 kDa (39,0 mg, 1,26 μmol) y PABH (4,7 mg, 31,2 μmol). La solución de proteína del primer vial se transfirió al segundo vial que contenía el reactivo de PEGilación y PABH, y la mezcla se agitó suavemente hasta que los sólidos se disolvieron (aproximadamente 20 min). Se midió el pH y la mezcla se ajustó a pH 4 usando HCl 0,1 M si era necesario.

La mezcla de reacción típica son soluciones homogéneas, por tanto, la solución de reacción se mantuvo a 20-25 °C sin agitar. El progreso de la reacción se controla mediante HPLC usando ELS o detección UV a 280 nm. La finalización de la reacción se evalúa mediante análisis de HPLC frente a un estándar externo.

Ejemplo 8

Comparación de las condiciones de pegilación

El objetivo final de esta iniciativa fue demostrar la utilidad de este nuevo procedimiento de PEGilación frente a los procedimientos vigentes en el momento del inicio del proyecto, así como las condiciones del "estado de la técnica" en la bibliografía. Esto es principalmente para cuantificar los ahorros en los costosos reactivos de PEGilación disponibles

mediante el uso de las combinaciones de aditivos recomendadas. La Tabla 11 incluye las condiciones originales utilizadas para las PEGilaciones de Relaxina y FGF21 G1 así como las PEGilaciones mediadas por el aditivo PABH.

Tabla 11

Comparación de las condiciones de PEGilación con énfasis en los posibles ahorros de costos							
Proteína	PEG	PEG (equiv)	T (°C)	PABH (equiv)	NH ₄ Cl (equiv)	Conv (%)	Notas
Relaxina	PEG-OA de 20 kDa	1,5	50	ND	ND	96	Condiciones originales.
Proteína	PEG	PEG (equiv)	T (°C)	PABH (equiv)	NH ₄ Cl (equiv)	Conv (%)	Notas
Relaxina	PEG-OA de 20 kDa	1,2	20	30	120	94	Reducción del 20% en PEG con rendimiento similar.
FGF21 G1	PEG-OA de 30 kDa	2,5	20	ND	ND	75	Condiciones originales.
FGF21 G1	PEG-OA de 30 kDa	1,2	20	30	120	88	58% de reducción en PEG más 13% de aumento en el rendimiento.

La posible reducción en el costo del compuesto de relaxina está puramente relacionada con la cantidad de reactivo PEG de 20 kDa usado, ya que las conversiones y rendimientos de ambos procesos es comparable. Sin embargo, para la PEGilación del activo FGF21 de primera generación, el ahorro es bastante espectacular. Más del 50% de reducción en la carga de PEG combinada con un aumento del 13% en el rendimiento de la reacción da como resultado una reducción general del 70% en el coste asociado con su producción. Como los costes de PABH y NH₄Cl son extremadamente bajos en relación con los reactivos de PEGilación, su uso contribuye mínimamente al coste total de producción. En la siguiente tabla, los presentes inventores comparan las condiciones de PABH con las que usan acetilhidrazida.

Tabla 12

Resumen de los resultados de la PEGilación de diversos sistemas de proteínas y comparación con acetilhidrazida		
Proteína	Condiciones ¹	Conversión (%)
Relaxina G1	² Sin aditivos, 50 °C	97
	² Sin aditivos, 20 °C	75
	² 30 equiv AcNHNH ₂ , sin coaditivo, 20 °C	90
	30 equiv de PABH, sin coaditivo, 20 °C	86
	30 equiv de PABH, 120 equiv de NH ₄ Cl, 20 °C	94
Relaxina G2	Sin aditivos, 40 °C	70
	Sin aditivos, 30 °C	70
	30 equiv de AcNHNH ₂ , sin coaditivo, 30 °C	80
	30 equiv de PABH, sin coaditivo, 30 °C	95
	30 equiv de PABH, NH ₄ Cl, 30 °C	90
FGF21 G1	Sin aditivos, 20 °C	53
	30 equiv de AcNHNH ₂ , sin coaditivo, 20 °C	80
	30 equiv de AcNHNH ₂ , 120 equiv de NH ₄ Cl	82
	30 equiv de PABH, 120 equiv de NH ₄ Cl, 20 °C	88
FGF21 G2	30 equiv de PABH, 120 equiv de NH ₄ Cl, 20 °C	98

¹Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando 1,2 equiv de reactivo de PEGilación, sin agitar a 20 °C. ²Las reacciones se realizaron utilizando 1,5 equiv de reactivo de PEGilación.

Algunas de las ventajas del sistema de aditivos en la presente divulgación se enumeran a continuación:

- 1) Promoción de conversiones más altas con cantidades considerablemente más bajas de reactivo de PEGilación (1,2 equiv en relación con 1,5-2,5 equiv), que es extremadamente caro. La siguiente tabla proporciona una comparación que destaca las mejoras con respecto al método anterior (condiciones estándar).

Molécula	Condiciones estándar	Conversión	Condiciones con aditivos	Conversión con aditivos
Relaxina	1,5 equiv de PEG 50 °C, 48 h	96 %	1,2 equiv de PEG 60 equiv de <i>p</i> -NHBzNHNH ₂ 120 equiv de NH ₄ Cl 20 °C, 10 h	96 %
FGF21	2,5 equiv de PEG Urea 6M 20 °C, 24 h	75 %	1,2 equiv de PEG 30 equiv de <i>p</i> -NHBzNHNH ₂ 120 equiv de NH ₄ Cl 20 °C, 24 h	82 %
FGF21-GEN2	1,6 equiv de PEG 30 equiv de AcNHNH ₂ 20 °C, 24 h	88 %	1,2 equiv de PEG 60 equiv de <i>p</i> -NHBzNHNH ₂ 120 equiv de NH ₄ Cl 20 °C, 24 h	89 %

La combinación de dos aditivos aumenta enormemente la velocidad de reacción y las conversiones, y permite una reducción drástica de la carga de PEG en comparación con las condiciones originales.

5

1) Promoción de reacciones más rápidas que eviten la necesidad de temperaturas de reacción elevadas. Evitar las altas temperaturas disminuye las preocupaciones asociadas sobre la modificación estructural de la proteína y la estabilidad en la reacción.

10

2) Sustitución de acetilhidrazida (Ames positivo) por PABH (Ames negativo en estudios preliminares). Elimina el uso de un material genotóxico y controles asociados en el producto final.

Composiciones farmacéuticas

15

Las proteínas PEGiladas preparadas de acuerdo con la presente divulgación pueden volverse adecuadas para inyección mediante mezcla o combinación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable adicional mediante métodos conocidos en la técnica. Entre los vehículos farmacéuticamente aceptables para formular los productos de la divulgación se encuentran la solución salina, albúmina de suero humano, proteínas plasmáticas humanas, etc. La divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado tal como se describió anteriormente y un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de líquidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Los conjugados de proteína preparados de acuerdo con la presente divulgación se pueden formular en composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable mediante métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, los documentos WO 97/09996, WO 97/40850, WO 98/58660 y WO 99/07401.

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de aditivos mejorado para la reacción de PEGilación de proteínas, comprendiendo dicho sistema hidrazida *p*-aminobenzoica en combinación con una amina aromática o una sal de amonio, en donde dicha amina aromática se selecciona de un grupo que consiste en ácido 3,5-diaminobenzoico, *o*-fenilendiamina, 1-piridin-2-il-etilamina, 2-(dimetilamino)etilhidrazina, *m*-fenilendiamina y 2-picolilamina, y en donde dicha sal de amonio se selecciona de un grupo que consiste en acetato de amonio y cloruro de amonio.
2. El sistema de la reivindicación 1, en donde la combinación del sistema incluye hidrazida *p*-aminobenzoica con ácido 3,5-diaminobenzoico o hidrazida *p*-aminobenzoica con cloruro de amonio.
3. El sistema de la reivindicación 1, en donde dicha reacción es una reacción de conjugación entre una proteína que contiene un resto de *p*-acetilfenilalanina y un compuesto aminoxi-PEG.
4. El sistema de la reivindicación 3, en donde el sistema de aditivos aumenta las velocidades de reacción de conjugación, proporciona un alto rendimiento de producto conjugado y facilita la reducción de los equivalentes de aminoxi-PEG necesarios para completar la reacción de conjugación.
5. El uso de un sistema de aditivos mejorado para la reacción de PEGilación de proteínas por formación de cetoxima, comprendiendo dicho sistema hidrazida *p*-aminobenzoica sola o en combinación con aminas aromáticas o sales de amonio.
6. El uso de la reivindicación 5, en donde dicha amina aromática se selecciona de un grupo que consiste en ácido 3,5-diaminobenzoico, *o*-fenilendiamina, 1-piridin-2-il-etilamina, 2-(dimetilamino)etilhidrazina, *m*-fenilendiamina y 2-picolilamina.
7. El uso de la reivindicación 5, en donde dicha sal de amonio se selecciona de un grupo que consiste en acetato de amonio y cloruro de amonio.
8. El uso de la reivindicación 5, en donde el sistema incluye hidrazida *p*-aminobenzoica con ácido 3,5-diaminobenzoico o hidrazida *p*-aminobenzoica con cloruro de amonio.
9. El uso de la reivindicación 5, en donde dicha reacción es una reacción de conjugación entre proteínas que contienen un resto de *p*-acetilfenilalanina y un compuesto aminoxi-PEG.
10. El uso de la reivindicación 9, en donde el sistema de aditivos aumenta las velocidades de reacción de conjugación, proporciona un alto rendimiento de producto conjugado y facilita la reducción de los equivalentes de aminoxi-PEG necesarios para completar la reacción de conjugación.
11. Un proceso para obtener proteína PEGilada, comprendiendo dicho proceso las etapas de:
 - (a) identificar una proteína, reactivo PEG y un sistema de aditivos;
 - (b) solubilizar la proteína seguido de combinar la proteína con el reactivo PEG en presencia del sistema aditivo,
 - (c) hacer reaccionar la proteína con el reactivo PEG para obtener proteína PEGilada con alto rendimiento,en donde dicho sistema de aditivos incluye hidrazida *p*-aminobenzoica y en donde dicho reactivo de PEG se selecciona de un grupo que consiste en PEG-oxiamina y otros derivados de PEG con un grupo aminoxi.
12. El proceso de la reivindicación 11, en donde dicha proteína lleva un resto de *p*-acetilfenilalanina.
13. El proceso de la reivindicación 11, en donde dicha proteína es relaxina o FGF21 que contiene un resto de *p*-acetilfenilalanina.
14. El proceso de la reivindicación 11, en donde la proteína solubilizada combinada con el reactivo PEG en presencia del sistema de aditivos se mantiene a un pH de aproximadamente 4.
15. El proceso de la reivindicación 11, en donde la proteína solubilizada combinada con el reactivo de PEG en presencia del sistema de aditivos se mantiene a una temperatura que varía de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C.
16. El proceso de la reivindicación 11, en donde dicho sistema de aditivos incluye hidrazida *p*-aminobenzoica en combinación con una amina aromática, tal como el ácido 3,5-diaminobenzoico o una sal de amonio, tales como acetato de amonio o cloruro de amonio.
17. El proceso de la reivindicación 11, en donde dicho sistema de aditivos incluye además cloruro de amonio.

