



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105593238 B

(45)授权公告日 2020.09.08

(21)申请号 201480046805.8

(22)申请日 2014.07.11

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105593238 A

(43)申请公布日 2016.05.18

(30)优先权数据  
61/845,273 2013.07.11 US (续)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.02.24

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/046409 2014.07.11

(87)PCT国际申请的公布数据  
WO2015/006728 EN 2015.01.15

(73)专利权人 诺华股份有限公司  
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 艾梅·尤塞拉 扎卡里·鲁滨逊  
珍妮弗·科布

(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038  
代理人 李程达

(51) Int. Cl.  
C07K 1/13(2006.01) (续)

(56)对比文件  
WO 2010002042 A1, 2010.01.07

WO 2010002042 A1, 2010.01.07

EP 0815833 A3, 1998.05.27

EP 0815833 A3, 1998.05.27

US 5543397 A, 1996.08.06

US 5543397 A, 1996.08.06

N Kamiya. Fluorescent substrates for covalent protein labeling catalyzed by microbial transglutaminase.《Org. Biomol. Chem》.2009,第7卷(第17期),全文.

Thomas L. Mindt等. Modification of Different IgG1 Antibodies via Glutamine and Lysine using Bacterial and Human Tissue Transglutaminase.《Bioconjugate Chem》.2008,第19卷(第1期),

Abhijeet Satwekar. site-specific modification of proteins mediated by transglutaminase.《NATURE PRECEDINGS》.2011,全文. (续)

审查员 康雨欢

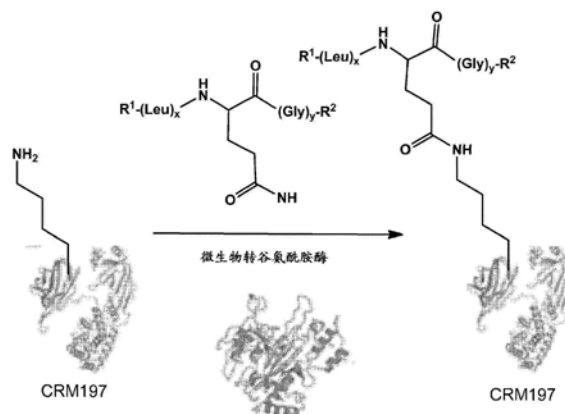
权利要求书7页 说明书76页  
序列表4页 附图5页

### (54)发明名称

使用微生物转谷氨酰胺酶进行赖氨酸特异性化学酶法蛋白质修饰

### (57)摘要

本发明涉及方法和试剂,其用于采用化学酶法微生物转谷氨酰胺酶-介导的反应、用官能化肽的具有赖氨酸残基的蛋白质的位点选择性修饰当中。官能化的蛋白质可以用于研究或治疗用途。



[转续页]

[接上页]

(30) 优先权数据

62/016,044 2014.06.23 US

*C07K 5/072*(2006.01)

*C07K 5/062*(2006.01)

*C07K 7/02*(2006.01)

(51) Int.Cl.

*C07H 13/00*(2006.01)

*C07C 317/24*(2006.01)

*C07C 237/06*(2006.01)

*C07C 247/04*(2006.01)

*C07D 209/42*(2006.01)

*C07C 13/45*(2006.01)

*C07K 5/083*(2006.01)

(56) 对比文件

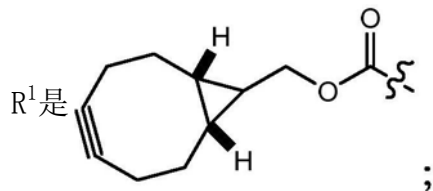
R Albalat.Langmuir monolayers of diacyl glycerol amino acid-based surfactants. Effect of the substitution pattern of the glycerol backbone.《Langmuir》.2003,第19卷(第26期),全文.

1. 修饰蛋白质的方法, 包括:

提供具有至少一个赖氨酸残基的靶标蛋白质;

在微生物转谷氨酰胺酶存在下, 将靶标蛋白质与具有式  $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$  的修饰化合物接触以形成经修饰的蛋白质;

其中  $x$  是 0 或 1;  $y$  是 0 或 1;  $z$  是 0 或 1;

