



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108350025 B

(45) 授权公告日 2023.02.21

(21) 申请号 201680067897.7

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2016.11.22

专利代理人 王媛媛 周李军

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108350025 A

(51) Int.Cl.

C07K 1/107 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.07.31

A61K 47/60 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 14/50 (2006.01)

62/258644 2015.11.23 US

C07K 14/64 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2018.05.21

WO 2007056448 A2, 2007.05.18

(86) PCT国际申请的申请数据

EP 1885404 A2, 2008.02.13

PCT/US2016/063313 2016.11.22

JP 2012116840 A, 2012.06.21

(87) PCT国际申请的公布数据

Liu C C 等. Accelerants for the

W02017/091568 EN 2017.06.01

modification of non-natural amino acids

(73) 专利权人 百时美施贵宝公司

and non-natural amino acid polypeptides.

地址 美国新泽西州

《Annu. Rev. Biochem.》. 2010, 413.

(72) 发明人 M.R.希基 A.拉米雷斯

审查员 马艳林

权利要求书2页 说明书17页 附图27页

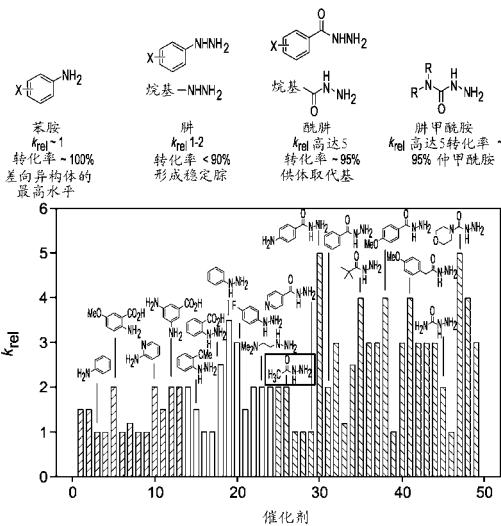
## (54) 发明名称

用于蛋白质聚乙二醇化的添加剂体系

对不同添加剂观察到的相对速率 ( $k_{rel}$ )。乙酰肼 ( $k_{rel} \approx 2$ ) 显示在方框中

## (57) 摘要

本公开提供了用于蛋白质聚乙二醇化的添加剂体系。所述添加剂体系包含单独使用或与芳族胺如3,5-二氨基苯甲酸或与铵盐如氯化铵或乙酸铵组合使用的对氨基苯甲酰肼。所公开的添加剂组合提供了几个益处，包括增加的反应速率，更高的产率和完成缀合反应所需的氨氧基-PEG当量的减少。典型的反应可以通过将添加剂或添加剂体系与蛋白质溶液和氨氧基-PEG试剂混合来进行。将溶液调节至pH 4并保持在20-25°C而不搅拌直至完成，通常在24小时内完成。



1. 用于蛋白质聚乙二醇化反应的改进添加剂体系,所述体系包含对氨基苯甲酰肼与芳族胺或铵盐的组合,其中所述芳族胺选自3,5-二氨基苯甲酸、邻苯二胺、1-吡啶-2-基-乙胺、2-(二甲基氨基)乙肼、间苯二胺和2-氨甲基吡啶,并且其中所述铵盐选自乙酸铵和氯化铵,其中所述反应是含有对乙酰基苯丙氨酸残基的蛋白质和氨氧基-PEG化合物之间的缀合反应。

2. 如权利要求1所述的体系,其中所述体系包含对氨基苯甲酰肼与3,5-二氨基苯甲酸或对氨基苯甲酰肼与氯化铵。

3. 如权利要求1所述的体系,其中所述添加剂体系增加反应速率,提供缀合产物的高产率并促进完成缀合反应所需的氨氧基-PEG当量的减少。

4. 改进添加剂体系用于蛋白质聚乙二醇化反应的用途,其中所述体系包含单独的对氨基苯甲酰肼或对氨基苯甲酰肼与芳族胺或铵盐的组合,其中所述反应是含有对乙酰基苯丙氨酸残基的蛋白质和氨氧基-PEG化合物之间的缀合反应。

5. 如权利要求4所述的用途,其中所述芳族胺选自3,5-二氨基苯甲酸、邻苯二胺、1-吡啶-2-基-乙胺、2-(二甲基氨基)乙肼、间苯二胺和2-氨甲基吡啶。

6. 如权利要求4所述的用途,其中所述铵盐选自乙酸铵和氯化铵。

7. 如权利要求4所述的用途,其中所述体系包含如下的组合:对氨基苯甲酰肼与3,5-二氨基苯甲酸或对氨基苯甲酰肼与氯化铵。

8. 如权利要求4所述的用途,其中所述添加剂体系增加缀合反应速率,提供缀合产物的高产率并促进完成缀合反应所需的氨氧基-PEG当量的减少。

9. 用于获得聚乙二醇化蛋白质的方法,所述方法包括下列步骤:

(a) 鉴定蛋白质、PEG试剂和添加剂体系;

(b) 溶解蛋白质,然后在添加剂体系存在下将所述蛋白质与PEG试剂混合;

(c) 使蛋白质与PEG试剂反应从而以高产率获得聚乙二醇化蛋白质;

其中所述添加剂体系包含对氨基苯甲酰肼,其中所述蛋白质是含有对乙酰基苯丙氨酸残基的松弛素或FGF21。

10. 如权利要求9所述的方法,其中在添加剂体系存在下将所述与PEG试剂混合的溶解蛋白质保持在约4的pH。

11. 如权利要求9所述的方法,其中在添加剂体系存在下将所述与PEG试剂混合的溶解蛋白质保持在20°C至25°C的温度范围。

12. 如权利要求9所述的方法,其中所述添加剂体系进一步包含氯化铵。

13. 如权利要求9所述的方法,其中所述添加剂体系包含对氨基苯甲酰肼与芳族胺或铵盐的组合。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述芳族胺是3,5-二氨基苯甲酸。

15. 如权利要求13所述的方法,其中所述铵盐是乙酸铵或氯化铵。

16. 如权利要求9所述的方法,其中所述添加剂体系包含对氨基苯甲酰肼与芳族胺和铵盐的组合。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述芳族胺是3,5-二氨基苯甲酸。

18. 如权利要求16所述的方法,其中所述铵盐是乙酸铵或氯化铵。

19. 如权利要求9所述的方法,其中所述PEG试剂选自PEG-0A和其他具有氨氧基的PEG衍

生物。

20. 聚乙二醇化蛋白质的方法,包括将携带对乙酰基苯丙氨酸残基的蛋白质与PEG试剂和添加剂体系混合,其中所述添加剂体系包含对氨基苯甲酰肼,使蛋白质与PEG试剂反应,和形成聚乙二醇化蛋白质的步骤。

## 用于蛋白质聚乙二醇化的添加剂体系

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2015年11月23日提交的临时专利申请62/258644的权益，其教导通过引用明确地并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开涉及用于蛋白质聚乙二醇化反应的改进的添加剂体系。具体而言，本公开鉴定了用于含有对乙酰基苯丙氨酸残基的蛋白质和氨氧基-PEG化合物之间的缀合反应的添加剂。

[0004] 背景

[0005] 蛋白质的聚乙二醇化是一种缀合过程，其涉及聚乙二醇衍生物与治疗性蛋白质的连接以通过降低清除率并提供空间庇护使免遭蛋白水解酶和免疫系统识别来提高其稳定性和药代动力学(Roberts, M.J.等人, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 54:459 (2002))。通常，聚乙二醇化技术可以分为两种类型，即随机和位点特异性缀合。随机聚乙二醇化任意地将聚乙二醇化试剂与反应性氨基酸如赖氨酸或半胱氨酸连接以提供聚乙二醇化产物的混合物。相反，位点特异性缀合利用天然官能团(例如N-或C-端基团)或非天然氨基酸(例如对乙酰基苯丙氨酸-pAcF)的明确反应性来控制连接在蛋白质上的PEG残基的位置和数目。涉及聚乙二醇化试剂与pAcF残基之间的酮肟形成的位点特异性缀合反应通过遗传密码的扩充被掺入底物蛋白质中(Liu, C.C.等人, *Annu. Rev. Biochem.*, 79:413 (2010); Tian, F.等人, "Accelerants for the modification of non-natural amino acids and non-natural amino acid polypeptides", 美国专利号7,468,458 (2008年12月23日))。尽管它们具有已证实的效用，但基于酮肟形成的缀合因速率慢和转化不完全而受到损害(Crisalli, P.等人, *J. Org. Chem.*, 78:1184 (2013))。改善酮肟形成的尝试包括使用过量的聚乙二醇化试剂，高温或高浓度的毒性催化剂。然而，这些解决方案引入了额外的步骤以从产物中除掉过量的聚乙二醇化试剂或毒性催化剂并且经常损害蛋白质的稳定性。此外，旧方法不使用添加剂，使用变性剂(脲)，和/或使用乙酰肼(AcNNH<sub>2</sub>)作为添加剂。AcNNH<sub>2</sub>和相关结构已经在PCT公开号WO 2007/056448中进行了限定。

[0006] 本领域现在需要通过检查影响失速的机械原理和通过鉴定加速反应并促进在低PEG:蛋白质摩尔比下的高转化率的新添加剂来提高含有pAcF残基的蛋白质(松弛素和FGF21)的聚乙二醇化的产率和速率的新方法。该方法应该是经济的，促进在非常低量的聚乙二醇化试剂下的较高转化率，促进更快的反应，其避免了需要高反应温度和除掉遗传毒性物质。

[0007] 概述

[0008] 在第一个实施方案中，本公开提供用于蛋白质聚乙二醇化反应的改进的添加剂体系，所述体系包含单独的对氨基苯甲酰肼或与芳族胺或铵盐组合的对氨基苯甲酰肼。

[0009] 在另一个实施方案中，本公开提供了用于获得聚乙二醇化蛋白质的方法，所述方法包括以下步骤：鉴定蛋白质、PEG试剂和添加剂体系；和溶解蛋白质，然后在添加剂体系存

在下将所述蛋白质与PEG试剂混合,从而以高产率获得聚乙二醇化蛋白质。

[0010] 在另一个实施方案中,本公开提供了包含通过上述实施方案中提及的方法获得的聚乙二醇化蛋白质的药物组合物,其用于需要其的个体的治疗。

[0011] 附图简述

[0012] 图1:形成酮肟的一般机制。

[0013] 图2:松弛素(4 mg/mL,在水中)与20 kDa PEG-0A试剂的聚乙二醇化的色谱图。

[0014] 图3:当暴露于连续的空气流时,20 kDa PEG-0A在水中分解的时间进程。

[0015] 图4:使用原位IR和<sup>1</sup>H NMR光谱研究乙酰肼的稳定性。

[0016] 图5:筛选添加剂的模型反应。反应条件:1 (3.6 mmol) 和2 (3.6 mmol),在1.0 mL乙酸盐缓冲液(20 mM, pH 4.0)中,在室温(23°C)下。

[0017] 图6:对不同添加剂观察到的相对速率( $k_{\text{rel}}$ )。乙酰肼( $k_{\text{rel}} \approx 2$ )显示在方框中。

[0018] 图7:在(a) 1当量吡唑胺(红色);(b) 1当量MCH(蓝色);(c) 1当量吡唑胺和1当量MCH(绿色)存在下,二肽1与0-苄基羟胺(2)的反应的时间进程。在没有添加剂的情况下获得的反应曲线以灰色显示。

[0019] 图8:含有二肽1 (a) (蓝色)与(b) 1当量MCH(绿色);(c) 1当量MCH和1当量吡唑胺(灰色);(d) 1当量吡唑胺(红色)的样品的<sup>1</sup>H NMR光谱的芳族区域。MCH和吡唑胺添加剂之间的协同效应产生具有更高浓度活性中间体的混合物,与仅含有一种添加剂的样品相比。

[0020] 图9:左:二肽1与30当量PABH和1.2当量20 kDa PEG-0A的聚乙二醇化;腙中间体被追踪为绿点。右:聚乙二醇化反应,其中在使二肽与30当量PABH平衡过夜后添加1.2当量聚乙二醇化试剂。

[0021] 图10:左:用于二肽1聚乙二醇化的腙浓度对PABH当量的图;蓝点表示其中省略了吡唑胺的反应混合物。中:PABH和吡唑胺的不同组合对反应速率的影响。右:二肽1及其腙衍生物在含有PABH和吡唑胺的反应混合物中的最终浓度。

[0022] 图11:反应结束时剩余二肽1对总添加剂当量和吡唑胺:PABH比例的图。

[0023] 图12:左:在(a) 30当量乙酰肼(蓝色);(b) 30当量MCH(红色)存在下,松弛素与20 kDa PEG-0A (1.5当量)的反应的时间进程;在没有添加剂的情况下获得的反应曲线以灰色显示。中:在(a) 30当量吡唑胺(蓝色);(b) 30当量MCH(红色);(c) 10当量MCH(紫色);(d) 30当量吡唑胺和10当量MCH(绿色);(e) 30当量MCH和30当量吡唑胺存在下松弛素与PEG-0A (1.5当量)的反应的时间进程。右:在(a) 40°C;(b) 10°C;(c) 25°C下,在30当量吡唑胺和10当量MCH存在下,松弛素与PEG-0A (1.5当量)的反应的时间进程。

[0024] 图13:左:在(a) 30当量MPCH和30当量吡唑胺(绿色);(b) 30当量PH和30当量吡唑胺(蓝色);和(c) 30当量MCH和30当量吡唑胺/脲6M(红色)存在下,松弛素与20 kDa PEG-0A (1.2当量)的反应的时间进程。右:在(a) 30当量PH和60当量吡唑胺(蓝色);(b) 30当量乙酰肼和60当量吡唑胺(绿色);和(c) 30当量PABH和60当量吡唑胺(红色)存在下,松弛素与PEG-0A (1.2当量)的反应的时间进程。

[0025] 图14:MCH在其端点加速的松弛素聚乙二醇化的HRMS分析。肟峰与残留的松弛素重叠。松弛素峰的0.04 min延迟是由于反应基质对色谱行为的影响,而不是晚洗脱杂质。

[0026] 图15:左:在脲6M与(a) 30当量MCH和30当量吡唑胺(红色);(b) 30当量MCH、30当

量吡唑胺和30当量NH<sub>2</sub>OH (蓝色) 的存在下,松弛素与20 kDa PEG-0A (1.2当量) 的反应的时间进程。右:在脲6M与30当量MCH和30当量吡唑胺(蓝色) 的存在下,松弛素与PEG-0A (1.2当量) 的分解的时间进程;肟峰(红色) 在反应期间形成,表明与PEG-0A分解平行形成羟胺。

[0027] 图16:左:在30当量PABH和(a) 60当量乙二胺(灰色);(b) 60当量3,5-二氨基苯甲酸(绿色);(c) 60当量间苯二胺(蓝色);和60当量吡唑胺(红色) 存在下,松弛素与20 kDa PEG-0A (1.2当量) 的反应的时间进程。右:在(a) 30当量PABH和60当量3,5-二氨基苯甲酸(绿色);和(b) 60当量PABH和120当量NH<sub>4</sub>C1 (蓝色) 存在下,松弛素与PEGOA (1.2当量) 的反应的时间进程。

[0028] 图17:初步聚乙二醇化筛选的方案。

[0029] 图18:在不同胺存在下,松弛素和FGF21的聚乙二醇化的方案。

[0030] 图19:邻苯二胺和间苯二胺的聚乙二醇化结果,说明总当量对胺:PABH比例对最终 FGF21浓度的图的曲率。左:邻苯二胺。右:间苯二胺。

[0031] 图20:使用PABH和3,5-二氨基苯甲酸进行聚乙二醇化的总添加剂当量对胺:PABH 比例的图和转化率。左:FGF21与30 kDa PEG-0A。右:松弛素与20 kDa PEG-0A。

[0032] 图21:左:在120当量盐和60当量PABH催化剂存在下,使用(a) 脲6 M (绿色);(b) NH<sub>4</sub>C1 (灰色) 和(c) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub>的松弛素与20 kDa PEG-0A (1.2当量) 的反应的时间进程。

[0033] 图22:在没有添加剂(蓝色) 的情况下和在(a) 120当量NH<sub>4</sub>C1 (红色),(b) 60当量乙酰肼(灰色),和(c) 60当量乙酰肼和120当量NH<sub>4</sub>C1 (绿色) 存在下,松弛素与20 kDa PEG-0A (1.2当量) 的反应的时间进程。

[0034] 图23:左:在加入120当量NH<sub>4</sub>C1之前和之后(分别为蓝色和红色) 的松弛素的UV光谱。右:用红色突出芳族残基的松弛素的氨基酸序列。

[0035] 图24:左:在加入120当量NH<sub>4</sub>C1之前和之后(分别为蓝色和紫色) 的松弛素的IR光谱。右:在加入120当量NH<sub>4</sub>C1之后的IR光谱插图,其具有结构变化的暂定分配。

[0036] 图25:在加入120当量NH<sub>4</sub>C1之前和之后(分别为红色和蓝色) 的松弛素的<sup>15</sup>N NMR HSQC光谱。

[0037] 图26:在加入120当量NH<sub>4</sub>C1之前(蓝色) 和之后(分别为蓝色和绿色) 的松弛素的近UV CD光谱。

[0038] 图27:商用PABH中存在的潜在杂质的结构。

[0039] 详述

[0040] 除非在本申请的其他地方另有明确规定,否则下列术语可以在本文使用,并且应该具有以下含义。

[0041] 缩写

[0042] PEG: 聚乙二醇

[0043] PEG-0A: 聚乙二醇-羟基胺

[0044] mPEG: 甲氧基聚乙二醇

[0045] MCH: 吡唑4-甲酰肼

[0046] MPCH: 4-甲基哌嗪-1-甲酰肼

[0047] PH: 新戊酰肼

[0048] PABH: 对氨基苯甲酰肼

[0049] PMBH: 对甲氧基苯甲酰肼。

[0050] 必须注意的是,除非上下文另有明确说明,否则如本文所用,单数形式“一(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数指示物。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。除非另有说明,否则本文所述的所有范围都包括具体的端点。下面提供了以下术语。

[0051] 约:术语“约”在本文中用于指近似地、粗略地围绕或在区域中。当术语“约”与数值范围结合使用时,它通过扩大在所列数值之上和之下的边界来修饰该范围。一般而言,术语“约”在本文中用于以向上或向下(高出或降低)5%的差异在所述值之上和之下修饰数值。

[0052] 添加剂体系:术语“添加剂体系”在本文中用来表示单独或组合的“催化剂化合物”。例如单独的对氨基苯甲酰肼或其与芳族胺即3,5-二氨基苯甲酸、邻苯二胺、1-吡啶-2-基-乙胺、2-(二甲基氨基)乙肼、间苯二胺和2-氨甲基吡啶或铵盐即乙酸铵和氯化铵的组合。优选的催化剂化合物包括对氨基苯甲酰肼与3,5-二氨基苯甲酸,或对氨基苯甲酰肼与氯化铵。