Mecanismo general para la formación de cetoxima

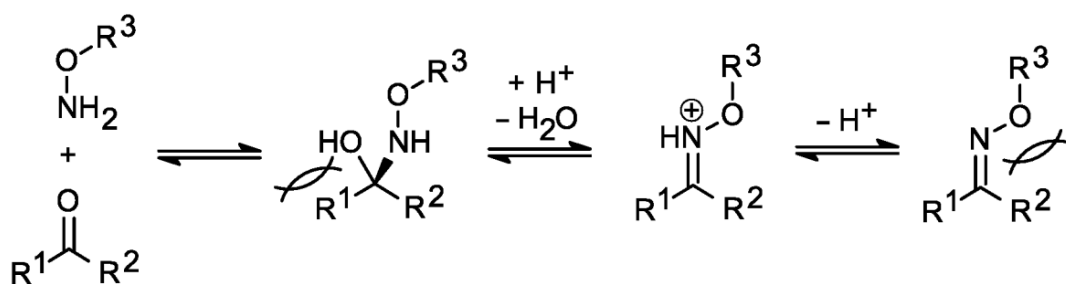
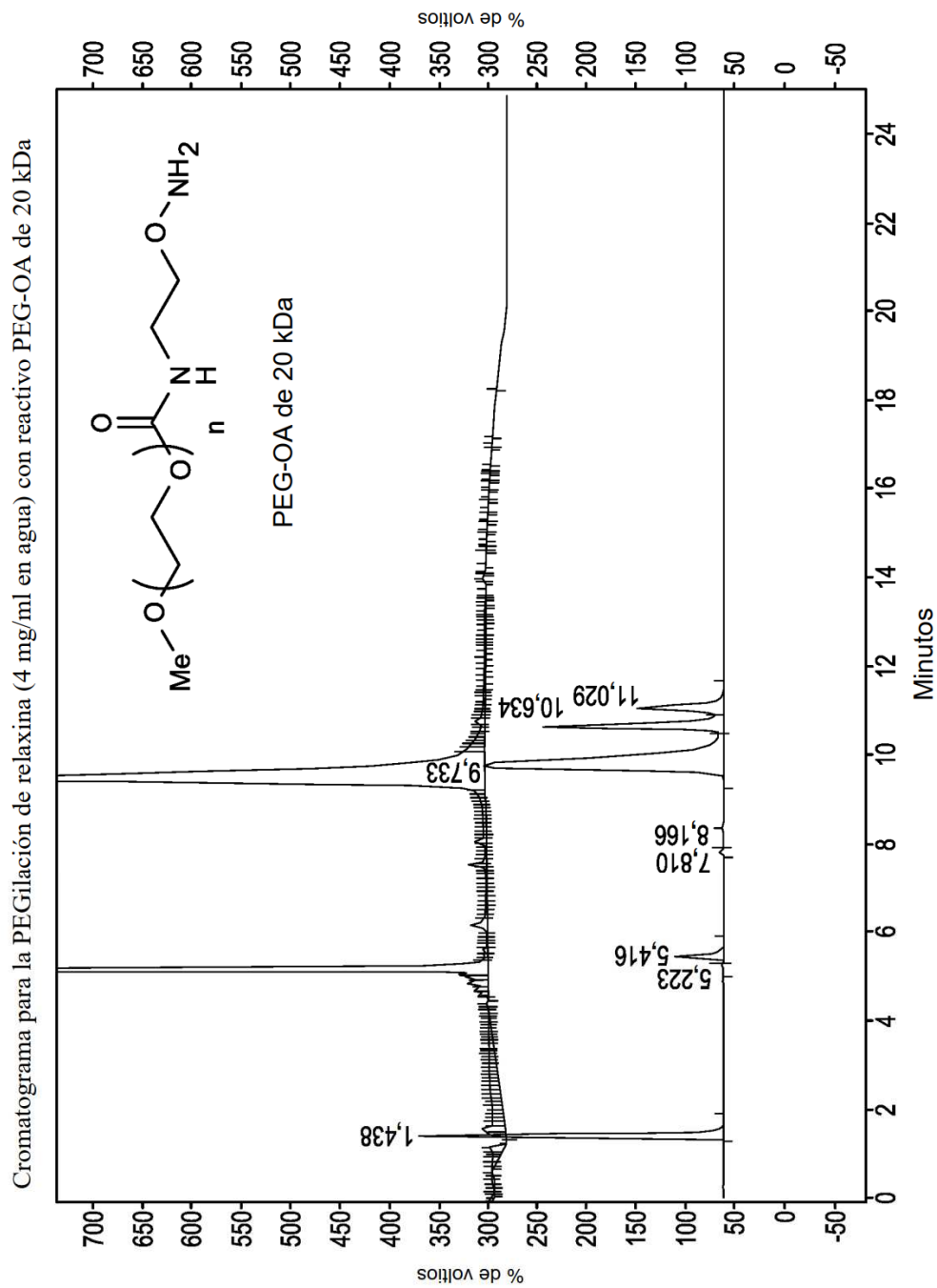


FIG. 1

**FIG. 2**

Evolución temporal para la descomposición de PEG-OA de 20 kDa en agua cuando se expone a una corriente continua de aire

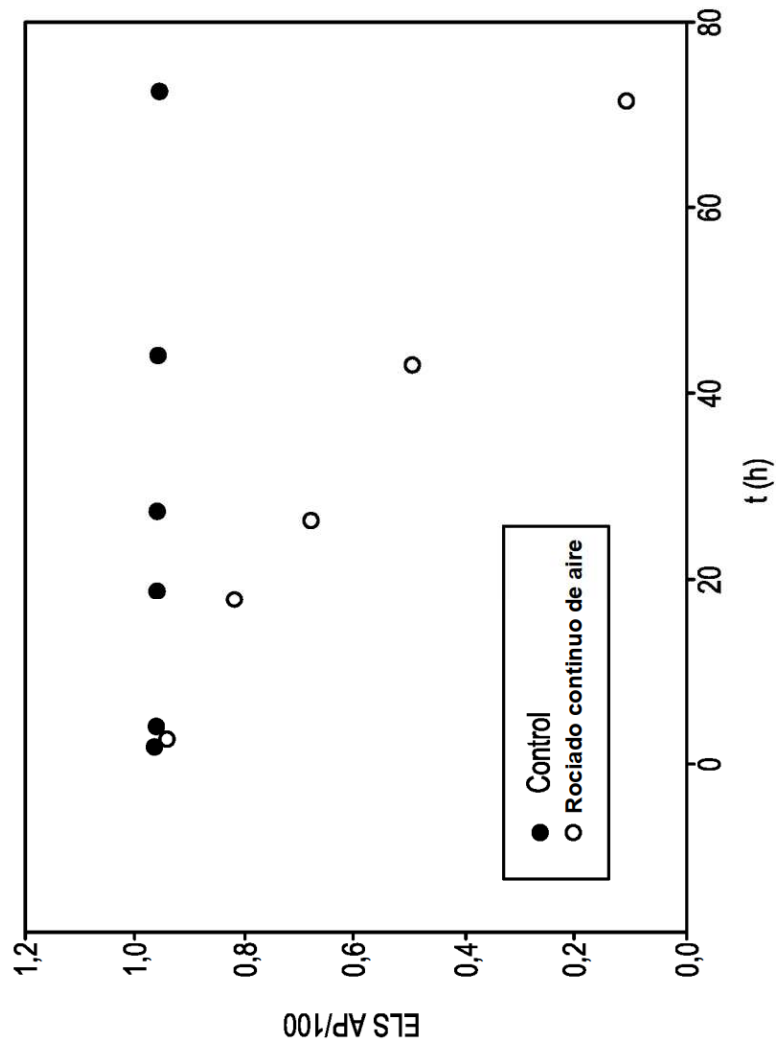


FIG. 3

Estudio de acetyl hidrazida usando los espectros de IR *in situ* y ^1H RMN

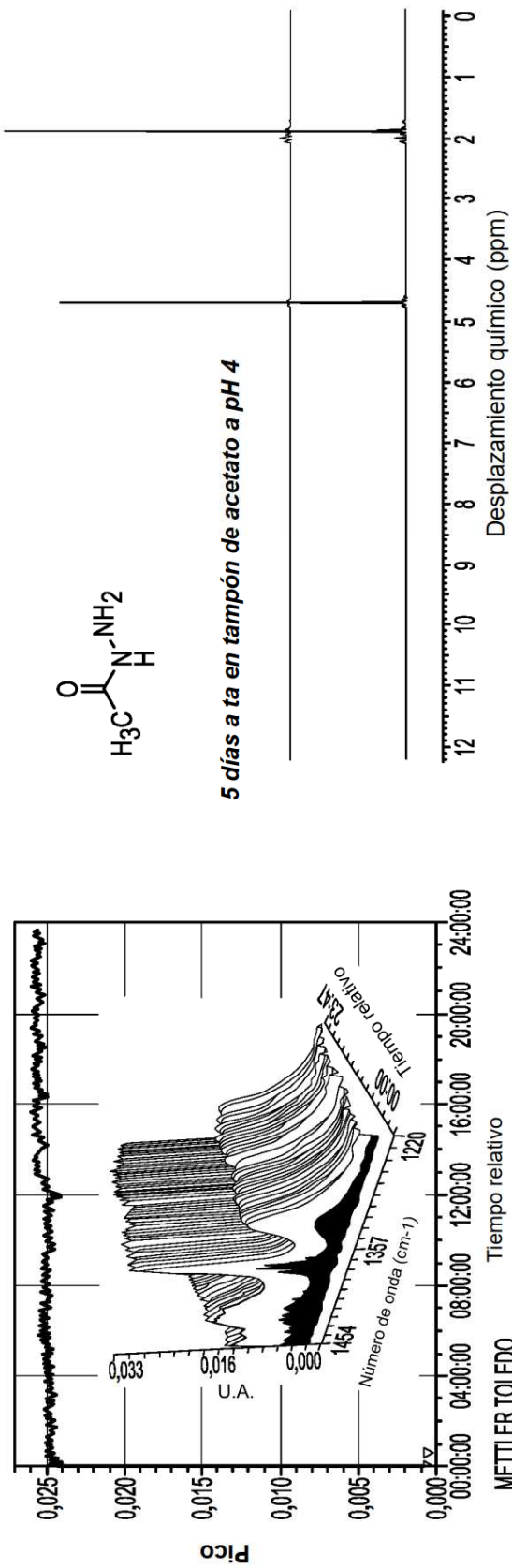


FIG. 4

Modelo de reacción para el cribado de aditivos. Condiciones de la reacción: 1 (3,6 mmol) y 2 (3,6 mmol) en 1,0 ml de tampón de acetato (20 mM, pH 4,0) a temperatura ambiente (23 °C).

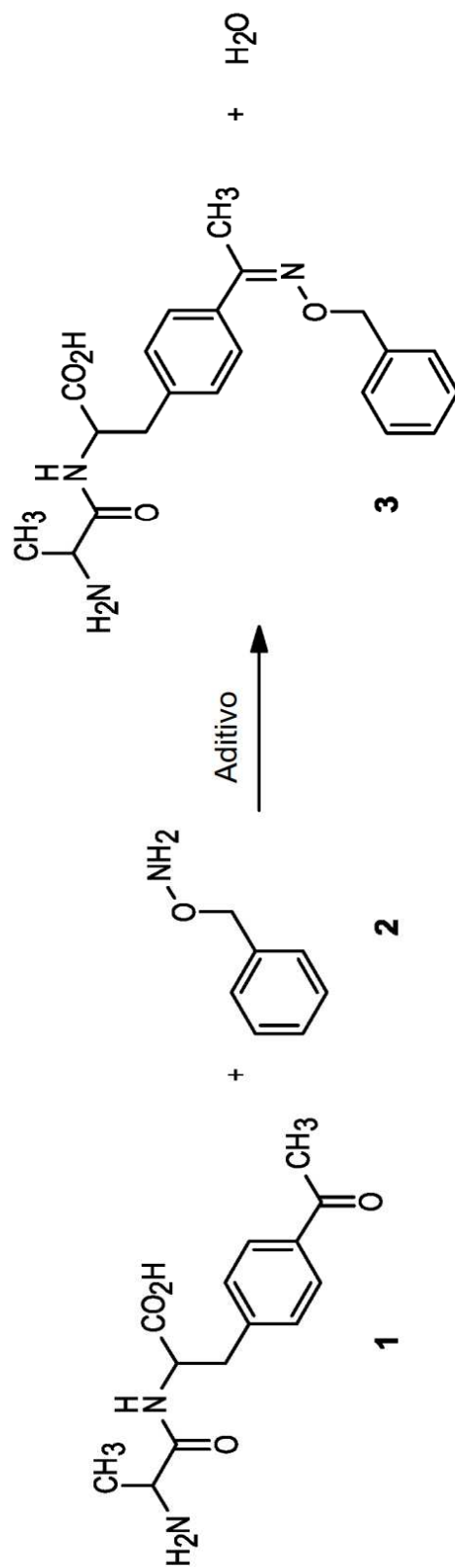


FIG. 5

Velocidades relativas (k_{rel}) observadas para diferentes aditivos. La acetil hidrazida ($k_{rel} \approx 2$) se muestra en un recuadro.