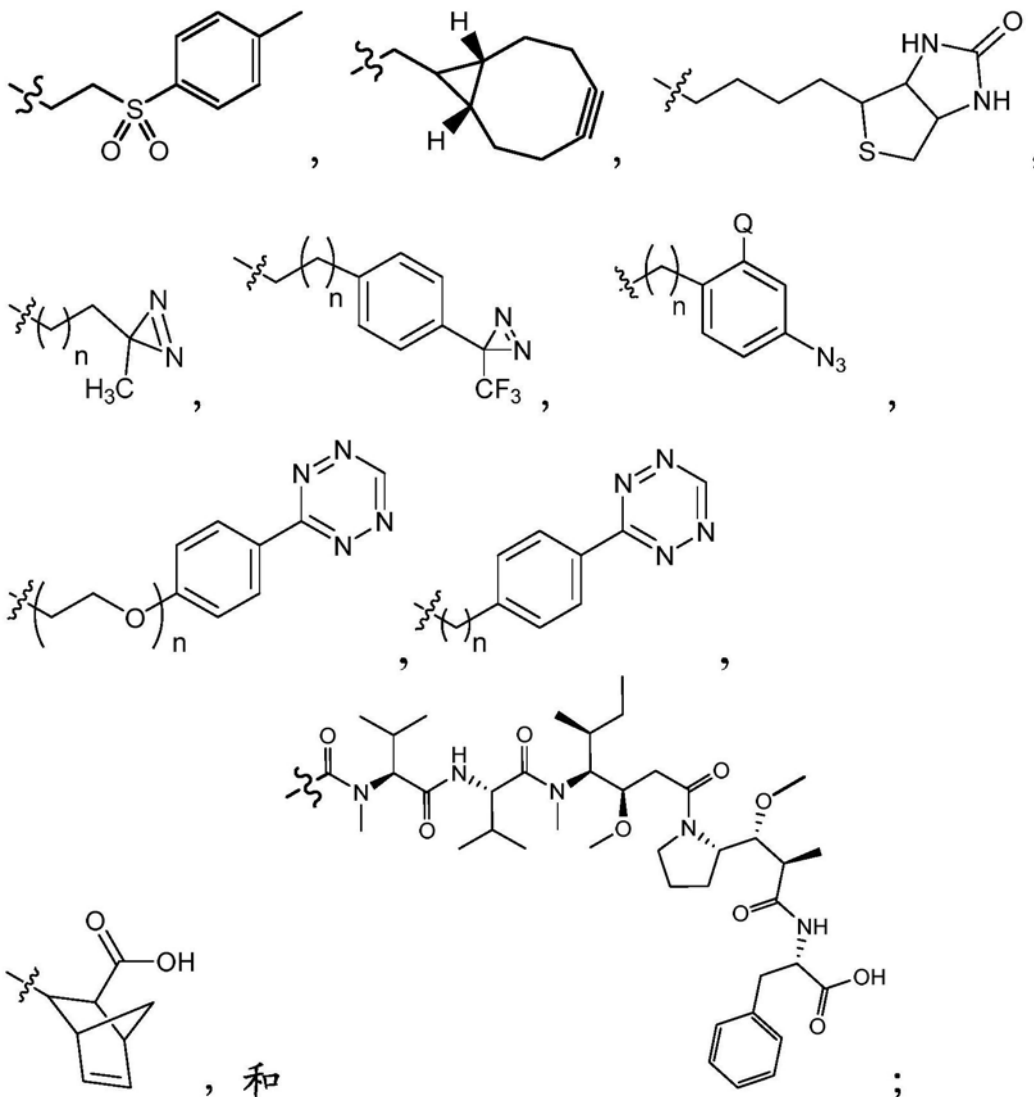


W 选自:  $C_1-C_6$  线性或支化的烷基或具有约 40 至约 80,000 amu 分子量的聚乙二醇;

A 是不存在或选自  $-O-$ ,  $-NH-$ , 和  $-S-$ ;

B 是不存在或选自  $-O-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-NH-$ ,  $-C(O)NH-$ ,  $-NHC(O)-$ ,  $-NHC(O)O-$ ,  $-OC(O)NH-$ ,  $-OC(O)O-$ ,  $-C=N(OH)-$ ,  $-S(O_2)-$ ,  $-NHS(O_2)-$ ,  $-S(O_2)NH-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-NHS(O)-$ ,  $-S(O)NH-$ ;  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-S-$ ,  $=NH-O-$ ,  $=NH-NH-$  和  $=NH-N(C_1-C_{20} \text{ 烷基})-$ ;