[0053] 包含:术语“包含”意指“包括”,例如,“包含”X的组合物可以仅由X组成,或者可以包括另外的物质,例如X + Y。

[0054] PEG:当在本公开的上下文中使用时,术语“PEG”是指聚乙二醇或衍生的聚乙二醇。

[0055] 聚乙二醇化或聚乙二醇化过程:术语“聚乙二醇化”或“聚乙二醇化过程”是指在本公开的上下文中聚乙二醇(PEG)聚合物链与另一分子连接至包含对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)残基的蛋白质的过程,所述蛋白质包括但不限于松弛素和FGF21。

[0056] 缀合:如本文所用,术语“缀合”是指含有对乙酰基苯丙氨酸残基的蛋白质和氨氧基-PEG化合物之间的缀合反应。

[0057] 它通常涉及PEG的活化以及活化的PEG-中间体直接与靶蛋白/肽或连接物偶联,其随后被活化并与靶蛋白/肽偶联(参见Abuchowski, A. 等人, *J. Biol. Chem.*, 252:3571 (1977) 和 *J. Biol. Chem.*, 252:3582 (1977), Zalipsky 等人, *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, 第21和22章, Harris, J.M., ed., Plenum Press, NY (1992))。注意到含有PEG分子的多肽也称为缀合的或聚乙二醇化的蛋白质,而缺乏连接的PEG分子的蛋白质可称为未缀合的或游离的。

[0058] PEG试剂或聚乙二醇化试剂:帮助聚乙二醇化反应的试剂。

[0059] 将理解的是,任何给定的示例性实施方案可以与一个或多个另外的示例性实施方案组合。

[0060] 在第一方面,本公开提供用于蛋白质聚乙二醇化反应的改进的添加剂体系,所述体系包含单独的对氨基苯甲酰肼或其与芳族胺或铵盐的组合。

[0061] 在第一方面的第一个实施方案中,芳族胺选自3,5-二氨基苯甲酸、邻苯二胺、1-吡啶-2-基-乙胺、2-(二甲基氨基)乙肼、间苯二胺和2-氨甲基吡啶。

[0062] 在第一方面的第二个实施方案中,铵盐选自乙酸铵和氯化铵。

[0063] 在第一方面的第三个实施方案中,优选的体系组合包含对氨基苯甲酰肼与3,5-二氨基苯甲酸,或对氨基苯甲酰肼与氯化铵。

[0064] 在第一方面的第四个实施方案中,所述反应是含有对乙酰基苯丙氨酸残基的蛋白质与氨氧基-PEG化合物之间的缀合反应。

[0065] 在第一方面的第五实施方案中,添加剂体系增加缀合反应速率,提供高产率的缀合产物并且促进完成缀合反应所需的氨氧基-PEG当量的减少。

[0066] 在第二方面,本公开提供了一种用于获得聚乙二醇化蛋白质的方法,所述方法包括以下步骤:鉴定蛋白质、PEG试剂和添加剂体系;和溶解蛋白质,然后在添加剂体系存在下将所述蛋白质与PEG试剂混合,从而以高产率获得聚乙二醇化蛋白质。

[0067] 在第二方面的第一个实施方案中,蛋白质是含有pAcF残基的松弛素或FGF21。

[0068] 在第二方面的第二个实施方案中,将与PEG试剂混合的溶解的蛋白质溶液维持在约4的pH。

[0069] 在第二方面的第三个实施方案中,将反应混合物保持在约20℃至约25℃的温度范围内。

[0070] 在第二方面的第四个实施方案中,添加剂体系包括单独的对氨基苯甲酰肼或其与芳族胺如3,5-二氨基苯甲酸或铵盐如乙酸铵或氯化铵的组合。

[0071] 在第二方面的第五个实施方案中,高质量的对氨基苯甲酰肼与氯化铵的添加剂组合优先用于大规模生产聚乙二醇化蛋白质。

[0072] 在第二方面的第六个实施方案中,PEG试剂选自PEG-0A和具有氨氧基的其他PEG衍生物。

[0073] 在第三方面,本公开提供了药物组合物,其包含通过第二方面记载的方法获得的聚乙二醇化蛋白质及其用于需要其的个体的治疗的实施方案。

## 实施例

[0074] 现在将结合某些不旨在限制其范围的实施方案来描述本公开。相反,本公开涵盖可包括在权利要求范围内的所有替代、修改和等同物。因此,包括具体实施方案的以下实施例将说明本公开的一个实践,应当理解的是,实施例是为了说明某些实施方案的目的并且被呈现以提供被认为是最有用和容易了解其程序和概念方面的描述。

[0075] 羰基和羟胺衍生物之间的一般反应机理对于小分子反应物是很好理解的(Jencks, W.P., *Prog. Phys. Org. Chem.*, 2:63 (1964) 和其中引用的参考文献)。该过程是酸催化的,总体而言,需要在多步平衡之后的脱水。虽然由于1,3-烯丙位张力形成酮亚胺的速率比形成醛亚胺的速率慢,但对于简单的烷氨基胺,酮-酮亚胺平衡主要移向脱水(图1)。

[0076] 实施例1

[0077] 调查作为反应失速的潜在原因的聚乙二醇化试剂分解的研究

[0078] 聚乙二醇化失速的一个可能原因可能是由于聚乙二醇化试剂的分解。由于PEG试剂不具有紫外活性,因此其需要不同的检测方法来监测其在反应过程中的命运。蒸发光散射检测包括使HPLC流动相通过雾化器以除去溶剂。任何在检测器中由激光束形成衍射光的固体颗粒产生信号。该方法允许检测任何形成能够衍射光的固体的化合物。由于聚乙二醇化试剂是高分子量固体,因此它们是使用ELS检测进行HPLC分析的优秀候选产品。这在图2中很明显。UV迹线显示为绿色,ELS迹线显示为黑色。上部色谱图(绿色)是210 nm处的UV迹线,黑色色谱图是与UV检测器串联获得的相同混合物的ELS迹线。显然,底部的黑色迹线提供了更多信息,尤其是较晚洗脱的基于PEG的化合物。

[0079] 最新的洗脱峰不具有紫外活性，并且在反应开始时不存在。这表明聚乙二醇化试剂的竞争性分解。事实上，当聚乙二醇化试剂溶液暴露于空气时该化合物形成(图3)。在浓度 $\approx 4 \text{ mg/mL}$ 时，20 kDa PEG-OA试剂的转化率 $> 97\%$ ，并产生在聚乙二醇化中没有反应性的副产物。

[0080] 由于这种分解是聚乙二醇化试剂与溶剂中溶解气体反应的结果，因此分解速率和浓度之间应该存在反相关。这个假设与下列观察结果相符：在30-40 mg/mL的更多反应相关浓度下的20 kDa PEG-OA样品相当稳定(<5%分解)。虽然对为了确保分析过程中样品的稳定性的这个项目的分析工作可能会存在一些影响，但在更多反应相关条件下的最小分解导致以下结论：空气分解PEG不是观察到的反应失速的有力原因。也研究了在用于加速聚乙二醇化的添加剂存在下聚乙二醇化试剂的稳定性。以预期的反应浓度进行这些实验，假设目标PEG加载量相对于松弛素为1.2当量。在所有情况下，聚乙二醇化试剂的分解都很小。

[0081] 由于聚乙二醇化失速在作为加速添加剂的大量过量的乙酰肼存在下发生，所以通过原位IR和<sup>1</sup>H NMR光谱测试在反应条件下该酰肼的稳定性。该研究显示，乙酰肼是稳定的，并且表明促进反应所需的过量最可能与平衡的存在和相对于未催化的背景过程的适度加速有关(图4)。

[0082] 实施例2

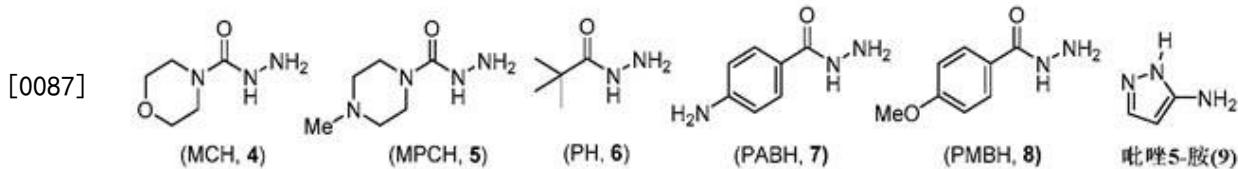
[0083] 利用二肽模型系统(DMS)筛选添加剂的研究

[0084] 寻找加速松弛素中pAcF酮柄(handle)与烷氨基胺之间的反应的添加剂的最初努力涉及筛选含有活化X-NH<sub>2</sub>部分的市售化合物，其能够通过脱水促进其相应亚氨基衍生物的形成。选择这些添加剂的最低要求是它们在用于促进水性介质中实际蛋白质的聚乙二醇化的温度、缓冲液和pH条件下具有足够的稳定性和溶解性。为了简化分析步骤并通过HPLC-UV和NMR光谱促进反应监测，选择二肽Ala-pAcF (1) 和O-苯基羟胺(2，参见图5)之间的缩合作为可以指导添加剂选择的模型转化。在随后的步骤中，改进模型反应的添加剂将在松弛素和FGF21的聚乙二醇化中进行测试。图5中提供了筛选添加剂的模型反应。反应条件：1 (3.6 mmol) 和2 (3.6 mmol)，在1.0 mL乙酸盐缓冲液(20 mM, pH 4.0)中，在室温(23°C)下。

[0085] 评价了五十种添加剂的反应速率和转化率百分比，根据X-NH<sub>2</sub>部分上X取代基的性质，所述添加剂分类为四大类，即：苯胺、肼、酰肼和肼甲酰胺。将观察到的速率标准化为在没有添加剂的情况下测量的速率( $k_{\text{rel}} = 1$ )。乙酰肼( $k_{\text{rel}} \approx 2$ )是建立基线可接受性能的参考添加剂；只有提供 $k_{\text{rel}} > 2$ 和高转化率(>95%)的那些添加剂才被认为是用于松弛素和FGF21的聚乙二醇化的后续应用和优化。结果的总结显示在图6中。反应在室温下在HPLC小瓶中在没有搅拌的情况下进行以模拟蛋白质聚乙二醇化条件，并且通过HPLC自动采样器定期抽取等分试样以避免进一步的样品操作。

[0086] 酰肼(蓝色)和肼甲酰胺(绿色)提供了最好的结果。通常，苯胺(红色)提供完全二肽转化，但不加速反应。此外，大多数苯胺促进高水平的不希望的差向异构化。肼(黄色)在反应条件下形成大量的腙并被丢弃用于进一步研究。芳族酰肼和仲肼甲酰胺产生了高达5倍的加速，以及高转化率，其在约95%二肽消耗时失速。特别是，筛选导致发现吗啉-4-甲酰肼(MCH，4)和对氨基苯甲酰肼(PABH，7)作为促进转化的最佳试剂。基于它们的性能，pH 4下的溶解度，商业可用性和成本，在松弛素和FGF21的聚乙二醇化中进一步评估PABH和MCH

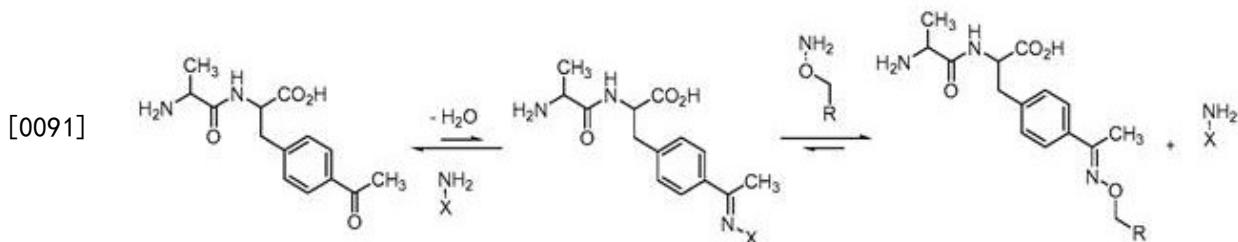
(参见下文)。



[0088] 有了这些信息,避免反应失速的尝试集中在三个方面: (a) 添加不同量的添加剂, (b) 离液剂的作用, 和 (c) 添加剂的组合。最初,用模型二肽和乙酰肼进行研究以确定反应性的固有趋势。在不同量的乙酰肼下监测反应速率揭示了添加剂中的饱和动力学,表明在高浓度试剂下速率增加达到阈值(方案1)。

[0089] 方案1

[0090] 由NMR光谱测定的酮-酮肟平衡

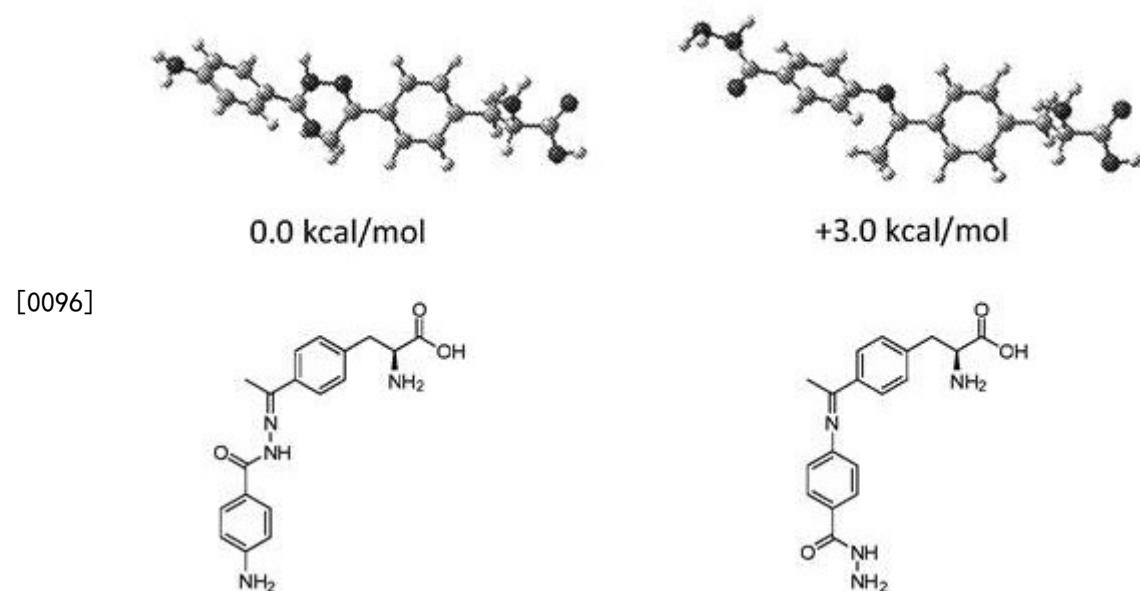


[0092] 而且,与涉及可逆亚胺转移反应多步顺序的一般机制一致,乙酰肼的浓度增加促进了更高的失速水平。在加速添加剂的存在下,这种机制指出通过将表观平衡移向脱水来实现更好转化率的可能性。通过改变反应介质来更改这种平衡的经验性尝试是不成功的。例如,添加6M脲或NH<sub>4</sub>Cl没有加速反应,也不影响原始转化率水平。某些苯胺的筛选导致完全转化而没有加速,并且预期这些苯胺与加速添加剂的组合可以帮助扩大底物转化率。事实上,使用乙酰肼和吡唑胺9的混合物导致更快的反应特性和几乎完全的转化(图6)。含有等摩尔量的二肽、吡唑胺、MCH添加剂或MCH与吡唑胺的混合物的混合物的<sup>1</sup>H NMR分析揭示了含有混合物的样品的亚胺和腙中间体的协同生长,并且表明将加速添加剂和苯胺组合的积极效应与途中平衡向反应中间体的转移相关(图8)。

[0093] 使用PABH,包含酰肼和苯胺部分二者的添加剂的类似<sup>1</sup>H NMR光谱研究显示了与DFT计算一致的单一腙中间体的普遍形成。在中性条件下,理论B3LYP/6-31G(d)水平的计算以≈ 3 kcal/mol有利于在pAcF和PABH之间形成腙,而不是其同型亚胺(方案2)。

[0094] 方案2

[0095] 在中性条件下形成pAcF的腙和亚胺中间体的B3LYP/6-31G(d)几何结构和能量



[0097] 质子化氨基酸-NH<sub>2</sub> ( $pK_a \approx 9$ ) 以  $\approx 9$  kcal/mol 支持腙形成。双质子化 ( $pK_a$ : 苯胺  $\approx 2.5$ , 酰肼  $< 2$ ) 以  $\approx 1.0$  kcal/mol 有利于亚胺形成。尽管反应不在如此低的 pH 值下进行, 但 DFT 计算表明脱水对 pH 变化和氢键作用高度敏感。

[0098] 在二肽1与PABH的聚乙二醇化期间可以监测腙中间体(图9)。在不存在聚乙二醇化试剂的情况下使二肽1与PABH的混合物平衡过夜的对照实验显示腙的形成以及其在加入20 kDa PEG-0A后的快速消耗以得到所需产物。在胺添加剂(例如吡唑胺, 图10)存在下进一步检查腙形成表明腙形成的程度与反应中使用的吡唑胺:PABH比例有关。有趣的是, 肮形成的程度不以简单方式的反应与速率或转化率相关。在模型二肽系统中, 1:1的吡唑胺:PABH比例对于形成腙是最佳的。但是, 在反应速率的情况下, 最佳条件与胺:酰肼的1:2比例相对应。通过初步筛选支持了相对于胺需要更高量的酰肼, 其中观察到酰肼提供比胺添加剂高得多的反应速率。另一方面, 胺:酰肼的3:1比例对于二肽转化率是最佳的, 这与(a) 观察到在低胺:酰肼比例下在反应结束时剩余显著量的腙中间体, 和(b) 在加入酰肼添加剂的“催化剂装料(kicker charges)”后检测到反应的逆转一致。在上面提出的实验中, 总当量是PBAH和吡唑胺的总和。通过改变胺:酰肼比例以及组合添加剂的总当量运行的一系列实验解决了添加剂总当量变化的影响。结果总结在图11中。图中的曲率表明胺和酰肼之间的合作效应是复杂的, 并且反应条件的优化可能需要不仅考虑添加剂的总当量, 而且要考虑两者之间的比例。

[0099] 实施例3

[0100] 蛋白质-松弛素和FGF21的添加剂加速的聚乙二醇化

[0101] 将在模型系统中学到的经验教训应用于松弛素和FGF21的聚乙二醇化目的在于将20 kDa PEG-0A的当量数降低至最多1.2当量, 并缩短室温下的反应时间而不损害反应产率或产品质量。为此, 在初步从粗略研究开发的反应条件下, 测试了用松弛素的模型反应中鉴定的添加剂。在30当量乙酰肼或MCH存在下, 在室温下24小时后, 松弛素(21 mg/mL, 于20 mM AcONa中, 在pH 4.0下)与1.5当量PEG-0A的聚乙二醇化得到良好的转化率( $\approx 90\%$ )。在不存在催化剂的情况下, 在相同条件下, 反应得到显著降低的转化率( $\approx 75\%$ )。与模型系统研究一致, 聚乙二醇化被添加剂加速, 并且用MCH的反应比用乙酰肼的反应快两倍。此外, 图6中

