



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106068127 B

(45)授权公告日 2020.06.19

(21)申请号 201480068335.5

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2014.12.15

代理人 罗文锋 彭昶

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106068127 A

(51)Int.Cl.

A61K 47/54(2017.01)

(43)申请公布日 2016.11.02

A61K 47/55(2017.01)

(30)优先权数据

C07K 14/00(2006.01)

13197150.9 2013.12.13 EP

(56)对比文件

CN 1210400 C,2005.07.13,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

CN 103002918 A,2013.03.27,

2016.06.13

WO 2006/134173 A2,2006.12.21,

(86)PCT国际申请的申请数据

CN 103087183 A,2013.05.08,

PCT/EP2014/077777 2014.12.15

CN 101212984 A,2008.07.02,

(87)PCT国际申请的公布数据

Pete Gagnon.“Technology trends in

W02015/086853 EN 2015.06.18

antibody purification”.《J. Chromatogr.

(73)专利权人 诺和诺德保健股份有限公司

A》.2011,第1221卷57-70.

地址 瑞士苏黎世

审查员 卢少楠

(72)发明人 C.S.亨内彻 T.B.汉森 E.B.汉森

权利要求书4页 说明书27页

序列表2页 附图7页

(54)发明名称

蛋白质的疏醚缀合方法

(57)摘要

本发明涉及获得蛋白质缀合物的方法，其中该蛋白质的半胱氨酸残基充当针对与该蛋白质缀合的化学部分的附接点。

1. 一种制备蛋白质缀合物的方法, 其中该蛋白质P与化学部分Z经由硫醚共价结合, 该方法包括以下步骤:

- a) 获得包含该蛋白质的混合二硫化物的组合物, 其中所述混合二硫化物是具有加帽的游离半胱氨酸的蛋白质P-S-S-帽, 并且组合物中P-S-S-帽的浓度为至少100  $\mu\text{M}$ ,
- b) 向所述蛋白质组合物中添加还原剂, 从而获得还原混合物, 其中所述还原剂是膦, 并且还原混合物中包含的还原剂的量为至多10当量的所述蛋白质P-S-S-帽,
- c) 使还原发生,
- d) 获得包含经还原的蛋白质P-SH的溶液,
- e) 去除该溶液中分子量低于10 kDa的分子,
- f) 向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分Z\*, 从而获得包含至多5当量的化学部分Z\*的缀合混合物,
- g) 使缀合反应发生, 以及
- h) 获得所述缀合蛋白质P-S-Z的制剂;

其中该方法在切向流过滤系统中进行。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中在步骤f) 中向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分Z\*, 从而获得包含至多4当量的化学部分Z\*的缀合混合物。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中在步骤f) 中向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分Z\*, 从而获得包含至多3当量的化学部分Z\*的缀合混合物。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中在步骤f) 中向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分Z\*, 从而获得包含至多2当量的化学部分Z\*的缀合混合物。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中a) 的组合物中P-S-S-帽的浓度为至少150  $\mu\text{M}$ 。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其中a) 的组合物中P-S-S-帽的浓度为至少250  $\mu\text{M}$ 。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其中a) 的组合物中P-S-S-帽的浓度为至少350  $\mu\text{M}$ 。

8. 根据权利要求1所述的方法, 其中a) 的组合物中P-S-S-帽的浓度为大于400  $\mu\text{M}$ 。

9. 根据权利要求1所述的方法, 其中a) 的组合物已通过超滤获得。

10. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述帽衍生自半胱氨酸、半胱胺或谷胱甘肽。

11. 根据权利要求1-10任一项所述的方法, 其中步骤g) 的缀合是选择性化学缀合。

12. 根据权利要求1-10任一项所述的方法, 其中所述还原剂是芳香膦。

13. 根据权利要求1-10任一项所述的方法, 其中所述还原剂是三芳基膦。

14. 根据权利要求1-10任一项所述的方法, 其中所述还原剂是取代的三芳基膦。

15. 根据权利要求1-10任一项所述的方法, 其中所述还原剂是三苯基膦-3,3',3''-三磺酸三钠TPPTS或三苯基膦-3,3'-二磺酸二钠TPPDS。

16. 根据权利要求1-10任一项所述的方法, 其中所述还原剂的量为至少2当量的所述蛋白质。

17. 根据权利要求1-10任一项所述的方法, 其中所述还原剂的量为5-10当量的所述蛋白质。

18. 根据权利要求1-10任一项所述的方法, 其中所述还原进行少于10小时。

19. 根据权利要求1-10任一项所述的方法, 其中所述化学部分Z是改性基团。

20. 据权利要求1-10任一项所述的方法, 其中所述化学部分Z是延长剂。

21. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述活化的化学部分Z\*是卤化的延长剂。

22. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述活化的化学部分Z\*是卤化的延长剂,其中卤素是Br、I或Cl。

23. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述活化的化学部分Z\*是卤化的延长剂,其中卤素是I。

24. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述活化的化学部分Z\*是卤化的延长剂,其中所述卤化的延长剂是碘乙酰胺。

25. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述活化的化学部分Z\*是马来酰亚胺取代的延长剂。

26. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述化学部分Z是白蛋白结合剂。

27. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述活化的化学部分Z\*是卤化的白蛋白结合剂,其中卤素是Br、I或Cl。

28. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述活化的化学部分Z\*是卤化的白蛋白结合剂,其中卤素是I。

29. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述活化的化学部分Z\*是白蛋白结合剂侧链的碘乙酰胺。

30. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述活化的化学部分Z\*是马来酰亚胺取代的白蛋白结合剂。

31. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述的缀合混合物包含相对于所述混合二硫化物的1-4当量的活化的化学部分Z\*。

32. 据权利要求1-10任一项所述的方法,其中通过渗滤进行步骤e)。

33. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其包括在步骤f)之前改变步骤d)的溶液的溶剂的步骤。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中通过渗滤进行所述溶剂改变步骤。

35. 根据权利要求1所述的方法,其包括进一步的步骤i):去除分子量低于10 kDa的分子和/或改变步骤h)的制剂的溶剂。

36. 根据权利要求1所述的方法,其包括通过对步骤h)的制剂的渗滤而进行的进一步的步骤i)。

37. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤a)的组合物、步骤d)的溶液和/或步骤h)的制剂中的一种或多种包含缓冲液和盐。

38. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤b)的还原混合物包含缓冲液和盐。

39. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤f)的制剂的缀合混合物包含缓冲液和盐。

40. 根据权利要求35或36所述的方法,其中步骤i)去除盐。

41. 根据权利要求37-39任一项所述的方法,其中所述缓冲液是三乙醇胺。

42. 根据权利要求37-39任一项所述的方法,其中所述盐是NaCl和/或KI。

43. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中步骤a)的组合物、步骤d)的溶液和/或步骤h)的制剂具有相同的pH。

44. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中步骤a)的组合物、步骤d)的溶液和/或

步骤h) 的制剂具有pH 7.0-8.0。

45. 根据权利要求35或36所述的方法,其中步骤d) 的溶液和步骤i) 的制剂具有不同的电导率。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中步骤d) 的溶液的电导率在22 °C时为10 mS/cm。

47. 根据权利要求45所述的方法,其中步骤i) 的制剂的电导率在22 °C时为1-2 mS/cm。

48. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中步骤e) 使用纤维素膜进行渗滤。

49. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中步骤e) 使用10 kD Hydrosart © 膜进行渗滤。

50. 根据权利要求35或36所述的方法,其中步骤i) 使用纤维素膜进行渗滤。

51. 根据权利要求35或36所述的方法,其中步骤i) 使用10 kD Hydrosart © 膜进行渗滤。

52. 根据权利要求48所述的方法,其中渗滤缓冲液不包含还原剂。

53. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述步骤c) 在超滤和/或渗滤设备的渗余物罐中进行。

54. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述步骤g) 在超滤和/或渗滤设备的渗余物罐中进行。

55. 根据权利要求1、35和36任一项所述的方法,其中制剂h) 或i) 具有至少5 g/L的浓度。

56. 根据权利要求1、35和36任一项所述的方法,其中制剂h) 或i) 的缀合蛋白质P-S-Z通过阴离子交换色谱法AIEC进行纯化。

57. 根据权利要求1、35和36任一项所述的方法,其中制剂h) 或i) 的缀合蛋白质P-S-Z使用Q sepharose HP通过阴离子交换色谱法AIEC进行纯化。

58. 根据权利要求1、35和36任一项所述的方法,其中制剂h) 或i) 的缀合蛋白质P-S-Z使用超滤进行浓缩,产生至少10 g/L的浓度。

59. 根据权利要求1、35和36任一项所述的方法,其中制剂h) 或i) 的缀合蛋白质P-S-Z使用超滤进行浓缩,产生至少20 g/L的浓度。

60. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中通过点突变引入所述游离半胱氨酸。

61. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中所述蛋白质是生长激素多肽。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中通过选自E30C、Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C、S95C、A98C、N99C、L101C、V102C和S108C的点突变提供所述生长激素多肽的游离半胱氨酸。

63. 根据权利要求61所述的方法,其中所述生长激素多肽包含L101C点突变。

64. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中步骤b) 的还原混合物具有至少为C<sub>min</sub>的混合二硫化物浓度,其中C<sub>min</sub>由以下公式确定:

$$C_{\min} = a * I^{-a_1} \exp(-b * T),$$

其中T为摄氏度温度,I为还原混合物的离子强度(M),a = 0.137 \* 10<sup>-3</sup>M<sup>1.425</sup>,a<sub>1</sub> = 0.425,且b = 0.070 °C<sup>-1</sup>。

65. 根据权利要求1-10任一项所述的方法,其中f) 的缀合混合物具有至少为C<sub>min</sub>的经还原的蛋白质的浓度,其中C<sub>min</sub>由以下公式确定:

$$C_{\min} = a * \exp(-b_1 * T - b_2 * I) + d * \exp(-d_1 * T),$$

其中T为摄氏度温度,I为缀合混合物的离子强度(M), $a = 6.96 \times 10^{-4} \text{ M}$ , $b_1 = 0.0396 \text{ } ^\circ \text{C}^{-1}$ , $b_2 = 10.9 \text{ M}^{-1}$ , $d = 6.12 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,且 $d_1 = 0.0289 \text{ } ^\circ \text{C}^{-1}$ 。

## 蛋白质的硫醚缀合方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及使用蛋白质的游离半胱氨酸作为针对感兴趣的部分的附接点来制备具有硫醚的蛋白质缀合物的改进方法。

### 背景技术

[0002] 蛋白质缀合物尤其在医药工业中具有多种功能,其能够使不同的部分与感兴趣的治疗性蛋白质共价连接,从而改善特别感兴趣的分子的性质。

[0003] 通常通过固态合成来实现肽的缀合,但该方法对于较大的蛋白质不太有吸引力。当需要缀合较大的多肽/蛋白质时,该方法因需要获得位点特异性缀合以便得到均质产物而变得复杂化。已开发出多种技术,提供了用于与N和C末端残基以及内部氨基酸残基缀合的手段。

[0004] 如例如W02005/070468和W02009/027369所述,对于生长激素蛋白质,Gln和Lys残基已经被成功地靶向,其中针对特定内部氨基酸残基的酶特异性确保了位点特异性缀合。

[0005] 先前已在例如WO 99/03887中描述了包括生长激素在内的蛋白质的位点特异性缀合,其中经由添加的半胱氨酸残基,通过使蛋白质与半胱氨酸反应性聚合物或部分发生反应而实现了定点缀合。在此之前,蛋白质用二硫苏糖醇(DTT)部分还原,以改善采用PEG-马来酰亚胺(或PEG-乙烯基砜)的聚乙二醇化,注意不要还原该蛋白质的二硫键。该公开文本进一步描述了在最终产物组合物中获得高比例的单聚乙二醇化蛋白质的困难。

[0006] 实现添加的半胱氨酸的选择性还原的不同手段还在主要涉及因子VIIa的WO 2006/134173中描述,因子VIIa也包含内部二硫键。W02010/089255和W02012/010516分别公开了使用额外的半胱氨酸残基进行白蛋白结合剂和胆酸残基的缀合。

[0007] 此外,cys缀合还可以应用于蛋白质、抗体或其片段,如W02007/03898和W02012166622所述。

[0008] 还原和缀合步骤本身是已知的化学过程,但是这些过程需要大量操作,使得这些过程费时且低效。

[0009] 因此,为了推进cys缀合的化合物的从研究到开发,对于提供有效、经济且适用的工业规模方法的需求尚未得到满足。

### 发明概述

[0011] 在一方面,本申请涉及一种制备蛋白质缀合物的方法,其中该蛋白质(P)与化学部分(Z)经由硫醚共价结合,该方法包括以下步骤:

[0012] a) 获得包含该蛋白质的混合二硫化物的组合物,

[0013] b) 向所述蛋白质组合物中添加还原剂,

[0014] c) 使还原发生,

[0015] d) 获得包含经还原的蛋白质(P-SH)的溶液,

[0016] e) 去除该溶液中分子量低于10kDa的分子,

[0017] f) 向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分(Z\*) ,

[0018] g) 使缀合反应发生,以及

[0019] h) 获得所述缀合蛋白质(P-S-Z)的制剂。

[0020] 该方法在某些实施方案中可以包括使用横向流过滤/切向流过滤系统。特别地,根据本发明,还原和缀合反应可以在过滤系统的渗余物罐中进行,并且当被认为有利时,该过滤系统可以在整个过程中使用。

[0021] 该方法可进一步包括超滤和/或渗滤的步骤。在需要指定浓度的一种或多种反应物的情况下,可以应用超滤步骤。作为一个例子,混合二硫化物的浓度可通过超滤步骤来调整,以达到至少100μM,如150μM、250μM、350μM,或甚至如400μM以上,它独立于起始制剂中混合二硫化物的浓度。对于生长激素,其浓度可以为至少2g/L,如5g/L或如10g/L,它独立于起始制剂中生长激素的浓度。

[0022] 渗滤可用于从过滤系统中去除小分子,并且可使用有关阈值如10kDa,但是当然取决于所用的蛋白质和反应物。

[0023] 该方法使用混合的二硫化物作为起始点,因为已经发现这是具有游离半胱氨酸的蛋白质的可靠来源,该游离半胱氨酸通常呈现为加帽的游离半胱氨酸,其中所述帽衍生自半胱氨酸、半胱胺或谷胱甘肽。

[0024] 用于还原的还原剂和条件对于混合二硫化物的选择性还原是有利的,并且膦,如三芳基膦,特别是三苯基膦-3,3'-二磺酸二钠(TPPDS),已被确定为有用的还原剂。本发明人已发现本发明的方法不需要高浓度的还原剂,虽然当还原剂的浓度至少等于蛋白质(P-S-S-帽)的浓度时得到更有效的过程。

[0025] 可以使用卤化的部分作为活化的化学部分(Z\*)。当向经还原的蛋白质添加活化的化学部分(步骤f)时,发现相对于混合二硫化物的量为至少一(1)当量的活化化学部分(Z\*)更有利。

[0026] 如本文所述,该方法可用于范围广泛的蛋白质和化学部分的缀合,并且提供用于获得这类蛋白质缀合物的有效且方便的方法。

[0027] 本发明还可以解决从示例性实施方案的公开内容中能明显看出的其他问题。

## 附图说明

[0028] 图1A显示了在pH 7.4下用5当量的TPPDS对浓度为2.4g/L的GH-L101C-S-谷胱甘肽的还原。在反应之后进行AIE-HPLC,并且将起始材料、反应中间体和产物的相对面积%对反应时间作图。▲:GH-L101C-S-谷胱甘肽,X:反应中间体,●:GH-L101C-SH。

[0029] 图1B显示了在如图1A所示还原4小时之后,侧链与经还原的GH-L101C-SH的缀合。在不进行任何渗滤的情况下,向还原混合物中直接添加2.2当量的侧链。将起始材料和产物的相对面积%对反应时间作图。将缀合反应开始时侧链的面积%设置为100%。X:侧链,●:GH-L101C-SH,▲:GH-L101C-S-侧链,O:GH-L101C-S-谷胱甘肽,△:反应中间体。

[0030] 图2显示了在pH 8.0和20°C下用10当量的TPPDS对超滤至5g/L之后的GH-L101C-S-谷胱甘肽的还原。在反应之后进行AIE-HPLC,并且将起始材料、反应中间体和产物的相对面积%对反应时间作图。△:GH-L101C-S-谷胱甘肽,X:反应中间体,O:GH-L101C-SH。该图表示来自表1的实验17的数据。

[0031] 图3A显示了在如图2所示还原4小时之后,侧链与经还原的GH-L101C-SH的缀合。在

不进行任何渗滤的情况下,向还原混合物中直接添加三(3)当量的侧链。将起始材料和产物的相对面积%对反应时间作图。将缀合反应开始时侧链的面积%设置为100%。※:侧链,●:GH-L101C-SH,■:GH-L101C-S-侧链。