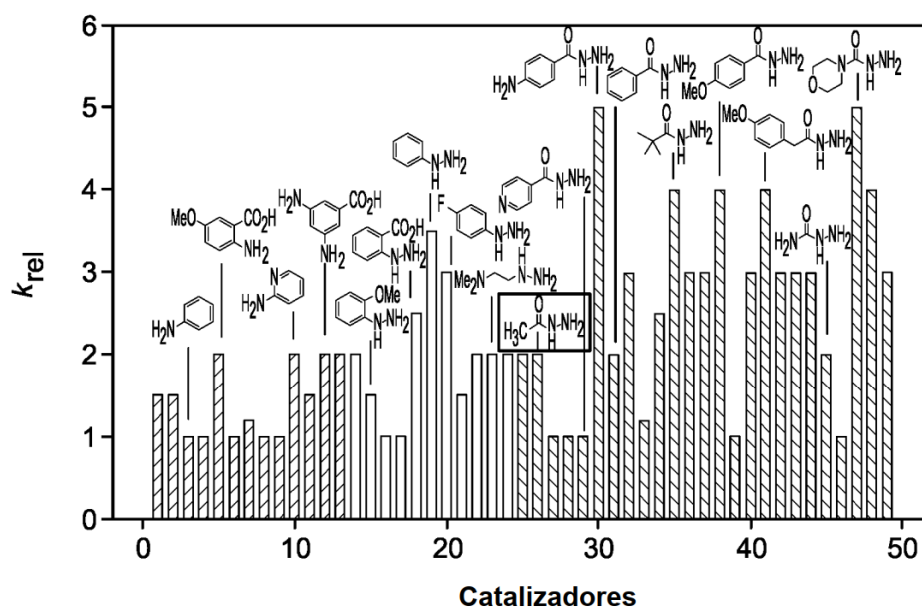
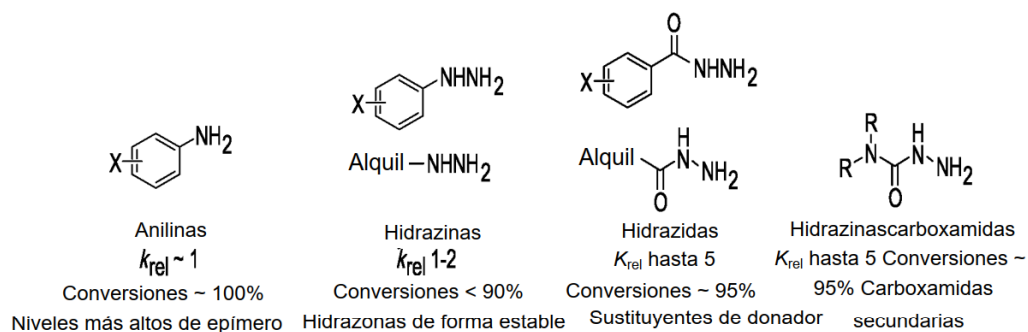
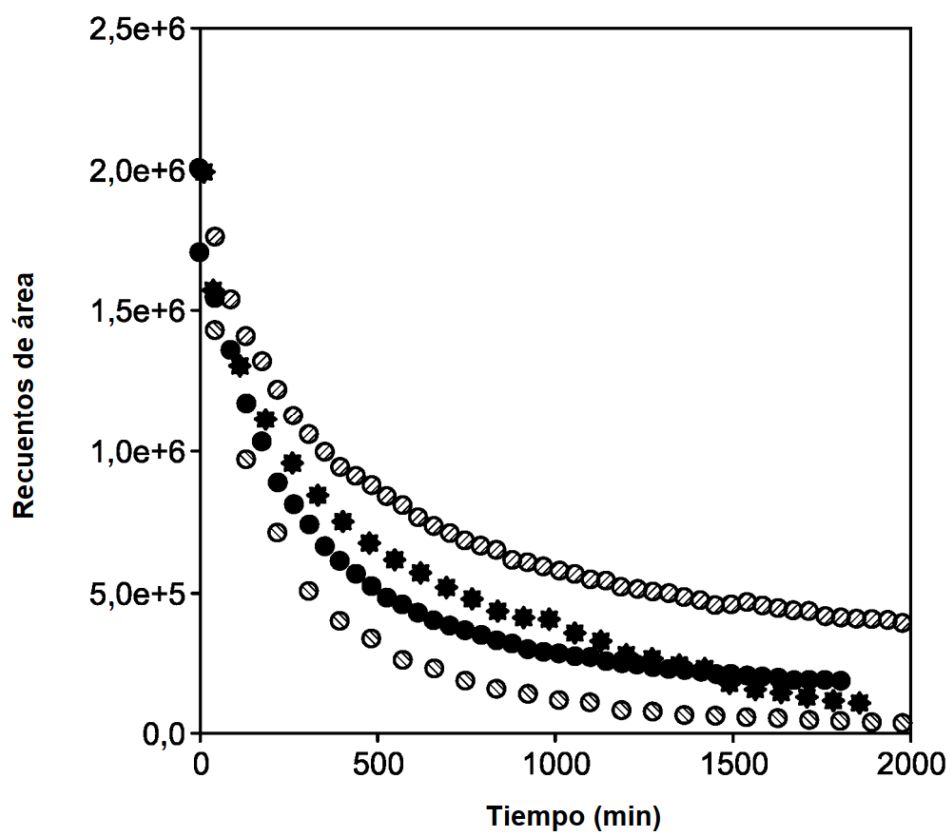
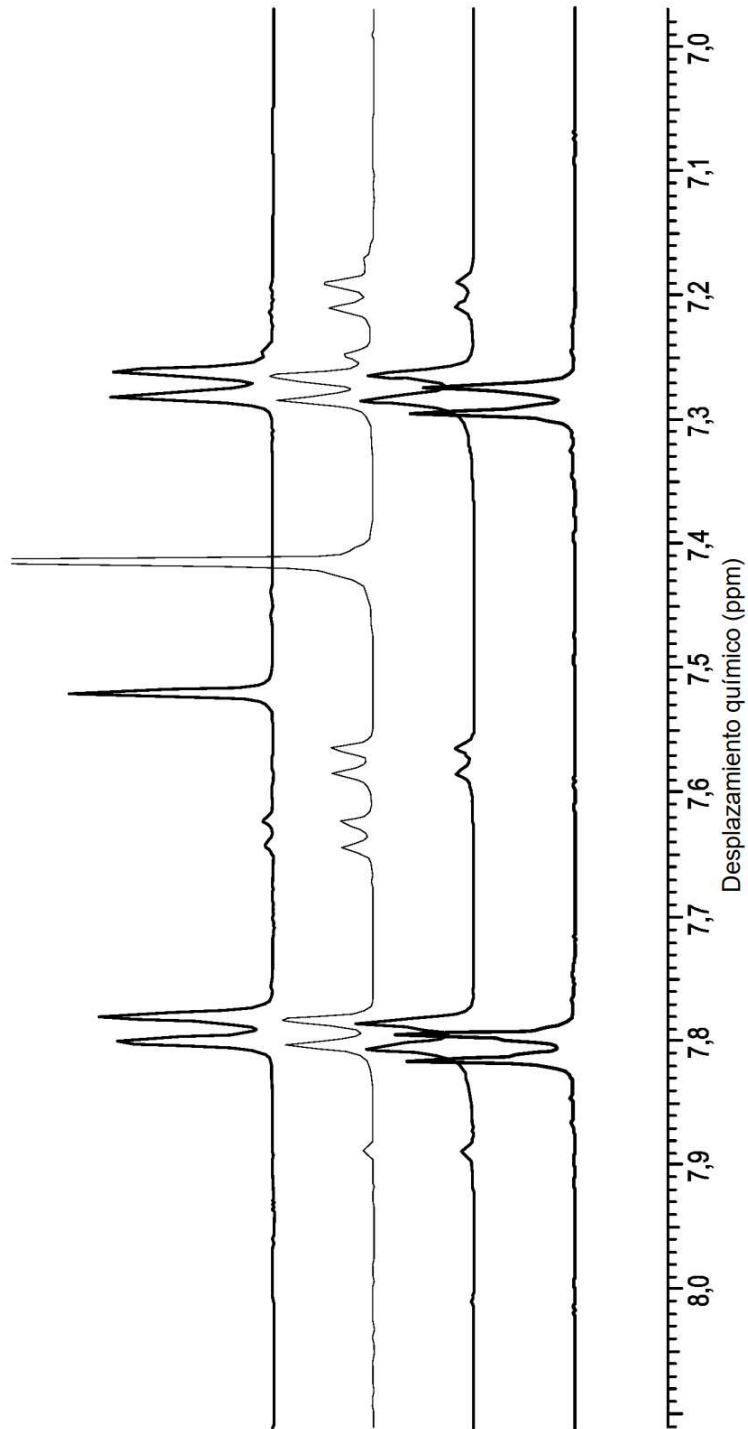


FIG. 6

Evolución temporal para la reacción de dipéptido 1 con *O*-bencilhidroxilamina (2) en presencia de (a) 1 equiv de pirazolamina (rojo); (b) 1 equiv de MCH (azul); (c) 1 equiv de pirazolamina y 1 equiv de MCH (verde). El perfil de reacción obtenido en ausencia de aditivos se muestra en gris.

**FIG. 7**

Región aromática de los espectros de ^1H RMN de muestras que contienen dipéptido 1 (a) (azul); con (b) 1 equiv de MCH (verde); (c) 1 equiv de MCH, y 1 equiv de pirazolamina (gris); (d) 1 equiv de pirazolamina (rojo). El efecto sinérgico entre los aditivos de MCH y pirazolamina produce mezclas con mayor concentración de intermediarios activos en relación con las muestras que contienen solo un aditivo.

**FIG. 8**

Izquierda: PEGilación del dipéptido 1 con 30 equiv de PABH y 1,2 equiv de PEG-OA de 20 kDa; el intermediario de hidrazona se registra como los puntos verdes. Derecha: reacción de PEGilación en la que se añadió 1,2 equiv de reactivo de PEGilación después de equilibrar el dipéptido con 30 equiv de PABH toda la noche.