提出的平衡在以下观察中得到支持：(a) 催化反应在相当的转化率下失速，(b) 一旦失速，添加30当量额外添加剂降低转化率水平，以及(c) 一旦失速，添加0.5当量PEG-OA使反应达到更高的转化率( $\approx 95\%$ )。在模型反应中对苯胺观察到的趋势转化为松弛素的聚乙二醇化：加入30当量的吡唑胺转化大部分松弛素原料而不加速，并且MCH与吡唑胺组合仅在8小时内就产生95%的转化率。优化反应条件的努力暴露了变量之间复杂的相互作用，并鼓励应用DoE研究以获得更深入的洞察力(实施例4)。例如，与30当量吡唑胺混合的更高或更低量的MCH不会提高转化率，并且使用更高的温度不会促进更快的反应(图12)。在添加剂MCH，MPCH (5) 或PH (6) 存在下，在对1.5当量优化的条件下，将PEG-OA的装料降低至1.2当量，导致在 $\approx 85\text{--}90\%$ 转化率下的失速。然而，与其在模型系统中可忽略不计的影响相反，使用MCH/脲6M提高了反应完成率，高达 $\approx 95\%$  (图12)。

[0102] 然而，在存在聚乙二醇化试剂的情况下，聚乙二醇化完成的发展揭示了与松弛素原料具有相同保留时间但不起反应的杂质的形成。HRMS研究表明杂质对应于pAcF N端残基处的肟，并且加入NH<sub>2</sub>OH证实杂质对聚乙二醇化没有作用(图13)。假定两种假设来解释NH<sub>2</sub>OH的来源，即：(a) 其作为聚乙二醇化试剂中的输入杂质存在，和(b) 其在聚乙二醇化反应期间形成。对PEG-OA的仔细分析证明原料中的NH<sub>2</sub>OH水平<0.05 ppm，并且证明了第一个假设是假的。与反应过程中聚乙二醇化试剂的降解一致，监测肟杂质的形成显示其在整个聚乙二醇化期间明确增长(图14)。添加剂4-9的系统性HRMS研究表明MCH和MPCH促进了PEG-OA的分解，而乙酰肼、PH、PABH、PMBH和吡唑胺没有。因此，由于PABH提供的转化率与MCH的那些相当(图6)，其成本远低于后者(1 U\$/g vs 60 U\$/g)，所以PABH介导的聚乙二醇化最优。优化的条件涉及使用30当量的PABH和60当量的吡唑胺。这些结果随后将由DoE研究证实。

[0103] 在模型系统筛选期间观察到的苯胺对反应转化率的影响的修正表明除了吡唑胺之外，三种胺能够提高完成率水平。这些是间苯二胺、乙二胺和3,5-二氨基苯甲酸。使用1.2当量PEG-OA和30当量PABH，加入60当量胺得到转化率 $\approx 95\%$  (图19)。较低的添加剂化学计量在短时间导致较低的转化率( $\approx 90\%$ )，但在24小时慢慢地获得较高的转化率。

[0104] 实施例4

[0105] 评估不同添加剂组合之间的相互作用的DoE研究

[0106] 使用DOE方法，考虑到四个变量，即(a) 酰肼的身份，(b) 胺的身份，(c) 添加剂的总当量，和(d) 所用添加剂的胺:酰肼比例，进一步探寻了用于松弛素和FGF21的聚乙二醇化的胺和酰肼添加剂之间的相互作用。使用松弛素和FGF21进行研究，以检查胺:酰肼摩尔比和PEG-OA加载量对速率和转化率的影响，并分析先前在模型系统中鉴定的各种胺(图6)。这些实验的结果指出胺:酰肼比例之间的复杂相互作用，并且表明反应优化需要仔细考虑胺的类型以及底物蛋白质。

[0107] 在第一轮筛选中(表1)，我们将PABH、乙酰肼和新戊酰肼与吡唑胺的组合用于松弛素和FGF21二者的聚乙二醇化(图17)。还考虑了PEG-OA当量和脲浓度。该筛选中的大多数添加剂体系都具有良好的性能。与先前的研究(图7和12)一致，2:1胺:酰肼体系在促进高转化率方面名列前茅。虽然新戊酰肼是一种优异的酰肼添加剂，可以促进高转化率和快速反应速率，但在反应混合物中观察到新的杂质，而在使用PABH时在反应混合物中未观察到新的杂质。

[0108] 表1

[0109] 松弛素聚乙二醇化的初步筛选结果

[0110]

吡唑胺 (当量)	酰肼	酰肼 (当量)	转化率 (%)
60	新戊酰肼	30	98
60	PABH	30	96
0	新戊酰肼	60	96
30	乙酰肼	10	96

[0111] 使用FGF21重复该筛选具有相似结果(表2)。PABH被证明是加速反应的杰出添加剂,并且作为该倡议的目标之一是开发可应用于范围广泛的蛋白质体系的一般聚乙二醇化方法,PABH被选择用于进一步研究。使用PABH作为酰肼组分的另一支持是下列事实:它在AMES测试中是阴性的,不像为已知有效诱变剂的乙酰肼(Bhide, S.V. 等人, *Cancer Lett.*, 23:235 (1984))。

[0112] 表2

[0113] FGF21聚乙二醇化的初步筛选结果

[0114]

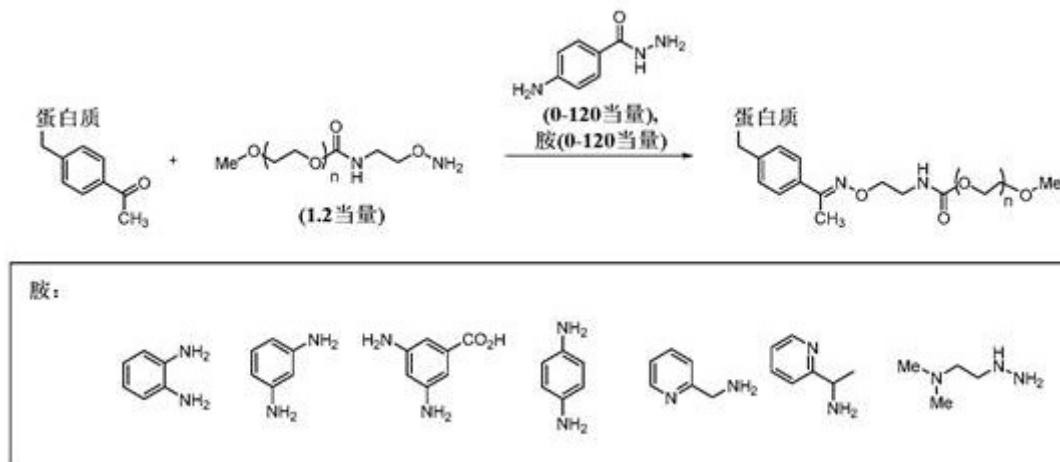
吡唑胺 (当量)	酰肼	酰肼 (当量)	转化率 (%)
0	PABH	30	91
60	PABH	60	89
30	PABH	30	88
30	新戊酰肼	60	83
10	乙酰肼	60	82
60	新戊酰肼	10	80
0	乙酰肼	10	77
10	新戊酰肼	10	73
0	乙酰肼	30	69

[0115] 选择PABH作为酰肼后,使用松弛素和FGF21蛋白二者,在PABH与更广范围的胺的组合中进行筛选(方案3)。对于这些实验,进行了以下考虑:(a) 筛选先前在模型系统中测试的胺(图5),(b) 总添加剂当量(酰肼和胺的总和)将在20-120范围内,和(c) 反应时间将被限制在24小时。

[0116] 方案3

[0117] 在不同胺存在下的松弛素和FGF21的聚乙二醇化方案

[0118]



[0119] 由于使用PABH和吡唑胺进行了第一次DOE筛选,所以确定哪种胺(或胺类)最适用于含PABH的添加剂体系是主要的兴趣。用松弛素和FGF21筛选的实验结果总结如下(分别为表3和4)。

[0120] 表3

[0121] 来自松弛素DoE第2轮的数据

[0122]

胺添加剂	胺:PABH 比例	总当量	时间 (h)	转化率 (%)
邻苯二胺	0.6	20	22.7	96
邻苯二胺	1.7	50	21.0	96
邻苯二胺	0.3	85	18.5	94
邻苯二胺	0.6	120	18.4	94
1-吡啶-2-基-乙胺	0.3	20	22.2	94
1-吡啶-2-基-乙胺	3.0	20	23.7	93
1-吡啶-2-基-乙胺	0.3	120	22.6	91
1-吡啶-2-基-乙胺	3.0	120	23.5	88
2-(二甲基氨基)乙肼	0.3	20	23.1	94
2-(二甲基氨基)乙肼	3.0	20	23.1	88
2-(二甲基氨基)乙肼	1.0	85	21.4	84
2-(二甲基氨基)乙肼	3.0	120	19.7	55
3,5-二氨基苯甲酸	3.0	20	18.8	94
3,5-二氨基苯甲酸	1.0	50	20.1	95
3,5-二氨基苯甲酸	3.0	120	21.8	94
3,5-二氨基苯甲酸	0.3	120	23.5	94
间苯二胺	3.0	20	19.3	94
间苯二胺	0.6	85	18.9	94
间苯二胺	3.0	120	23.1	96
间苯二胺	0.3	120	19.7	93
对苯二胺	1.0	20	19.3	96
对苯二胺	3.0	50	18.9	96
对苯二胺	1.6	120	20.6	94

[0123] 表4

[0124] 来自FGF21第2轮的数据

[0125]

胺添加剂	胺:PABH 比例	总当量	时间 (h)	转化率 (%)
邻苯二胺	0.64	120	23.5	60
邻苯二胺	3.00	85	23.7	70
邻苯二胺	0.33	85	24.3	57
邻苯二胺	1.74	50	20.9	67
邻苯二胺	0.64	20	20.5	64
间苯二胺	3.00	20	24.4	48
间苯二胺	0.33	120	24.9	55

间苯二胺	0.33	20	24.1	70
间苯二胺	0.64	85	24.7	37
间苯二胺	3.00	120	20.9	75
3,5-二氨基苯甲酸	3.00	20	23.9	55
3,5-二氨基苯甲酸	0.33	120	23.2	58
3,5-二氨基苯甲酸	0.33	20	22.3	70
3,5-二氨基苯甲酸	1.00	50	20.1	76
3,5-二氨基苯甲酸	3.00	120	19.7	77
乙二胺	1.00	20	24.3	59
乙二胺	3.00	50	24.0	55
乙二胺	0.33	50	22.7	73
乙二胺	0.33	120	21.4	77
乙二胺	1.57	120	20.5	52
2-氨基吡啶	0.33	85	23.6	65
2-氨基吡啶	3.00	85	23.1	74
2-氨基吡啶	1.00	120	22.4	68
2-氨基吡啶	1.57	20	24.5	58
2-氨基吡啶	0.33	20	19.2	54
1-吡啶-2-基-乙胺	0.33	120	22.2	58
1-吡啶-2-基-乙胺	3.00	120	23.1	42
1-吡啶-2-基-乙胺	3.00	20	24.0	24
1-吡啶-2-基-乙胺	1.57	85	21.8	70
1-吡啶-2-基-乙胺	0.64	50	23.2	68
1-吡啶-2-基-乙胺	0.33	20	20.1	53
2-(二甲基氨基)乙肼	3.00	20	22.7	52
2-(二甲基氨基)乙肼	0.33	20	22.8	48
2-(二甲基氨基)乙肼	0.33	120	22.8	70
2-(二甲基氨基)乙肼	3.00	120	19.7	20
2-(二甲基氨基)乙肼	1.00	85	19.3	49

[0126] 松弛素的聚乙二醇化结果在各种胺之间是一致的,一般而言转化率相当高。另一方面,对于FGF21,3,5-二氨基苯甲酸似乎在1.0和3.0的胺:PABH比例下都是聚乙二醇化的好良好促进剂。保持总当量和比例不变,我们可以更好地描述胺对转化率的影响。对于松弛素,该数据在表5中给出。

[0127] 表5

[0128] 胺选择对松弛素聚乙二醇化转化率的影响

[0129]

胺添加剂	胺:PABH 比例	总当量	时间 (h)	转化率 (%)
1-吡啶-2-基-乙胺	0.33	120	28.1	91
间苯二胺	0.33	120	25.2	94
1-吡啶-2-基-乙胺	0.33	120	22.6	91

对苯二胺	0.33	120	25.0	94
3,5-二氨基苯甲酸	0.33	120	23.5	93
2-(二甲基氨基)乙肼	0.33	120	32.1	88

[0130] 对于松弛素, 胺添加剂的影响是显而易见的, 但鉴于观察到高总转化率, 这种影响又是低的。对于FGF21, 影响更高(表6)。

[0131] 表6

[0132] 胺选择对FGF21聚乙二醇化转化率的影响

胺添加剂	胺:PABH 比例	总当量	时间 (h)	转化率 (%)
间苯二胺	0.33	120	24.9	55
3,5-二氨基苯甲酸	0.33	120	23.2	58
乙二胺	0.33	120	21.4	77
1-吡啶-2-基-乙胺	0.33	120	22.2	58
2-(二甲基氨基)乙肼	0.33	120	22.8	70

[0134] 从这些数据可以清楚地看出转化率高度依赖于与PABH组合使用的胺的身份。实现这些条件不一定反映聚乙二醇化反应的最佳条件, 我们通过转化率排序以得到FGF21的前五名执行添加剂组合清单(表7)。

[0135] 表7

[0136] FGF21聚乙二醇化的前五名执行添加剂体系

胺添加剂	总当量	胺:PABH 比例	时间 (h)	转化率 (%)
间苯二胺	120	3.00	20.9	75
3,5-二氨基苯甲酸	50	1.00	20.1	76
3,5-二氨基苯甲酸	120	3.00	19.7	77
乙二胺	120	0.33	21.4	77
2-氨基吡啶	85	3.00	23.1	74

[0138] 乙二胺和3,5-二氨基苯甲酸是在筛选条件下FGF21聚乙二醇化的两个最佳执行者。由于3,5-二氨基苯甲酸是一种相对廉价且容易得到的结晶固体, 因此它被认为是胺:PABH组合的最喜欢的添加剂。进一步的支持将来自总当量对胺:PABH比例的详细分析。正如在模型系统中观察到的那样, 这两种添加剂的合作效应相当复杂。实际上, 在模型系统中观察到的曲率对于松弛素和FGF21的聚乙二醇化更加显著。图19显示了FGF21的数据和趋势。当用于FGF21的聚乙二醇化时, 苯胺邻和间苯二胺是良好的添加剂。有趣的是, 剩余蛋白质的最终浓度对总当量和胺:PABH比例的图提供了完全不同的结果。这两种添加剂之间唯一的结构差异是氨基的取向。

[0139] 由于z轴是反应混合物中FGF21的最终浓度, 理想条件将在图中具有最低的z轴值。对于可以允许试剂装料的较小差异的稳定过程, 平坦图或具有谷或凹陷的图是理想的。一种符合此前提的添加剂是3,5-二氨基苯甲酸(图20)。

[0140] 当用于松弛素的聚乙二醇化时, 3,5-二氨基苯甲酸在合理的反应时间内也产生高转化率。图20(左和右)的比较表明增加的转化率也与蛋白质的身份相关联。

[0141] 实施例5

[0142] 使用简单铵盐

[0143] 鉴于胺添加剂在pH 4下的有益作用,我们推测简单的铵盐也可以改善松弛素的聚乙二醇化。为此,进行了具有不同量的PABH和NH<sub>4</sub>OAc或NH<sub>4</sub>Cl的一系列实验,揭示了60当量PABH和120当量NH<sub>4</sub>Cl的组合的优越性,以提供已在10小时时观察到的最佳转化率(97%,表8)。有趣的是,重新检查在NH<sub>4</sub>Cl存在下模型二肽的反应提供了与没有NH<sub>4</sub>Cl观察到的曲线相同的曲线,表明NH<sub>4</sub>Cl的作用可能与松弛素结构的改变相关。实际上,添加已知的离液剂如脲或(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>得到相当的结果(图21)。NH<sub>4</sub>Cl的积极作用似乎是普遍的,并且在没有酰肼添加剂或存在乙酰肼的情况下,在松弛素的聚乙二醇化中重新出现(图22)。

[0144] 表8

[0145] 用于筛选添加剂量和简单铵盐的转化率

	反应	添加剂	盐	转化率 (10 h)
[0146]	1	30 当量 pNHP 酰肼	60 当量 NH <sub>4</sub> OAc	90 %
	2	30 当量 pNHP 酰肼	120 当量 NH <sub>4</sub> OAc	94 % (x3)
	3	60 当量 pNHP 酰肼	60 当量 NH <sub>4</sub> OAc	95 %
	4	60 当量 pNHP 酰肼	120 当量 NH <sub>4</sub> OAc	92 %
	5	60 当量 pNHP 酰肼	120 当量 NH <sub>4</sub> Cl	97 %
	6	30 当量 pNHP 酰肼	60 当量 NH <sub>4</sub> Cl	95 %

[0147] 寻找更好地理解NH<sub>4</sub>Cl效应起源的光谱研究表明盐改变溶液中松弛素的构象。虽然紫外光谱分析无法检测到加入120当量NH<sub>4</sub>Cl后芳族残基(260-290 nm)的吸光度的变化(图23),但红外光谱表明存在对酰胺II带H键的结构修饰(图24)。据推测,紫外分析检测芳族残基变化的失败可追溯到松弛素中氨基酸Tyr(Y)、Phe(F)和Trp(W)的远端位置,这在很大程度上使残基暴露于溶剂并缺乏任何重要的分子内相互作用。

[0148] 对松弛素结构的细微修饰发现,对<sup>15</sup>N NMR HSQC光谱研究的进一步支持,其与下列相一致:在加入NH<sub>4</sub>Cl后蛋白质折叠进入更高的无规卷曲百分比(图25),和近紫外CD研究,其显示松弛素三级结构指纹区域的小差异可能是由于二聚化界面改变(图26)。

[0149] 实施例6

[0150] 典型程序和结果

[0151] 根据本备忘录中报告的研究,建议以更大规模使用PABH和NH<sub>4</sub>Cl的组合。下表给出了各种蛋白质体系的结果。

[0152] 表9

	蛋白质 / PEG-OA	条件 <sup>1</sup>	转化率 (%)
	松弛素 / 20 kDa PEG-OA	30 当量 PABH, 120 当量 NH <sub>4</sub> Cl, 20°C	94
	松弛素 / dPEG36-OA	30 当量 PABH, 30°C	90
	FGF21 G1 / 30 kDa PEG-OA	30 当量 PABH, 120 当量 NH <sub>4</sub> Cl, 20°C	88
	FGF21 G2 / 30 kDa PEG-OA	30 当量 PABH, 120 当量 NH <sub>4</sub> Cl, 20°C	98