$R^2$  选自: 脂肪酸, 线性或支化的  $C_1-C_3$  烷基- $N_3$ , 环辛炔基, 荧光团, 多糖,  $-CH(OCH_3)_2$ ,



各n是独立地选自0至6的整数；

各Q选自H和NO<sub>2</sub>。

2. 权利要求1的方法，其中x是1。

3. 权利要求1的方法，其中y是1和z是1。

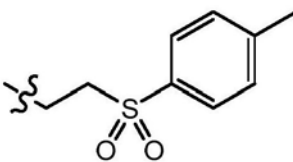
4. 权利要求1的方法，其中A是-NH-。

5. 权利要求1的方法，其中B是-C(O)-。

6. 权利要求1的方法，其中W选自C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>线性或支化的烷基。

7. 权利要求1的方法，其中W是C<sub>2</sub>线性烷基。

8. 权利要求4-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是



9. 权利要求1的方法，其中y是1和z是0。

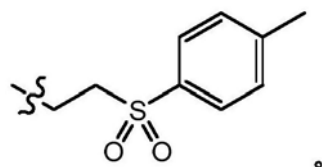
10. 权利要求1的方法，其中x是0，且y是1。

11. 权利要求1-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是C<sub>2</sub>-烷基-N<sub>3</sub>。

12. 权利要求1-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是环辛炔基。

13. 权利要求1-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。

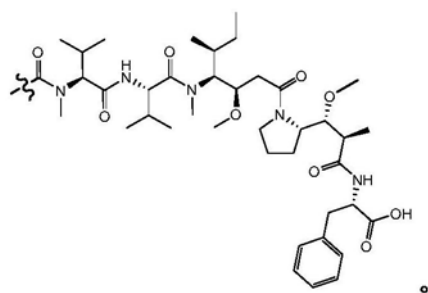
14. 权利要求1-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是



15. 权利要求1-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是荧光团。

16. 权利要求15的方法，其中所述荧光团选自: alexa 647, alexa750, alexa 488, Cy5, Cy7, 罗丹明和荧光素。

17. 权利要求1-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是



18. 权利要求1-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是多糖。

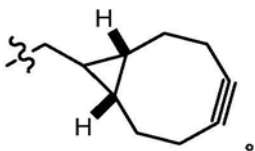
19. 权利要求18的方法，其中所述多糖选自GBSII, GBSV和MenA。

20. 权利要求1-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是GBSII。

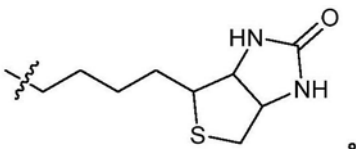
21. 权利要求1-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是GBSV。