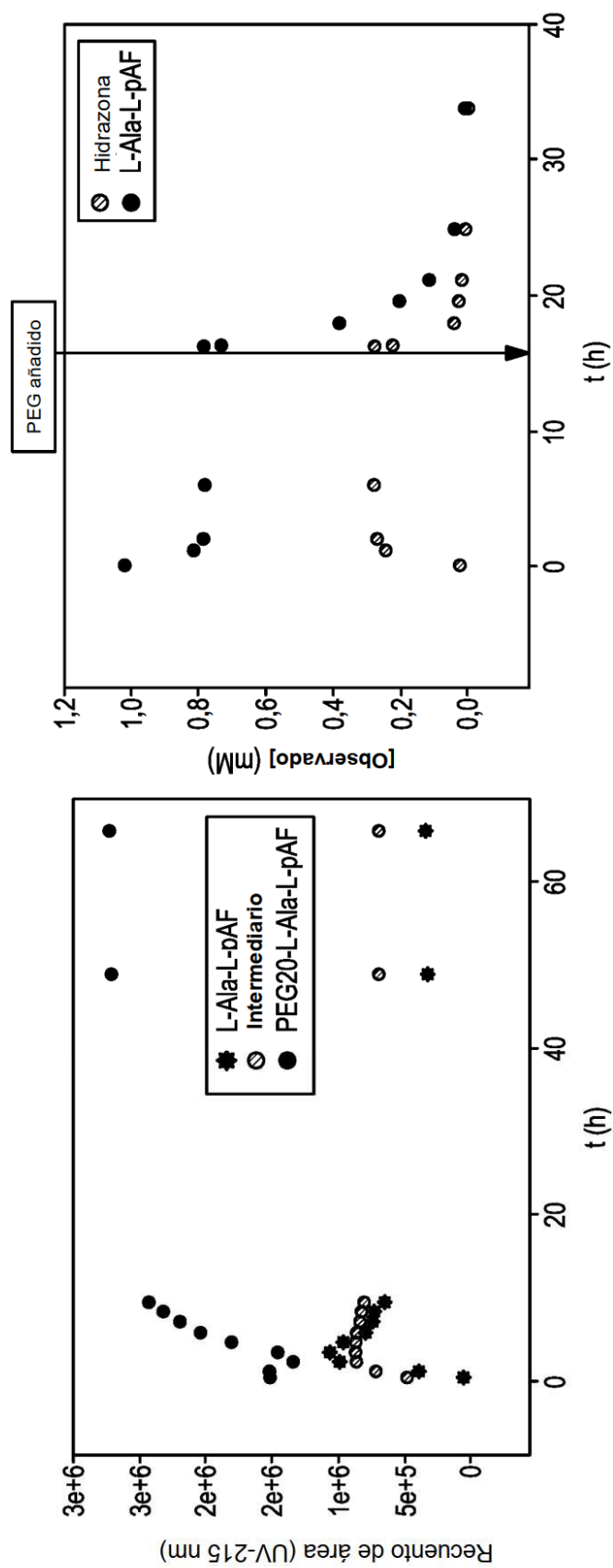


FIG. 9

Izquierda: Gráfico de la concentración de hidrazona frente a los equivalentes de PABH para la PEGilación del dipéptido 1; los puntos azules indican la mezcla de reacción en la que se omite la pirazolamina. Centro: Efecto de diferentes combinaciones de PABH y pirazolamina sobre las velocidades de reacción. Derecha: Concentración final del dipéptido 1 y su derivado de hidrazona en mezclas de reacción que contienen PABH y pirazolamina.

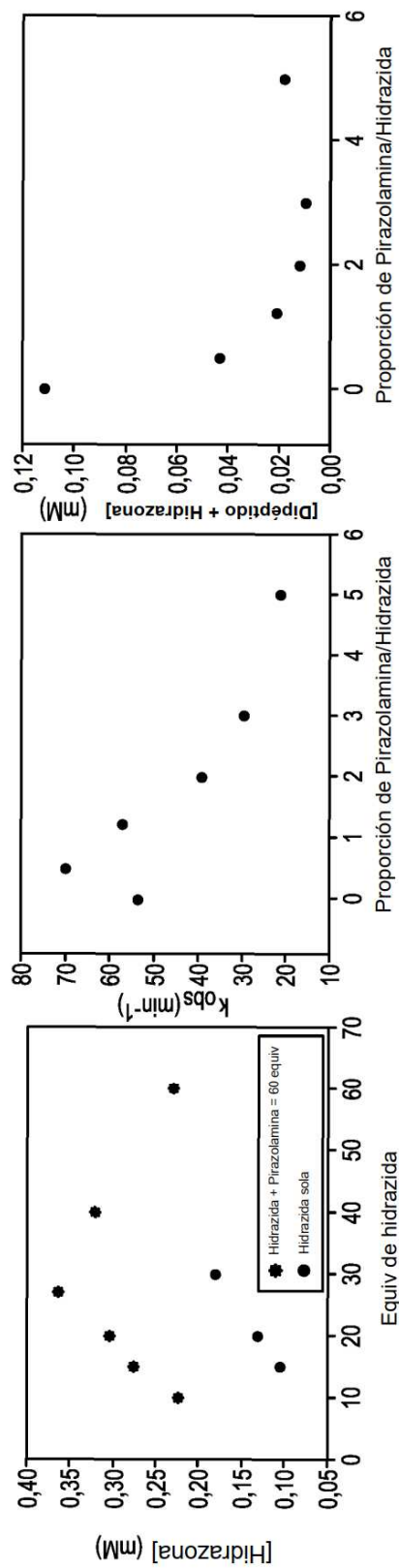


FIG. 10

Gráfico del dipéptido 1 remanente al final de la reacción, frente a los equivalentes totales de aditivos y proporción de pirazolamina: PABH.

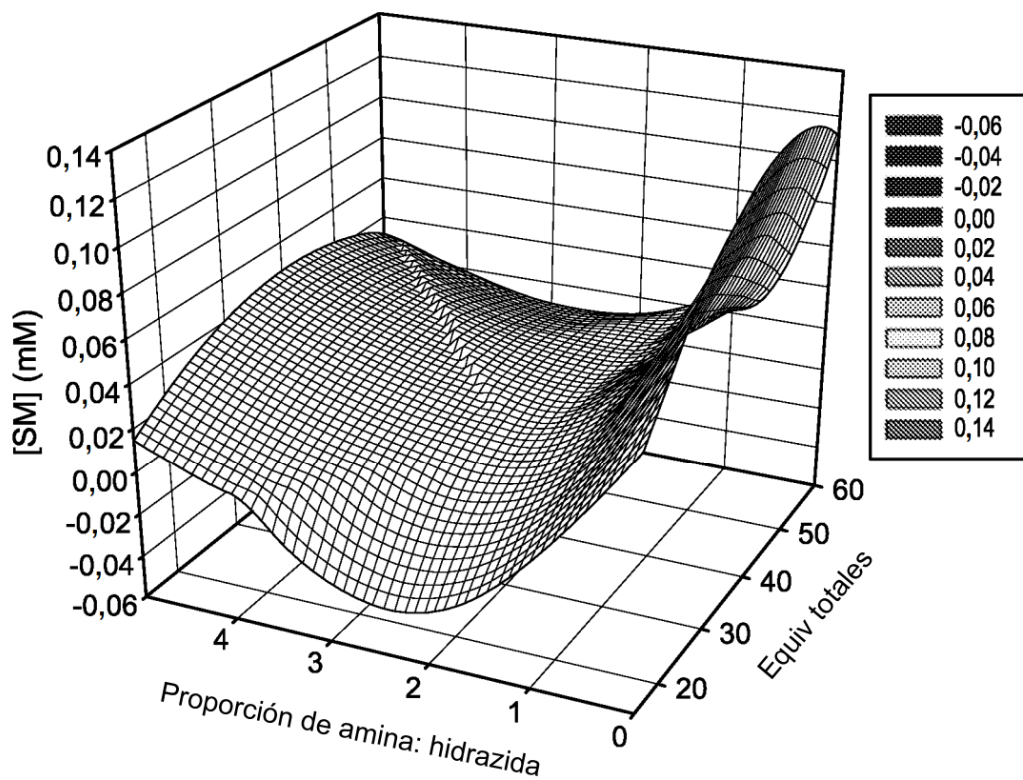


FIG. 11

Izquierda: Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,5 equiv) en presencia de (a) 30 equiv de acetil hidrazida (azul); (b) 30 equiv de MCH (rojo); el perfil de reacción obtenido en ausencia de aditivos se muestra en color gris. Centro: Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEG-OA (1,5 equiv) en presencia de (a) 30 equiv de pirazolamina (azul); (b) 30 equiv de MCH (rojo); (c) 10 equiv de MCH (morado); (d) 30 equiv de pirazolamina y 10 equiv de MCH (verde); (e) 30 equiv de MCH y 30 equiv de pirazolamina. Derecha: Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEG-OA (1,5 equiv) en presencia de 30 equiv de pirazolamina y 10 equiv de MCH a (a) 40 °C; (b) 10 °C; (c) 25 °C.

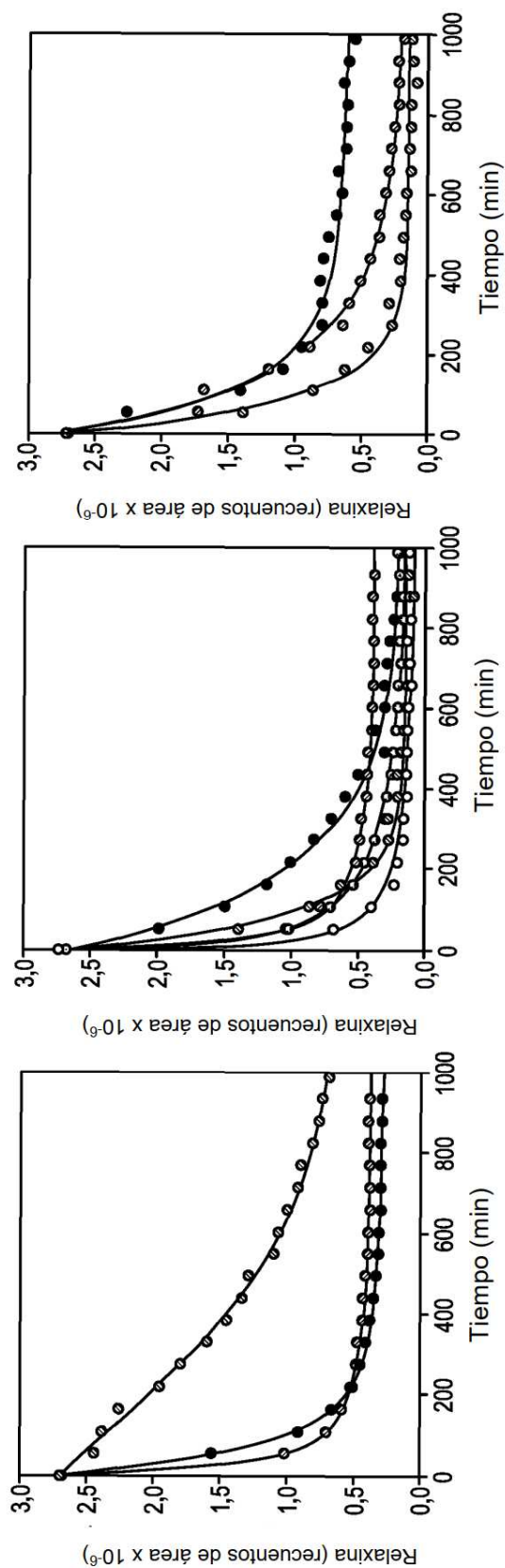


FIG. 12

Izquierda: Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,2 equiv) en presencia de (a) 30 equiv de MPCH y 30 equiv de pirazolamina (verde); 30 equiv de PH y 30 equiv de pirazolamina (azul); y (c) 30 equiv de MCH y 30 equiv de pirazolamina en urea 6M (rojo). Derecha: Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEG-OA (1,2 equiv) en presencia de (a) 30 equiv de PH y 60 equiv de pirazolamina (azul); (b) 30 equiv de acetil hidrazida y 60 equiv de pirazolamina (verde); y (c) 30 equiv de pirazolamina (rojo).