[0154] <sup>1</sup>条件: 1.2 当量 PEG-OA试剂, 20°C, 除非另外指出。在18-24小时反应时间后通过HPLC测定确定转化率。

[0155] 在聚乙二醇化反应中使用PABH时的一个考虑因素是可商购的试剂的纯度在供应商中不相同。大规模使用98%PABH导致在色谱过程中与所需产物一起洗脱的杂质峰。这些杂质的分离证实它们的结构是存在于PABH中的酰肼和酰胺杂质(图27)。

[0156] 由于反应中使用的当量高,该试剂中即使是低水平的杂质也会产生影响。因此,建

议追求可得的最高质量的PABH。

[0157] 实施例7

[0158] 典型筛选程序

[0159] 添加剂的使用在操作上是简单的。作为代表性实施例,给出了FGF21 G1与30 kDa PEG-OA的聚乙二醇化。

[0160] 表10

[0161] 试剂及其浓度

[0162]

项目	量(mg)	体积(mL)	MW	$\mu\text{mol}$
FGF21溶液	20.3	1.0	19585	1.04
PABH	4.7		151.17	31.2
$\text{NH}_4\text{Cl}$	6.7		53.49	125
30 kDa PEG-OA	39.0		31000	1.26

[0163] 程序

[0164] 在干净的1.5 mL小瓶中将FGF21 (1.0 mL, 20.3 mg/mL, 1.04  $\mu\text{mol}$ ) 在20 mM NaOAc, 6M脲, pH 4中的溶液加入到固体 $\text{NH}_4\text{Cl}$  (6.7 mg, 124.8  $\mu\text{mol}$ ) 中。轻轻搅拌混合物直至所有固体溶解。在单独的小瓶中,合并MPEG 30 kDa (39.0 mg, 1.26  $\mu\text{mol}$ ) 和PABH (4.7 mg, 31.2  $\mu\text{mol}$ )。将来自第一小瓶的蛋白质溶液转移到含有聚乙二醇化试剂和PABH的第二小瓶中,轻轻搅拌混合物直至固体溶解(约20 min)。测量pH,如果需要,使用0.1M HCl将混合物调节至pH 4。

[0165] 典型的反应混合物是均匀的溶液,因此在不搅拌的情况下将反应溶液保持在20-25°C。通过HPLC使用ELS或UV检测在280 nm监测反应进展。通过将HPLC分析与外标比较来评估反应完成率。

[0166] 实施例8

[0167] 比较聚乙二醇化条件

[0168] 该倡议的最终目标是证明该新的聚乙二醇化程序对比项目开始时适当的程序以及文献中“现有技术状态”条件的实用性。这主要是为了量化通过使用推荐的添加剂组合可获得的昂贵聚乙二醇化试剂的节省。表11包括用于松弛素和FGF21 G1聚乙二醇化以及由PABH添加剂介导的聚乙二醇化的原始条件。

[0169] 表11

[0170] 聚乙二醇化条件的比较,强调潜在成本节约

[0171]

蛋白质	PEG	PEG (当量)	T (°C)	PABH(当量)	$\text{NH}_4\text{Cl}$ (当量)	转化率 (%)	注
松弛素	20 kDa PEG-OA	1.5	50	N/A	N/A	96	原始条件
松弛素	20 kDa PEG-OA	1.2	20	30	120	94	20%的PEG减少,产率类似。
FGF21 G1	30 kDa PEG-OA	2.5	20	N/A	N/A	75	原始条件
FGF21 G1	30 kDa PEG-OA	1.2	20	30	120	88	58%的PEG减少加13%的产率增加。

[0172] 松弛素化合物的潜在成本降低纯粹与所用PEG 20 kDa试剂的量有关,因为两种方法的转化率和产率相当。但是,对于第一代FGF21资产的聚乙二醇化,节省相当引人注目。PEG加载量减少多于50%与反应产率增加13%的组合,导致与其生产相关的总体成本降低70%。由于PABH和 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 的成本相对于聚乙二醇化试剂而言都非常低,所以它们的使用对生产的总体成本贡献最小。在下表中,我们比较了PABH条件与使用乙酰肼的那些。

[0173] 表12

[0174] 各种蛋白质体系聚乙二醇化结果总结及与乙酰肼的比较

蛋白质	条件 <sup>1</sup>	转化率(%)
松弛素 G1	<sup>2</sup> 无添加剂, 50℃	97
	<sup>2</sup> 无添加剂, 20℃	75
	30 当量 AcNNH <sub>2</sub> , 无共添加剂, 20℃	90
	30 当量 PABH, 无共添加剂, 20℃	86
	30 当量 PABH, 120 当量 NH <sub>4</sub> Cl, 20℃	94
[0175] 松弛素 G2	无添加剂, 40℃	70
	无添加剂, 30℃	70
	30 当量 AcNNH <sub>2</sub> , 无共添加剂, 30℃	80
	30 当量 PABH, 无共添加剂, 30℃	95
	30 当量 PABH, NH <sub>4</sub> Cl, 30℃	90
FGF21 G1	无添加剂, 20℃	53
	30 当量 AcNNH <sub>2</sub> , 无共添加剂, 20℃	80
	30 当量 AcNNH <sub>2</sub> , 120 当量 NH <sub>4</sub> Cl	82
	30 当量 PABH, 120 当量 NH <sub>4</sub> Cl, 20℃	88
FGF21 G2	30 当量 PABH, 120 当量 NH <sub>4</sub> Cl, 20℃	98

[0176] <sup>1</sup>所有反应使用1.2当量的聚乙二醇化试剂在20℃不搅拌下进行。

[0177] <sup>2</sup>反应使用1.5 当量聚乙二醇化试剂进行。

[0178] 以下列出了本公开中添加剂体系的一些优点：

[0179] 1) 用相当低量的非常昂贵的聚乙二醇化试剂(1.2当量相对于1.5-2.5当量)促进更高的转化率。下表提供了一个比较,其突出了对旧方法(标准条件)的改进。

分子	标准条件	转化率	在添加剂存在下的条件	在添加剂存在下的转化率
松弛素	1.5 当量 PEG 50 °C, 48 h	96 %	1.2 当量 PEG 60 当量 p-NHBzNNH <sub>2</sub> 120 当量 NH <sub>4</sub> Cl 20 °C, 10 h	96 %
	2.5 当量 PEG 脲 6M 20 °C, 24 h	75 %	1.2 当量 PEG 30 当量 p-NHBzNNH <sub>2</sub> 120 当量 NH <sub>4</sub> Cl 20 °C, 24 h	82 %
FGF21	1.6 当量 PEG 30 当量 AcNNH <sub>2</sub> 20 °C, 24 h	88 %	1.2 当量 PEG 60 当量 p-NHBzNNH <sub>2</sub> 120 当量 NH <sub>4</sub> Cl 20 °C, 24 h	89 %
	FGF21-GEN2			

[0181] 两种添加剂的组合极大地提高了反应速率和转化率,并且与原始条件相比,允许显著降低PEG加载量。

[0182] 2) 促进更快反应,其避免需要高反应温度。避免高温减少了有关蛋白质结构修饰

和反应稳定性的相关担忧。

[0183] 3) 用PABH(在初步研究中Ames阴性)代替乙酰肼(Ames阳性)。排除使用遗传毒性物质和在最终产品中的相关控制。

[0184] 药物组合物

[0185] 根据本公开制备的聚乙二醇化蛋白质可以进一步使得适合通过由本领域已知的方法与另外的药学上可接受的载体或媒介物的混合物或组合注射。在用于配制本发明产品的药学上可接受的载体中的为盐水、人血清白蛋白、人血浆蛋白等。本发明还涉及包含如上所述的缀合物和药学上可接受的赋形剂和/或载体的药物组合物。这样的药学上可接受的载体可以是水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇，聚乙二醇，植物油如橄榄油，和可注射的有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水，醇/水溶液，乳液或悬浮液，包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒介物包括氯化钠溶液，林格氏右旋糖，右旋糖和氯化钠，乳酸林格氏液或不挥发油。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂，电解质补充剂如基于林格氏右旋糖的那些等。也可以存在防腐剂和其他添加剂，例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。根据本公开制备的蛋白质缀合物可以通过本领域已知的方法用药学上可接受的载体或媒介物配制成为适于注射的药物组合物。参见例如WO 97/09996、WO 97/40850、WO 98/58660和WO 99/07401（其各自特此通过引用整体并入）。

[0186] 对于本领域技术人员而言显而易见的是，本公开不限于前述公开，并且可以以其他特定形式来体现而不脱离其基本属性。因此，期望本公开在所有方面都被认为是示例的而非限制性的，参考所附权利要求而不是前述公开，因此意图将落入权利要求等价物的含义和范围内的所有变化都包含在其中。

## 形成酮肟的一般机制

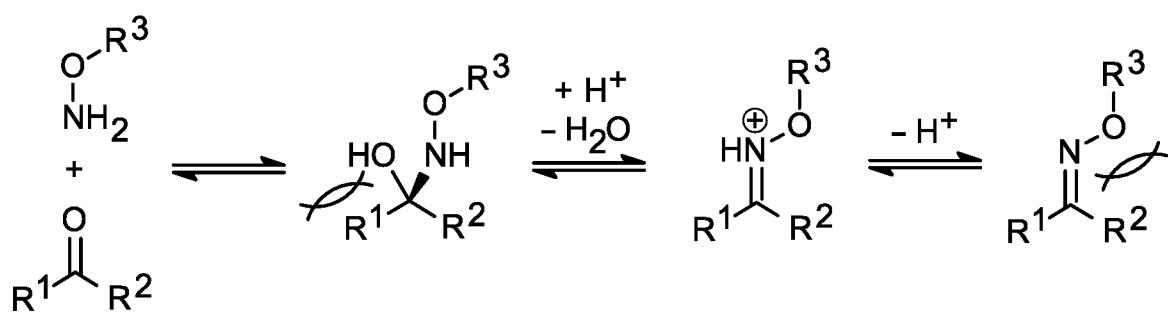


图 1

松弛素 (4mg/mL, 在水中) 与 20 kDa PEG-OA试剂的聚乙二醇化的色谱图

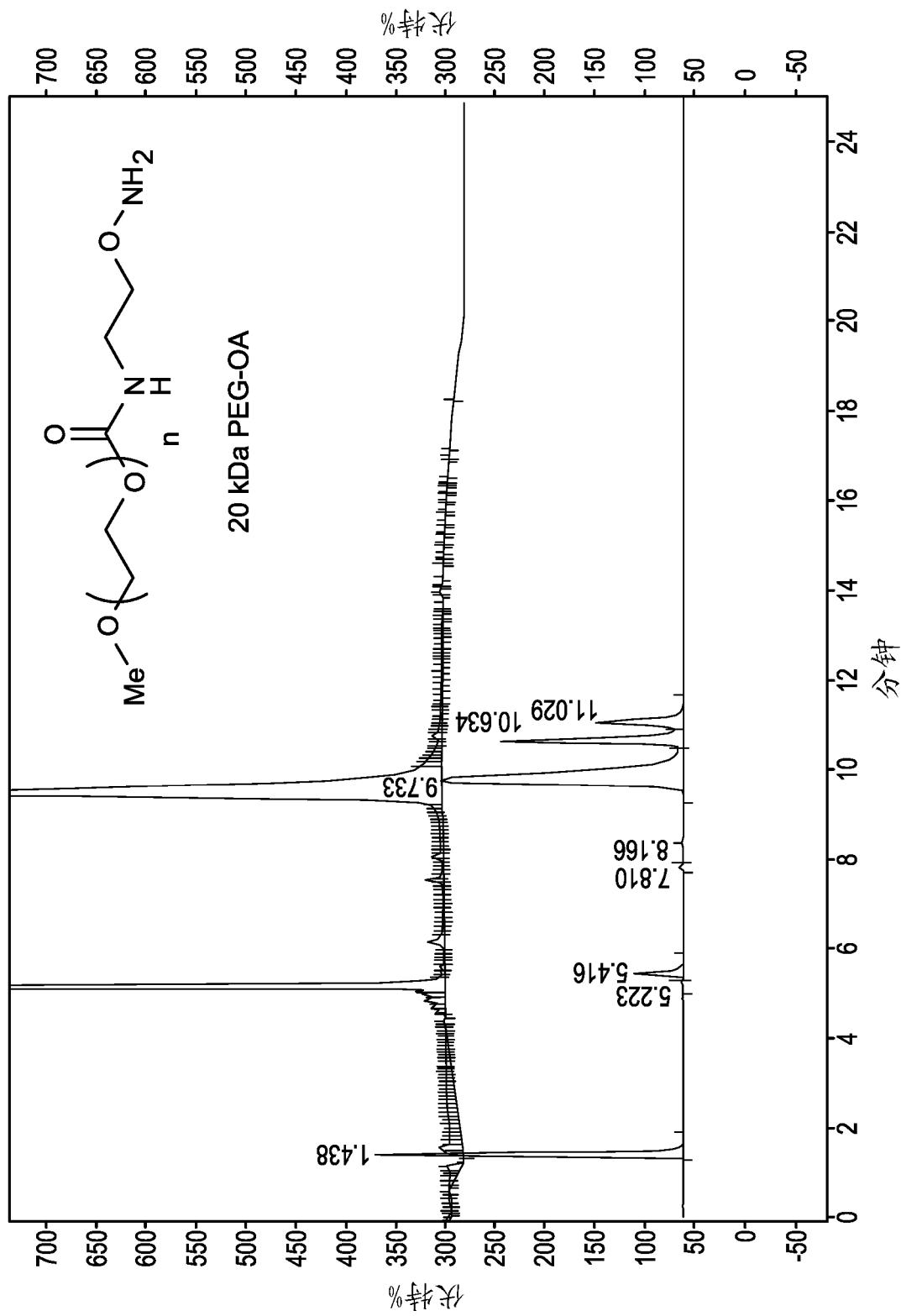


图 2

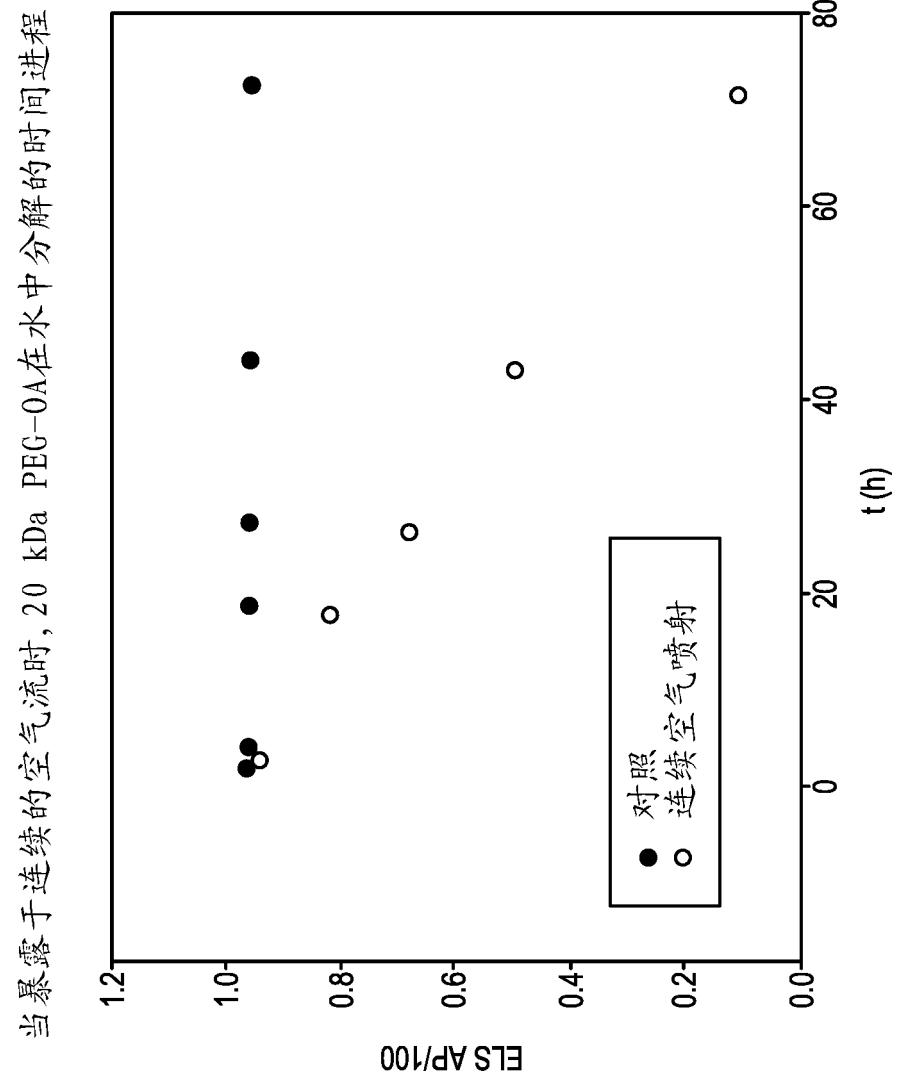


图 3

使用原位IR和 $^1\text{H}$ NMR光谱研究乙酰肼的稳定性

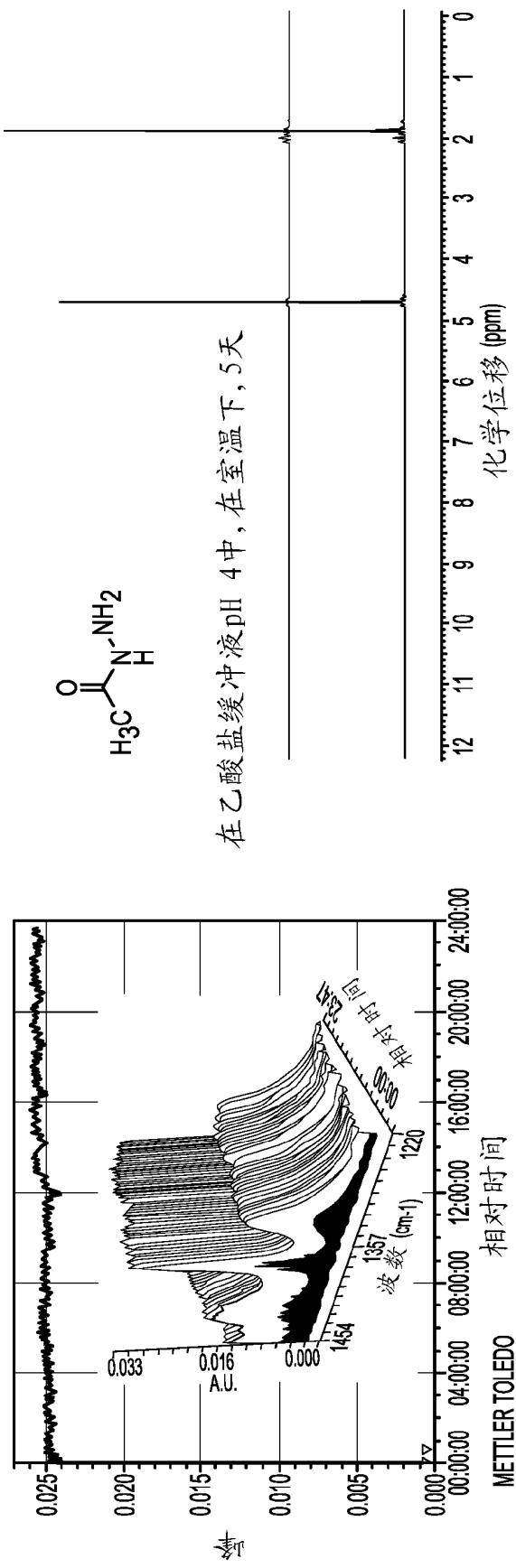


图 4

筛选添加剂的模型反应。反应条件: 1 (3.6 mmol) 和 2 (3.6 mmol), 在 1.0 mL 乙酸盐缓冲液 (20 mM, pH 4.0) 中, 在室温 (23°C) 下