[0032] 图3B显示了在如图2所示还原4小时之后,侧链与经还原的GH-L101C-SH的缀合。在还原混合物已渗滤至缓冲液1中之后,向经还原的蛋白质添加三(3)当量的侧链。将起始材料和产物的相对面积%对反应时间作图。将缀合反应开始时侧链的面积%设置为100%。※:侧链,0:GH-L101C-SH,□:GH-L101C-S-侧链。

[0033] 图4A显示了在pH 7.4下用5当量的TPPDS对超滤至10g/L浓度之后的GH-L101C-S-谷胱甘肽的还原。在反应之后进行AIE-HPLC,并且将起始材料、反应中间体和产物的相对面积%对反应时间作图。△:GH-L101C-S-谷胱甘肽,X:反应中间体,0:GH-L101C-SH。

[0034] 图4B显示了在如图4A所示还原4小时之后,侧链与经还原的GH-L101C-SH的缀合。在还原混合物已渗滤至缓冲液3中之后,向经还原的蛋白质添加2.2当量的侧链。将起始材料和产物的相对面积%对反应时间作图。将缀合反应开始时侧链的面积%设置为100%。X:侧链,0:GH-L101C-SH,△:GH-L101C-S-侧链。

[0035] 图5显示了在三个不同温度下,作为离子强度的函数的还原过程中最小蛋白质浓度的关联。来自表1的实验实例用以下符号表示:X:T=5℃,△:T=20℃,○:T=40℃。

[0036] 图6显示了在来自表1的实验9、12、15和16的条件下GH-L101C-S-谷胱甘肽的还原。通过AIE-HPLC监测反应,并且将起始材料的相对面积%对反应时间作图。实线为5℃,而虚线为40℃。

[0037] 图7显示了在三个不同温度下,作为离子强度的函数的缀合过程中最小蛋白质浓度的关联。来自表2的实验实例用以下符号表示:X:T=5℃,△:T=20℃,○:T=40℃。

[0038] 图8显示了缀合反应的实例,其中监测经还原的蛋白质(GH-L101C-SH)的相对含量。图8A显示在来自表2的实验5、6和11的条件下缀合过程中,经还原的蛋白质的相对含量。图8B显示在来自表2的实验14、15、18和19的缀合反应过程中,经还原的蛋白质的相对含量。这些图显示了经还原的GH-L101C-SH(渗滤之后)的转化和侧链的添加。通过AIE-HPLC监测反应,并且将起始材料的相对面积%对反应时间作图。

[0039] SEQ ID NO:1-人生长激素氨基酸1-181

[0040] FPTIPLSRLF DNAMLRAHRL HQLAFDTYQE FEEAYIPKEQ KYSFLQNPQT SLCFSESIPT

[0041] PSNREETQQK SNLELLRISL LLIQSWLEPV QFLRSVFANS LVYGASDSNV YDLLKDLEEG

[0042] IQLTLMGRLED GSPRTGQIFK QTYSKFDTNS HNDDALLKNY GLLYCFRKDM DKVETFLRIV

[0043] QCRSVEGSCG F

[0044] 定义

[0045] 如本文所用的术语“多肽”和“肽”意指由通过酰胺(或肽)键连接的至少两个氨基酸组成的化合物。

[0046] 术语“氨基酸”包括由遗传密码编码的氨基酸的组,这些氨基酸在本文中被称作标准氨基酸。还包括不由遗传密码编码的天然氨基酸,以及合成氨基酸。通常已知的天然氨基酸包括 $\gamma$ -羧基谷氨酸、羟脯氨酸、鸟氨酸、肌氨酸和磷酸丝氨酸。通常已知的合成氨基酸包括通过化学合成制备的氨基酸,如Aib( $\alpha$ -氨基异丁酸)、Abu( $\alpha$ -氨基丁酸)、T1e(叔丁基甘氨酸)、 $\beta$ -丙氨酸、3-氨基甲基苯甲酸、邻氨基苯甲酸。

- [0047] 如本文所用的术语“蛋白质”意指由一种或多种多肽组成的生物化学化合物。
- [0048] 术语“生长激素”用来描述野生型生长激素,如由SEQ ID NO 1表示的人生长激素。
- [0049] 如本文所用的术语“生长激素变体”意指具有如下氨基酸序列的生长激素蛋白质,该氨基酸序列通过缺失、添加和/或置换在天然人生长激素中存在的至少一个氨基酸残基,和/或通过添加至少一个氨基酸残基,而衍生自天然存在的生长激素的结构,例如衍生自由SEQ ID NO 1表示的人生长激素的结构。该术语还用于修饰的生长激素蛋白质,其中该生长激素序列的一个或多个氨基酸残基已被其他氨基酸残基置换,和/或其中该生长激素已缺失一个或多个氨基酸残基,和/或其中一个或多个氨基酸残基已添加和/或插入该生长激素中。
- [0050] 如本文所用的术语“生长激素化合物”意指保留由SEQ ID NO 1表示的人生长激素的至少一些功能及其整体结构的生长激素分子,该整体结构包括连接C53与C165和C182与C189或在生长激素变体中的相应氨基酸残基的两个分子内二硫键。这样的分子可以是生长激素变体、生长激素衍生物或生长激素融合体以及生长激素变体的衍生物和融合体。
- [0051] 如本文所用的术语“生长激素衍生物”因此是人生长激素或人生长激素类似物/变体,其包含附接至一个或多个氨基酸的至少一个共价修饰,例如附接至该生长激素或生长激素变体或类似物的一个或多个氨基酸侧链的至少一个共价修饰,其中所述修饰是酰胺、碳水化合物、烷基基团、酯、聚乙二醇化等附接的形式。
- [0052] 这样的生长激素衍生物可以被称为“烷基化的生长激素”,其包括通过一个或多个化学部分任选地经由连接体附接至生长激素蛋白质而对生长激素的修饰。
- [0053] 所述化学部分可以被描述为改性(property modifying)实体。该化学部分通过包括脂肪酸而可以是亲脂性的,并且任选地经由连接体附接至生长激素蛋白质或类似物。这种包括任何任选连接体的化学部分可被描述为“侧链”。在本申请中,通过使化学部分与游离半胱氨酸连接,“侧链”将作为半胱氨酸氨基酸残基的延伸而附接。
- [0054] 如本文所用的术语“生长激素融合体”是指这样的蛋白质分子,其中生长激素化合物(野生型或变体)被表达为具有感兴趣的多肽的融合蛋白,因而通过传统的肽键连接。
- [0055] 术语“药物”、“治疗剂”、“药剂”或“药品”当在本文中使用时,是指在药物组合物中使用的活性成分,其可以在治疗中使用。
- [0056] 术语“超滤”用来描述使用适当的膜或过滤器过滤溶液的过程,其中该过程通常因压力差而导致溶液的体积减小,结果是该溶液中感兴趣的分子得到浓缩。
- [0057] 术语“渗滤”用来描述使用适当的膜或过滤器过滤溶液的过程,其中该过程包括当从系统中排出的溶液被新溶液代替而导致起始溶液与新溶液交换时,溶液中的赋形剂发生变化。在大多数系统中,当从系统中排出5倍体积的起始溶液并且用等量的新溶液填充该系统时,该溶液被认为发生了交换。通过该过程,感兴趣的分子从一种溶液转移至新溶液。
- [0058] 发明详述
- [0059] 在一方面,本发明涉及一种制备蛋白质缀合物的方法,其中该蛋白质(P)与化学部分(Z)经由硫醚共价结合。该方法可起始于包含经历缀合的蛋白质的混合二硫化合物的组合物。还原该二硫化物以获得适合于缀合的具有游离半胱氨酸的蛋白质(P-SH)。随后通过向经还原的蛋白质添加活化的化学部分(Z\*)进行缀合反应,这导致缀合蛋白质(P-S-Z)的形成。如本文所述,单独的步骤已得到优化,以获得用于制备蛋白质缀合物的有效过程。

[0060] 本申请涉及一种制备蛋白质缀合物的方法,其中该蛋白质(P)与化学部分(Z)经由硫原子连接,形成硫醇醚。如本文以下所述,该蛋白质可以是任何感兴趣的蛋白质,并且特别包括治疗性蛋白质,如生长激素和生长激素变体。

[0061] 在一个实施方案中,本发明涉及一种制备蛋白质缀合物的方法,其中化学部分与蛋白质经由该蛋白质的半胱氨酸残基连接。硫原子因此提供针对待附接至蛋白质的化学部分的附接点,由此蛋白质和化学部分经由硫醚共价连接。

[0062] 已发现“游离半胱氨酸”是用于缀合各种改性基团的合适的附接点。此处的游离半胱氨酸是指不参与一个或两个多肽的两个半胱氨酸之间的普通二硫键的半胱氨酸残基。通常,游离半胱氨酸将会是通过位点选择性突变而引入到感兴趣的多肽序列中的半胱氨酸,但是一些蛋白质可能或者在合适的位置包含半胱氨酸。如背景技术中所述,添加的半胱氨酸可以是改性基团与蛋白质的合适的附接点。在蛋白质中不存在用于形成二硫键的配偶体时,通常通过引入半胱氨酸残基获得游离半胱氨酸。

[0063] 在一个实施方案中,本发明涉及一种制备蛋白质缀合物的方法,其中该蛋白质(P)与化学部分(Z)经由硫醚共价结合,该方法包括以下步骤:

- [0064] a) 获得包含该蛋白质的混合二硫化物的组合物,
- [0065] b) 向所述组合物中添加还原剂,从而获得还原混合物,
- [0066] c) 使还原发生,
- [0067] d) 获得包含经还原的蛋白质(P-SH)的溶液,
- [0068] e) 任选地去除该溶液中分子量低于10kDa的分子,
- [0069] f) 向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分(Z\*),从而获得缀合混合物,
- [0070] g) 使缀合反应发生,以及
- [0071] h) 获得所述缀合蛋白质(P-S-Z)的制剂。

[0072] 该方法允许游离半胱氨酸的选择性还原,从而允许蛋白质的选择性化学缀合。

#### [0073] 混合二硫化物

[0074] 二硫化物(R1-S-S-R2)是可存在于不同(或相同)分子中的两个硫原子的共价结合物。在蛋白质中,半胱氨酸残基可经由二硫键连接,也称作胱氨酸。

[0075] 为了成为缀合反应的有效靶标,游离半胱氨酸必须是还原形式。具有游离半胱氨酸的蛋白质可能由于相同的原因而难以产生,从而常常获得包含小的有机部分的混合二硫化物。混合二硫化物是包含二硫化物的分子,类似于两个半胱氨酸氨基酸残基之间的二硫键,每个半胱氨酸残基均包含在多肽序列(它们可以是相同的或不同的)中。所述小的有机部分在此被称为帽,因此混合二硫化物是蛋白质-S-S-帽分子。在本申请中,术语“混合二硫化物”用于包含连接不都是多肽的两个不同实体的二硫键的分子,虽然所述分子除混合二硫化物外还可另外包含“普通”二硫键。

[0076] 在一个实施方案中,当经历缀合的蛋白质以蛋白质-S-S-帽分子的组合物的形式获得时,本发明的方法包括蛋白质-S-S-帽分子的还原的步骤。

[0077] 如上所述,所述帽通常衍生自小的有机部分,包括作为混合二硫化物的二硫键的一部分的至少一个硫原子。这样的有机部分可以作为还原形式的单体或作为氧化形式的二聚体而存在。在混合二硫化物中,-S-帽因此是单体或二聚体的一半的氧化形式。在一个实

施方案中,-S-帽衍生自半胱氨酸/胱氨酸、半胱胺/胱胺(它是脱羧基的胱氨酸)或谷胱甘肽(G-SH)/谷胱甘肽二硫化物(GS-SG),并且在一个实施方案中,混合二硫化物选自蛋白质-S-S-cys、蛋白质-S-S-cyst或蛋白质-S-S-G,其中cys指胱氨酸的一半,cyst指胱胺的一半,而G指谷胱甘肽二硫化物的一半。换言之,在一个实施方案中,蛋白质-S-S-帽的帽衍生自半胱氨酸、半胱胺或谷胱甘肽。

[0078] 如上所述,还原的目的是获得具有在缀合反应中为反应性的游离的还原半胱氨酸(-SH)的分子。

[0079] 在一个实施方案中,混合二硫化物是蛋白质-S-S-帽分子,其中蛋白质-S衍生自包含游离半胱氨酸的蛋白质。

[0080] 在一个实施方案中,本发明涉及一种制备蛋白质缀合物的方法,其中该蛋白质(P)与化学部分(Z)经由硫醚共价结合,该方法包括以下步骤:

[0081] a) 获得包含该蛋白质的混合二硫化物的组合物,

[0082] b) 向所述蛋白质组合物中添加还原剂,

[0083] c) 使还原发生,

[0084] d) 获得包含经还原的蛋白质(P-SH)的溶液,

[0085] e) 任选地去除该溶液中分子量低于10kDa的分子,

[0086] f) 向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分(Z\*) ,

[0087] g) 使缀合反应发生,以及

[0088] h) 获得所述缀合蛋白质(P-S-Z)的制剂。

[0089] 每一步将在下文进一步解释并在实施例中举例说明。

[0090] 生长激素蛋白质

[0091] 如上所述,还原的目的是获得具有在缀合反应中为反应性的游离的还原半胱氨酸(-SH)的蛋白质分子。

[0092] 在一个实施方案中,混合二硫化物是蛋白质-S-S-帽分子,其中蛋白质-S衍生自包含游离半胱氨酸的蛋白质。在进一步的实施方案中,所述蛋白质是生长激素。

[0093] 生长激素蛋白质的结构由通过三个环(L1-3)连接的四个螺旋(螺旋1-4)和一个C末端区段组成。在人生长激素(SEQ ID NO 1)中,螺旋1由氨基酸残基6-35限定,螺旋2由氨基酸残基71-98限定,螺旋3由氨基酸残基107-127限定,而螺旋4被限定为氨基酸残基155-184。

[0094] 因为野生型人生长激素不包含游离半胱氨酸,本发明主要涉及包含额外的半胱氨酸以提供游离半胱氨酸的生长激素变体。该方法可以在使用这样的游离半胱氨酸制备生长激素缀合物或衍生物的过程中应用。这样的衍生物可通过在生长激素序列中经由单一氨基酸置换引入的游离巯基基团的烷基化而获得。

[0095] 在一个实施方案中,所述生长激素可以是生长激素融合体,例如,包含借助于肽键与第二蛋白质序列连接的生长激素序列的蛋白质分子。通常通过使用重组表达载体表达融合蛋白来获得融合体,该载体连接编码所述生长激素序列的DNA序列与任选地包含连接体序列的编码所述第二蛋白质的DNA序列。生长激素融合体包括但不限于包含一个或多个抗体Fc区和/或白蛋白蛋白质的融合体。

[0096] 如本文所用的术语“生长激素化合物”泛指基本上保留由SEQ ID NO1表示的成熟

人生长激素的功能特征的生长激素分子。因此该化合物可以是生长激素、生长激素融合蛋白、生长激素变体或类似物，或者生长激素衍生物，也包括酰化或烷基化的生长激素。

[0097] 在一个实施方案中，根据本发明的生长激素类似物相对于人生长激素包含少于8个修饰(置换、缺失、添加)。

[0098] 在一个实施方案中，生长激素类似物相对于人生长激素包含少于7个修饰(置换、缺失、添加)。在一个实施方案中，生长激素类似物相对于人生长激素包含少于6个修饰(置换、缺失、添加)。

[0099] 在一个实施方案中，生长激素类似物相对于人生长激素包含少于5个修饰(置换、缺失、添加)。在一个实施方案中，生长激素类似物相对于人生长激素包含少于4个修饰(置换、缺失、添加)。在一个实施方案中，生长激素类似物相对于人生长激素包含少于3个修饰(置换、缺失、添加)。在一个实施方案中，生长激素类似物相对于人生长激素包含少于2个修饰(置换、缺失、添加)。

[0100] 在一系列的实施方案中，生长激素的生长激素类似物与由SEQ ID N0:1表示的人生长激素至少95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0101] 与野生型人生长激素相比，所述生长激素化合物优选地具有延长的血浆半衰期( $T_{1/2}$ )。这可以通过本领域技术人员已知的多种方法来实现，例如使蛋白质稳定而免遭降解的氨基酸置换。生长激素化合物的延长的循环时间还可以通过与血清蛋白质共价或非共价连接来获得。血清白蛋白可通过与生长激素或其变体直接缀合(任选地包括连接体)或通过蛋白质融合来使用。或者，也可以考虑与白蛋白的化学连接，以及与抗体Fc区的融合或连接。与白蛋白的非共价附接可以通过使用白蛋白结合剂，例如与生长激素或其变体共价结合的烷基基团来获得。