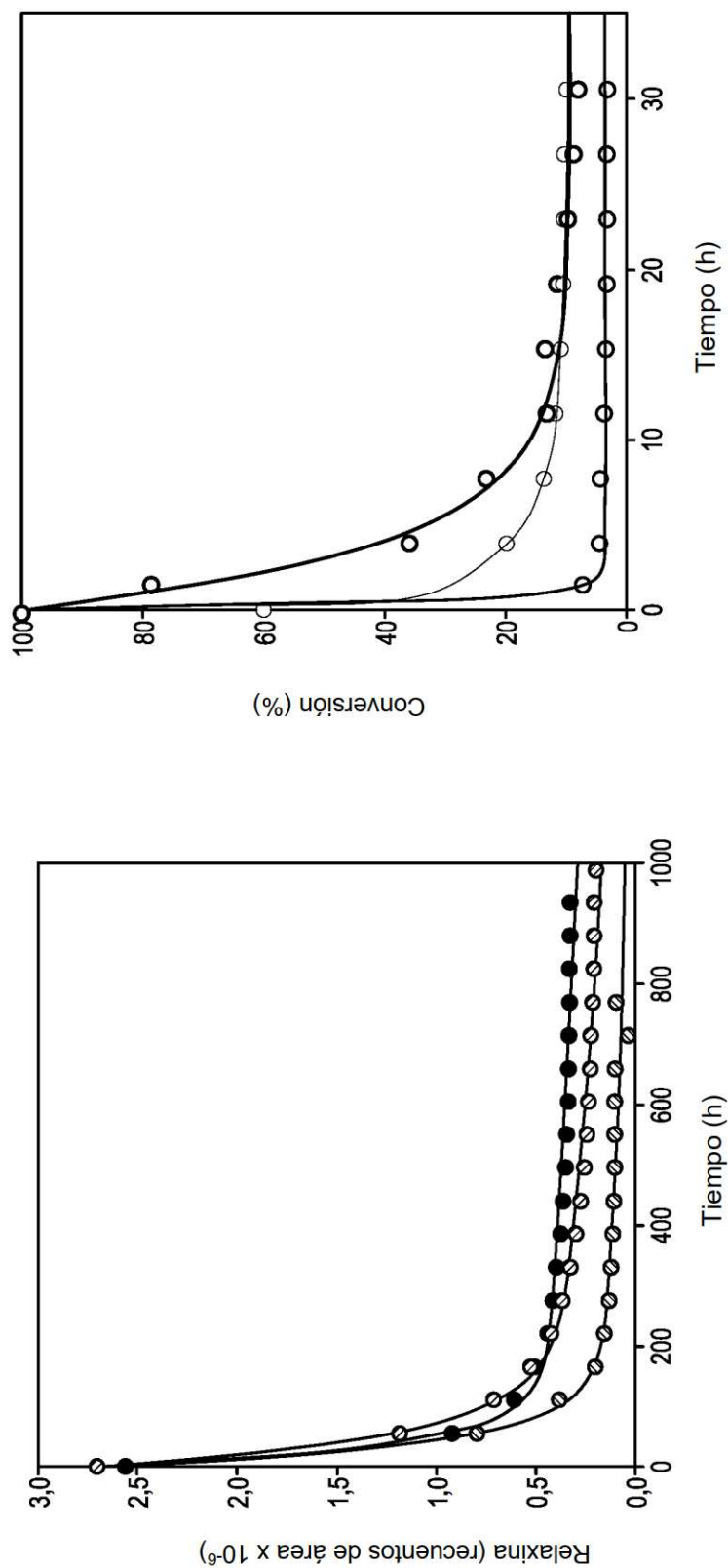


FIG. 13

Análisis HRMS de una PEGilación de relaxina acelerada por MCH en su punto final. El pico de oxima se solapa con el de relaxina residual. El retraso de 0.04 min para el pico de relaxina se debe al efecto de la matriz de reacción sobre el comportamiento más que a una impureza de la elución tardía.

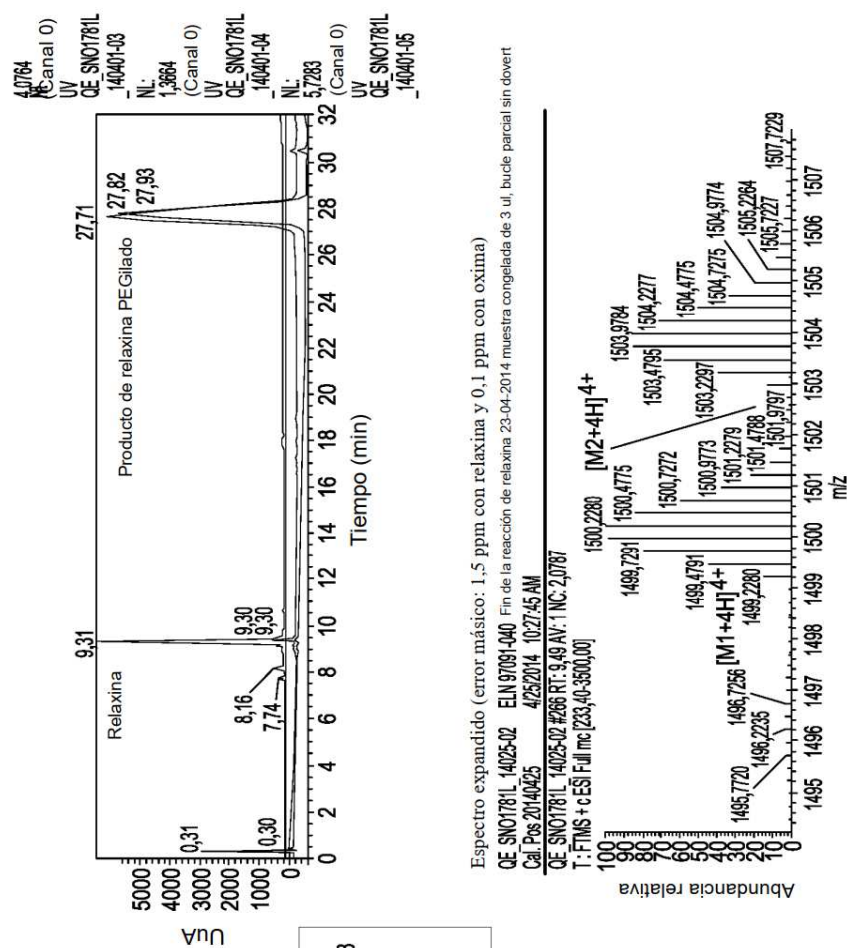
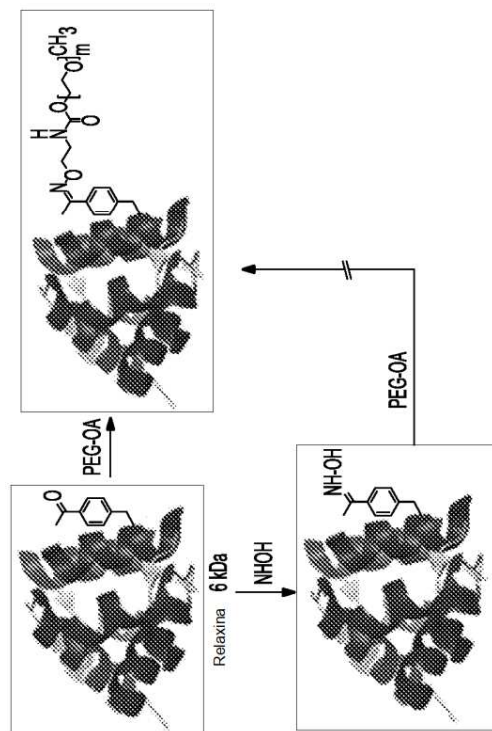


FIG. 14



Izquierda: Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,2 equiv) en presencia de urea 6M con (a) 30 equiv de MCH y 30 equiv de pirazolamina (rojo); (b) 30 equiv de MCH, 30 equiv de pirazolamina y 30 equiv de NH_2OH (azul). Derecha: Evolución temporal para el agotamiento de relaxina con PEG-OA (1,2 equiv) en presencia de urea 6 M con 30 equiv de MCH y 30 equiv de pirazolamina (azul); el pico de oxima (rojo) aumenta durante la reacción, lo que sugiere la formación paralela de hidroxilamina a partir de la descomposición de PEG-OA.

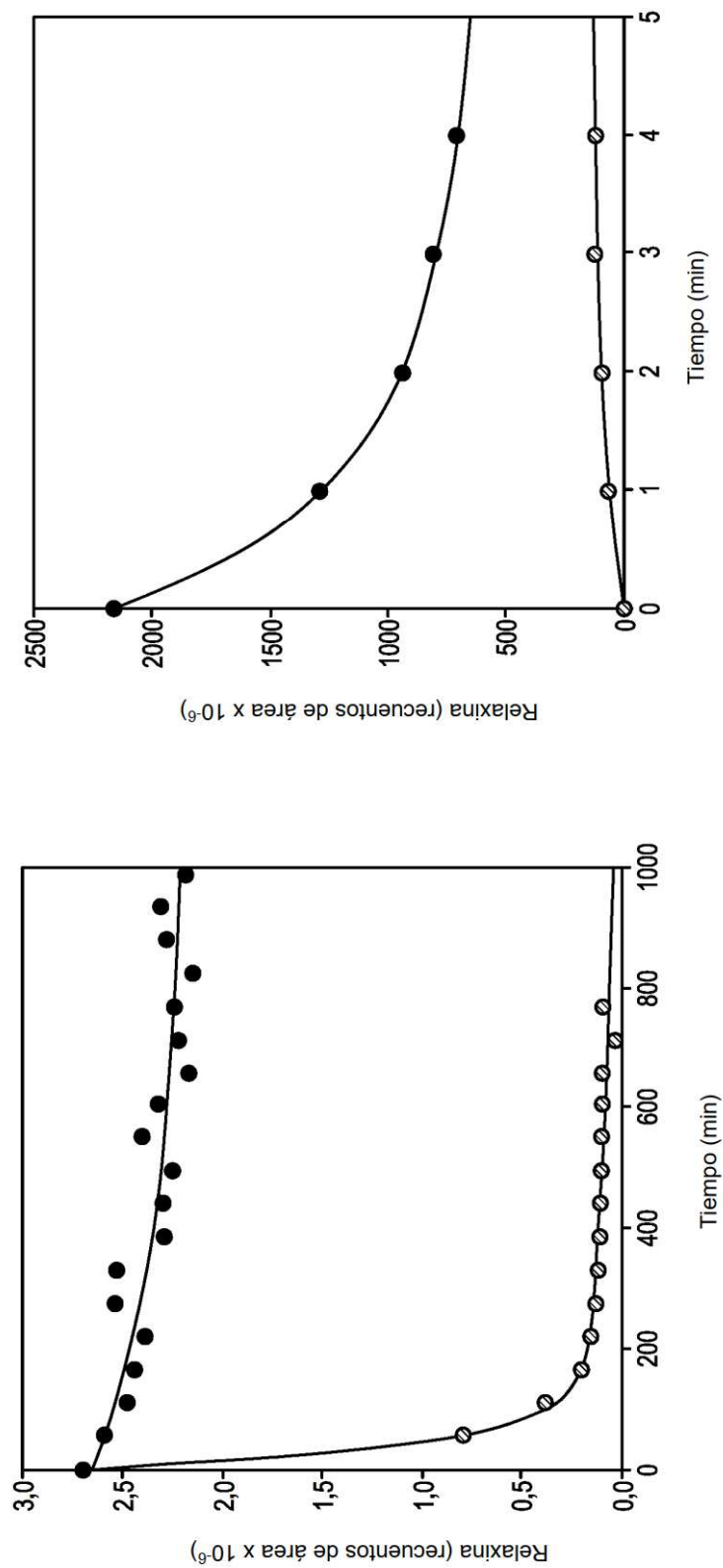


FIG. 15

Izquierda: Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,2 equiv) en presencia de 30 equiv de PABH y (a) 60 equiv de etilendiamina (gris); (b) 60 equiv de ácido 3,5-diaminobenzoico (verde); (c) 60 equiv de *m*-fenilendiamina (azul); y 60 equiv de pirazolamina (rojo). Derecha: Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEGOA (1,2 equiv) en presencia de (a) 30 equiv de PABH y 60 equiv de ácido 3,5-diaminobenzoico (verde); y (b) 60 equiv de PABH y 120 equiv de NH_4Cl (azul).