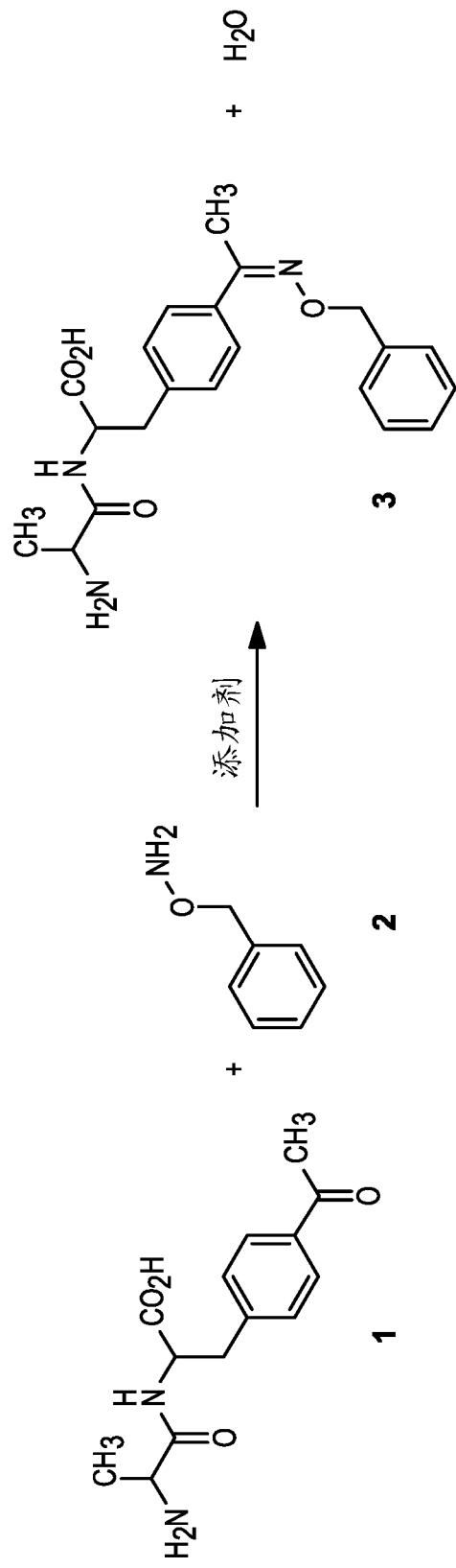


图 5

对不同添加剂观察到的相对速率 ( $k_{\text{rel}}$ )。乙酰肼 ( $k_{\text{rel}} \approx 2$ ) 显示在方框中

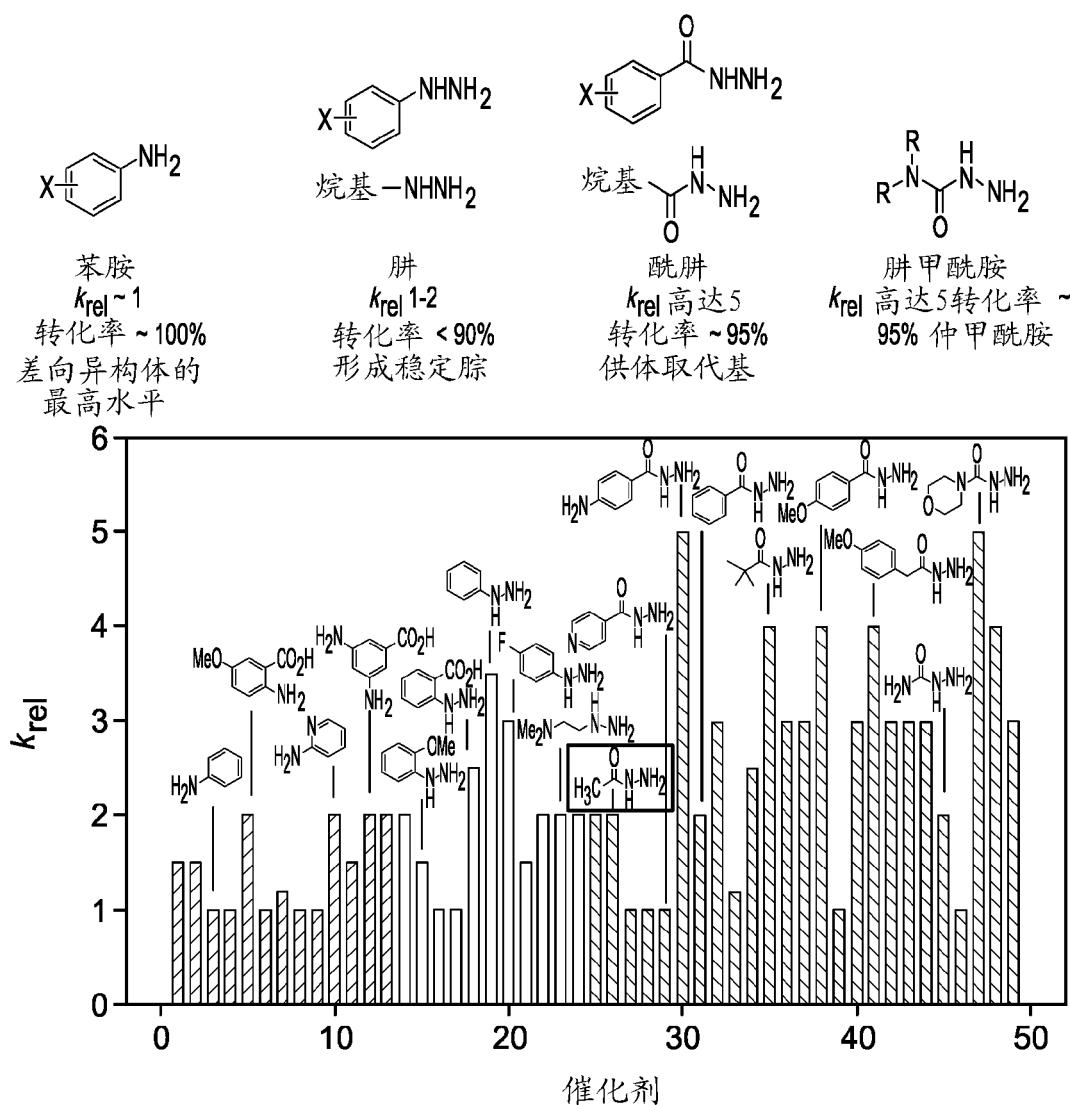


图 6

在(a)1当量吡唑胺(红色);(b)1当量MCH(蓝色);(c)1当量吡唑胺和1当量MCH(绿色)存在下,二肽1与0-苄基羟胺(2)的反应的时间进程。  
在没有添加剂的情况下获得的反应曲线以灰色显示

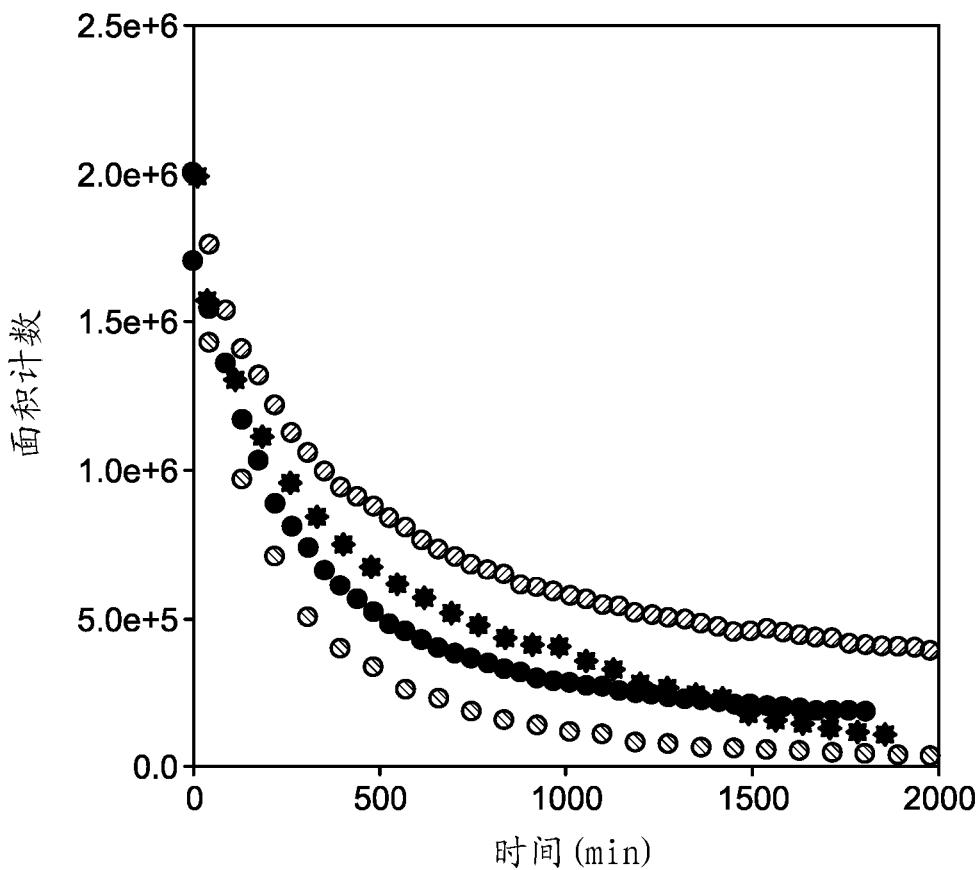


图 7

含有二肽1 (a) (蓝色); 与 (b) 1当量MCH (绿色); (c) 1当量MCH和1当量吡唑胺 (灰色); (d) 1当量吡唑胺 (红色) 的样品的<sup>1</sup>H NMR光谱的芳族区域。MCH和吡唑胺添加剂之间的协同效应产生具有更高浓度活性中间体的混合物, 与仅含有一种添加剂的样品相比

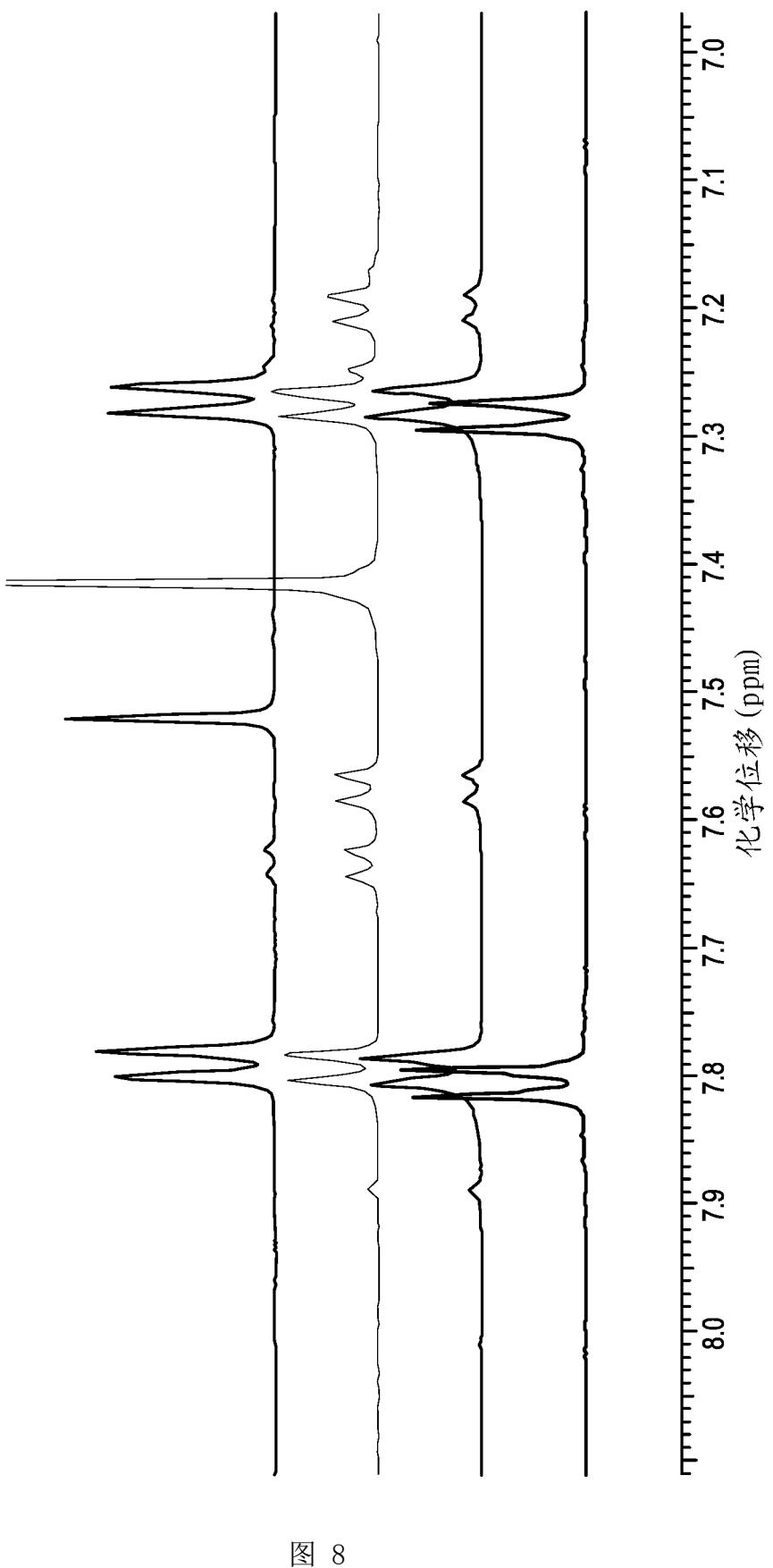


图 8

左：二肽1与30当量PABH和1.2当量20 kDa PEG-0A的聚乙二醇化；腙中间体被追踪为绿点。  
 右：聚乙二醇化反应，其中在使二肽与30当量PABH平衡过夜后添加1.2当量聚乙二醇化试剂

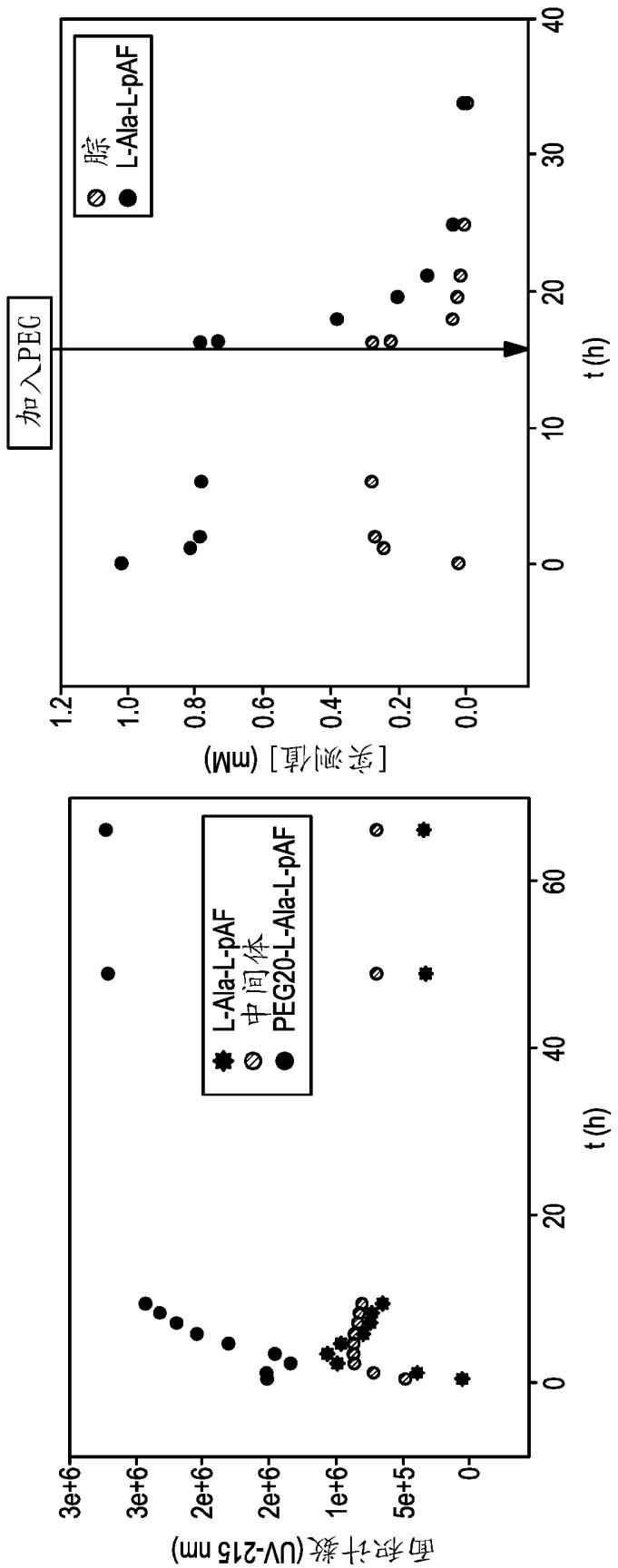


图 9

左：用于二肽1聚乙二醇化的脲浓度对PABH当量的图；蓝点表示其中省略了吡唑胺的影响。右：二肽1及其腙衍生物在混合物中：PABH和吡唑胺的不同组合对反应速率的影响。右：二肽1及其腙衍生物在含有PABH和吡唑胺的反应混合物中的最终浓度