22. 权利要求1-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是MenA。

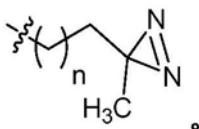
23. 权利要求1-7中任一项的方法，其中R<sup>2</sup>是



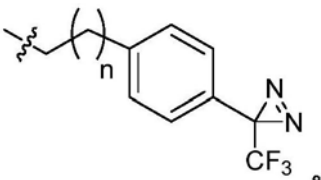
24. 权利要求1-7中任一项的方法,其中R<sup>2</sup>是



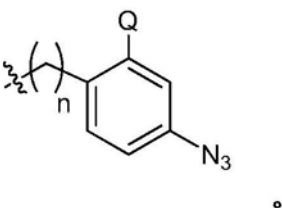
25. 权利要求1-7中任一项的方法,其中R<sup>2</sup>是



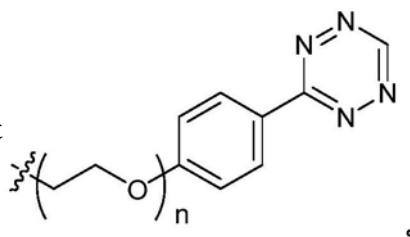
26. 权利要求1-7中任一项的方法,其中R<sup>2</sup>是



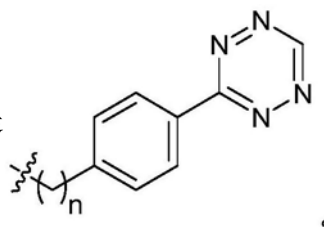
27. 权利要求1-7中任一项的方法,其中R<sup>2</sup>是



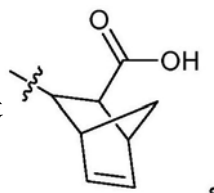
28. 权利要求1-7中任一项的方法,其中R<sup>2</sup>是



29. 权利要求1-7中任一项的方法,其中R<sup>2</sup>是

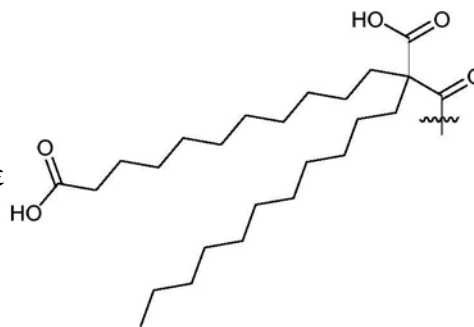


30. 权利要求1-7中任一项的方法,其中R<sup>2</sup>是



31. 权利要求1-7中任一项的方法,其中R<sup>2</sup>是脂肪酸。

32. 权利要求31的方法,其中所述脂肪酸是



33. 权利要求1-7中任一项的方法,其中A是-O-。
34. 权利要求1-7中任一项的方法,其中A是-NH-。
35. 权利要求1-7中任一项的方法,其中A是-S-。
36. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-O-。
37. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-C(O)-。
38. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-NH-。
39. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-C(O)NH-。
40. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-NHC(O)-。
41. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是NHC(O)O-。
42. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-OC(O)NH-。
43. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-OC(O)O-。
44. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-C=N(OH)-。
45. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-S(O<sub>2</sub>)-。
46. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-NHS(O<sub>2</sub>)-。
47. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-S(O<sub>2</sub>)NH-。
48. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-S(O)-。
49. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-NHS(O)-。
50. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-S(O)NH-。
51. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-C(O)O-。
52. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是-OC(O)-。
53. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是=NH-O-。
54. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是=NH-NH-。
55. 权利要求1-7中任一项的方法,其中B是=NH-N(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基)-。
56. 权利要求1的方法,其中y和z都是0。
57. 权利要求1-7中任一项的方法,其中n如果存在则是0。
58. 权利要求1-7中任一项的方法,其中n如果存在则是1。
59. 权利要求1-7中任一项的方法,其中n如果存在则是2。
60. 权利要求1-7中任一项的方法,其中n如果存在则是3。
61. 权利要求1-7中任一项的方法,其中n如果存在则是4。
62. 权利要求1-7中任一项的方法,其中n如果存在则是5。
63. 权利要求1-7中任一项的方法,其中n如果存在则是6。
64. 权利要求14的方法,还包括

控制靶标蛋白质的pH环境为pH大于7;和

将修饰的蛋白质与具有半胱氨酸残基的分子接触。

65. 权利要求64的方法,其中具有半胱氨酸残基的分子是 $N^5-((R)-1-((\text{羧甲基})\text{氨基})-3\text{-巯基}-1\text{-氧代丙}-2\text{-基})\text{-L-谷氨酰胺}$ 。

66. 权利要求1-7中任一项的方法,其中微生物转谷氨酰胺酶是Ajinomoto微生物转谷氨酰胺酶TI。

67. 权利要求1-7中任一项的方法,其中蛋白质是载体蛋白质。

68. 权利要求1-7中任一项的方法,其中蛋白质是CRM<sub>197</sub>。

69. 权利要求1-7中任一项的方法,其中蛋白质选自:细菌毒素,细菌毒素片段,解毒的细菌毒素,抗体和抗体片段。

70. 权利要求1的方法,还包含将 $R_1$ 基团与生物相互作用剂或分析试剂反应。

71. 权利要求1的方法,还包括将 $R^2$ 基团与生物相互作用剂或分析试剂反应。

72. 权利要求70和71任一项的方法,其中所述分析试剂是标记物。

73. 权利要求72的方法,还包含检测所述标记物。

74. 通过根据权利要求1-73中任一项的方法制备的缀合物。

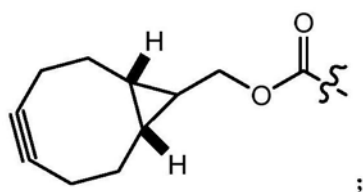
75. 疫苗,包含根据权利要求74的制备的缀合物或根据权利要求1-67中任一项制备的修饰的蛋白质。

76. 治疗性蛋白质,包含根据权利要求1-72中任一项制备的修饰的蛋白质。

77. 成像试剂,包含根据权利要求1-72中任一项制备的修饰的蛋白质。

78. 标记工具,包含根据权利要求1-72中任一项制备的修饰的蛋白质。

79. 式 $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{A-W-B-R}^2)_z$ 的化合物,其中x是0或1;y是0或1;z是0或1;  
 $R^1$ 是