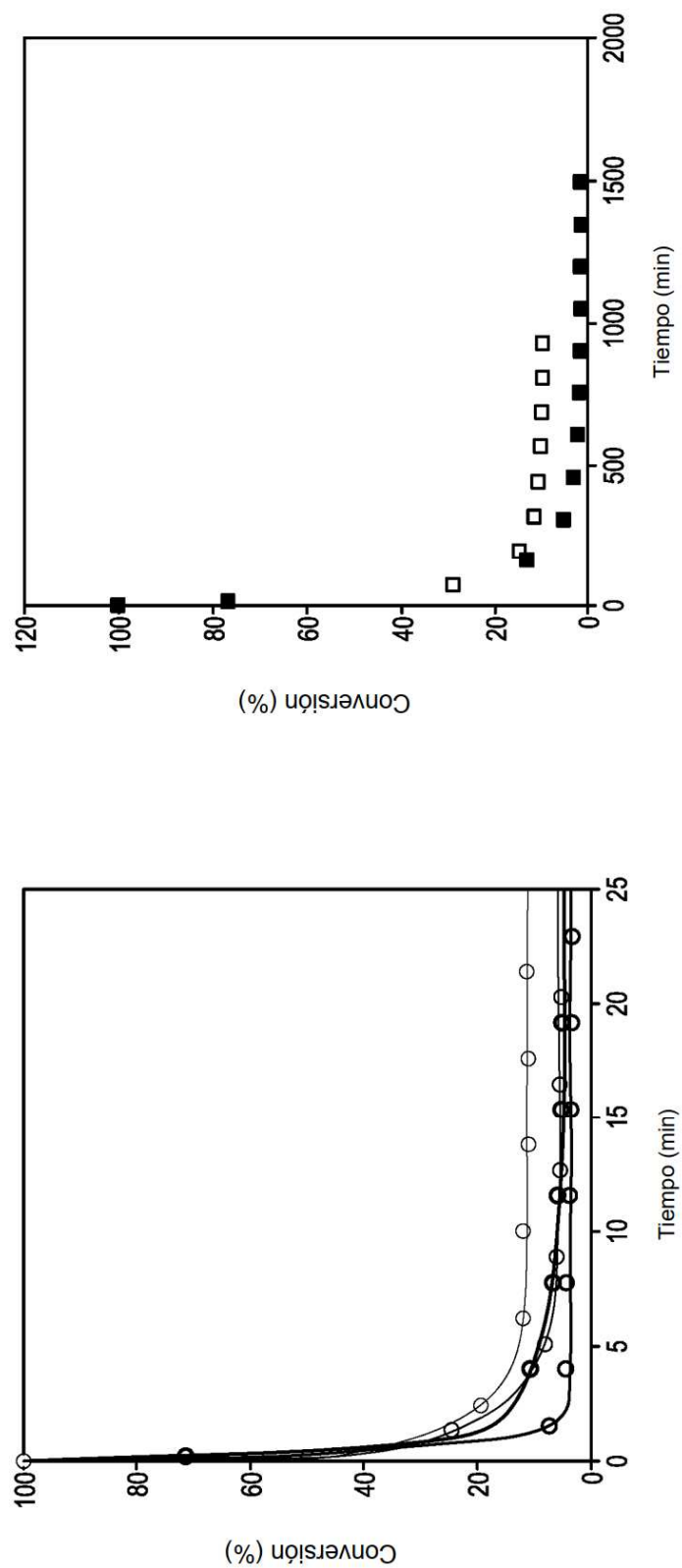


FIG. 16

Esquema para la selección de PEGilación preliminar

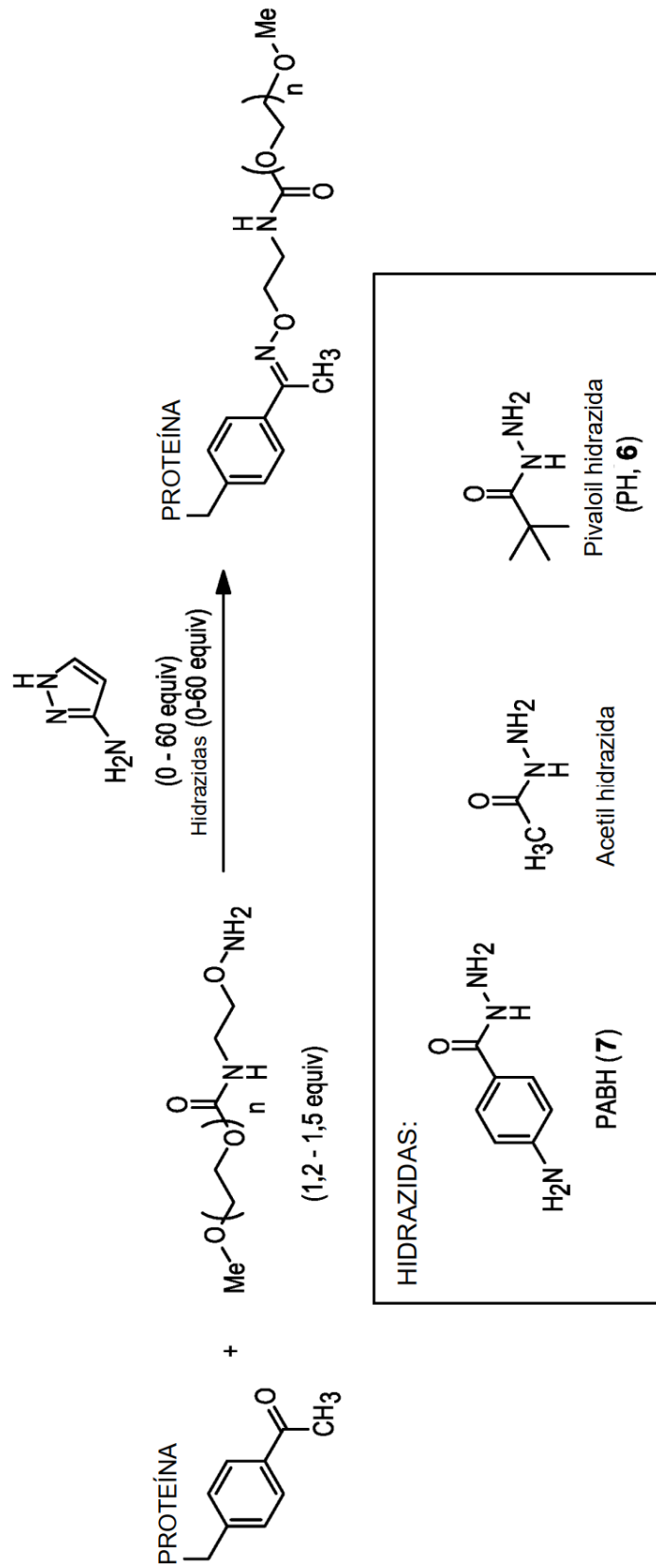


FIG. 17

Resultados de PEGilación para o- y m-fenilenodiamina que ilustra la curvatura del gráfico del total de equiv frente a proporción de amina: PABH frente a la concentración final de FGF21. Izquierda: o-fenilenodiamina. Derecha: m-fenilenodiamina

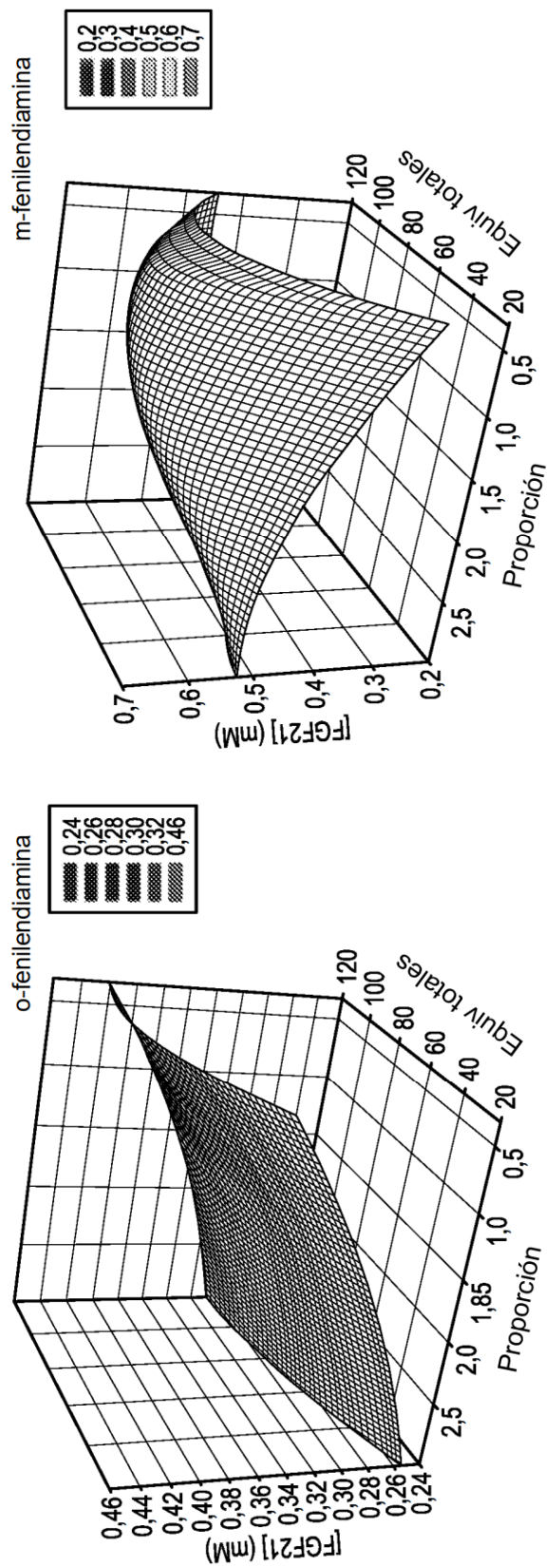


FIG. 19

Gráficos del total de equivalentes aditivos frente a la proporción de amina: PABH y conversión para las PEGilaciones usando PABH y ácido 3,5-diaminobenzoico. Izquierda: FGF21 con PEG-OA 30 kDa. Derecha: relaxina con PEG-OA de 20 kDa.