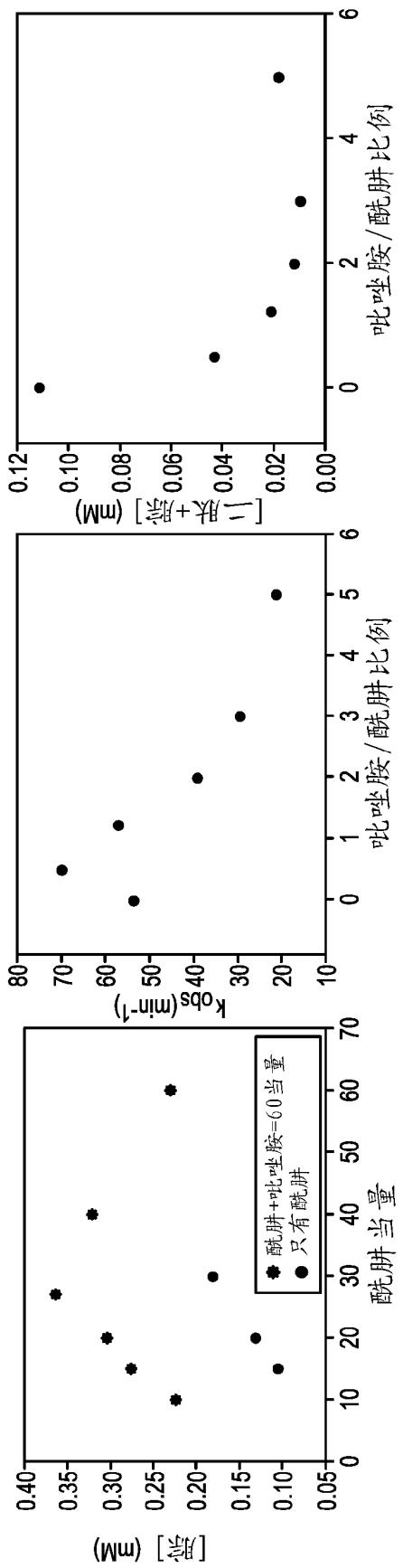


图 10

反应结束时剩余二肽1对总添加剂当量和吡唑胺: PABH比例的图

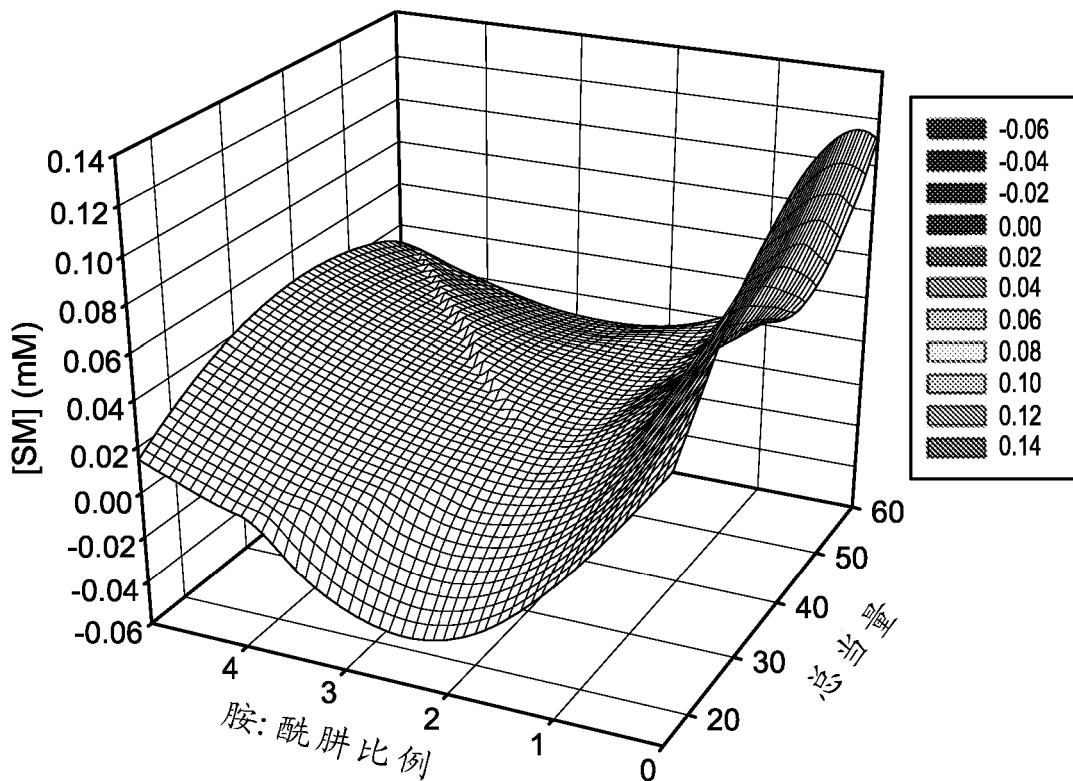


图 11

左: 在(a) 30当量乙酰肼(蓝色); (b) 30当量MCH(红色); (c) 10当量MCH(紫色); (d) 30当量吡唑胺(绿色); (e) 30当量MCH和30当量吡唑胺存在下松弛素与PEG-0A (1.5当量)的反应的时间进程; 在没有添加剂的情况下获得的反应曲线以灰色显示。中: 在(a) 30当量吡唑胺(蓝色); (b) 30当量MCH(红色); (c) 10当量MCH(紫色); (d) 30当量吡唑胺和10当量MCH(绿色); (e) 30当量MCH和30当量吡唑胺存在下松弛素与PEG-0A (1.5当量)的反应的时间进程。右: 在(a) 40 °C; (b) 10 °C; (c) 25 °C下, 在30当量吡唑胺和10当量MCH存在下, 松弛素与PEG-0A (1.5当量)的反应的时间进程。

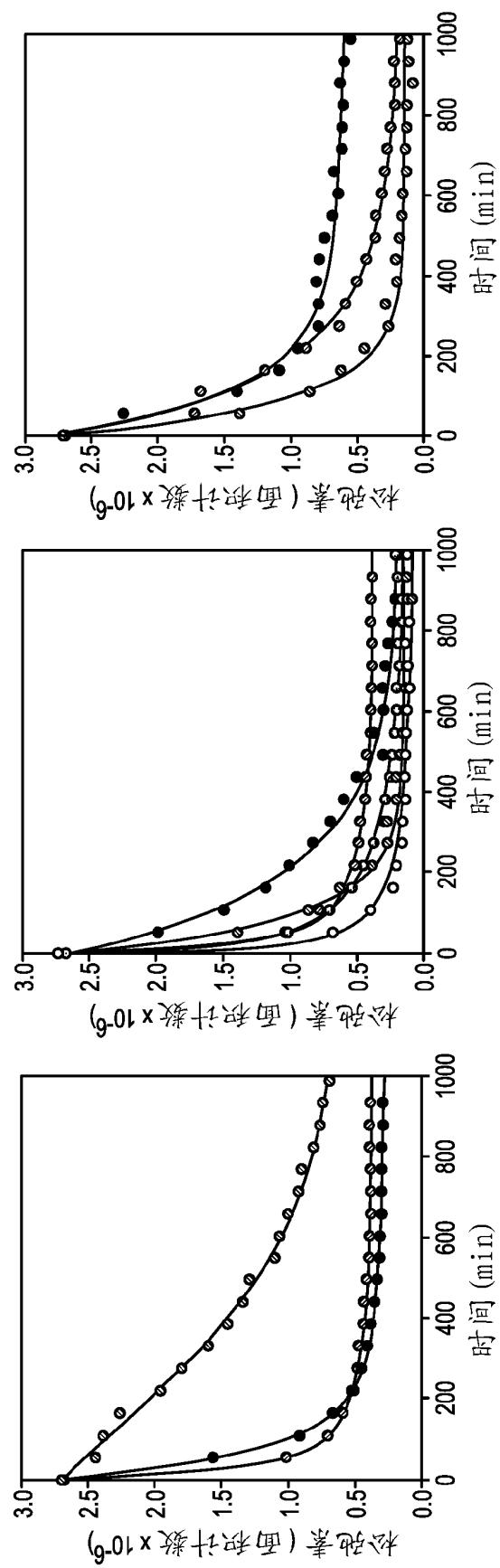


图 12

左: 在 (a) 30 当量MPCH和30 当量吡唑胺(绿色); 30 当量PH和30 当量吡唑胺(蓝色); 和(c) 30 当量MCH 和30 当量吡唑胺/脲6M (红色) 存在下, 松弛素与20 kDa PEG-0A (1.2当量) 的反应的时间进程。  
右: 在 (a) 30 当量PH和60 当量吡唑胺(蓝色); (b) 30 当量乙酰胺和60 当量吡唑胺(绿色); 和(c) 30 当量 PABI和60 当量吡唑胺(红色) 存在下, 松弛素与PEG-0A (1.2当量) 的反应的时间进程

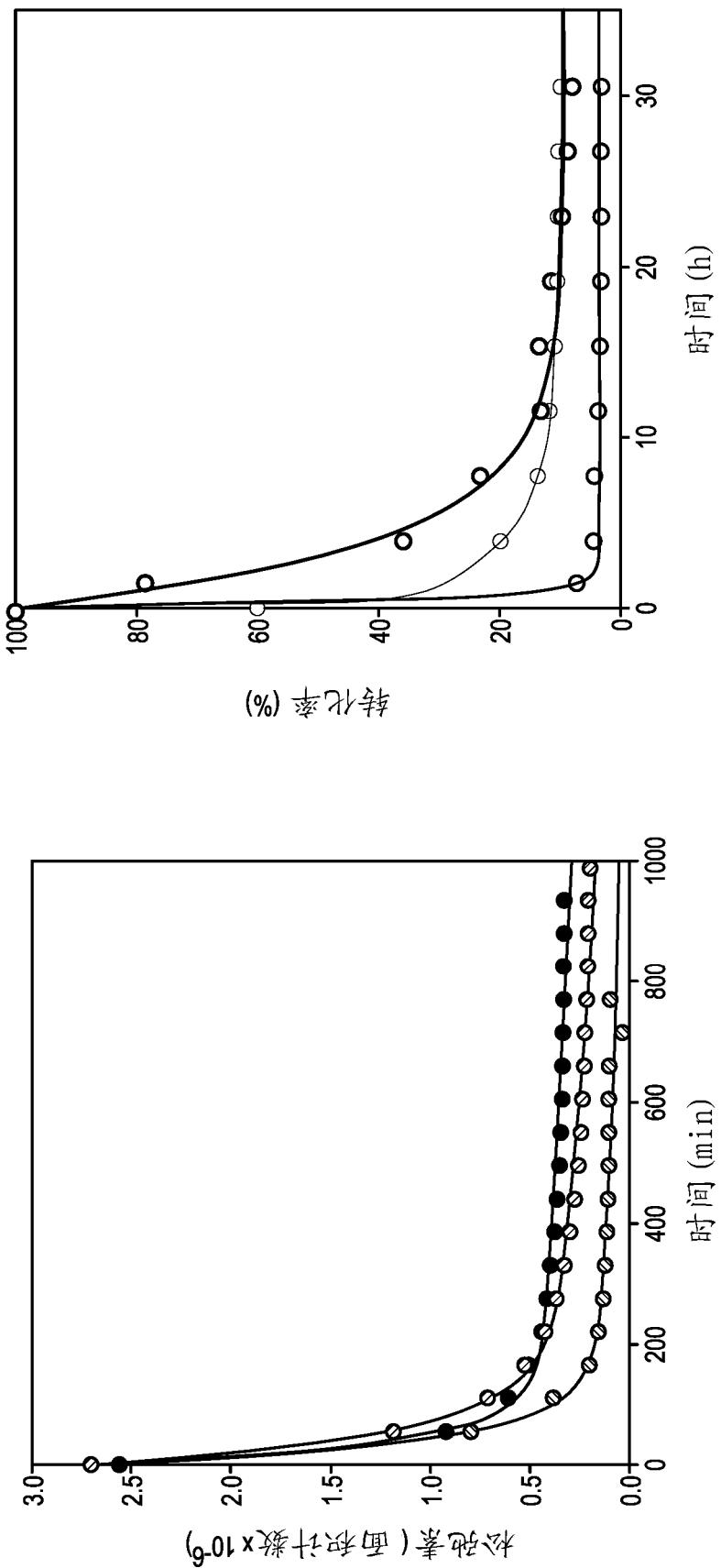


图 13

MCH在其端点加速的松弛素聚乙二醇化的HRMS分析。历程与残留的松弛素重叠。松弛素峰的0.04 min延迟是由于反应基团对色谱行为的影响，而不是晚洗脱杂质。

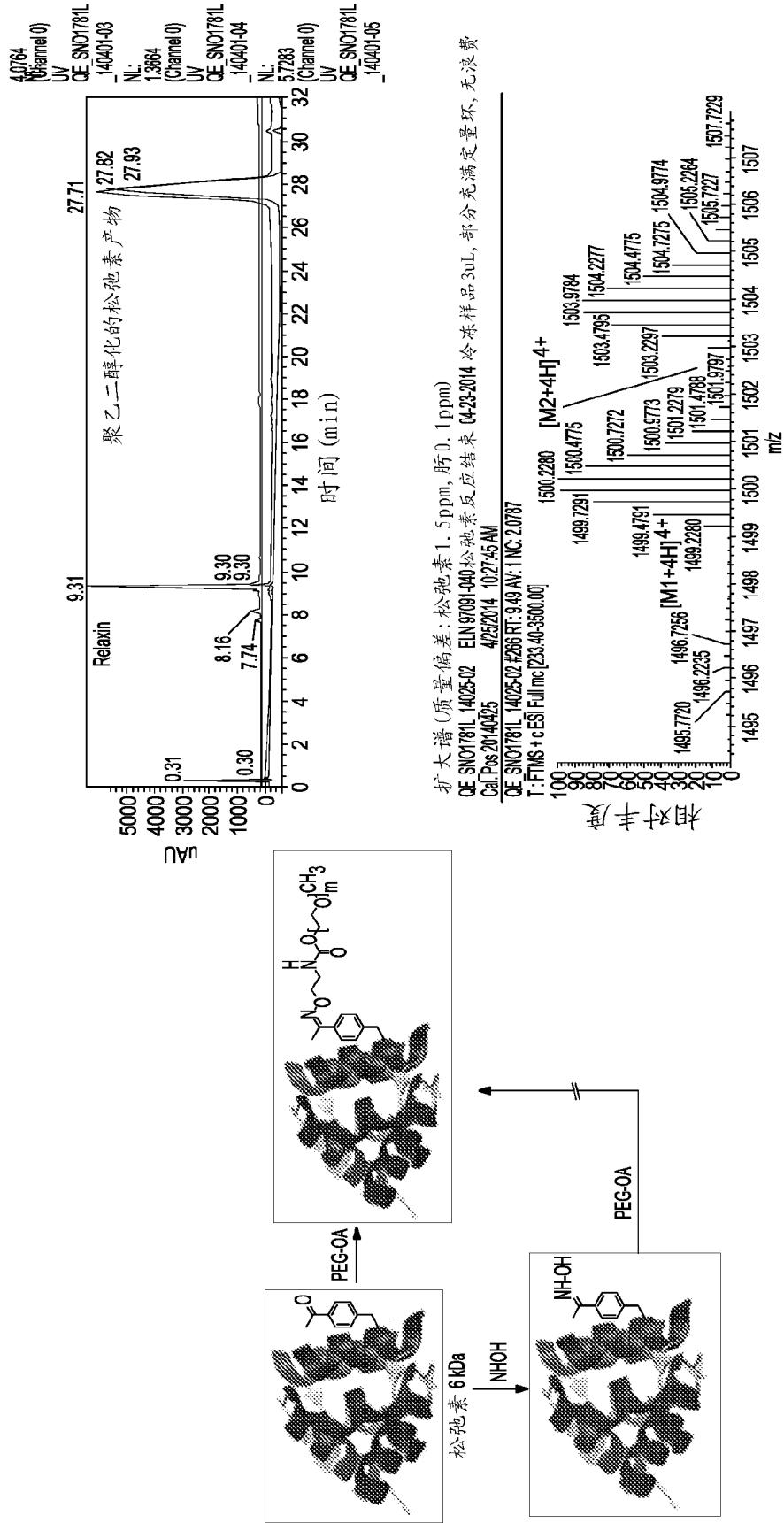


图 14

左: 在脲6M与(a) 30当量MCH和30当量吡唑胺(红色); (b) 30当量MCH、30当量吡唑胺和30当量NH<sub>2</sub>OH(蓝色)的存下, 松弛素与20 kDa PEG-0A (1.2当量) 的反应的时间进程。右: 在脲6M与30当量MCH和30当量吡唑胺(蓝色)的存在下, 松弛素与PEG-0A (1.2当量) 的分解的时间进程; 肝峰(红色)

在反应期间增长, 表明与PEG-0A分解平行形成差胺

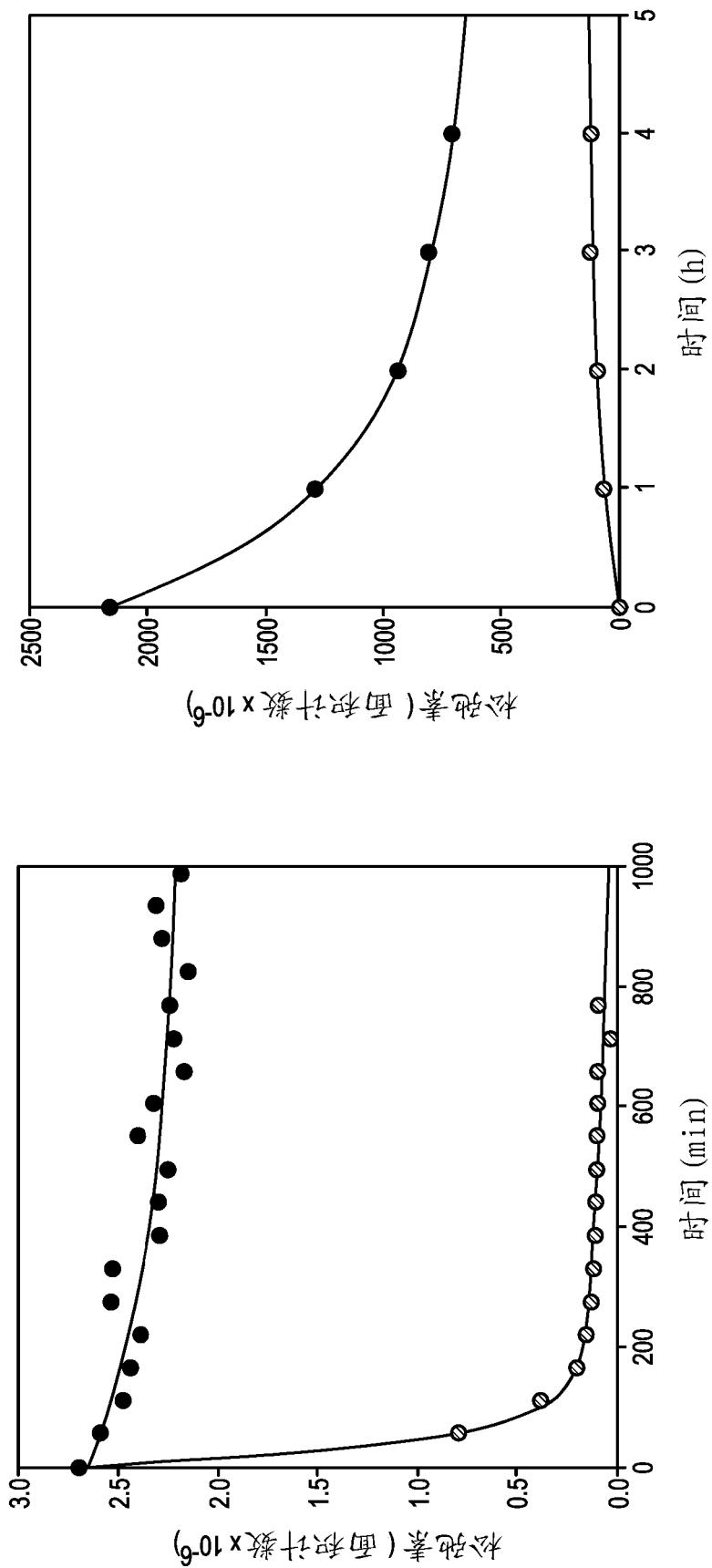


图 15

左: 在30当量PABH和(a) 60当量乙二胺(灰色); (b) 60当量3,5-二氨基苯甲酸(绿色); (c) 60当量间苯二胺(蓝色); 和60当量吡唑胺(红色)存在下, 松弛素与20 kDa PEG-0A (1.2当量)的反应的时间进程。右: 在(a) 30当量PABH和60当量3,5-二氨基苯甲酸(绿色); 和(b) 60当量PABH和120当量NH<sub>4</sub>C1 (蓝色)存在下, 松弛素与PEGOA (1.2当量)的反应的时间进程