[0102] 在一个实施方案中，所述生长激素是对蛋白水解降解稳定的变体(通过特定突变)，并且这样的变体可以在生长激素蛋白质的一个或多个氨基酸中进一步烷基化。

[0103] 对蛋白水解降解稳定的生长激素蛋白质(通过特定突变)的非限制性实例可见于WO 2011/089250中。

[0104] 蛋白酶稳定的生长激素蛋白质变体包括在其中引入额外的二硫键的变体。所述额外的二硫键优选地将L3与螺旋2连接。这可以通过引入两个额外的半胱氨酸氨基酸残基来实现，所述半胱氨酸残基在优选的实施方案中置换在对应于SEQ ID No.1的H2中的AA84或AA85以及L3中的AA143或AA144的位置处的野生型氨基酸残基。因此，根据本发明的生长激素变体可优选包含对应于SEQ ID No.1中的L73C/S132C、L73C/F139C、R77C/I138C、R77C/F139C、L81C/Q141C、L81C/Y143C、Q84C/Y143C、Q84C/S144C、S85C/Y143C、S85C/S144C、P89C/F146C、F92C/F146C或F92C/T148C的一对突变。在进一步的实施方案中，该生长激素变体包含对应于SEQ ID No.1中的L81C/Y143C、Q84C/Y143C、S85C/Y143C、S85C/S144C或F92C/T148C的一对突变。

[0105] 在一个实施方案中，所述生长激素是一种生长激素变体，其除了上述任何蛋白酶稳定化突变外，也适合于针对可能通过突变引入的游离半胱氨酸的单一置换/位点特异性修饰，例如一个化学部分的烷基化。适合于烷基化的生长激素变体的非限制性列表可见于WO2011/089255中。

[0106] 在进一步的实施方案中，所述蛋白质是包含游离半胱氨酸的生长激素变体。在进

一步的实施方案中,所述蛋白质是包含在由SEQ ID NO.:1表示的人生长激素中引入的游离半胱氨酸的生长激素变体。在进一步的实施方案中,所述蛋白质是包含选自T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、K38C、E39C、Y42C、S43C、D47C、P48C、S55C、S57C、P59C、S62、E65C、Q69C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C、G126C、E129C、D130C、G131C、P133C、T135C、G136C、T142C、D147C、N149C、D154C、A155C、L156C、R178C、E186C、G187C和G190C的半胱氨酸突变的生长激素变体。在进一步的实施方案中,所述蛋白质是包含选自T3C、P5C、S7C、D11C、H18C、Q29C、E30C、E33C、A34C、Y35C、E88C、Q91C、S95C、A98C、N99C、S100C、L101C、V102C、Y103C、D107C、S108C、D112C、Q122C和G126C的半胱氨酸突变的生长激素变体。

[0107] 在进一步的实施方案中,游离cys突变位于hGH中的氨基酸93-106内或hGH变体中的相应残基内。在进一步指定的实施方案中,游离cys突变位于L2内,诸如氨基酸99-106或氨基酸99-103内或相应的残基内。

[0108] 在进一步的实施方案中,游离cys突变选自下组:E30C、Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C、S95C、A98C、N99C、L101C、V102C和S108C。

[0109] 在进一步的实施方案中,单一cys突变是E30C。在进一步的实施方案中,单一cys突变是Y42C。在进一步的实施方案中,单一cys突变是S55C。在进一步的实施方案中,单一cys突变是S57C。在进一步的实施方案中,单一cys突变是S62C。在进一步的实施方案中,游离cys突变是Q69C。在进一步的实施方案中,游离cys突变是S95C。在进一步的实施方案中,游离cys突变是A98C。在进一步的实施方案中,游离cys突变是N99C。在进一步的实施方案中,游离cys突变是S100C。在进一步的实施方案中,游离cys突变是L101C。在进一步的实施方案中,游离cys突变是V102C。在进一步的实施方案中,游离cys突变是S108C。

[0110] 在进一步的实施方案中,所述蛋白质是包含选自Y42C和L101C的半胱氨酸突变的生长激素变体。

#### [0111] 还原剂

[0112] 为了获得具有反应性硫原子的蛋白质,向混合二硫化物组合物中添加还原剂,并将混合物温育以使还原发生,从而获得具有反应性硫原子的蛋白质,例如以下形式的经还原的蛋白质:蛋白质-S-H。所描述的步骤为a)获得包含蛋白质的混合二硫化物的组合物,b)向所述蛋白质组合物中添加还原剂,c)使还原发生并获得包含经还原的蛋白质(P-SH)的溶液。

[0113] 所述还原剂可以在多种可用的还原剂中选择,本文中仅提到少数几种,可知本领域技术人员将能够从更多的大量还原剂中选择。

[0114] 在一个实施方案中,所述还原剂是选自谷胱甘肽、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸(gama-glytamylcysteine)、半胱氨酸-甘氨酸、半胱氨酸、N-酰基半胱氨酸(N-actylcystein)、半胱胺和lipamide的氧化还原缓冲剂。

[0115] 在一个实施方案中,包括硫醇二硫化物氧化还原催化剂,诸如酶,如谷胱甘蛋白。

[0116] 在一个实施方案中,所述还原剂选自小分子还原剂如DTT。

[0117] 在一个实施方案中,所述还原剂是膦,诸如芳香膦,诸如三芳基膦,诸如取代的三芳基膦,诸如三苯基膦-3,3',3"-三碘酸三钠(TPPTS),或诸如三苯基膦-3,3'-二碘酸二钠(TPPDS)。

[0118] 一旦混合二硫化物已被还原，则获得了包含经还原的蛋白质(P-SH)的溶液。在后续缀合之前，去除还原剂和/或释放的帽分子可能是有益的。在一个实施方案中，可包括从包含经还原的蛋白质(P-SH)的溶液中去除小分子如分子量低于10kDa的分子的任选步骤。在一个实施方案中，通过渗滤从包含经还原的蛋白质的溶液中去除分子量低于10kDa的分子。

[0119] 化学部分(Z)

[0120] 在缀合反应中，化学部分与经还原的蛋白质(蛋白质-SH)的游离半胱氨酸的硫原子共价键合。

[0121] 所述化学部分可以是适合与蛋白质缀合的任何部分，如改性部分。所述改性部分可以是能够改变感兴趣的蛋白质的一种或多种特征的化学部分。在一个实施方案中，该化学部分是改性基团，诸如能够稳定蛋白质、延长循环半衰期或提高效力的化学部分。在一个实施方案中，该化学部分是延长剂(protracting agent)。在一个实施方案中，该化学部分(Z)是白蛋白结合剂(AB)。为了有效地进行缀合，可以使用活化形式的化学部分(Z\*)。在如本文以上所述的根据本发明的方法中，向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分(Z\*)，并且该化学部分与经还原的蛋白质的缀合产生缀合蛋白质(P-S-Z)的制剂。因此，根据本发明的方法进一步包括以下步骤：向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分(Z\*)，使缀合反应发生，并且获得所述缀合蛋白质(P-S-Z)的制剂。

[0122] 将以上描述概括起来，本发明涉及一种制备蛋白质缀合物的方法，其中该蛋白质(P)与化学部分(Z)经由硫醚共价结合，该方法包括以下步骤：

[0123] a) 获得包含该蛋白质的混合二硫化物的组合物，

[0124] b) 向所述蛋白质组合物中添加还原剂，

[0125] c) 使还原发生，

[0126] d) 获得包含经还原的蛋白质(P-SH)的溶液，

[0127] e) 任选地去除该溶液中分子量低于10kDa的分子，

[0128] f) 向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分(Z\*)，

[0129] g) 使缀合反应发生，如选择性化学缀合，以及

[0130] h) 获得所述缀合蛋白质(P-S-Z)的制剂。

[0131] 所述化学部分可以是适合与蛋白质缀合的任何部分，如改性部分。所述改性部分可以是能够改变感兴趣的蛋白质的一种或多种特征的化学部分。在一个实施方案中，该化学部分是改性基团，诸如能够稳定蛋白质、延长循环半衰期或提高效力的化学部分。在一个实施方案中，该化学部分是白蛋白结合剂。为了有效地进行缀合，可以使用活化形式的化学部分。在如本文以上所述的根据本发明的方法中，将活化的化学部分与经还原的蛋白质组合，并且该化学部分与经还原的蛋白质的缀合产生经由硫原子缀合的蛋白质的制剂。

[0132] 所述化学部分优选地是活化的化学部分，其意指能够与蛋白质-SH反应形成蛋白质-S-化学部分分子的部分。这样的活化的化学部分可以包括包含马来酰亚胺或卤代乙酰基基团的温和亲电子烷基化试剂，它们是本领域已知的。

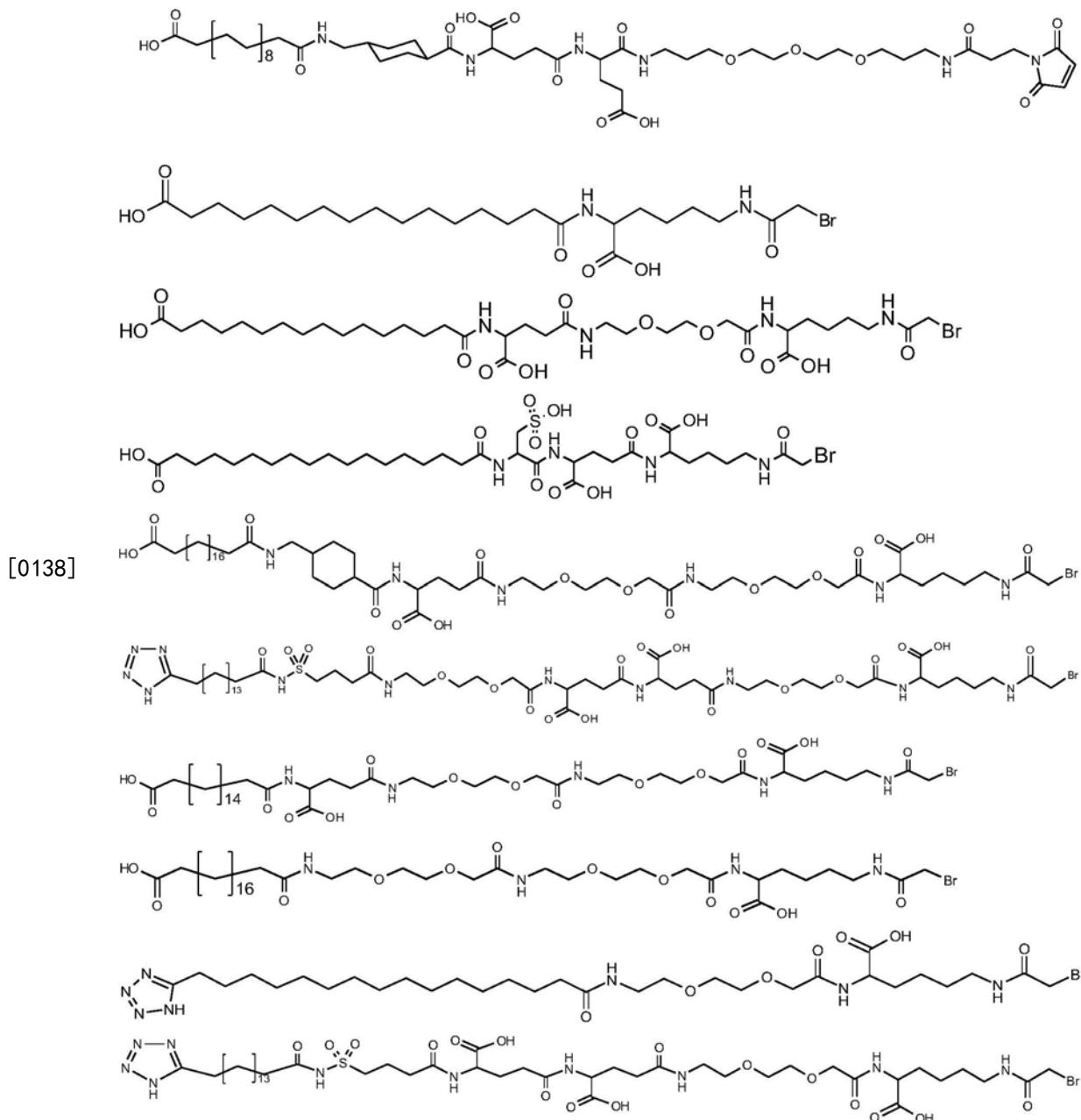
[0133] 在一个实施方案中，所述活化的化学部分(Z\*)是卤化的化学部分(Z-卤素)，诸如卤化的改性基团，如卤化的延长剂。所述卤化的化学部分(Z-卤素)可包含Br、I或Cl。如果优选一种，则可以在缀合之前和向经还原的蛋白质添加化学部分之前进行特定的激活反应。

[0134] 在一个实施方案中,所述活化的化学部分( $Z^*$ )是卤化的白蛋白结合剂(AB-卤素)。在一个实施方案中,该化学部分( $Z^*$ )是包含Br、I或Cl的卤化的白蛋白结合剂,如WO2010/089255所述。在一个实施方案中,所述活化的化学部分是碘乙酰胺,诸如白蛋白结合剂侧链的碘乙酰胺。

[0135] 在一个实施方案中,所述活化的化学部分( $Z^*$ )是马来酰亚胺取代的化学部分( $Z$ -马来酰亚胺),诸如马来酰亚胺取代的改性基团,如马来酰亚胺取代的延长剂。在一个实施方案中,所述活化的化学部分( $Z^*$ )是马来酰亚胺取代的白蛋白结合剂,如WO2010/089255所述。

[0136] 实施例2和3中描述的还原和缀合反应包括经还原的生长激素L101C与卤化的白蛋白结合剂侧链的反应,其中卤素是碘。

[0137] 在一个实施方案中,所述白蛋白结合侧链可以选自:



[0139] 其他的白蛋白结合侧链在WO2010/089255中描述。在一个实施方案中,所述活化的

白蛋白侧链是以上侧链的碘化物形式。这样的碘化物部分可以通过将卤化(Br或Cl)的化学部分溶解在KI(碘化钾)溶液中以提供碘乙酰胺而获得。

[0140] 化学部分的其他实例包括PEG分子、血清白蛋白、白蛋白结合剂、Fc、结构域、生长激素结合蛋白质、AA聚合物(XTEN technology、Amunix和PA Sylation®, XL-蛋白质)和碳水化合物基团,如肝素原(heparosan)和羟乙基淀粉。

[0141] 如本文以下所述,缀合步骤的有效性可能取决于经还原的蛋白质(P-SH)与活化的化学部分(Z\*)之比。

[0142] 混合二硫化物的组合物

[0143] 包含将要在游离半胱氨酸处缀合的蛋白质的混合二硫化物的组合物优选地作为仅包含少量其他蛋白质或杂质的纯化组合物而获得,并且可以认为技术人员将知道用于产生和纯化具有游离半胱氨酸作为混合二硫化物的一部分的蛋白质的方法。

[0144] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物具有5-4000μM、25-1000μM、50-850μM、100-600μM、250-600μM或250-500μM的蛋白质浓度。在进一步的实施方案中,优选的是蛋白质的浓度大于100μM,如150μM、250μM、350μM,或甚至诸如大于400μM。

[0145] 在混合二硫化物是生长激素或生长激素变体的实施方案中,浓度优选为0.1-100g/L、0.5-25g/L、1-20g/L、2-15g/L、5-15g/L或诸如5-12g/L。在一个实施方案中,hGH组合物具有至少2.5g/L,或诸如至少4.0g/L,或诸如至少8.0g/L,或诸如至少10g/L的浓度。还应指出,可通过包括额外的步骤来调节浓度,通过该步骤,混合二硫化物的制剂或者得到稀释或者得到浓缩,以达到蛋白质的优选浓度。在一个实施方案中,所述方法包括混合二硫化物制剂的超滤的步骤,从而产生混合二硫化物组合物的组合物。

[0146] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物具有适合于蛋白质的还原和/或随后适合于经还原的蛋白质缀合的pH,诸如pH 4-10,如5-9或6-8。在进一步的实施方案中,pH可以为7.0-8.0,或7.2-7.8,或7.3-7.6,如大约7.4-7.5。

[0147] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物具有在22°C下约5-50mS/cm的电导率,或诸如在22°C下5-25mS/cm,或在22°C下约10mS/cm的电导率。

[0148] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物包含缓冲液。

[0149] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物包含选自BES、HEPES、MES、磷酸盐、柠檬酸盐、Bis-Tris和三乙醇胺的缓冲液。

[0150] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物包含5-50mmol/kg三乙醇胺,如10-25mmol/kg三乙醇胺或如大约20mmol/kg三乙醇胺。

[0151] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物包含盐。

[0152] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物包含选自钠盐、铵盐、胍盐和钾盐的盐。

[0153] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物包含选自硫酸盐、乙酸盐和卤化物盐的盐。

[0154] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物包含选自硫酸钠、乙酸钠、乙酸铵、盐酸胍、KI和NaCl的盐。

[0155] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物包含NaCl。

[0156] 在一个实施方案中,混合二硫化物组合物包含25-500mmol/kg NaCl,如50-250mmol/kg、如75-100mmol/kg NaCl或如大约80mmol/kg NaCl。

[0157] 方法步骤

[0158] 在以上的一般性描述中,描述了在所述方法中使用的组分,但具有一定的可变性。在本发明范围内的可变性的其他点是所述过程步骤的持续时间,每种组分的不同浓度的使用,和提供所述组分的溶液的赋形剂,以及在其中进行每一个方法步骤的溶液的赋形剂。