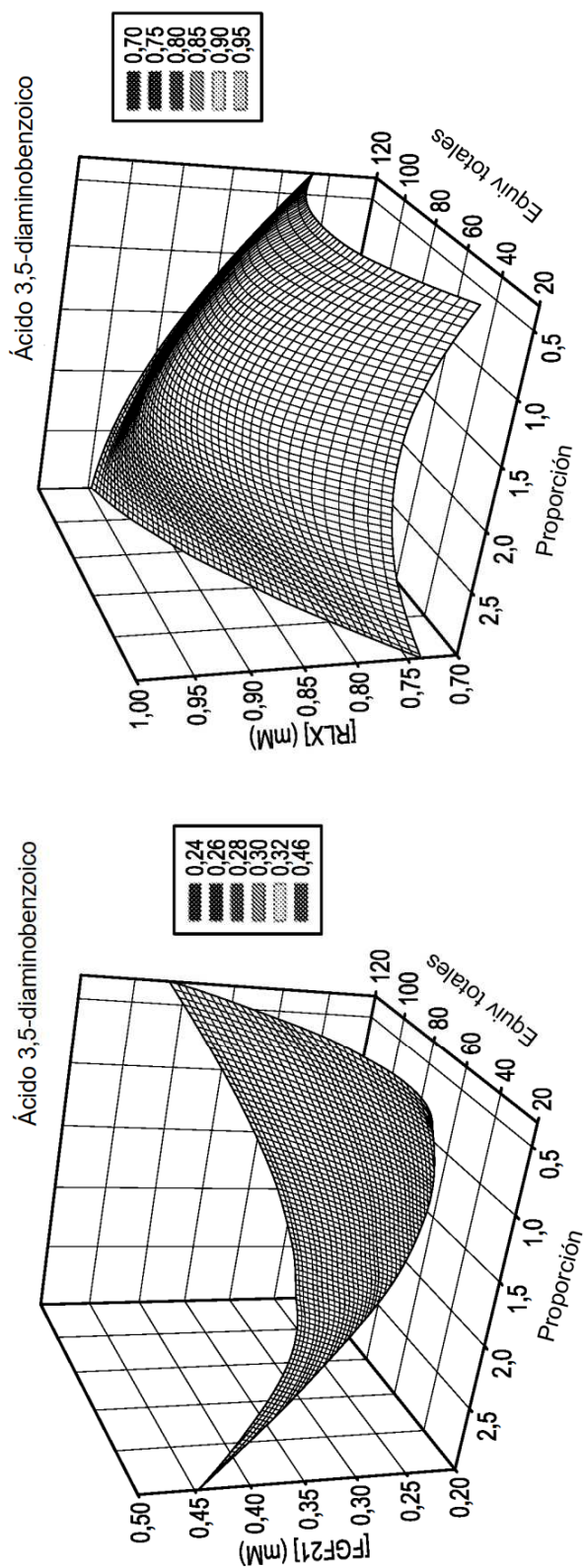


FIG. 20

Izquierda: Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,2 equiv) en presencia de 120 equiv de sal y 60 equiv de catalizador PABH usando (a) urea 6 M (verde); NH_4Cl (gris); y (c) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (morado).

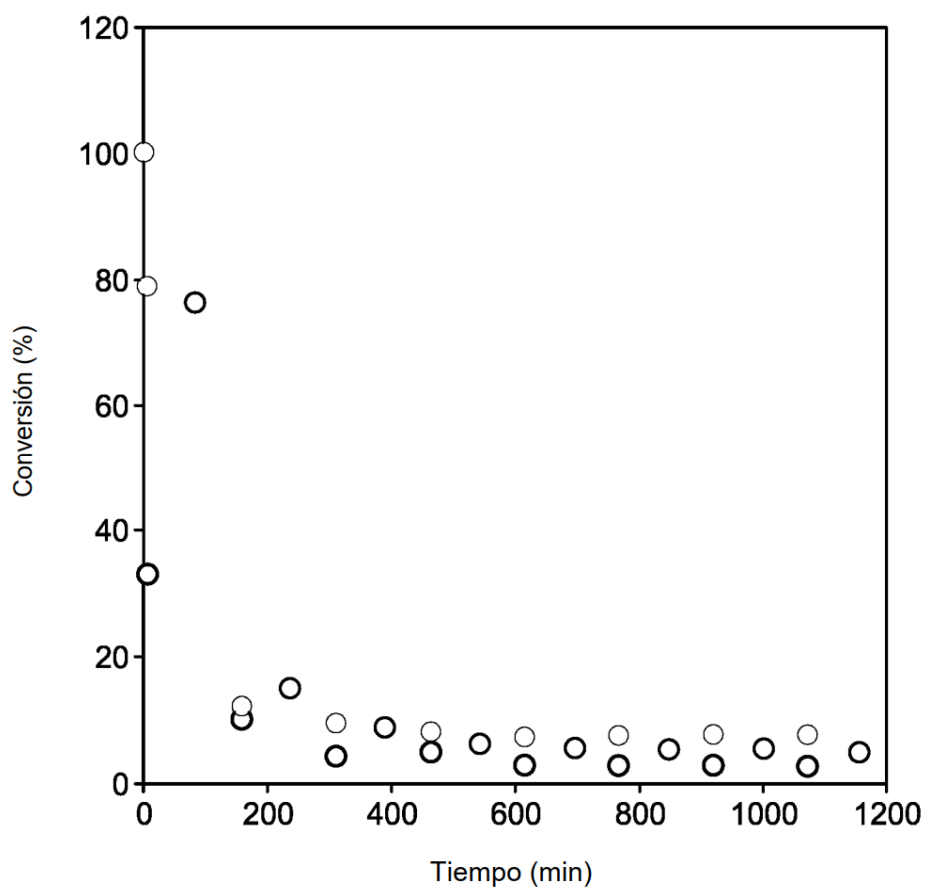
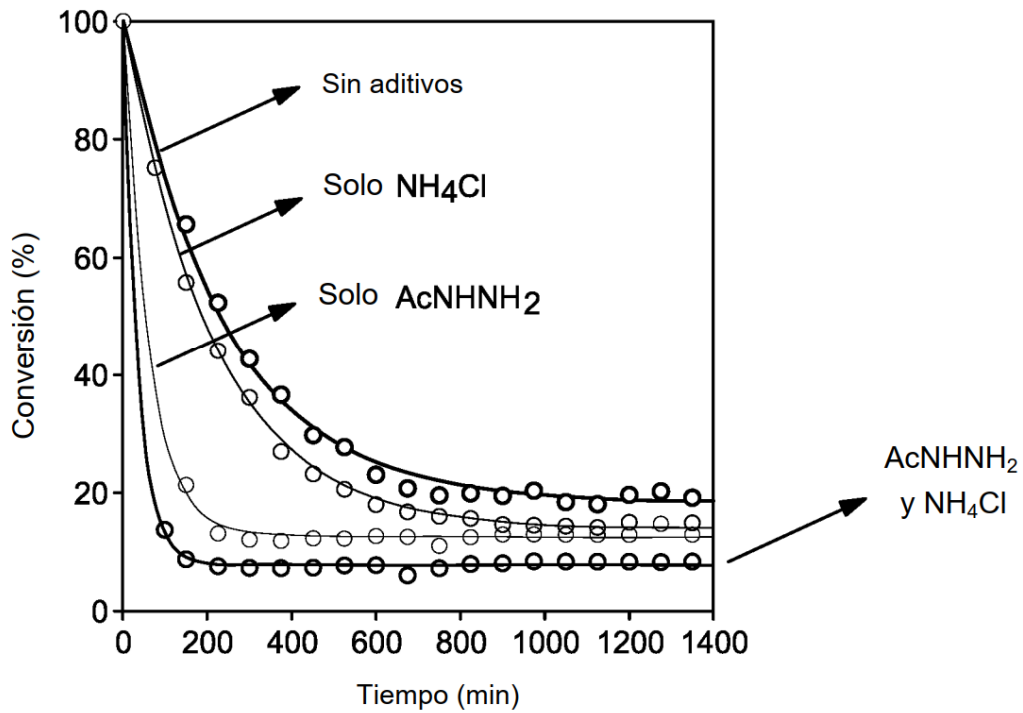


FIG. 21

Evolución temporal para la reacción de relaxina con PEG-OA de 20 kDa (1,2 equiv) en ausencia de aditivos (azul) y en presencia de: (a) 120 equiv NH_4Cl (rojo), (b) 60 equiv de acetil hidrazida (gris); y (c) 60 equiv de acetil hidrazida y 120 equiv de NH_4Cl (verde).

**FIG. 22**

Izquierda: espectro de UV de relaxina antes y después de la adición de 120 equiv de NH_4Cl (azul y rojo, respectivamente).
 Derecha: Secuencia de aminoácidos de relaxina que resalta los restos aromáticos en rojo.

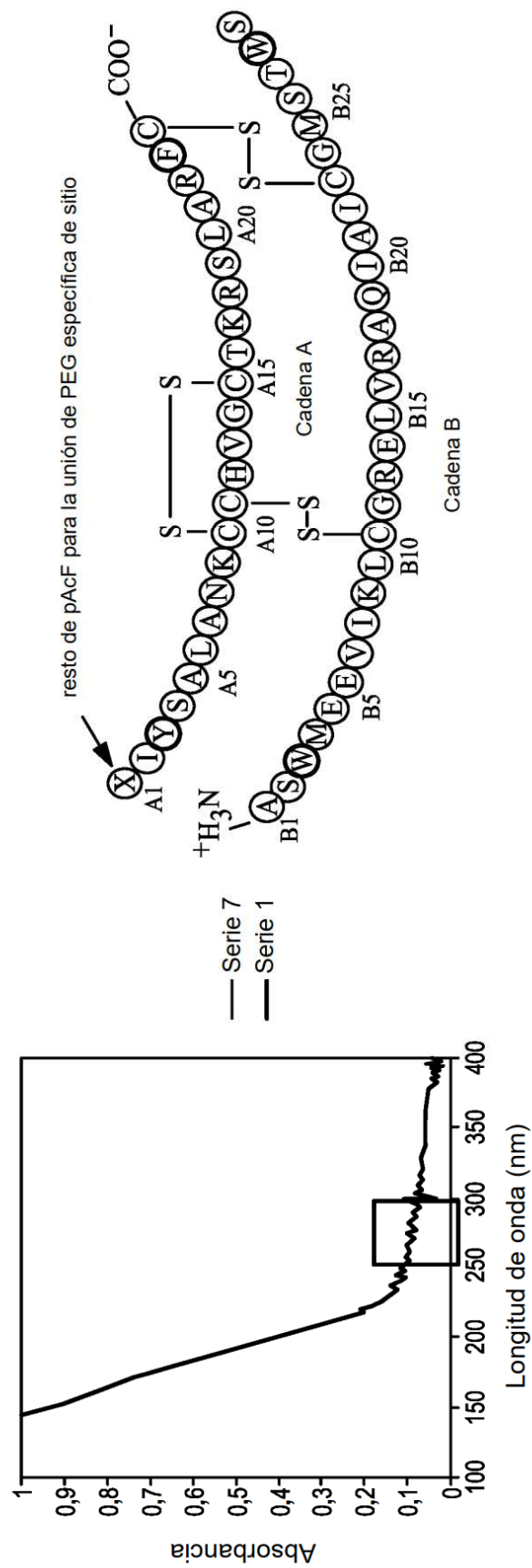


FIG. 23

Izquierda: espectro IR de relaxina antes y después de la adición de 120 equiv de NH_4Cl (azul y morado, respectivamente).
 Derecha: Recuadro del espectro IR después de la adición de 120 equiv de NH_4Cl con asignaciones provisionales para los cambios estructurales.