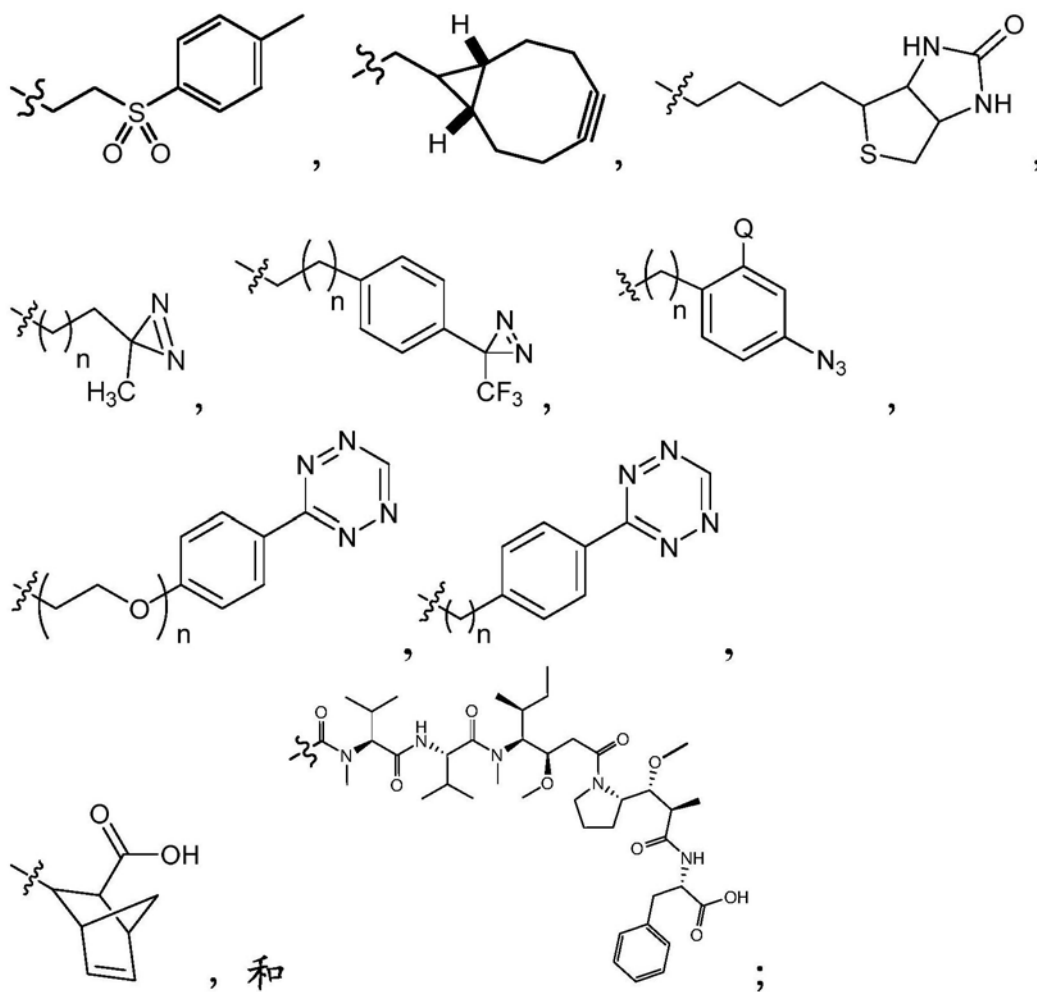


W选自: $C_1-C_6$ 线性或支化的烷基或具有约40至约80,000amu分子量的聚乙二醇;

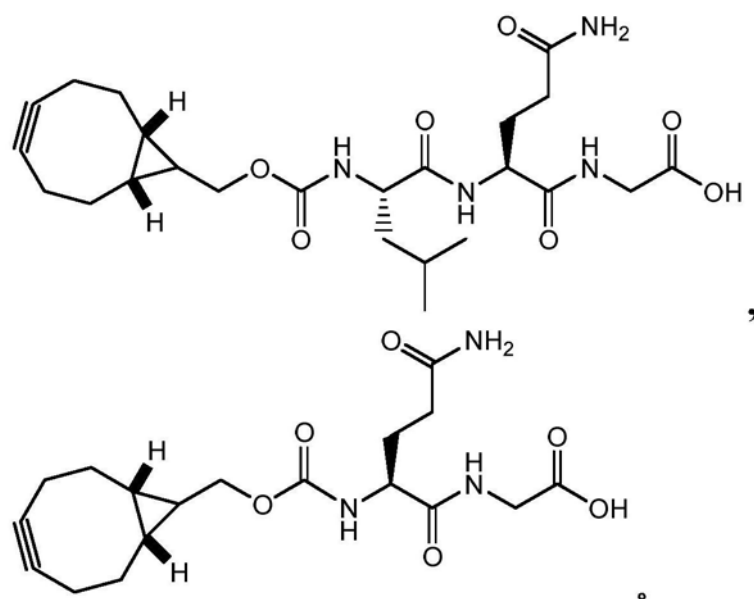
A是不存在或选自 $-O-$ , $-NH-$ ,和 $-S-$ ;