[0159] 虽然技术人员将知道进一步的变化也许是可能的,但是以下说明进一步描述了发明人已经发现特别有利的实施方案。说明所述过程的细节可见于实施例中。

[0160] 添加还原剂

[0161] 为了使混合二硫化物得到有效还原,通常使用摩尔浓度过量的还原剂。通过向混合二硫化物的组合物中添加还原剂,获得还原混合物。还原剂的量可以用混合二硫化物(或P-S-S-帽)的量的当量来表示,使得在还原剂的量是混合二硫化物的量的1当量的情况下,该混合物中的混合二硫化物与还原剂的摩尔浓度相等。

[0162] 在一个实施方案中,在步骤b)中添加的还原剂的量是混合二硫化物(或P-S-S-帽)的量的至少2当量,诸如3-20当量,诸如4-15当量,或诸如5-10当量。在一个实施方案中,添加2-12当量的还原剂。在一个实施方案中,添加2-10当量的还原剂。在一个实施方案中,添加3-7或4-6当量的还原剂。

[0163] 由于还原剂可能是昂贵的资源,因此减少所需的量是有利的,如果优化过程步骤,则如本文所述这是可能的。使用较少量的还原剂的有效还原反应需要像本发明所提供的那样认真选择其余的反应条件。

[0164] 在一个实施方案中,还原剂的量为至多10当量,如至多8当量,如至多5当量的混合二硫化物,如至多4当量、如至多3当量、如至多2.5当量、如至多2当量、如至多1.5当量的待还原的混合二硫化物。

[0165] 在一个实施方案中,还原剂的量为诸如1-8当量如2-6当量的待还原的混合二硫化物。

[0166] 根据条件不同,混合二硫化物的还原可能花费数分钟或数小时。技术人员将会知道不同的条件将产生不同的效能,因此在下文更详细地描述了获得混合二硫化物的完全或几乎完全的还原所需的时间和条件。

[0167] 可以向混合二硫化物组合物中添加呈浓缩物的还原剂或简单地添加呈固体粉末的还原剂。将还原剂与混合二硫化物组合物混合,以启动还原。该混合物可被称为还原混合物。

[0168] 为了使过程充分有效,所述还原应当导致混合二硫化物总量的至少80%的还原,如至少90%的还原。在这样的情况下,当混合二硫化物的量为还原混合物中的混合二硫化物的至多20%,如至多10%时,所述还原被认为是令人满意的。在优选的实施方案中,可获得约95%的混合二硫化物的还原,在包含经还原的蛋白质的溶液中留下约5%未还原的混合二硫化物。在进一步的实施方案中,有效的过程在适当的时间内留下至多2%的混合二硫化物。

[0169] 所述还原可以在至少15分钟,如至少30分钟,或如至少1小时的时间段内发生。在一个实施方案中,添加还原剂之后将还原混合物放置2-10小时,如3-6小时或约3-4小时。

[0170] 在一个实施方案中,还原进行长达24小时,如长达12小时,如长达8小时,如长达6小时,如长达4小时。

[0171] 在一个实施方案中,还原可以在1–50°C下发生,如在室温下,如在18–25°C下发生。在替代的实施方案中,还原可以在较冷的温度下进行,如在10°C以下,如在约4–6°C进行。

[0172] 根据使用的条件,在还原混合物中包含盐可能是有利的。该盐可以是任何盐或盐的组合,例如关于混合二硫化物组合物所描述的盐。

[0173] 本发明的发明人已经提供了允许有效还原混合二硫化物的一系列条件,并且使用该信息来描述将要根据温度和盐(还原混合物的离子强度)而使用的混合二硫化物的浓度。

[0174] 溶液中盐的量可通过离子强度(I)来描述。该值由该溶液中存在的全部离子的浓度和电荷来计算。为简单起见,蛋白质和还原剂的任何电荷都不包含在根据本发明的计算中,而包含缓冲液和盐组分。如本文实施例中所见,提高离子强度(主要是通过提高盐浓度)允许在不太有利的条件(低温或较低的反应物浓度)下有效反应。

[0175] 如实施例5中所述,可以使用蛋白质的最低适宜浓度与温度和离子强度之间的关联,使用还原混合物中最高十当量的还原剂来描述还原反应的条件。因此,允许有效还原的最小蛋白质浓度由以下方程确定:

[0176]  $C_{min} = a * I^{-a1} \exp(-b * T)$ , 其中T为摄氏度温度,

[0177] I是以M(mol/L)为单位的离子强度,  $C_{min}$ 为M(mol/L), 并且常数  $a = 0.137 * 10^{-3} M^{1.425}$ ,  $a_1 = 0.425$ , 且  $b = 0.070^{\circ}\text{C}^{-1}$ 。

[0178] 混合二硫化物的浓度的上限可能具有实际意义,因为许多蛋白质在非常高的浓度下是不可溶的。可以预期,对于大多数蛋白质,该还原反应在高达100g/L的浓度下将会良好运行。

[0179] 还原混合物的离子强度的上限可能也具有实际意义,因为许多盐在非常高的浓度下是不可溶的。可以预期,对于大多数盐,该还原反应在高达5M的浓度下将会良好运行。

[0180] 还原混合物的温度的上限可能具有实际意义,因为许多蛋白质在非常高的温度下是不稳定的。可以预期,对于大多数蛋白质,该还原反应在高达50°C的温度下将会良好运行。

[0181] 按照这一指导,可使用至多10当量的还原剂获得有效还原反应。熟练技术人员还将清楚,对于单独的蛋白质和反应,根据它们的稳定性,可能需要调节。

[0182] 在一些实施方案中,当还原剂以浓缩形式简单地添加至组合物中时,还原混合物中混合二硫化物的浓度类似于混合二硫化物组合物的蛋白质浓度。在一个实施方案中,混合二硫化物的浓度可以为诸如5–4000μM、25–1000μM、50–850μM、100–600μM、250–600μM或250–500μM。在进一步的实施方案中,优选的是混合二硫化物的浓度大于100μM,如150μM、250μM、350μM,或甚至诸如大于400μM。在混合二硫化物是生长激素或生长激素变体的实施方案中,浓度优选为0.1–100g/L、0.5–25g/L、1–20g/L、2–15g/L、5–15g/L或诸如5–12g/L。在一个实施方案中,GH的浓度为至少2.5g/L,或诸如至少4.0g/L,或诸如至少8.0g/L,或诸如至少10g/L。

[0183] 中间步骤

[0184] 在进行缀合步骤之前,可将经还原的蛋白质(P-SH)从还原混合物中分离出来,例如与过量的还原剂和/或混合二硫化物的有机小分子,例如具有加帽的游离半胱氨酸的蛋白质(P-S-S-帽)的H-S-帽分离开来。这一任选的步骤可以是去除具有低分子量的分子,如分子量低于10kDa的分子的步骤。

[0185] 技术人员将会知道各种用于去除小分子量化合物的方法,例如通过使用合适的膜过滤。在一个实施方案中,所述方法包括使用截断值为5kDa、10kDa或30kDa的膜/过滤器进行渗滤的步骤。

[0186] 技术人员可根据所需的大小特征来选择截断值;了解到接近产物分子量的截断值增大了损失该产物的风险。经验法则是使截断值为感兴趣的产物的分子量的1/3-1/6。

[0187] 进行缀合步骤之前的另一选项是改变经还原的蛋白质(P-SH)的溶液,例如改变溶剂,即该溶剂的单独的赋形剂或该赋形剂的浓度。在一个实施方案中,该方法包括在步骤f)之前改变步骤d)的溶液的溶剂的步骤。

[0188] 改变溶剂的一种方便的方式是渗滤。在一个实施方案中,包括渗滤步骤以去除溶液中分子量低于10kDa的分子和/或改变包含经还原的蛋白质(P-SH)的溶液的溶剂。

[0189] 渗滤步骤的效力,例如去除的小分子和赋形剂的量,与相对于渗余物体积的产生的滤液体积有关。还应当指出,在该语境中的单词“去除”应该被理解为“降低浓度”,因为在“去除”低分子量分子的渗滤步骤(或替代的过程步骤)之后通常将会有残余量的低分子量分子和赋形剂。

[0190] 使用开始渗滤时组合物的总体积作为评估所需体积的参考。渗滤通常采用恒定的体积来进行,使得生成的滤液的体积等于进入该系统的新溶剂的体积。为了使渗滤有效,应当优选使用大于一(1)倍体积的新溶剂。

[0191] 在一个实施方案中,使用至少2倍体积的溶剂进行渗滤,或者使用至少3倍,如至少4倍或至少5倍体积的溶剂进行渗滤。

[0192] 在一个实施方案中,根据本发明的方法包括在开始缀合反应之前改变包含经还原的蛋白质的溶液的溶剂的步骤。

[0193] 在一个实施方案中,根据本发明的方法包括在步骤f)之前改变步骤d)的溶液的溶剂的步骤。在进一步的实施方案中,通过渗滤改变溶剂。

[0194] 在一个实施方案中,经还原的蛋白质的溶液具有或被改变为具有适合于蛋白质、获得的经还原的蛋白质和待制备的蛋白质缀合物的pH的溶液,诸如pH 4-10,如5-9或6-8。在进一步的实施方案中,pH可以为7.0-8.0,或7.2-7.8,或7.3-7.6,诸如约7.4-7.5。

[0195] 在一个实施方案中,经还原的蛋白质的溶液具有或被改变为具有在22°C下约1-150mS/cm的电导率,或诸如在22°C下5-50mS/cm,或诸如在22°C下5-25mS/cm,或在22°C下约10mS/cm的电导率的溶液。

[0196] 在一个实施方案中,经还原的蛋白质的溶液包含或被改变为包含缓冲液的溶液。在一个实施方案中,该缓冲液选自:BES、HEPES、MES、磷酸盐、柠檬酸盐、Bis-Tris和三乙醇胺。

[0197] 在一个实施方案中,经还原的蛋白质的溶液包含或被改变为包含5-50mmol/kg三乙醇胺,如10-25mmol/kg三乙醇胺或如大约20mmol/kg三乙醇胺的溶液。

[0198] 在一个实施方案中,经还原的蛋白质的溶液包含或被改变为包含盐的溶液,该盐例如是关于混合二硫化物组合物描述的任何盐。

[0199] 在一个实施方案中,经还原的蛋白质的溶液包含或被改变为包含选自硫酸钠、乙酸钠、乙酸铵、盐酸胍、KI和NaCl的盐的溶液。

[0200] 在一个实施方案中,经还原的蛋白质的溶液包含或被改变为包含NaCl的溶液。

[0201] 在一个实施方案中,经还原的蛋白质的溶液包含或被改变为不含盐的溶液。在一个实施方案中,经还原的蛋白质的溶液包含或被改变为不含NaCl的溶液。

[0202] 在一个实施方案中,经还原的蛋白质的溶液包含或被改变为包含10–2000mmol/kg NaCl,如50–500mmol/kg NaCl、如75–100mmol/kg NaCl或如大约80mmol/kg NaCl的溶液。

### [0203] 缀合步骤

[0204] 如上所述,根据所述方法通过向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分(Z\*)进行缀合。

[0205] 如果先前的还原不完全,则经还原的蛋白质与混合二硫化物之比(P-SH/P-S-S-帽)可能阻碍高产率的缀合反应。而且,过量的还原剂和释放的帽分子的存在可能会干扰缀合反应。

[0206] 此外,反应物例如经还原的蛋白质与活化的化学部分的相对比影响反应的有效性。

[0207] 在一个实施方案中,活化的化学部分的摩尔浓度至少等于或可能两倍于待缀合的蛋白质的摩尔浓度。这还可以用当量来表示,例如,可以使用相对于待缀合的蛋白质至少10当量,如8当量、如6当量、如4当量、如2当量或如至少一(1)当量的活化的化学部分(Z\*)。由于活化的化学部分(Z\*)可能是昂贵的资源,因此减少所需的量是有利的,如果优化先前的步骤,则如本文所述这是可能的。使用减少量的活化化学部分(Z\*)的有效缀合反应需要像本发明所提供的那样认真选择其余的反应条件。在一个实施方案中,活化的化学部分(Z\*)的量为至多8当量的待缀合的蛋白质,如至多6当量、如至多4当量、如至多3当量、如至多2.5当量、如至多2当量、如至多1.5当量的待缀合的蛋白质。

[0208] 如关于还原混合物所描述的,缀合溶液可被称为缀合混合物。关于上述的方法步骤a)–h),在步骤f)中添加活化的化学部分(Z\*)导致缀合混合物的形成。进一步明确,可以调整缀合混合物的组分以优化缀合条件。

[0209] 根据条件的不同,经还原的蛋白质与化学部分的缀合可能花费数分钟或数小时。技术人员将会知道不同的条件将导致不同的效力,因此获得完全或几乎完全的缀合所需的时间将根据条件而不同,如将在下文更详细地描述的。按照本方法,当起始材料例如经还原的蛋白质的量达到10%,如5%或优选2%或更少时,缀合反应被认为是令人满意的。

[0210] 如实施例6所述,可使用依赖于温度、离子强度的蛋白质的最低适宜浓度与将在缀合混合物中使用的活化化学部分(Z\*)的相对量之间的关联来描述缀合反应的条件。因此,允许有效缀合的最小蛋白质浓度( $C_{min}$ ,以M(mol/L)为单位)由 $C_{min}=a*\exp(-b_1*T-b_2*I)+d*\exp(-d_1*T)$ 来确定,其中T为摄氏度温度,I是以M(mol/L)为单位的离子强度,a=6.96\*10<sup>-4</sup>M,b1=0.0396°C<sup>-1</sup>,b2=10.9M<sup>-1</sup>,d=6.12\*10<sup>-5</sup>M,且d1=0.0289°C<sup>-1</sup>。

[0211] 如以上关于还原所描述的,蛋白质、离子强度和温度的上限可能具有实际意义。可以预期,对于大多数蛋白质,该缀合反应在高达100g/L的浓度下将会有效运行。同样可以预期,对于大多数盐,该缀合反应在高达5M的浓度下将会有效运行。可以进一步预期,对于大多数蛋白质,该缀合反应在高达50°C的温度下将会有效运行。按照这一指导,可使用至多4当量的活化的化学部分(Z\*)获得有效的缀合反应。

[0212] 可以向包含经还原的蛋白质的溶液中添加呈浓缩物的活化的化学部分或简单地添加呈固体粉末的试剂。在一个实施方案中,在向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化

的化学部分之前,将活化的化学部分溶解在合适的溶液中。还可以在缀合反应之前在溶液中活化所述化学部分。

[0213] 根据本发明,缀合混合物优选为pH 5-10,如7.0-9.0或7.0-8.5。

[0214] 在一个实施方案中,缀合混合物中经还原的蛋白质的浓度至少为50 $\mu\text{M}$ 。在进一步的实施方案中,优选的是缀合混合物中经还原的蛋白质的浓度大于100 $\mu\text{M}$ ,如150 $\mu\text{M}$ 、250 $\mu\text{M}$ 、350 $\mu\text{M}$ 或甚至诸如大于400 $\mu\text{M}$ 。

[0215] 在关于人生长激素的缀合的实施方案中,浓度至少为1g/L。在优选的实施方案中,人生长激素的浓度甚至更高,如至少2.0g/L,如至少3.0g/L,如至少5g/L,或至少7.5g/L或至少10g/L。

[0216] 根据本发明,可通过在缀合混合物中包含盐来提高缀合的效率。这在较低的蛋白质浓度范围内尤其有用,例如,当经还原的蛋白质的浓度为50mM-150mM时,或者对于人生长激素,当缀合混合物中蛋白质浓度为1-3g/L时。当使用更高的蛋白质浓度时,当然也有可能包含盐。

[0217] 盐可以包含在缀合混合物中使用的任意溶液中或者被单独添加以优化反应条件。盐由阳离子和阴离子组成,提供相等的正和负电荷。盐可以根据在水中水解时获得的离子而被描述为中性、碱性或酸性的。所述盐可以是任何盐,例如关于混合二硫化物组合物描述的任何盐。盐可以是无机盐或有机盐,如钠盐、铵盐、胍盐和钾盐,或者如硫酸盐、乙酸盐和卤化物盐,或者如硫酸钠、乙酸钠、乙酸铵、盐酸胍、KI和NaCl。

[0218] 溶液中盐的量可通过离子强度(I)来描述。该值由该溶液中存在的全部离子的浓度和电荷来计算。为简单起见,蛋白质和活化的化学部分(Z\*)的任何电荷不包含在根据本发明的计算中,而包含缓冲液和盐组分。如本文实施例所见,当计算I时包含三乙醇胺(缓冲液)和NaCl(或其他盐)的浓度。

[0219] 在一个实施方案中,缀合混合物的离子强度(I)大于0.1M,如大于0.2M,如大于0.3M,如大于0.4M,如大于0.5M。如上所述,这在缀合混合物中经还原的蛋白质的浓度较低的情况下可能尤其有用,例如对于人生长激素为50-250 $\mu\text{M}$ 或诸如1-5g/L或0.5-3.0g/L时。