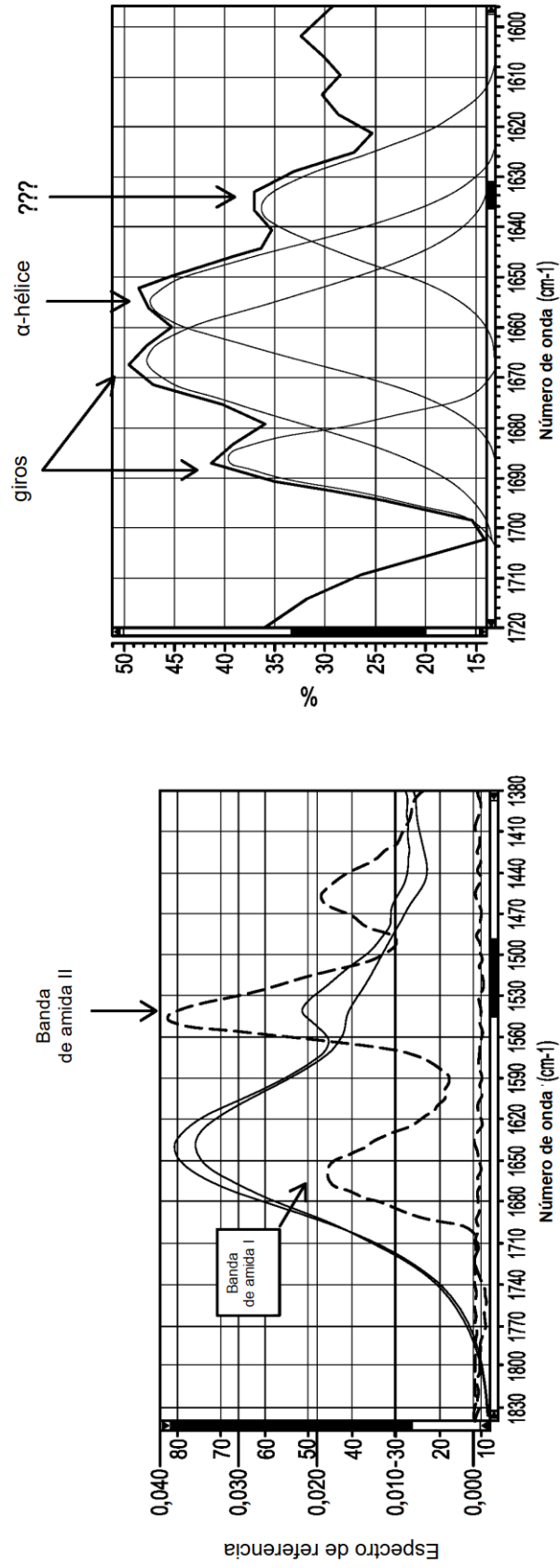


FIG. 24

Espectros ^{15}N RMN HSQC de relaxina antes y después de la adición de 120 equivalentes de NH_4Cl (rojo y azul, respectivamente)

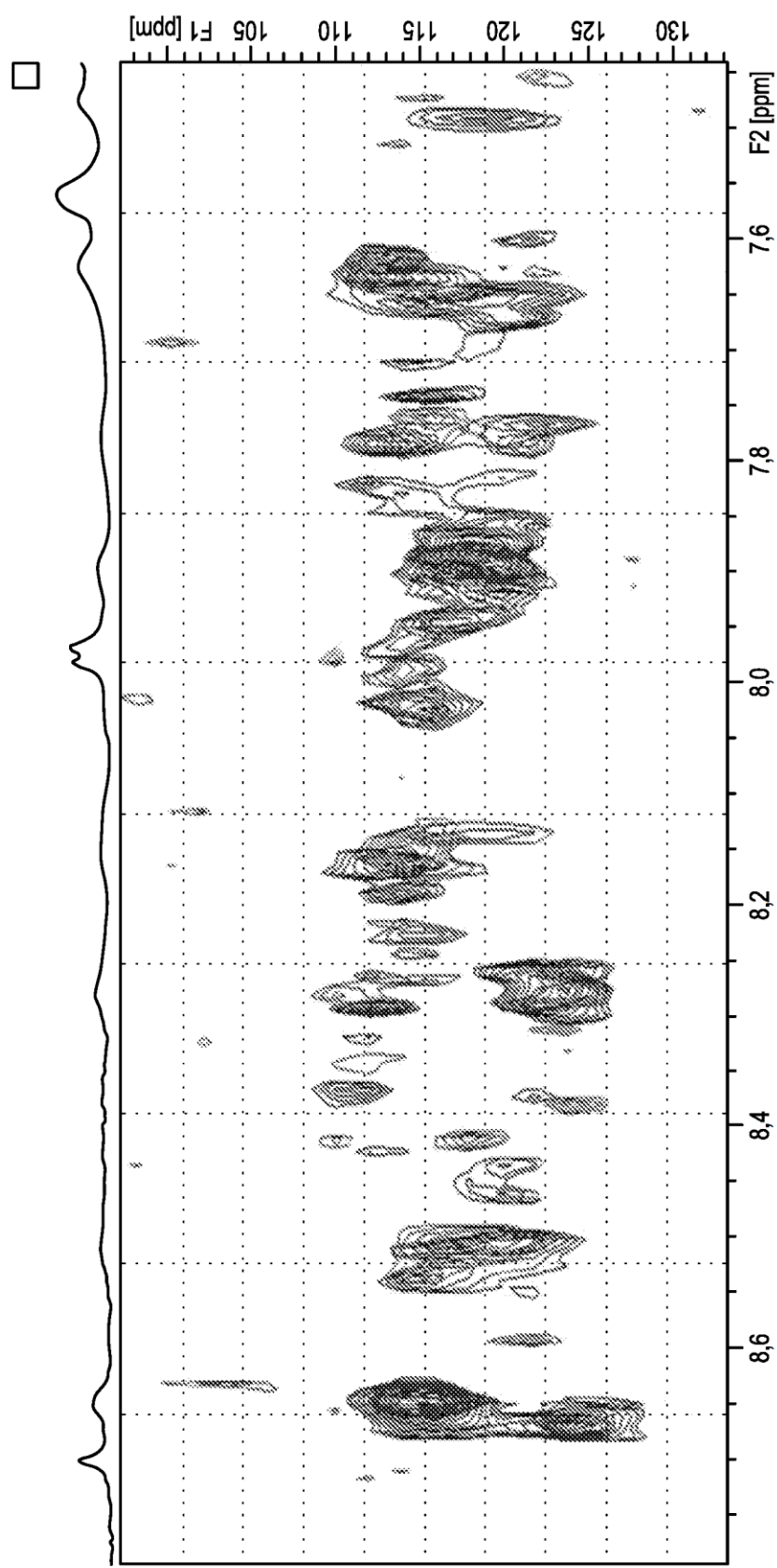


FIG. 25

Espectros CD de UV cercano de relaxina antes (azul) y después de la adición de NH_4Cl (azul y verde, respectivamente)

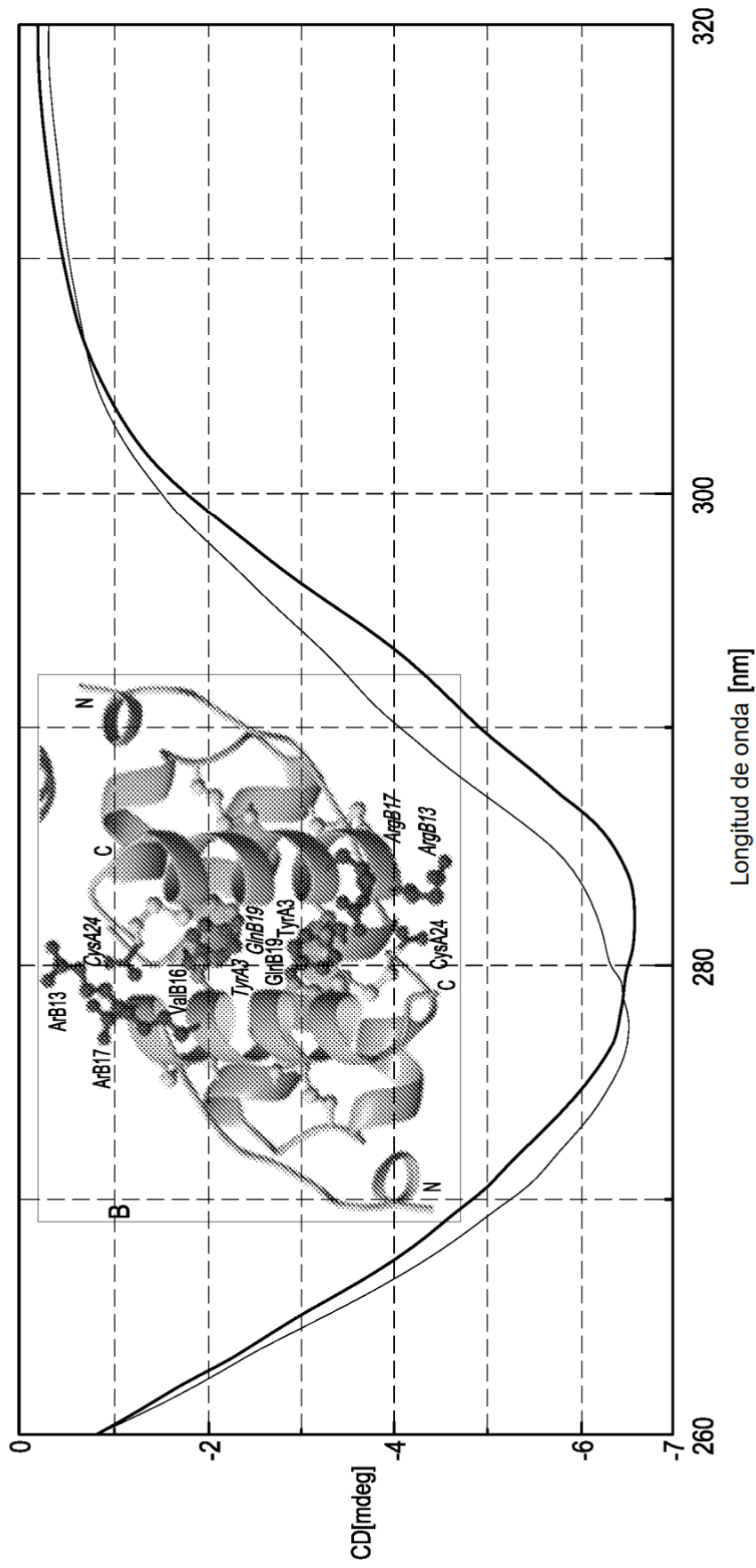


FIG. 26

Estructuras de posibles impurezas presentes en PABH comercial

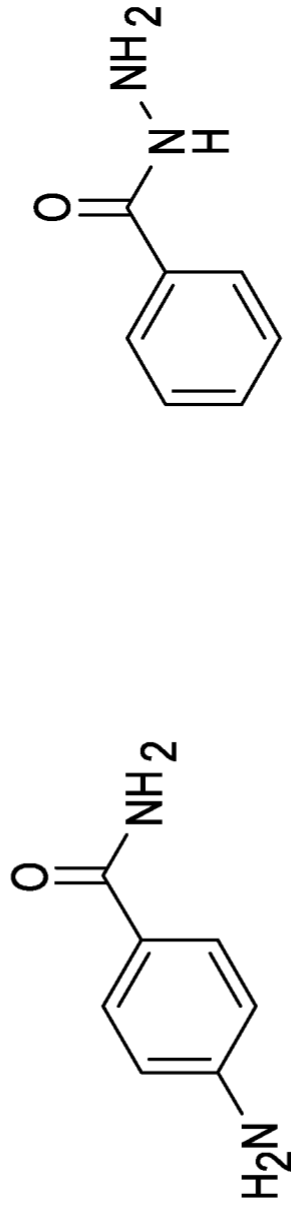


FIG. 27