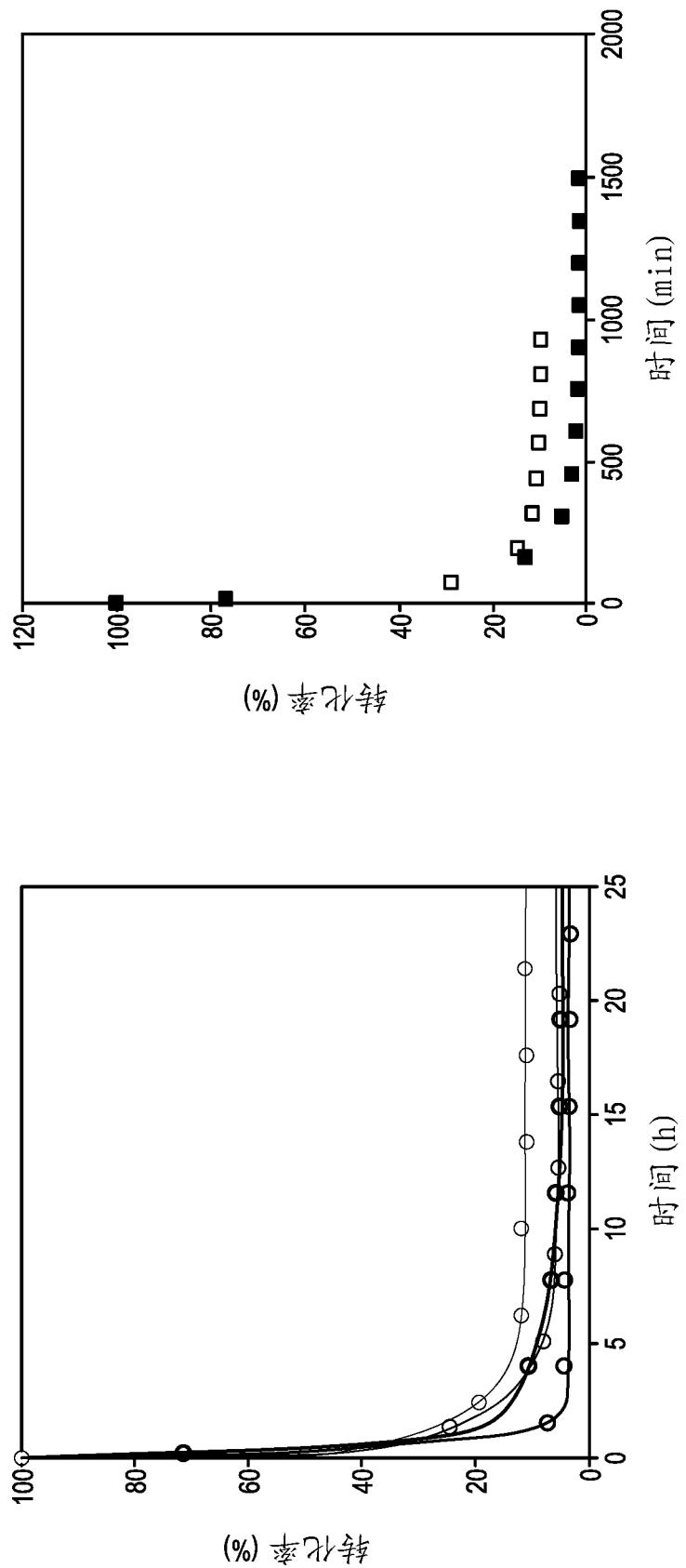


图 16

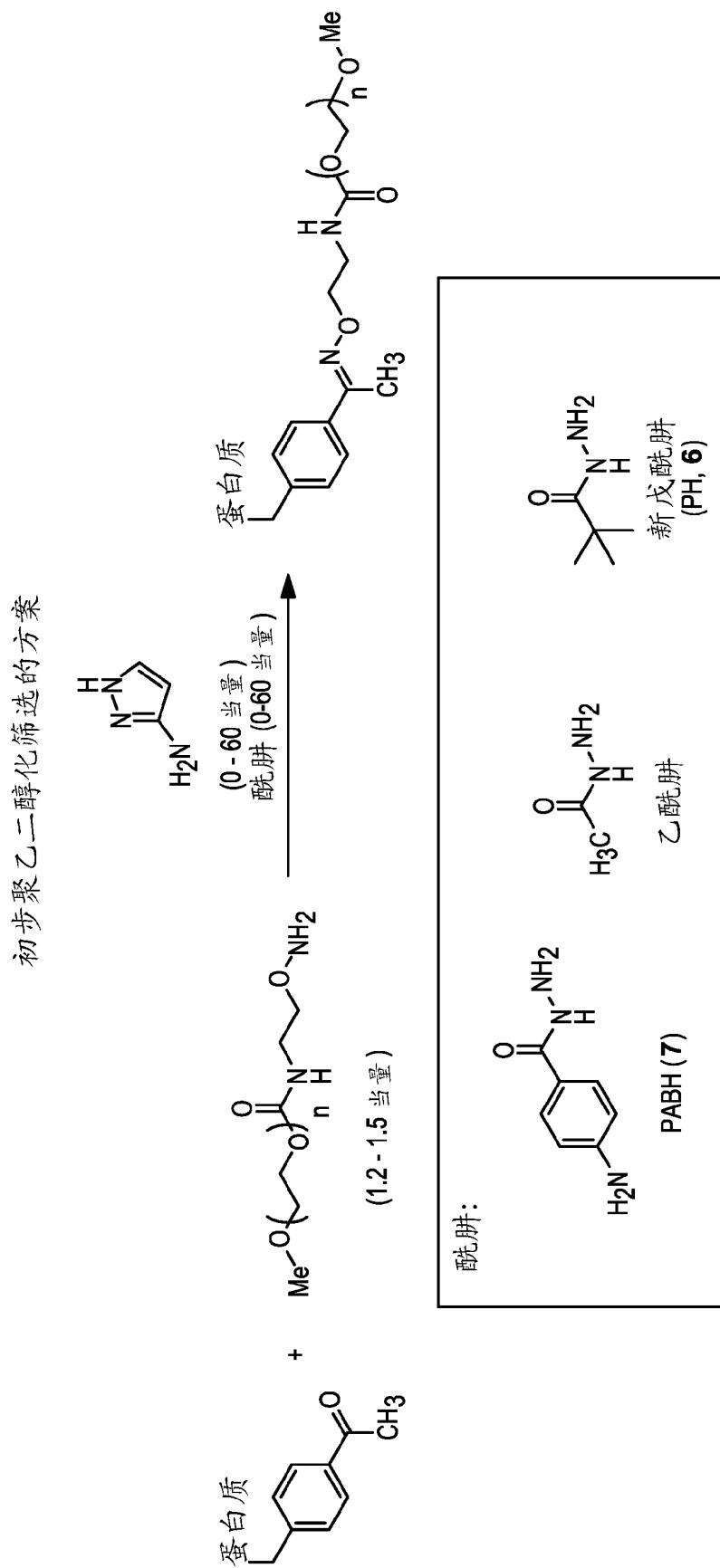


图 17

在不同胺存在下,松弛素和FGF21的聚乙二醇化的方案。

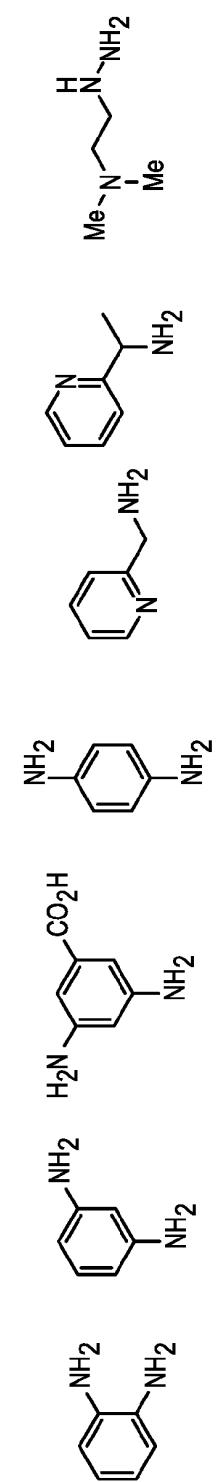
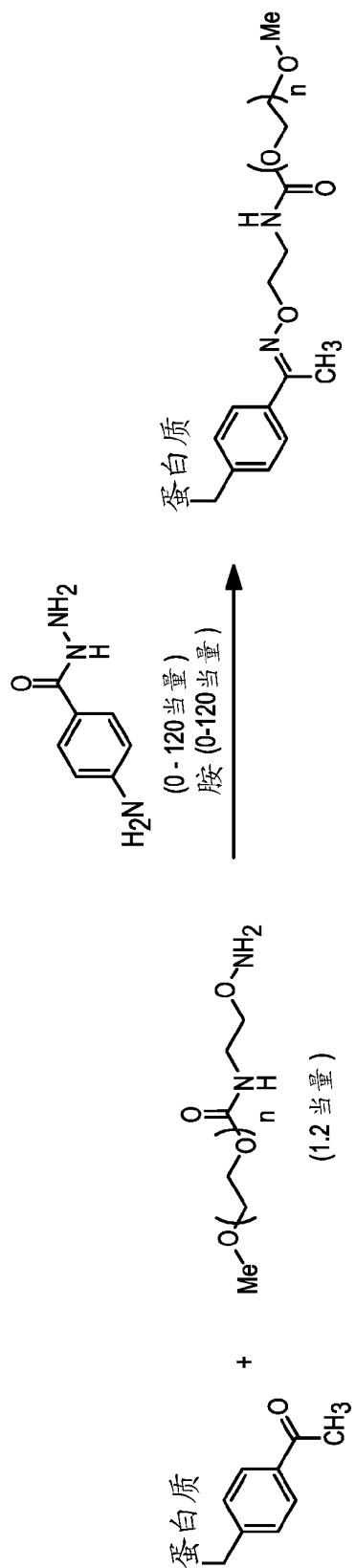


图 18

邻苯二胺和间苯二胺的聚乙二醇化结果，说明总当量对胺：PABH比例对最终 FGF21浓度的图的速率。左：邻苯二胺。右：间苯二胺。

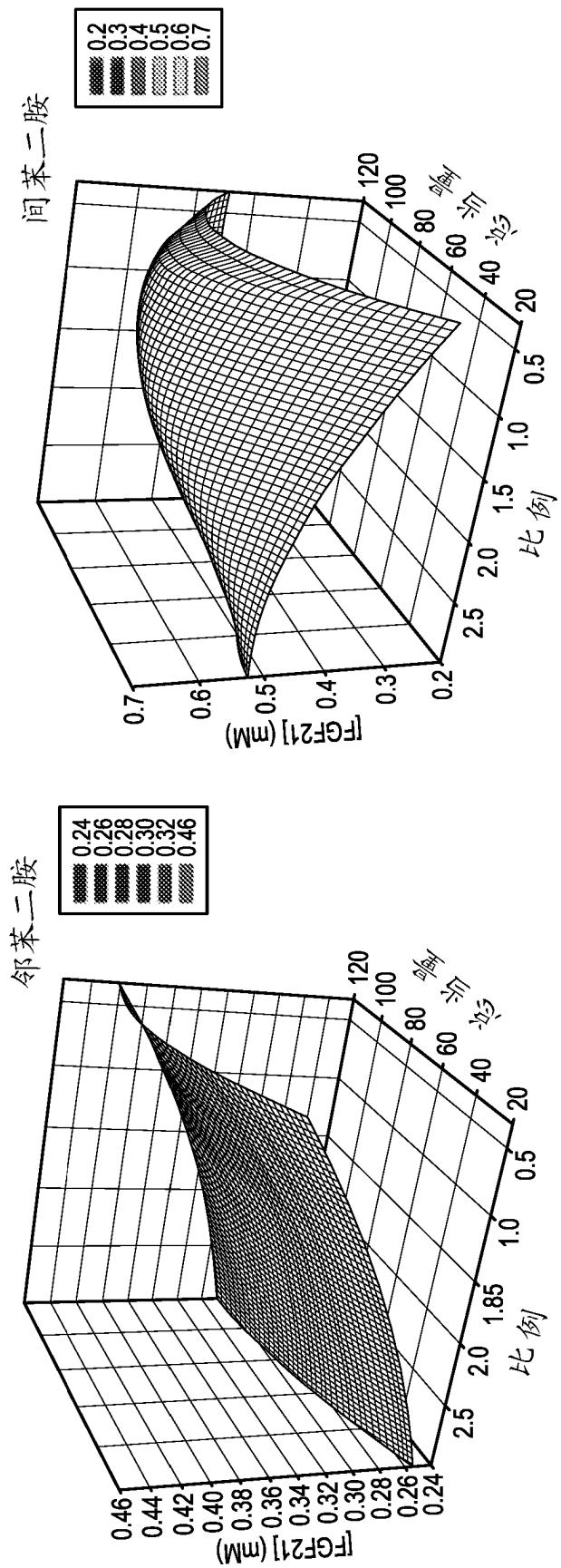


图 19

使用PABI和3, 5-二氨基苯甲酸进行聚乙二醇化的总添加剂当量对胺:PABI比例的图和转化率。左: FGF21与30 kDa PEG-0A。右: 松弛素与20 kDa PEG-0A

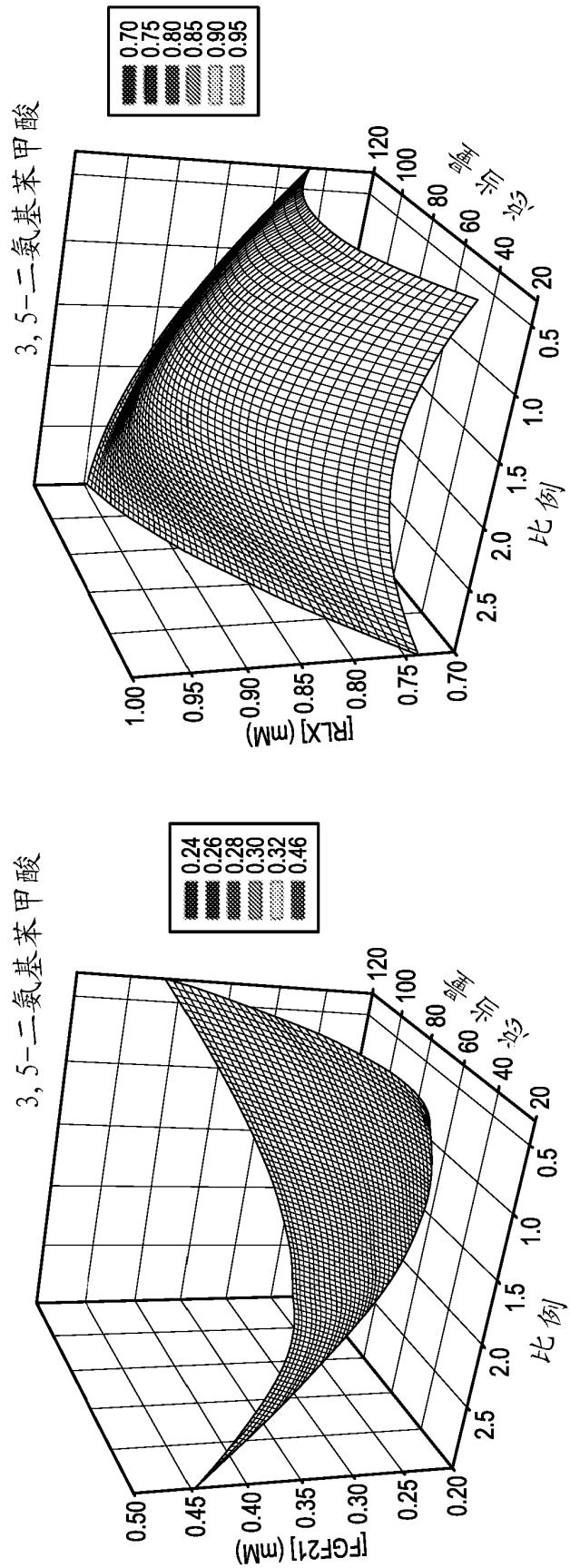


图 20

左: 在120当量盐和60当量PABH催化剂存在下, 使用 (a) 脲6 M(绿色);  
(b) NH<sub>4</sub>Cl(灰色) 和 (c) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (紫色) 的松弛素与20 kDa PEG-0A  
(1.2当量) 的反应的时间进程