B是不存在或选自 $-O-$ , $-C(O)-$ , $-NH-$ , $-C(O)NH-$ , $-NHC(O)-$ , $-NHC(O)O-$ , $-OC(O)NH-$ , $-OC(O)O-$ , $-C=N(OH)-$ , $-S(O_2)-$ , $-NHS(O_2)-$ , $-S(O_2)NH-$ , $-S(O)-$ , $-NHS(O)-$ , $-S(O)NH-$ ;  $-C(O)O-$ , $-OC(O)-$ , $-S-$ , $=NH-O-$ , $=NH-NH-$ 和 $=NH-N(C_1-C_{20}\text{烷基})-$ ;

$R^2$ 选自:脂肪酸,线性或支化的 $C_1-C_3$ 烷基- $N_3$ ,环辛炔基,荧光团,多糖, $-\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$ ,



80. 权利要求79的化合物, 选自:



81. 权利要求79-80中任一项的化合物的缀合物。

82. 权利要求81的缀合物, 其中缀合物蛋白质是CRM<sub>197</sub>。



83. 权利要求81的缀合物, 其中缀合物蛋白质是GBS<sub>80</sub>。

84. 疫苗, 包含权利要求81-83中任一项的缀合物。

## 使用微生物转谷氨酰胺酶进行赖氨酸特异性化学酶法蛋白质修饰

### 发明领域

[0001] 本发明一般地涉及向蛋白质引入修饰基团的新方法。尤其是,本发明涉及蛋白质中的赖氨酸残基的选择性衍生化,其采用化学酶法微生物转谷氨酰胺酶-介导的修饰蛋白质的反应,和它们的制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 熟知的是蛋白质的特性和特征可以通过将基团缀合至蛋白质来修饰。例如,U.S. 专利号4,179,337公开缀合至聚乙烯或聚丙二醇的蛋白质。一般来说,所述缀合常常需要蛋白质中的某些官能团与缀合基团中的又一官能团反应。出于该意图,赖氨酸残基中的氨基比如N-末端氨基或 $\epsilon$ -氨基已用来与适宜酰化剂结合。常常希望或必需的是控制缀合反应,比如缀合化合物连接至蛋白质的位置和控制连接缀合基团的多少。这常常称为特异性或选择性。

[0003] 蛋白质的位点特异性修饰是药物和生物技术领域中长期存在的挑战。经典方法通常导致非特异性的标记(例如NHS Lys标记)或需要工程改造(例如马来酰亚胺Cys标记或非天然氨基酸)。此外,选择性化学反应的范围却是很有限的。一种备择途径是,通过重组方法引入具有独特反应性的特别的非天然氨基酸,然后在进一步的衍生化中利用该反应性。又一备择途径是,使用识别待修饰蛋白质的结构和功能特征的酶。其实例是微生物转谷氨酰胺酶(mTGase)选择性修饰生长激素中的Gln残基的用途。其它文献公开转谷氨酰胺酶改变生理学活性蛋白质的特性的用途。参见例如EP 950665,EP 785276和Sato,Adv. Drug Delivery Rev., 54,487-504 (2002),其公开在转谷氨酰胺酶存在下、在包含至少一个 Gln 的蛋白质与胺-官能化的PEG或相似配体之间的直接反应;也参见 Wada in Biotech.Lett.,23,1367-1372 (2001),其公开P-乳球蛋白与脂肪酸通过转谷氨酰胺酶的直接缀合。转谷氨酰胺酶催化的反应是转酰胺基化反应,其中谷氨酰胺残基的伯酰胺由反应混合物中的伯胺转化为仲酰胺。