[0220] 以类似的方式,可根据缀合反应的温度调整反应条件。在许多情况下,在室温或大约室温( $T=18-25^\circ\text{C}$ )下进行大规模反应被认为是有利的,但在其他情况下,由于各种原因,提高或降低缀合反应的温度可能是优选的。

[0221] 在一个实施方案中,缀合反应在15-50 $^\circ\text{C}$ 下进行,例如在如上所述经还原的蛋白质的浓度大于150 $\mu\text{M}$ 的情况下。在替代的实施方案中,如果缀合混合物中包含盐,则可以使用较低的温度范围。

[0222] 在一个实施方案中,其中缀合反应在低于室温的温度,如低于20 $^\circ\text{C}$ ,如低于15 $^\circ\text{C}$ ,如低于10 $^\circ\text{C}$ ,或者如2-8 $^\circ\text{C}$ 下进行,缀合混合物优选具有大于0.1M,如大于0.2M,如大于0.3M,如大于0.4M,如大于0.5M的离子强度(I)。

[0223] 将活化的化学部分与经还原的蛋白质混合以启动缀合。该混合物在本文中被称为缀合混合物。缀合可在至少15分钟,如至少1小时,如至少2小时,如至少3小时,如至少4小时或如至少5小时的时间段内发生。在一个实施方案中,在添加活化的化学部分之后将缀合混合物放置2小时,如3-6小时或约3-4小时。在一个实施方案中,在添加活化的化学部分之后将缀合混合物放置2-20小时,如6-16小时或约8-12小时。

[0224] 在一个实施方案中,缀合可进行长达24小时,如长达18小时,如长达12小时,如长达6小时,如长达4小时。

[0225] 缀合反应可在不同的温度下发生,如1-50°C,或者如10-50°C。在一个实施方案中,缀合可以在室温下发生,如在15-25°C或20-25°C下发生。在替代的实施方案中,还原可以在较冷的温度下,如10°C以下,诸如约4-6°C进行。

[0226] 随着缀合反应进行,获得缀合蛋白质(P-S-Z)的制剂,并且一旦获得这样的制剂,技术人员可进行进一步的纯化步骤,例如将产物渗透至合适的储存缓冲液中,以去除如上所述的低分子量的杂质,或采用更具特异性的纯化步骤,如阴离子交换色谱法。

#### [0227] 设备

[0228] 在本文实施例中使用的设备举例说明了用于进行所述方法的合适的设备。该方法可以在普通的玻璃器皿/试管等中进行,根据需要具有中间的转移装置(transfers)。本发明还可以在横向流过滤或切向流过滤(TFF)设备中非常有利地进行。这样的设备是本领域公知的,并且允许所述过程从实验室扩大至工业规模。

[0229] 在横向流过滤中,液体切向穿过膜/过滤器,并且可以连续地收集/排出渗余物和渗透物或滤液,并且渗余物可以在该系统中再循环。

[0230] 如实施例中所述,该系统可用于在缀合过程的各个阶段的蛋白质超滤和/或渗透。在还原之前,可对二硫化物制剂进行超滤以获得所需浓度的混合二硫化物的组合物。

[0231] 可以调节入口压力和出口压力,并且在渗透物从系统中排出时可以添加包含缓冲液和/或其他赋形剂的新溶液。

[0232] 该系统也可以在不施加压力差的情况下使用,这意味着液体体积是恒定的,并且不从系统中排出渗透物。

[0233] 关于本发明的方法,在一个实施方案中,在超滤/渗透系统或TFF系统中进行一个或多个步骤。

[0234] 在进一步的实施方案中,在超滤/渗透系统或横向流过滤/TFF系统的渗余物罐中进行还原(步骤c)。

[0235] 可以向渗余物罐中添加还原剂,并施加循环来混合还原剂与混合二硫化物的组合物。在混合过程中,溶液(包含混合二硫化物和还原剂)的赋形剂没有变化,并且其体积保持恒定。尽管在所述系统中发生混合,但没有应用过滤,例如,没有额外的溶液进入该系统,和/或没有施加跨膜压力差,因而没有获得渗透物。

[0236] 在一个实施方案中,在添加和/或混合还原剂与混合二硫化物的过程中没有获得或产生渗透物。在一个实施方案中,在还原步骤过程中没有获得或产生渗透物。在一个实施方案中,没有进行作为步骤b) 和/或c) 的一部分的渗透。

[0237] 在进一步的实施方案中,在超滤/渗透系统或横向流过滤/TFF系统的渗余物罐中进行缀合(步骤g)。

[0238] 在一个实施方案中,在整个过程中使用横向流过滤/切向流过滤系统。

[0239] 在进一步的实施方案中,所述方法包括一个或多个超滤/渗透步骤,用以浓缩蛋白质,去除分子量低于10kDa的分子,或改变所使用的溶液的赋形剂或赋形剂的浓度。

[0240] 在所述方法结束时,可通过排空横向流过滤系统获得缀合蛋白质(P-S-Z)的制剂(步骤h)。

[0241] 以下所述的实施方案和实施例描述并说明了本发明的某些特征，无论如何应当理解本发明不限于此，因为本领域普通技术人员将会想到许多修改、替代、变化和等同物，因此它们也被认为是本发明的一部分。

[0242] 实施方案

[0243] 1. 一种制备蛋白质缀合物的方法，其中该蛋白质 (P) 与化学部分 (Z) 经由硫醚共价结合，该方法包括以下步骤：

- [0244] a) 获得包含该蛋白质的混合二硫化物的组合物，
  - [0245] b) 向所述蛋白质组合物中添加还原剂，从而获得还原混合物，
  - [0246] c) 使还原发生，
  - [0247] d) 获得包含经还原的蛋白质 (P-SH) 的溶液，
  - [0248] e) 任选地去除该溶液中分子量低于10kDa的分子，
  - [0249] f) 向包含经还原的蛋白质的溶液中添加活化的化学部分 (Z\*)，从而获得缀合混合物，
  - [0250] g) 使缀合反应发生，以及
  - [0251] h) 获得所述缀合蛋白质 (P-S-Z) 的制剂。
- [0252] 2. 根据实施方案1所述的方法，其中该方法在横向流过滤/切向流过滤系统中进行。
- [0253] 3. 根据任何前述实施方案所述的方法，其中所述混合二硫化物是具有加帽的游离半胱氨酸的蛋白质 (P-S-S-帽)。
- [0254] 4. 根据实施方案3所述的方法，其中a) 的组合物中P-S-S-帽的浓度为至少100 $\mu$ M，如150 $\mu$ M、250 $\mu$ M、350 $\mu$ M，或甚至如大于400 $\mu$ M。
- [0255] 5. 根据实施方案3所述的方法，其中a) 的组合物已通过超滤获得。
- [0256] 6. 根据实施方案3所述的方法，其中所述帽衍生自半胱氨酸、半胱胺或谷胱甘肽。
- [0257] 7. 根据任何前述实施方案所述的方法，其中步骤g) 的缀合是选择性化学缀合。
- [0258] 8. 根据任何前述实施方案所述的方法，其中所述还原剂是膦，诸如芳香膦，诸如三芳基膦，诸如取代的三芳基膦，诸如三苯基膦-3,3',3"-三磺酸三钠 (TPPTS)，或诸如三苯基膦-3,3'-二磺酸二钠 (TPPDS)。
- [0259] 9. 根据任何前述实施方案所述的方法，其中所述还原剂的量为至少2当量的所述蛋白质，如4-15当量、如大约5-10当量的所述蛋白质。
- [0260] 10. 根据任何前述实施方案所述的方法，其中所述还原进行少于10小时。
- [0261] 11. 根据任何前述实施方案所述的方法，其中所述化学部分 (Z) 是改性基团如延长剂。
- [0262] 12. 根据任何前述实施方案所述的方法，其中所述活化的化学部分 (Z\*) 是卤化的延长剂。
- [0263] 13. 根据任何前述实施方案所述的方法，其中所述活化的化学部分 (Z\*) 是马来酰亚胺取代的延长剂。
- [0264] 14. 根据任何前述实施方案所述的方法，其中所述化学部分 (Z) 是白蛋白结合剂 (AB)。
- [0265] 15. 根据任何前述实施方案所述的方法，其中所述活化的化学部分 (Z\*) 是卤化的

白蛋白结合剂,其中所述卤素是Br、I或Cl。

[0266] 16.根据任何前述实施方案所述的方法,其中所述活化的化学部分(Z\*)是马来酰亚胺取代的白蛋白结合剂(AB)。

[0267] 17.根据任何前述实施方案所述的方法,其中在步骤f)中添加相对于所述混合二硫化物至多5当量,如至多4、3或至多2当量的活化的化学部分(Z\*)。

[0268] 18.根据任何前述实施方案所述的方法,其包括在步骤f)之前改变步骤d)的溶液的溶剂的步骤。

[0269] 19.根据任何前述实施方案所述的方法,其包括步骤e)。

[0270] 20.根据任何前述实施方案所述的方法,其中通过渗滤进行步骤e)和/或所述溶剂改变步骤。

[0271] 21.根据任何前述实施方案所述的方法,其包括进一步的步骤i):去除分子量低于10kDa的分子和/或改变步骤h)的制剂的溶剂。

[0272] 22.根据任何前述实施方案所述的方法,其包括通过对步骤h)的制剂的渗滤而进行的进一步的步骤i)。

[0273] 23.根据任何前述实施方案所述的方法,其中步骤a)的组合物、步骤d)的溶液和/或步骤h)的制剂中的一种或多种包含缓冲液和盐。

[0274] 24.根据任何前述实施方案所述的方法,其中步骤b)的还原混合物包含缓冲液和盐。

[0275] 25.根据任何前述实施方案所述的方法,其中步骤f)的制剂的缀合混合物包含缓冲液和盐。

[0276] 26.根据任何前述实施方案所述的方法,其中步骤i)去除盐。

[0277] 27.根据任何前述实施方案所述的方法,其中所述缓冲液是三乙醇胺。

[0278] 28.根据任何前述实施方案所述的方法,其中所述盐是NaCl和/或KI。

[0279] 29.根据任何前述实施方案所述的方法,其中步骤a)的组合物、步骤d)的溶液和/或步骤h)的制剂具有相同的pH。

[0280] 30.根据任何前述实施方案所述的方法,其中步骤a)的组合物、步骤d)的溶液和/或步骤h)的制剂具有pH 7.0-8.0。

[0281] 31.根据任何前述实施方案所述的方法,其中步骤d)的溶液和步骤i)的制剂具有不同的电导率。

[0282] 32.根据任何前述实施方案所述的方法,其中步骤d)的溶液的电导率为10mS/cm (22°C)。

[0283] 33.根据任何前述实施方案所述的方法,其中步骤i)的制剂的电导率为1-2mS/cm (22°C)。

[0284] 34.根据任何前述实施方案所述的方法,其中步骤e)使用纤维素膜如10kD Hydrosart©膜进行。

[0285] 35.根据任何前述实施方案所述的方法,其中步骤i)使用纤维素膜如10kD Hydrosart©膜进行。

[0286] 36.根据任何前述实施方案所述的方法,其中至少一个步骤在横向流过滤/切向流

过滤系统中进行。

[0287] 37. 根据任何前述实施方案所述的方法, 其中所述还原(步骤c)在超滤/渗滤设备的渗余物罐中进行。

[0288] 38. 根据任何一个前述实施方案所述的方法, 其中所述缀合(步骤g)在超滤/渗滤设备的渗余物罐中进行。

[0289] 39. 根据任何前述实施方案所述的方法, 其中在整个过程中使用横向流过滤/切向流过滤系统。

[0290] 40. 根据任何前述实施方案所述的方法, 其中制剂h)或i)通过排空所述横向流过滤系统而获得。

[0291] 41. 根据任何前述实施方案所述的方法, 其中制剂h)或i)具有至少5g/L的浓度。

[0292] 42. 根据任何前述实施方案所述的方法, 其中制剂h)或i)的缀合蛋白质(P-S-Z)使用诸如Q sepharose HP通过阴离子交换色谱法(AIEC)进行纯化。

[0293] 43. 根据任何前述实施方案所述的方法, 其中制剂h)或i)的缀合蛋白质(P-S-Z)使用超滤进行浓缩, 产生至少10g/L如20g/L的浓度。

[0294] 44. 根据任何前述实施方案所述的方法, 其中通过点突变引入所述游离半胱氨酸。

[0295] 45. 根据任何前述实施方案所述的方法, 其中所述蛋白质是生长激素多肽。

[0296] 46. 根据任何前述实施方案所述的方法, 其中通过选自E30C、Y42C、S55C、S57C、S62C、Q69C、S95C、A98C、N99C、L101C、V102C和S108C的点突变提供所述生长激素多肽的游离半胱氨酸。

[0297] 47. 根据任何前述实施方案所述的方法, 其中所述生长激素多肽包含L101C点突变。

[0298] 48. 根据任何前述实施方案所述的方法, 其中步骤b)的还原混合物具有至少为 $C_{min}$ 的混合二硫化物浓度, 其中 $C_{min}$ 由以下公式确定:

[0299]  $C_{min} = a * I^{-a_1} \exp(-b * T)$ ,

[0300] 其中T为摄氏度温度, I为还原混合物的离子强度(M),  $a = 0.137 * 10^{-3} M^{1.425}$ ,  $a_1 = 0.425$ , 且 $b = 0.070 \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ 。

[0301] 49. 根据任何前述权利要求所述的方法, 其中f)的缀合混合物具有至少为 $C_{min}$ 的经还原的蛋白质的浓度, 其中 $C_{min}$ 由以下公式确定:

[0302]  $C_{min} = a * \exp(-b_1 * T - b_2 * I) + d * \exp(-d_1 * T)$ ,

[0303] 其中T为摄氏度温度, I为缀合混合物的离子强度(M),  $a = 6.96 * 10^{-4} M$ ,  $b_1 = 0.0396 \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ ,  $b_2 = 10.9 M^{-1}$ ,  $d = 6.12 * 10^{-5} M$ , 且 $d_1 = 0.0289 \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ 。

## 实施例

[0304] 用于制备具有游离半胱氨酸的生长激素蛋白质的一般方法

[0305] 所述蛋白质可以如WO 2011/089255所述在大肠杆菌(E.Coli)中重组表达。

[0306] 简言之, 通过离心分离表达GH-L101C的大肠杆菌细胞。将细胞沉淀物重悬于含有EDTA和聚山梨醇酯20的Tris缓冲液中。通过使细胞穿过高压匀浆器而使之破裂。将获得的匀浆与尿素溶液混合, 调节pH, 并放置过夜。蛋白质由此溶解, 并且天然存在的谷胱甘肽与游离半胱氨酸偶联, 导致形成GH-L101C-S-谷胱甘肽。在还原/与白蛋白侧链缀合之前, GH-

L101C-S-谷胱甘肽前体可通过阴离子交换色谱法进行纯化。

[0307] 在阴离子交换步骤中使用Q Sepharose XL作为固定相并使用Tris缓冲液作为流动相来捕获所述蛋白质。使用线性氯化钠梯度进行洗脱。在调节离子强度之后,洗脱出的蛋白质通过疏水相互作用色谱法进行纯化。苯基Sepharose FF用作固定相且Tris缓冲液用作流动相。通过应用不连续梯度进行洗脱,其中氯化钠浓度不同。

[0308] 通过所述前体的酶消化去除MEAE标签,产生GH-L101C-S-谷胱甘肽,其在稀释后最终通过阴离子交换进行纯化。Source 30Q用作固定相且三乙醇胺用作流动相。使用线性氯化钠梯度进行洗脱。对于缀合步骤而言,该蛋白质现已准备就绪。

[0309] 用于制备白蛋白结合剂侧链的一般方法

[0310] 白蛋白结合剂侧链可以如WO 2011/089255所述合成。

[0311] 在白蛋白结合剂侧链与GH-L101C-SH缀合之前,通过将该侧链溶解于KI (5M)、抗坏血酸(50mM)和三乙醇胺(150mM)的pH 7.5溶液中活化该侧链。该侧链在KI溶液中的浓度通常为5至30g/L。

[0312] 实施例1:在不使用TFF系统的情况下还原和缀合

[0313] 使用如上所述从阴离子交换色谱法获得的GH-L101C-S-谷胱甘肽。浓度为2.4g/L, NaCl为0.08M, 三乙醇胺为0.02M, 且pH为7.4。离子强度为0.09M。

[0314] 向GH-L101C-S-谷胱甘肽中添加TPPDS (5当量, 约0.12g/g GH-L101C-S-谷胱甘肽), 并且在还原之后每30分钟进行AIE-HPLC, 持续4小时(使用自动采样器, 参见图1A)。4小时后, 向还原混合物中添加侧链溶液(2.2当量, 约0.12g/g GH-L101C-S-谷胱甘肽), 并且在缀合反应之后进行AIE-HPLC过夜(参见图1B)。

[0315] 实施例2:在使用TFF系统进行超滤和渗滤的情况下GH-L101C-SH的还原和缀合

[0316] 设备:

[0317] Millipore Labscale TFF系统

[0318] ÄKTAcrossflow TFF系统

[0319] Sartcon Slice 200过滤器, 截断值10kD (Hydrosart®)

[0320] 溶液:

	GH-L101C-S-谷胱甘肽制剂:	渗滤缓冲液“1”	渗滤缓冲液“2”
三乙醇胺 (mmol/kg)	20	20	20
NaCl (mmol/kg)	80	80	0
pH (22 °C)	7.4	8.0	8.0
电导率 (mS/cm)	10	10	1-2
离子强度 (M)	0.09	0.09	0.01

[0322] 如以上方法中所述获得GH-L101C-S-谷胱甘肽的制剂。将GH制剂加载到TFF系统(Millipore Lab scale TFF系统)中,并进行超滤直至获得5g/L的浓度。

[0323] 向渗余物罐中添加相对于GH过量(10当量, 约0.24g/g GH-L101C-S-谷胱甘肽)的还原剂(TPPDS), 并施加循环直至变为均质的(约15分钟)。将还原混合物放置(在不进行循环的情况下)4小时。反应之后进行AIE-HPLC。如图2中所见, 在应用的条件下在4小时内发生还原。

[0324] 为了评估包括渗滤步骤的作用,在该步骤之前和之后获得经还原的GH-L101C-SH的样品(1mL),并进行单独的缀合反应。

[0325] 经还原的蛋白质使用10kD(Hydrosart<sup>®</sup>)膜用渗滤缓冲液1以5倍体积在恒定体积下进行渗滤(条件:350mL,0.4巴(入口),0.3巴(出口),和17LMH的通量)以去除低分子量(<10kDa)分子。由于TPPDS,还原溶液的OD280为23.7。在OD280下追踪TPPDS的去除,并且渗透物最初显示在280nM处的高吸光度,降至0.058。最后,渗余物具有与添加TPPDS之前的OD280相等的OD280,表明TPPDS已被去除。

[0326] 使用1mL经还原的蛋白质(在渗滤之前获得),通过添加0.1mL侧链溶液——相当于添加3当量(约0.16g/g GH-L101C-S-谷胱甘肽)的侧链,进行缀合,并通过AIE-HPLC监测烷基化过程(图3A)。

[0327] 使用1mL浓缩的渗余物(渗滤之后的经还原的GH-L101C-SH)并添加0.1mL侧链溶液——相当于添加3当量(约0.16g/g GH-L101C-S-谷胱甘肽)的侧链,平行地建立缀合反应。通过HPCL监测缀合反应(图3B)。

[0328] 剩余的浓缩的渗余物(66mL)与侧链溶液混合,并在TFF系统中循环以确保混合。在没有泵送的情况下将混合物放置过夜。

[0329] 为了进一步纯化产物,将缀合混合物(渗余物)采用5倍体积在恒定体积下渗滤至渗滤缓冲液2中,以去除溶液中分子量低于10kDa的分子并制备用于任何后续色谱步骤的产物。

[0330] 最终渗滤的缀合GH-L101C-S-侧链的AIE-HPLC显示,与缀合混合物相比,GH-L101C-SH几乎完全转化且一定量的侧链和KI成功还原(未示出)。

[0331] 实施例3:在使用TFF系统进行超滤和渗滤的情况下,采用高GH浓度和低侧链浓度进行的GH-L101C-SH的还原和缀合

[0332] 设备:

[0333] Millipore Labscale TFF系统

[0334] ÄKTAcrossflow TFF系统

[0335] Sartocon Slice 200过滤器,截断值10kD(Hydrosart<sup>®</sup>)

[0336] 溶液:

	GH-L101C-S-谷胱甘肽制剂:	渗滤缓冲液“3”	渗滤缓冲液“4”
三乙醇胺(mmol/kg)	20	20	20
NaCl(mmol/kg)	80	80	0
pH(22°C)	7.4	7.4	7.4
电导率(mS/cm)	10	10	1-2
离子强度(M)	0.09	0.09	0.01

[0338] 如上所述将GH制剂加载到TFF系统(AÄKTAcrossflow)中,并进行超滤直至获得10g/L的GH-L101C-S-谷胱甘肽浓度(入口压力2巴,出口压力1巴)。如实施例1中所述,向渗余物罐中添加相同量的TPPDS(5当量),并施加循环直至变为均质的(约15分钟)。还原之后每30分钟进行AIE-HPLC,持续4小时(使用自动采样器,参见图4A)。

[0339] 4小时后,将还原混合物在恒定体积下5倍渗滤至渗滤缓冲液3中。添加侧链溶液(2.2当量,约0.12g/g GH-L101C-S-谷胱甘肽),并施加循环直至变为均质的(约15分钟)。缀合反应之后进行AIE-HPLC(使用自动采样器,参见图4B)。

[0340] 在缀合反应之后,将缀合混合物采用5倍体积渗滤至渗滤缓冲液4中,以便减少KI和剩余侧链的含量,并制备用于任何后续色谱步骤的缀合蛋白质。

[0341] 实施例4:用于纯化缀合蛋白质GH-L101C-S-侧链的方法

[0342] 在缀合之后,产物可通过阴离子交换色谱法进行纯化,其中Q Sepharose HP用作固定相且三乙醇胺用作流动相。可以以线性氯化钠梯度的方式进行洗脱。产物可渗滤至合适的储存缓冲液中,以去除大小小于10kDa膜的截断值的杂质。UF/DF-步骤也允许制备浓缩的产物。

[0343] 实施例1-4的总结

[0344] 使用TFF系统进行的还原和缀合过程已经证明是成功的。已经示出了使用TPPDS还原GH-L101C-S-谷胱甘肽的3个实施例,并且结果示于图1A、图2和图4A中。图1A显示在2.4g/L的蛋白质浓度下采用5当量的TPPDS的还原。4小时后,起始材料的转化仅为约60%。然而,当在5g/L下采用10当量的TPPDS(图2)或在10g/L下采用5当量的TPPDS(图4A)进行还原时,反应在少于4小时内完成。还观测到当底物(蛋白质前体)浓度较高时可减少还原剂的量。

[0345] 以上实施例包含缀合反应可在TFF系统中进行的若干例证(图3A、图3B和图4B)。在所有的实施例中,使还原运行4小时。

[0346] 图1B中显示的缀合导致在20小时后小于60%的缀合。如图1A中所见,起始材料的还原不完全,因此剩余的GH-L101C-S-谷胱甘肽和反应中间体可能干扰缀合反应。在反应期间,GH-L101C-S-谷胱甘肽和反应中间体完全转化为GH-L101C-SH,但是完全转化为GH-L101C-S-侧链并未发生。侧链在能够与蛋白质的游离巯基反应之前可能通过与谷胱甘肽和可能剩余的TPPDS反应而耗尽。

[0347] 图3A与图3B之间仅有的差别是中间渗滤步骤,与低于80%相比,该步骤使缀合的产率提高至90%以上。

[0348] 还注意到,中间渗滤影响侧链的浓度。在不进行渗滤的情况下,侧链的浓度几乎立即下降,而中间渗滤步骤的进行避免了侧链浓度的这种急剧下降。

[0349] 侧链浓度的下降很可能是由侧链与释放的谷胱甘肽(相当于1当量的侧链)和可能TPPDS的反应引起的。通过引入中间渗滤,不再可能发生这些副反应。

[0350] 当比较图3B和图4B时,显示出了超滤和渗滤组合的另一优势。在图3B中,通过添加3当量的侧链并使用pH 8.0获得了快速且几乎完全的缀合反应。因为蛋白质在pH 8.0下不是非常稳定,所以较低的pH将会具有优势。然而较低的pH还将导致较低的反应速率。类似地,侧链的使用应当被限制为最小值,但侧链的减少还将降低反应速率。图4B显示,使用较少的侧链和较低的pH,通过增加缀合反应过程中的蛋白质浓度可能获得快速且令人满意的反应。

[0351] 由于在缀合混合物中获得的缀合蛋白质不是非常稳定,因此包括进一步的纯化步骤可能是有利的。如实施例4中所描述的,引入最终的渗滤步骤导致可在正常条件下储存的稳定的蛋白质制剂,并且另外蛋白质制剂可以在不进行稀释或pH调节的情况下直接施加至后续柱,从而避免了进一步的处理。

[0352] 实施例5—确定还原反应的最小蛋白质浓度

[0353] 本发明的发明人已发现关键的控制参数是还原反应混合物中的蛋白质的浓度。如上所见,在起始材料具有相对较低浓度的情况下,可通过在添加还原剂之前包括浓缩步骤而获得改善的反应。通过浓缩蛋白质组合物,可使用较少当量的还原剂获得令人满意的还原。进一步的研究表明,反应速率还受到温度和还原混合物的离子强度的影响。

[0354] 为了描述蛋白质浓度、温度和还原混合物的离子强度的联合作用,研究了相当多的条件(表1中的实例)。作为标准,包含三乙醇胺(20mM)和NaCl(80mM),提供了0.09的离子强度。在实验4、5、10、11和16中包含了额外的盐以提高离子强度,而14和15中的盐浓度降低。缓冲液的离子强度按照带电荷缓冲液的分数乘以缓冲液的总浓度来计算。带电荷缓冲液的分数(x)使用Henderson-Hasselbalch方程由该缓冲液的pKa来计算:

$$[0355] x = \frac{1}{1+10^{pH-pK_a}} m。对于三乙醇胺, pK_a 在 22^{\circ}C 下为 7.8。$$

	实验	C <sub>P</sub> (mM)	温度 (°C)	n (TPPDS)	NaCl (mM)	三乙醇胺 (mM)	离子强度 (M)	pH	C <sub>min</sub> (mM)
[0356]	1	0.11	30	5	80	20	0.09	7.5	0.05
	2	0.11	30	10	80	20	0.09	7.5	0.05
[0357]	3	0.45	20	3	80	20	0.09	7.4	0.09
	4	0.45	20	3	580	20	0.59	7.4	0.04
	5	0.22	20	5	580	20	0.59	7.4	0.04
	6	0.22	20	5	80	20	0.09	7.4	0.09
	7	0.10	20	5	80	20	0.09	7.4	0.09
	8	0.11	20	5	80	20	0.09	7.5	0.09
	9	0.11	5	10	80	20	0.09	7.4	0.26
	10	0.11	5	10	280	20	0.29	7.4	0.16
	11	0.11	5	10	580	20	0.59	7.4	0.12
	12	0.45	5	10	80	20	0.09	7.4	0.26
	13	0.04	40	10	80	20	0.09	7.4	0.02
	14	0.04	40	10	27	7	0.03	7.4	0.04
	15	0.02	40	10	16	4	0.02	7.4	0.04
	16	0.02	40	10	516	4	0.52	7.4	0.01
	17	0.22	20	10	80	20	0.09	8	0.09
	18	0.22	20	10	80	20	0.09	8	0.09
	19	0.11	20	10	80	20	0.08	8.5	0.10
	20	0.11	20	10	80	20	0.09	7.5	0.09

[0358] 表1.对于还原实验1-20,还原反应的条件,包括蛋白质浓度(C<sub>P</sub>)、温度(Temp)、还原剂的当量数(n)和还原混合物(包括缓冲液但不包括蛋白质组分)中的离子强度。也包括如下所述的计算的C<sub>min</sub>以供比较。实施例9-20在图5中作图。

[0359] 开发了一种机械模型,其基于反应动力学描述还原。除了蛋白质浓度和还原剂的

摩尔比的固有影响之外,该模型还包括电导率和温度对反应速率常数的影响。这些模型参数通过拟合实验数据来确定。模型模拟随后用来描述在相当多的条件下蛋白质浓度、温度和离子强度的联合作用。

[0360] 获得了描述为了得到令人满意的还原而在给定温度和离子强度下所需的小浓度的关联。在这种情况下令人满意意味着起始蛋白质的浓度在约6h内降至<2%。使用模拟创建的大量数据点允许进行详细的关联,因此允许特定(独特)形状的关联。

[0361] 得出以下关联,并由图5示出。

[0362]  $C_{\min} = a * I^{-a_1} \exp(-b * T)$ , 其中

[0363] T为摄氏度温度

[0364] I是以M(mol/L)为单位的离子强度

[0365]  $C_{\min}$ 为M(mol/L),且常数为

[0366]  $a = 0.137 * 10^{-3} M^{1.425}$

[0367]  $a_1 = 0.425$

[0368]  $b = 0.070 C^{-1}$

[0369] 下面举例说明了来自表1和图9的实验9和16的 $C_{\min}$ 的计算。

[0370] 根据以上描述的以下关联计算 $C_{\min}$ ,其中

[0371]  $C_{\min} = a * I^{-a_1} \exp(-b * T)$ ,

[0372] 实验9的计算

[0373]  $I = 0.08 (\text{NaCl}) + 0.02 * 1 / (1 + 10^{(7.4 - 7.8)})$  (三乙醇胺) = 0.09M

[0374] T=5°C:

[0375]  $C_{\min} = 0.137 * 10^{-3} * 0.09^{-0.425} * \exp(-0.070 * 5) = 0.26 * 10^{-3} M = 0.26 mM$

[0376] 实验9的Cp为0.11mM,其低于 $C_{\min}$ ,因此在根据本发明的有利条件的范围之外。

[0377] 实验16的计算

[0378]  $I = 0.516 (\text{NaCl}) + 0.004 * 1 / (1 + 10^{(7.4 - 7.8)})$  (三乙醇胺) = 0.52M

[0379] T=40°C:

[0380]  $C_{\min} = 0.137 * 10^{-3} * 0.52^{-0.425} * \exp(-0.070 * 40) = 0.01 * 10^{-3} M = 0.01 mM$

[0381] 实验16的Cp为0.02,其大于 $C_{\min}$ ,因此在根据本发明的有利条件的范围之内。

[0382] 可用性由图6进一步示出,图6显示了蛋白质浓度(Cp)高于 $C_{\min}$ 的两个实验(实验12和16),和Cp低于 $C_{\min}$ 的两个实验(实验9和15)。在实验12和16中,在6h的反应时间内,起始材料(蛋白质-S-S-帽)转化至低于2%。实验12和16证明,采用高蛋白质浓度(实验12)来补偿低温或通过具有高离子强度和较高的温度来补偿低蛋白质浓度(实验16)可以获得有用的反应产率。

[0383] 实施例6—确定缀合反应的最小蛋白质浓度

[0384] 如前面的实施例(如实施例3)中所见,通过在缀合反应中使用较高的蛋白质浓度获得了令人满意的缀合反应,这允许使用较少当量的活化的化学部分(Z\*),例如白蛋白结合侧链。此外,研究了离子强度和温度的影响,并且在这一情况下令人满意的缀合反应意味着起始蛋白质(蛋白质-SH)的浓度在约10h内降低至<5%。作为标准,包含三乙醇胺(20mM)、NaCl(80mM)和KI(0.5M),提供了约0.5的离子强度。

实验	C <sub>p</sub> (mM)	温度 (°C)	n (Z*)	NaCl/盐 酸胍 (mM)	KI (mM)	三乙醇胺 (mM)	离子强度 (M)	pH	C <sub>min</sub> (mM)	
[0385]	1	0.11	30	3	80	450	20	0.55	7.0	0.03
	2	0.11	30	3	80	450	20	0.54	8.0	0.03
	3	0.45	20	2.2	80	460	20	0.55	7.4	0.04
	4	0.45	20	2.2	280	460	20	0.75	7.4	0.03
	5	0.45	20	2	80	200	20	0.29	7.4	0.05
	6	0.45	20	2	580	200	20	0.79	7.4	0.03
	7	0.45	20	2	580*	200	20	0.79	7.4	0.03
	8	0.45	20	2	400	200	20	0.61	7.4	0.03
	9	0.22	20	2	80	320	20	0.41	7.4	0.04
	10	0.08	20	3.6	80	450	20	0.55	7.0	0.04
[0386]	11	0.08	20	3.6	80	450	20	0.54	8.0	0.04
	12	0.22	20	4.7	80	160	20	0.25	7.4	0.05
	13	0.22	20	4.7	280	160	20	0.45	7.4	0.04
	14	0.11	5	4	80	220	20	0.31	7.4	0.07
	15	0.45	5	4	80	750	20	0.84	7.4	0.05
	16	0.11	5	4	280	220	20	0.51	7.4	0.06
	17	0.11	5	4	580	220	20	0.81	7.4	0.05
	18	0.04	40	4	27	70	7	0.10	7.4	0.07
	19	0.04	40	4	427	70	7	0.50	7.4	0.02
	20	0.11	40	4	20	220	5	0.24	7.4	0.03
	21	0.05	40	4	320	110	5	0.43	7.4	0.02

[0387] 表2. 针对缀合反应测试的不同条件的实例。

[0388] 对于缀合实验1-21, 缀合反应的条件包括蛋白质浓度(Cp)、温度(Temp)、侧链Z\*的当量数(n)和缀合混合物(包括缓冲液但不包括蛋白质和侧链)中的离子强度。实例10-21在图7中作图。