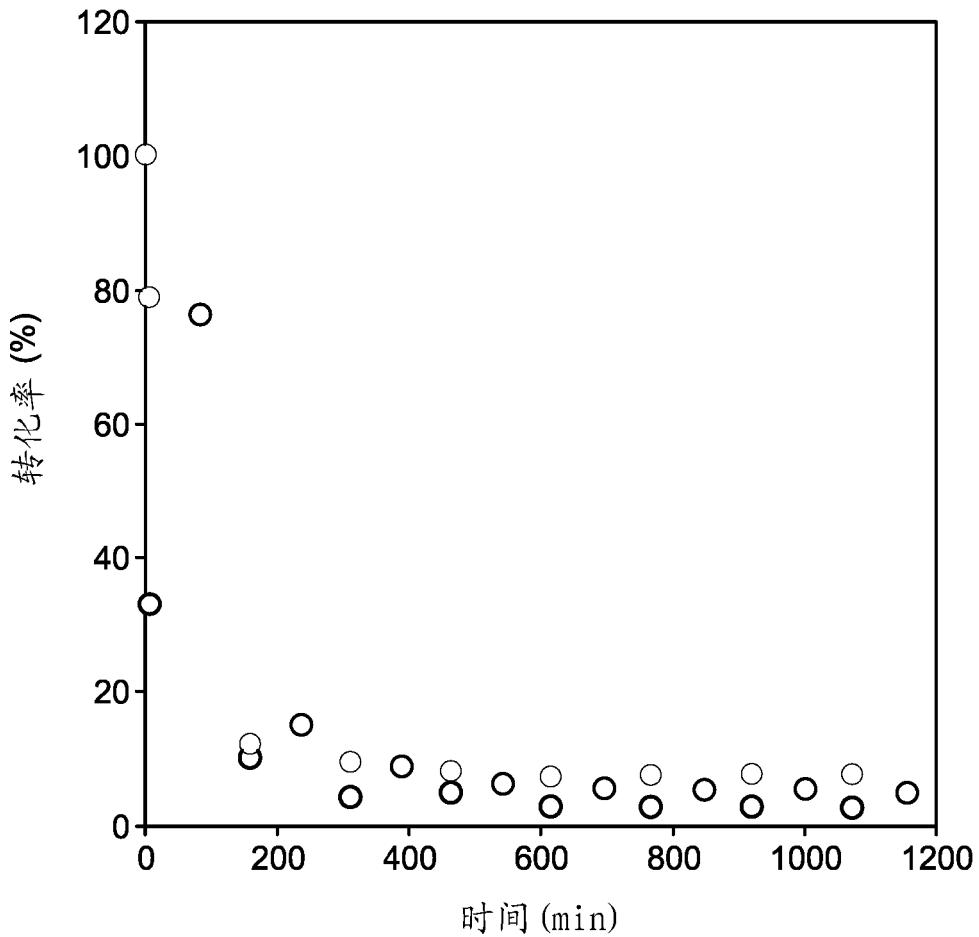


图 21

在没有添加剂(蓝色)的情况下和在(a)120当量NH<sub>4</sub>Cl(红色),  
(b)60当量乙酰肼(灰色),和(c)60当量乙酰肼和120当量NH<sub>4</sub>Cl(绿色)  
存在下,松弛素与20 kDa PEG-OA(1.2当量)的反应的时间进程

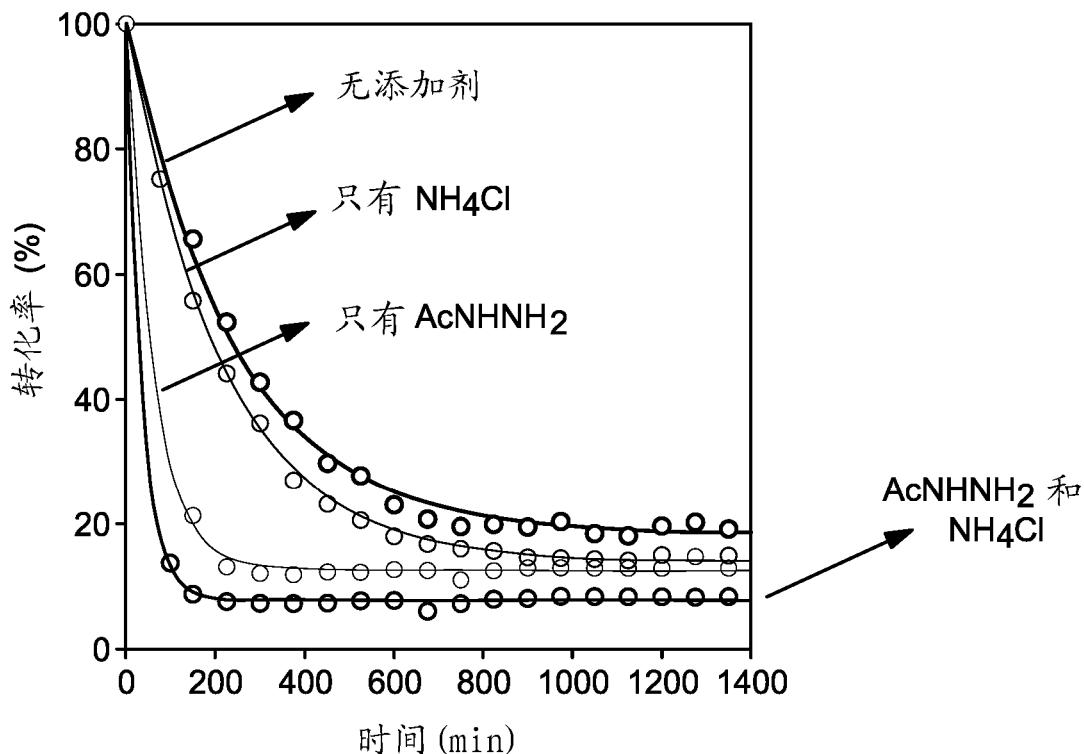


图 22

左：在加入120当量NH<sub>4</sub>Cl之前和之后（分别为蓝色和红色）的松弛素的UV光谱。  
右：用红色突出芳族残基的松弛素的氨基酸序列

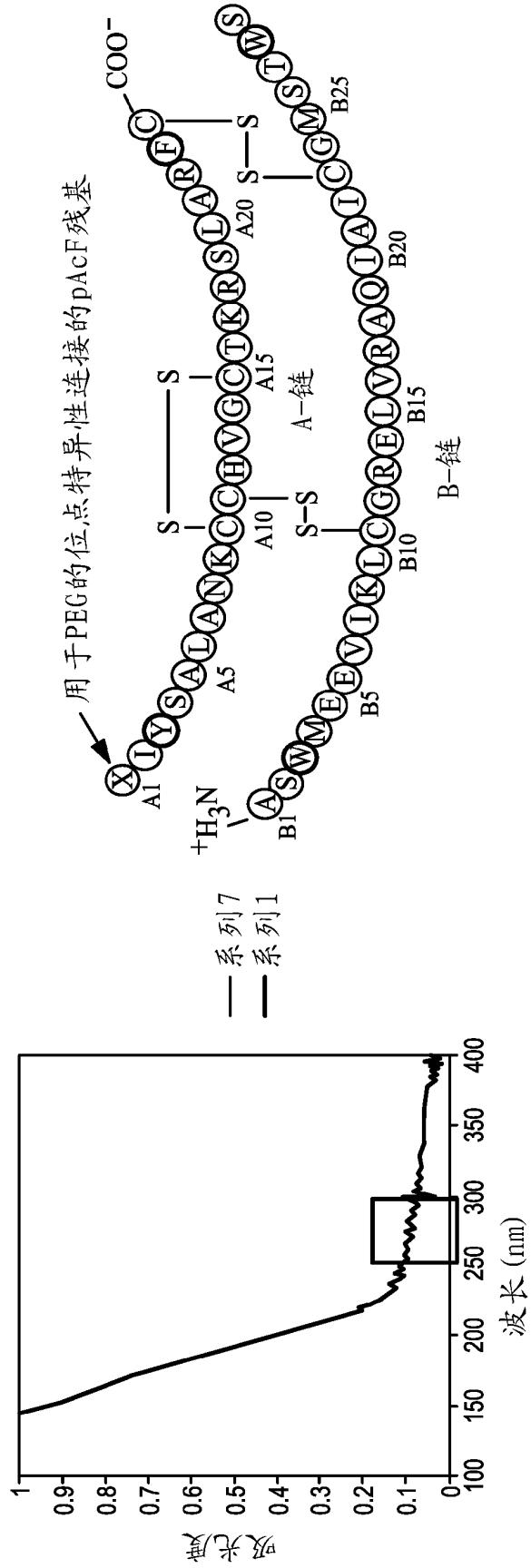


图 23

左: 在加入120当量NH<sub>4</sub>Cl之前和之后(分别为蓝色和紫色)的松弛素的IR光谱。  
 右: 在加入120当量NH<sub>4</sub>Cl之后的IR光谱插图, 具有结构变化的暂定分配。

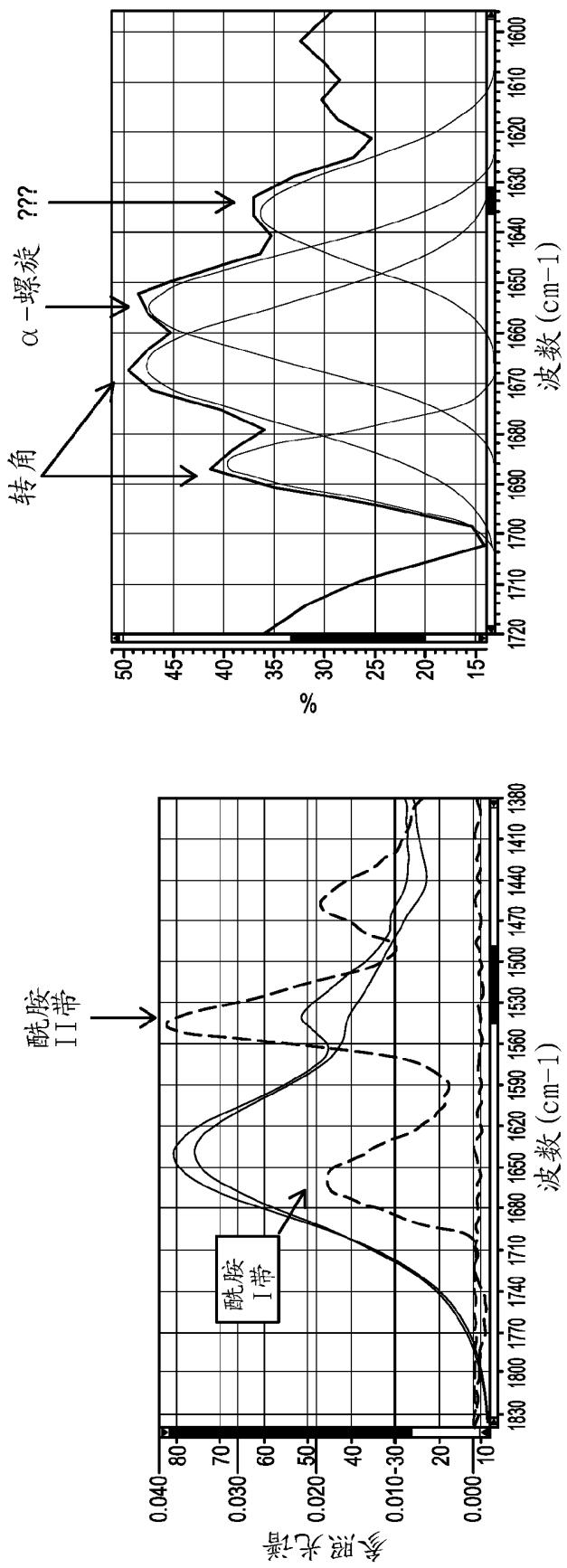


图 24

在加入120当量NH<sub>4</sub>C1之前和之后(分别为红色和蓝色)的松弛素的<sup>15</sup>N NMR HSQC光谱

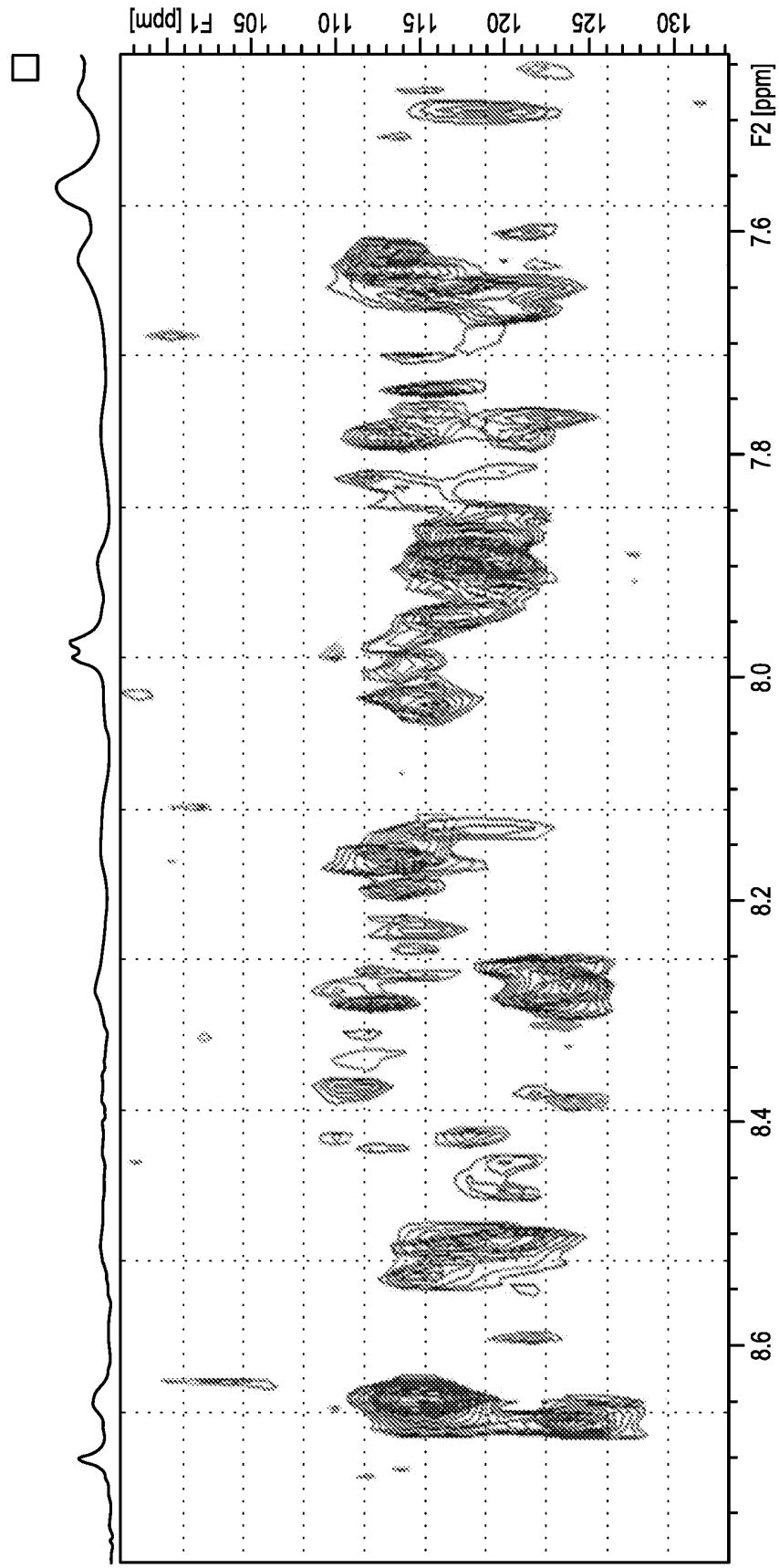


图 25

在加入120当量NH<sub>4</sub>C1之前(蓝色)和之后(分别为蓝色和绿色)的松弛素的近UV CD光谱

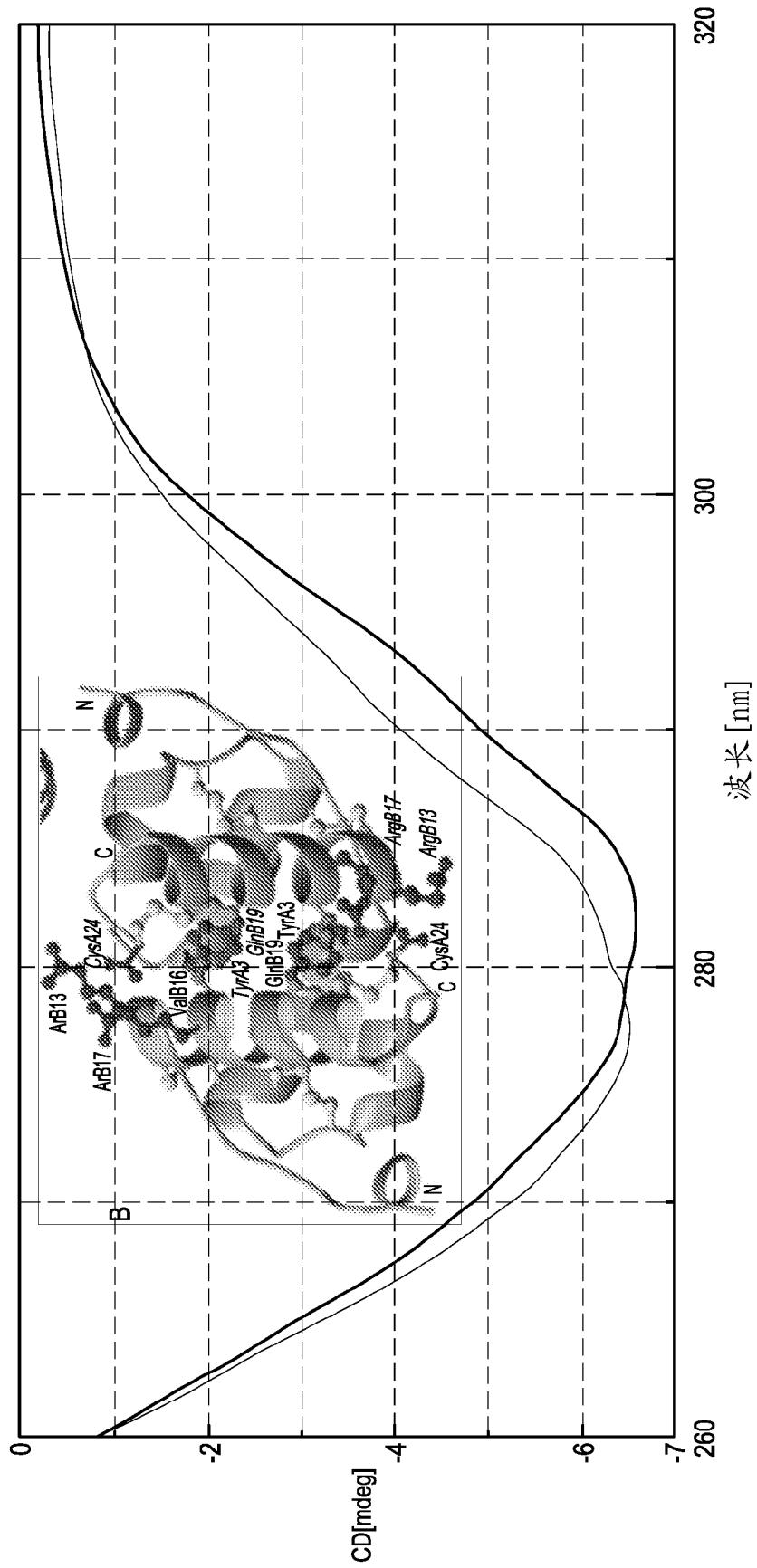


图 26

商用PABH中存在的潜在杂质的结构

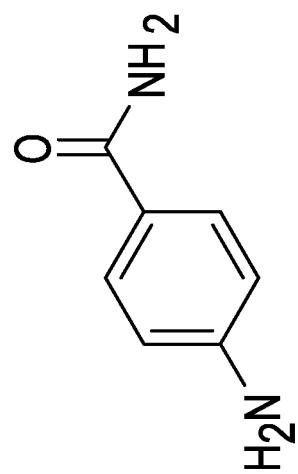
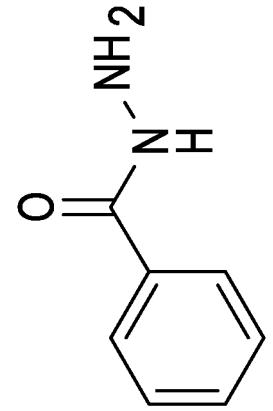


图 27