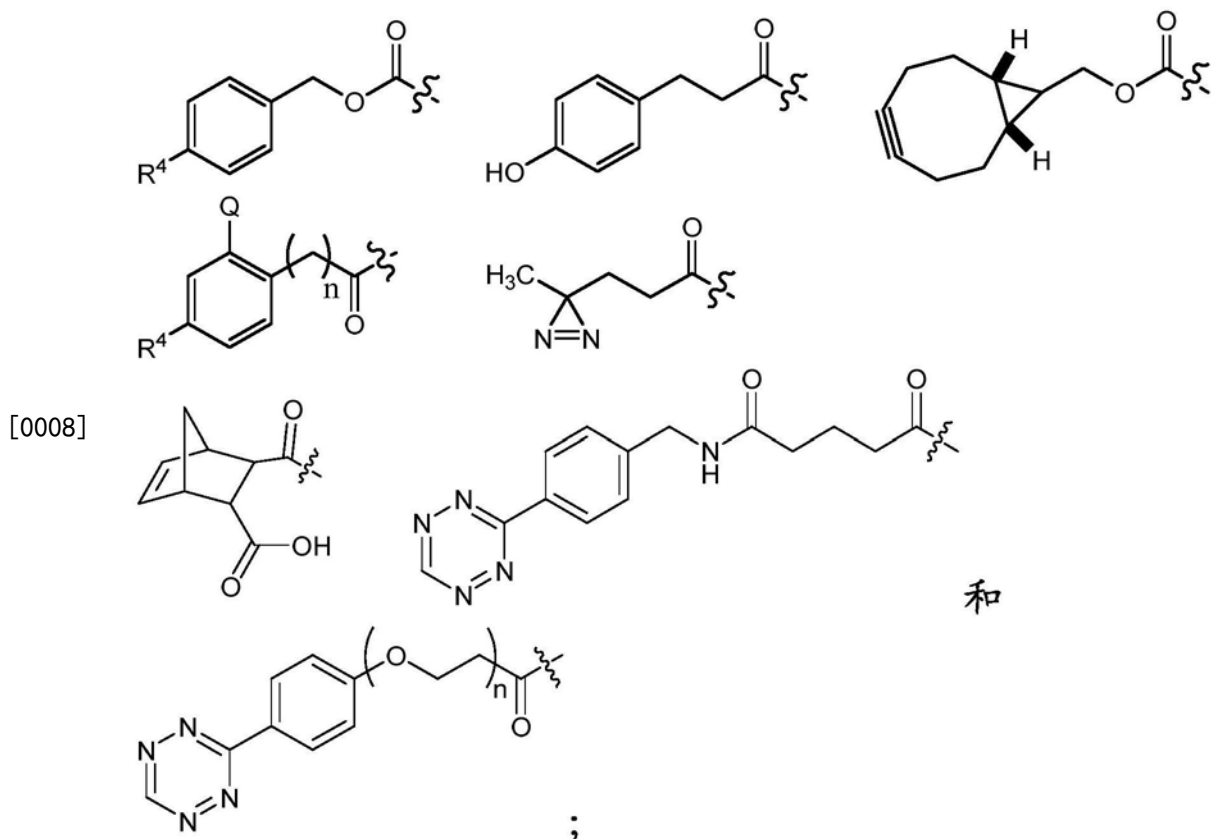
[0004] 蛋白质的选择性衍生化仍是很困难的任务;蛋白质中的赖氨酸通过酰化而衍生化甚至是更加固地非选择性过程。从而,目前不存在选择性衍生化赖氨酸残基的有效方法。相应地,本领域需要选择性衍生蛋白质或多肽中的氨基酸残基比如赖氨酸的方法。

### 发明概要

[0005] 在一方面,本文公开修饰蛋白质的方法。该方法允许位点选择性的修饰。该方法包括提供具有至少一个赖氨酸残基的靶标蛋白质;将靶标蛋白质与具有式 $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$ 的修饰化合物在微生物转谷氨酰胺酶存在下接触,形成经修饰的蛋白质;

[0006] 其中x是0或1;y是0或1;z是0或1;

[0007]  $R^1$ 选自:乙酰基,



[0009] 其中各 $R^4$ 选自-H,  $-N_3$ 和 ;

[0010] W选自:  $C_1$ - $C_6$ 线性或支化的烷基或具有约40至约80,000amu分子量的聚乙二醇;