[0389] 也包括如下所述的计算的C<sub>min</sub>以供比较。

[0390] \*本实施例是采用盐酸胍的唯一一个。

[0391] 缀合反应的条件包括蛋白质浓度(Cp)、摄氏度温度(Temp)、侧链的当量数(n)和还原混合物(包括缓冲液但不包括蛋白质和侧链组分)中的离子强度, 例如盐浓度。基于在表2a的实验1-20中测试的缀合条件, 使用与针对还原相同的方法开发了一种机械模型。使用模拟生成大量数据, 使得能够开发描述为了获得令人满意的缀合而在给定的温度和离子强度的组合下所需的最小蛋白质浓度的关联。在这一情况下令人满意意味着经还原的蛋白质的浓度在约10h内降低至<5%。基于获得的数据, 缀合反应的合适的条件可使用依赖于温度和离子强度的最小蛋白质浓度(C<sub>min</sub>)的以下定义来确定, 如图7所示。

$$C_{\min} = 6.96 \times 10^{-4} \times \exp(-0.0396 \times 5 - 10.9 \times I) + 6.12 \times 10^{-5} \times \exp(-0.0289 \times 5)$$

[0393]  $=6.96 \times 10^{-4} \times \exp(-1.98 - 10.9 \times I) + 5.30 \times 10^{-5}$

[0394]  $C_{\min} = a \times \exp(-b_1 \times T - b_2 \times I) + d \times \exp(-d_1 \times T)$ , 其中T为摄氏度温度, I是以M(mol/L)为单位的离子强度, 且 $C_{\min}$ 是以M(mol/L)为单位的最小蛋白质浓度

[0395]  $a = 6.96 \times 10^{-4} M$

[0396]  $b_1 = 0.0396 \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$

[0397]  $b_2 = 10.9 M^{-1}$

[0398]  $d = 6.12 \times 10^{-5} M$

[0399]  $d_1 = 0.0289 \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$

[0400] 缀合实验15和18的计算在下面示出:

[0401] 实验15的计算

[0402]  $I = 0.08 (\text{NaCl}) + 0.75 (\text{KI}) + 0.02 * 1 / (1 + 10^{(7.4-7.8)})$  (三乙醇胺) = 0.84M

[0403]  $T = 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ :

[0404]  $C_{\min} = 6.96 \times 10^{-4} \times \exp(-0.0396 \times 5 - 10.9 \times 0.84) + 6.12 \times 10^{-5} \times \exp(-0.0289 \times 5) = 0.05 \times 10^{-3} M = 0.05 \text{ mM}$

[0405] 实验15中的蛋白质浓度( $C_P$ )为0.45M, 显然大于所计算的 $C_{\min}$ 。

[0406] 实验18的计算

[0407]  $I = 0.027 (\text{NaCl}) + 0.07 (\text{KI}) + 0.007 * 1 / (1 + 10^{(7.4-7.8)})$  (三乙醇胺) = 0.10M

[0408]  $T = 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ :

[0409]  $C_{\min} = 6.96 \times 10^{-4} \times \exp(-0.0396 \times 40 - 10.9 \times 0.10) + 6.12 \times 10^{-5} \times \exp(-0.0289 \times 40) = 0.07 \times 10^{-3} M = 0.07 \text{ mM}$

[0410] 实验18中的蛋白质浓度( $C_P$ )为0.04mM, 其小于0.10M的 $C_{\min}$ 。

[0411] 所述关联的可用性由图8A和8B示出, 其中显示了测试不同缀合条件的一系列实验。在实验11中, 在20℃下在约10h后, 经还原的蛋白质的量降低至起始材料的约5% ( $C_P = 0.08 \text{ mM}$ , 及3.6当量的侧链)。在实验5中, 反应更快, 这通过使用增加量的经还原的蛋白质( $C_P$ )而实现, 即使侧链的当量数降低至2当量。如实验6所见, 与实验5相比, 离子强度的增加进一步加快了反应。在实验14、15和19(图8B)中, 蛋白质浓度( $C_P$ )高于 $C_{\min}$ , 而实验18证明 $C_P$ 低于 $C_{\min}$ 的实验有低效率。在后者中, 反应非常缓慢, 在20h后仍然存在约20%的起始材料。与实验18相比, 在实验19中, 离子强度增加, 但 $C_P$ 和T保持恒定, 这导致较高的反应速率, 并因此在少于3h内起始材料转化至5%以下。在5℃下这两个实例均具有高于 $C_{\min}$ 的 $C_P$ , 并且起始材料转化至5%以下在约10h或更短的时间内达到。然而, 与实验14相比, 实验15中 $C_P$ 和离子强度的增加导致起始材料更加有效的转化。

[0412] 虽然本文已经说明并描述了本发明的某些特征, 但是本领域普通技术人员将会想到许多修改、替代、变化和等同物。因此, 应当理解, 所附权利要求旨在涵盖所有这样的修改和变化, 它们落在本发明的真正的范围内。

## 序列表

<110> Novo Nordisk A/S

<120> 蛋白质的硫醚缀合方法

<130> 8695CN01

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 191

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg  
1 5 10 15

[0001]

Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu  
20 25 30

Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro  
35 40 45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg  
50 55 60

Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu  
65 70 75 80

Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val  
85 90 95

Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp

100 105 110

Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu  
115 120 125

Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser  
130 135 140

[0002]

Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr  
145 150 155 160

Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe  
165 170 175

Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe  
180 185 190

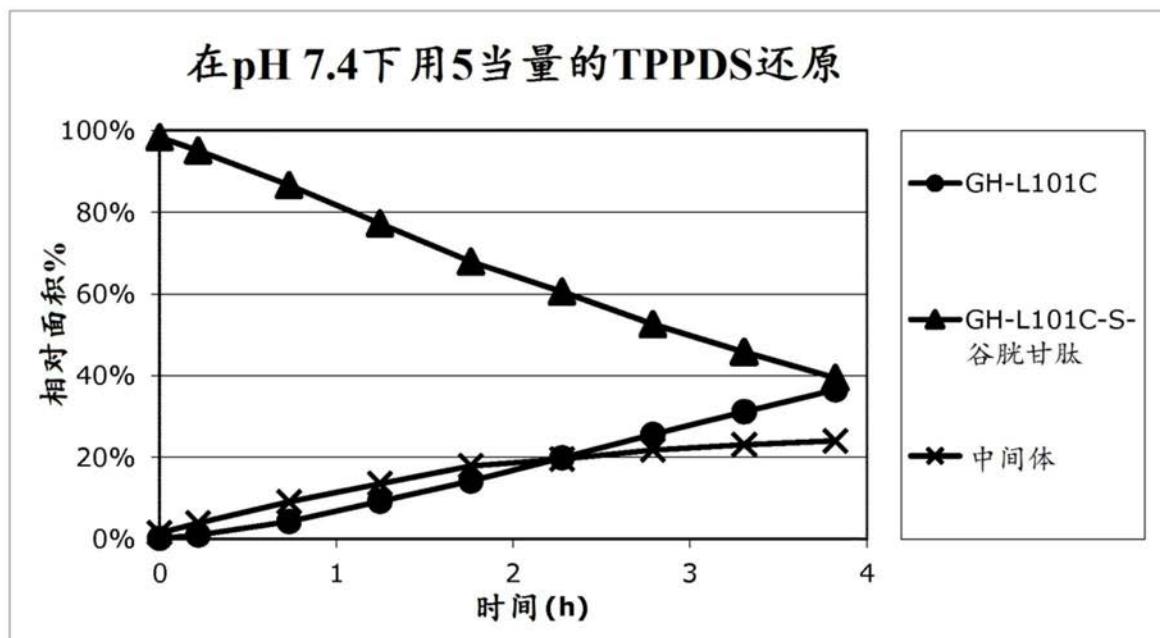
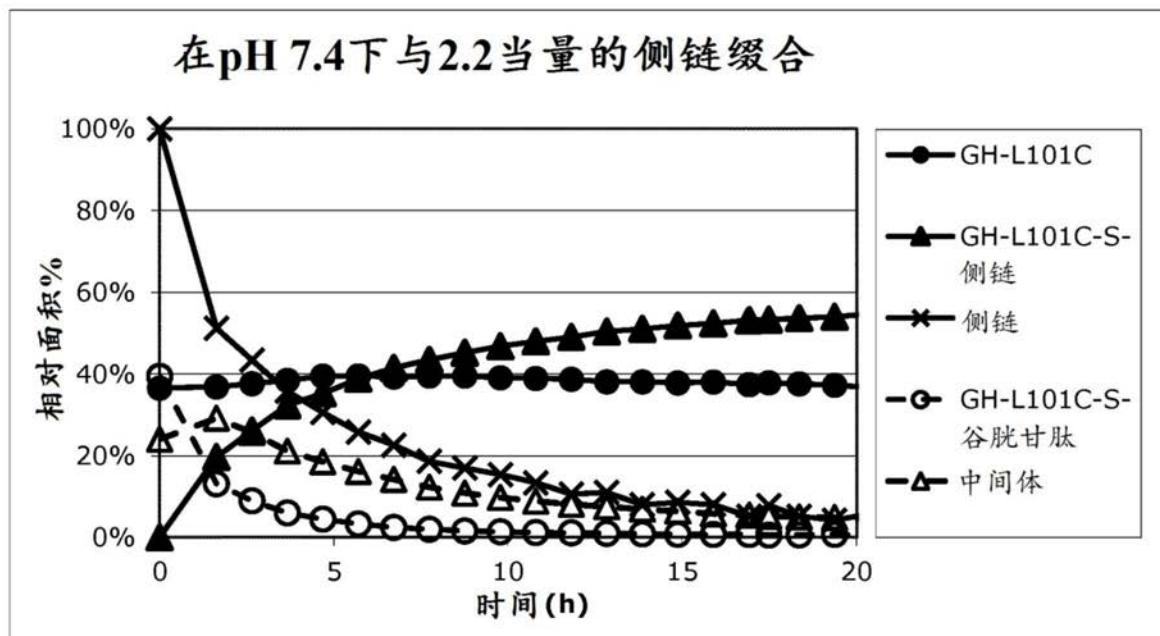
**A****B**

图1

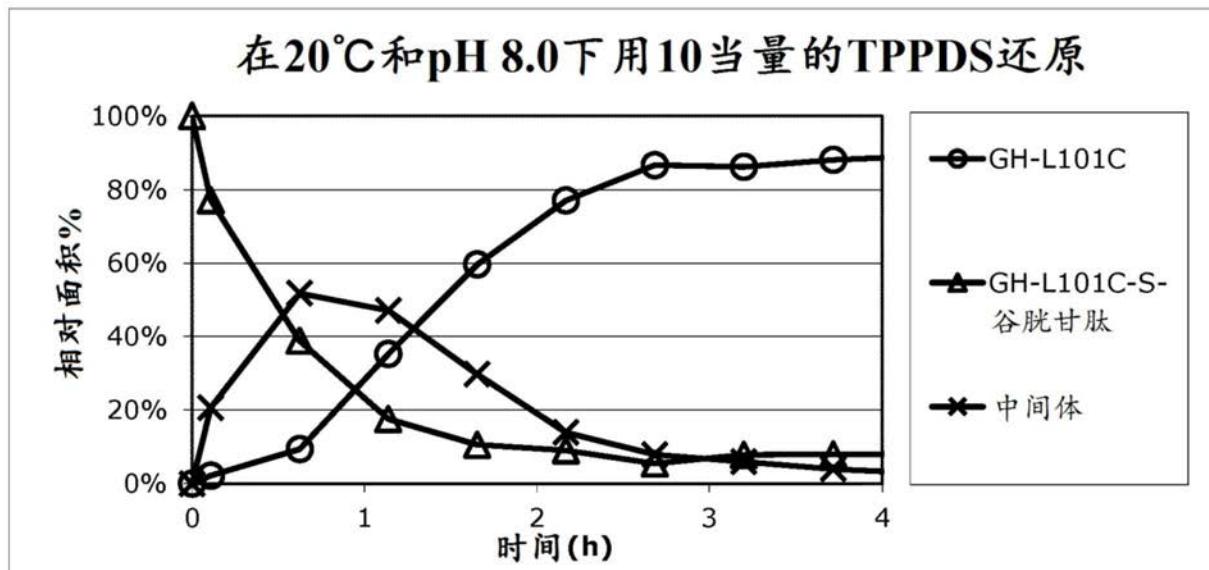
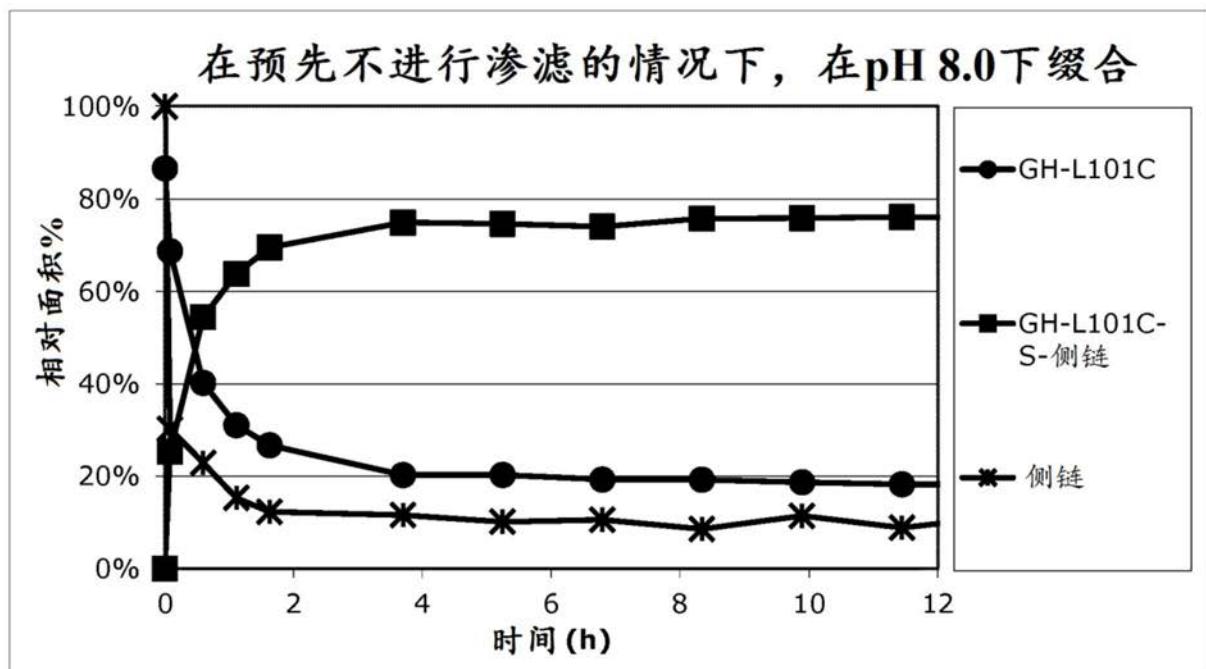


图2

A



B

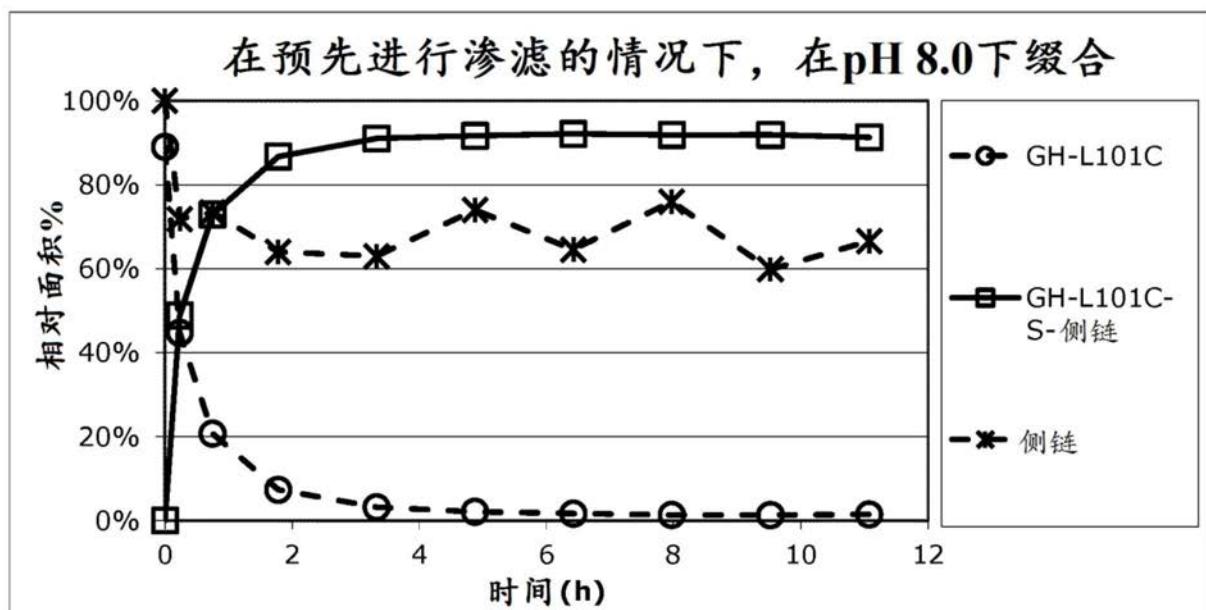


图3

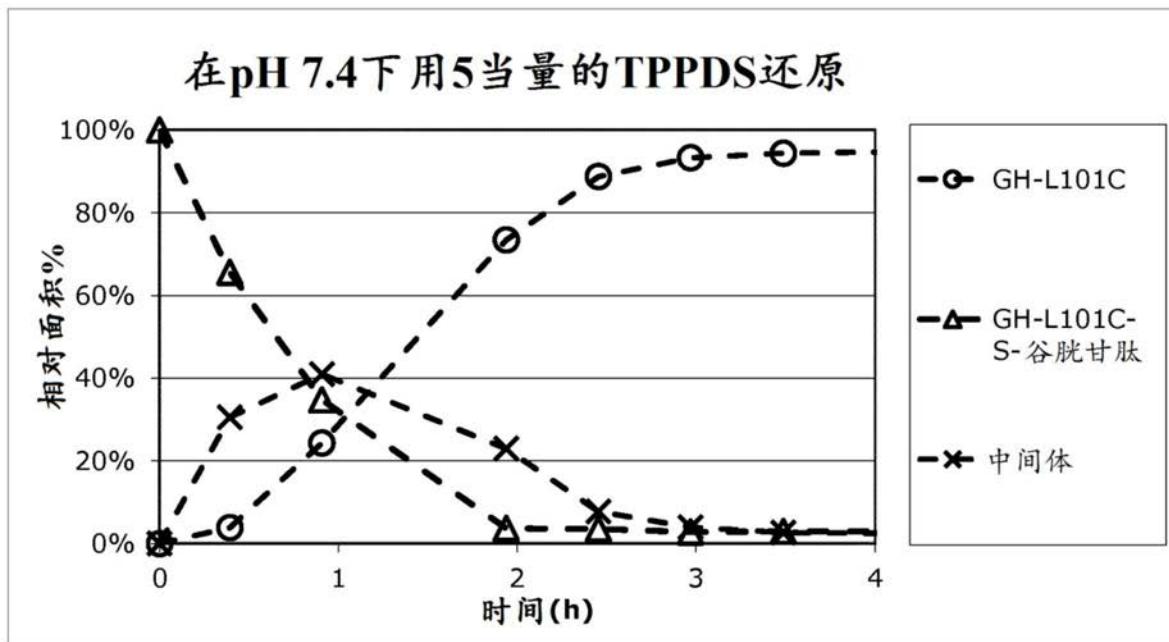
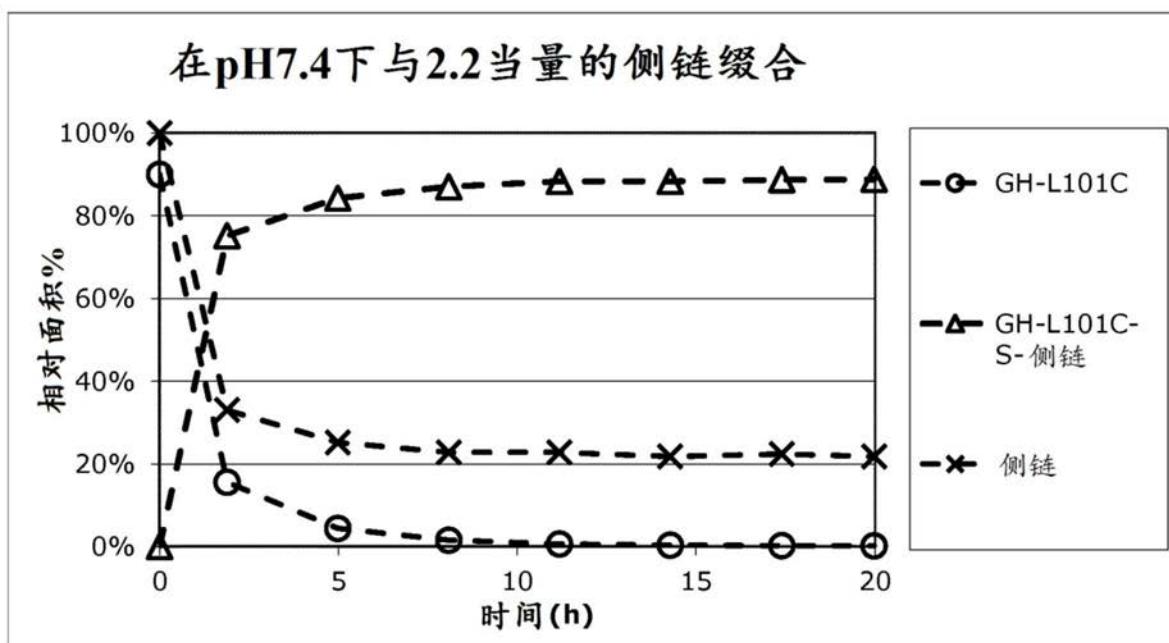
**A****B**

图4

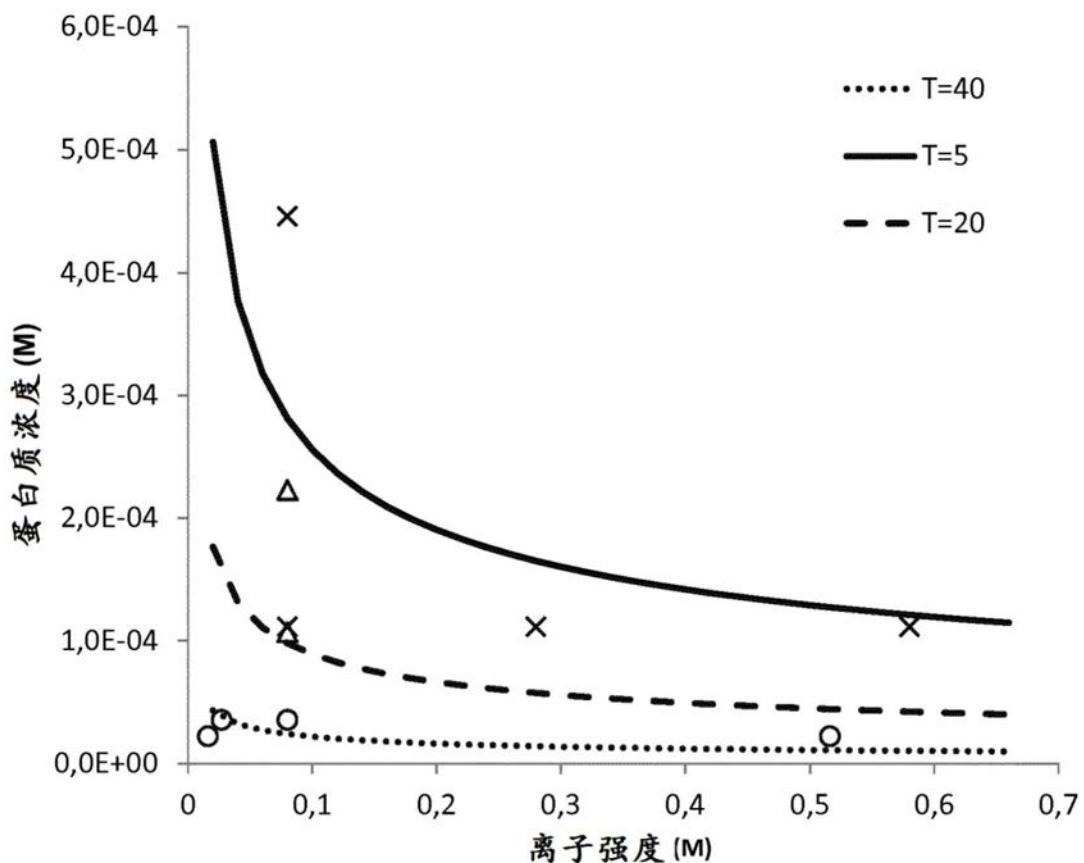


图5

### 在5或40°C下用10当量的TPPDS还原

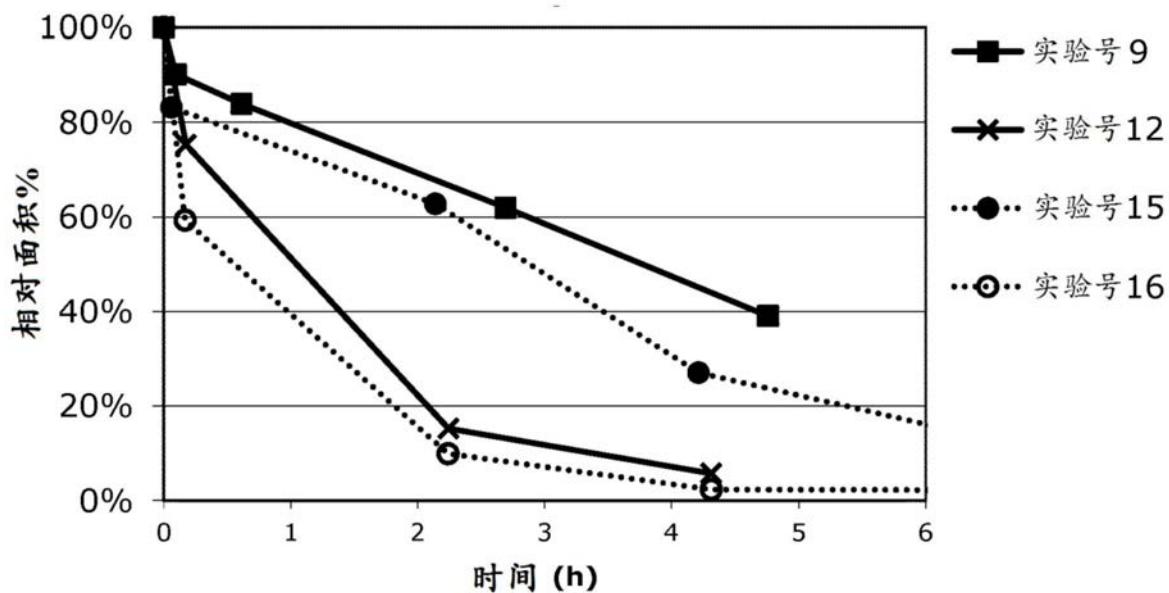


图6

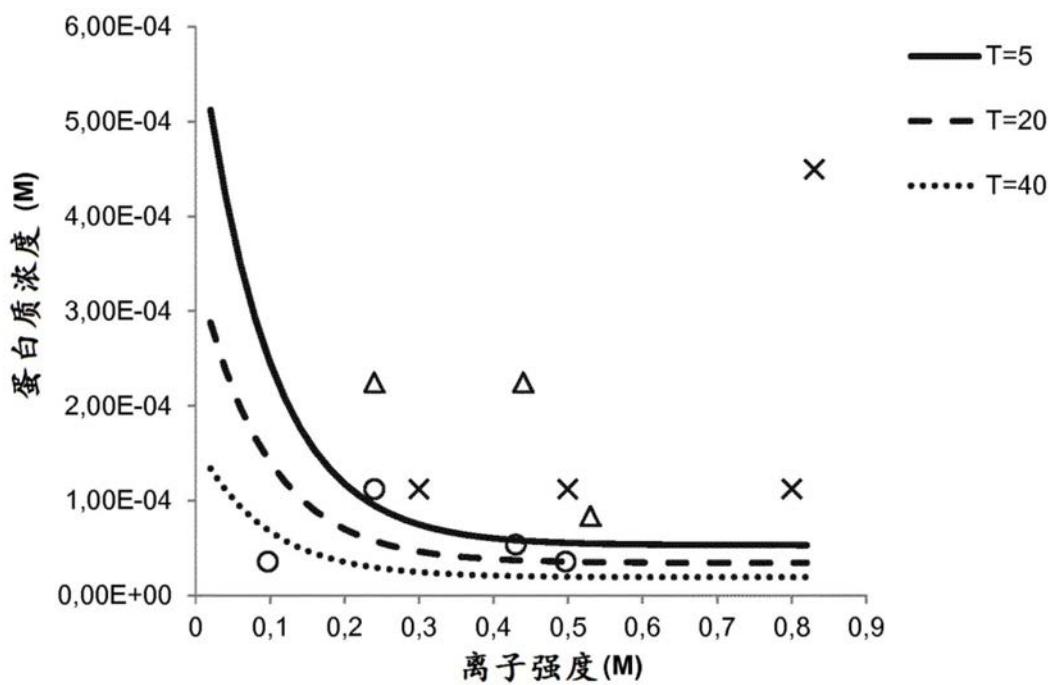
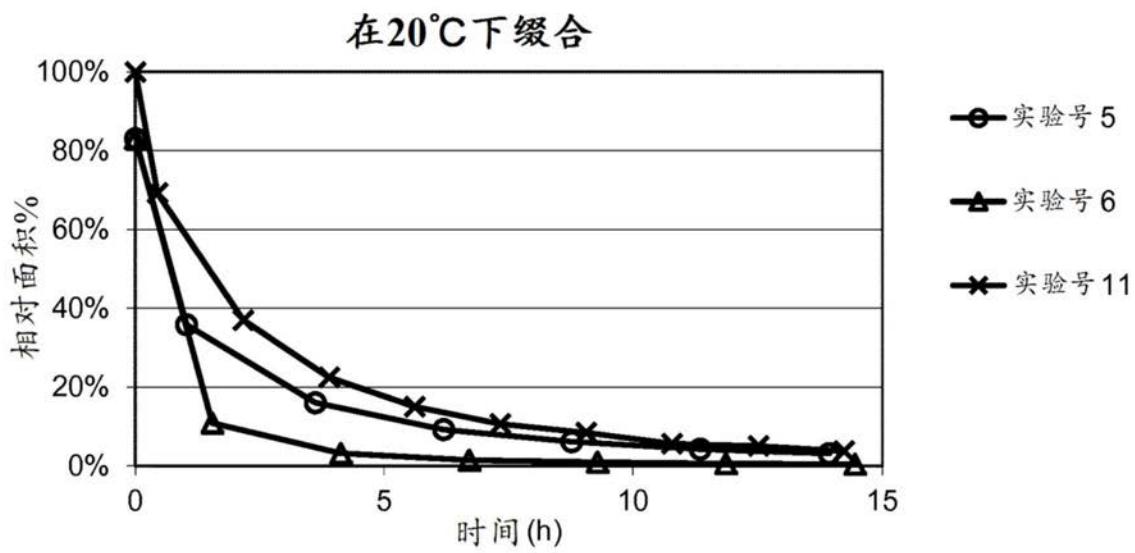


图7

A



B

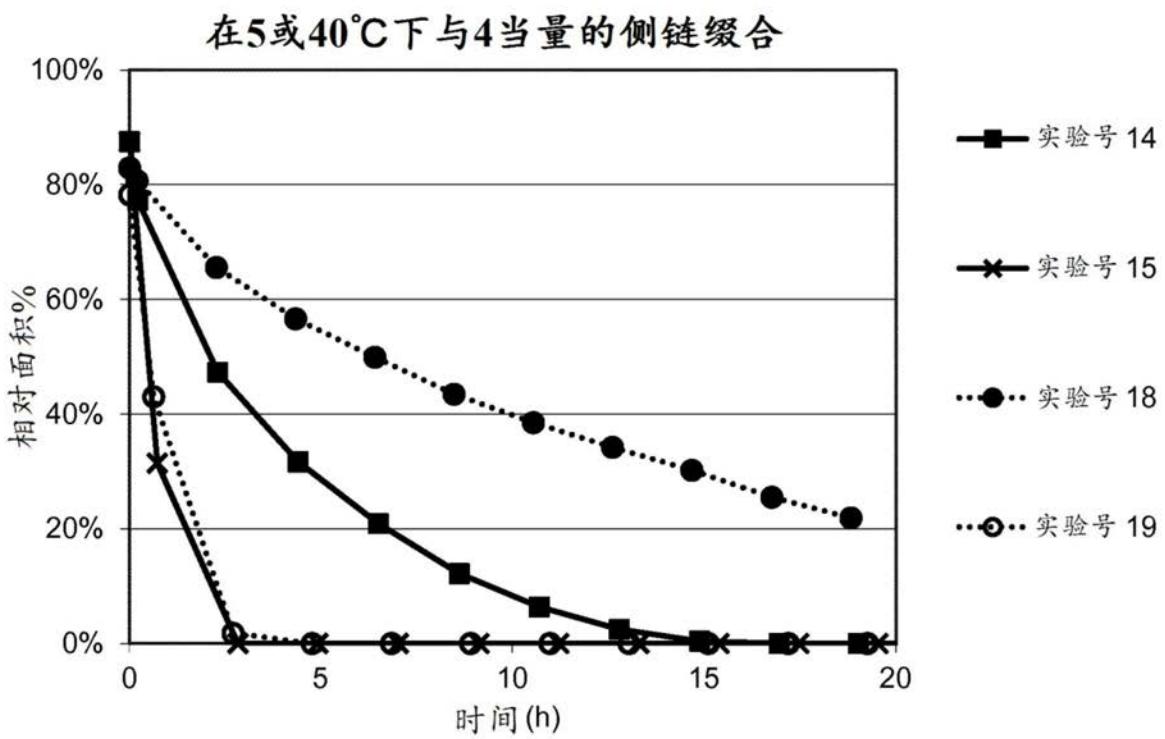


图8