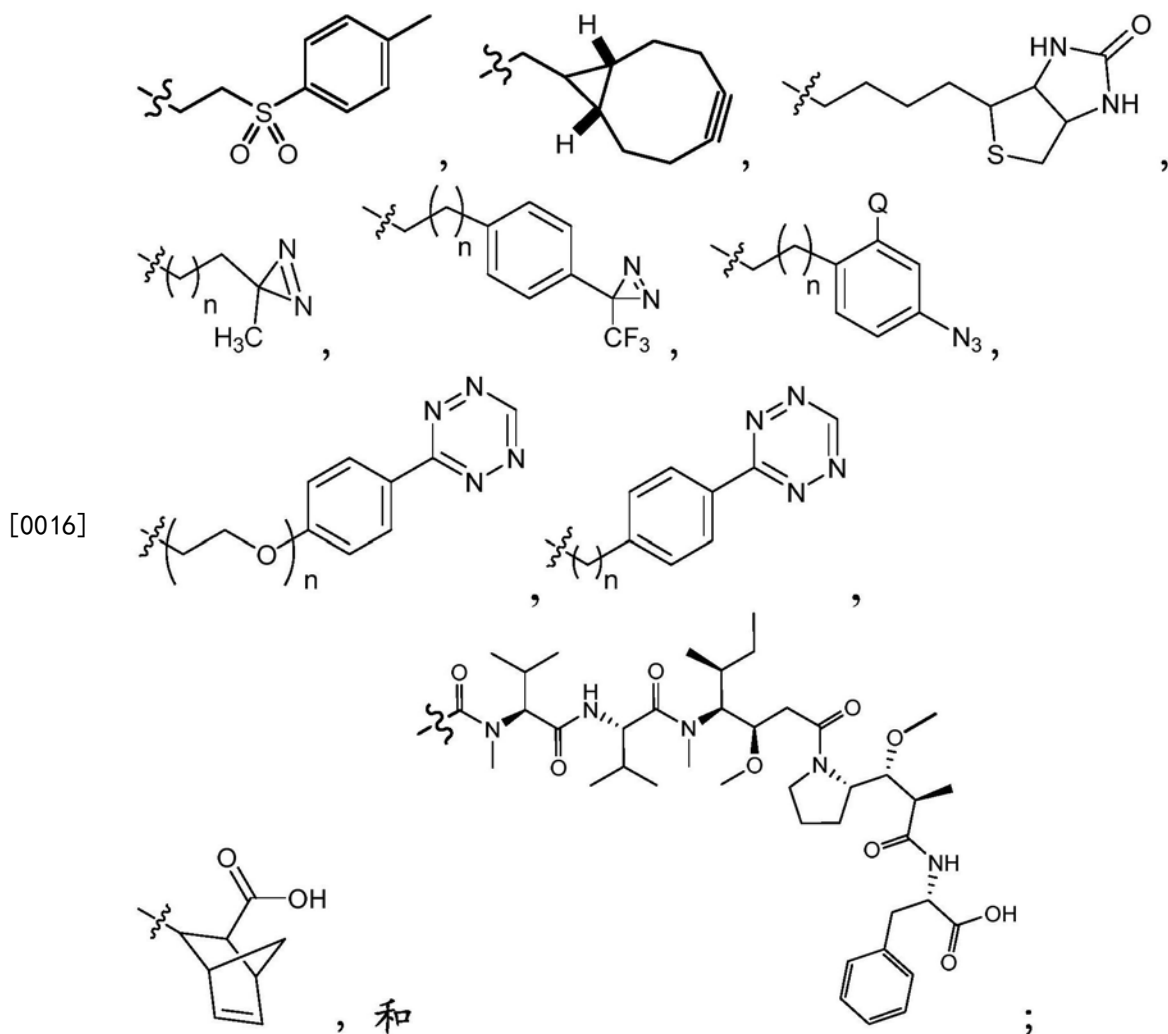
[0011] A是不存在或选自-O-, -NH-和-S-;

[0012] B是不存在或选自-O-, -C(O)-, -NH-, -C(O)NH-, -NHC(O)-, -NHC(O)O-,

[0013] -OC(O)NH-, -OC(O)O-, -C=N(OH)-, -S(O<sub>2</sub>)-, -NHS(O<sub>2</sub>)-, -S(O<sub>2</sub>)NH-, -S(O)-,

[0014] -NHS(O)-, -S(O)NH-; -C(O)O-, -OC(O)-, -S-, =NH-O-, =NH-NH- 和 =NH-N( $C_1$ - $C_{20}$ 烷基)-;

[0015]  $R^2$ 选自: 脂肪酸, 线性或支化的 $C_1$ - $C_3$ 烷基- $N_3$ , 环辛炔基, 荧光团, 多糖,  $-\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$ ,



[0017] 各 $n$ 是独立地选自0至6的整数:

[0018] 各Q选自H和-NO<sub>2</sub>。

[0019] 在某些实施方式中,方法也包括控制靶标蛋白质的pH环境为pH 大于7;和将修饰的蛋白质与具有半胱氨酸残基的分子接触。

[0020] 在某些实施方式中,具有半胱氨酸残基的分子是N<sup>5</sup>-(R)-1-((羧甲基)氨基)-3-巯基-1-氧代丙-2-基)-L-谷氨酰胺。

[0021] 在某些实施方式中,微生物转谷氨酰胺酶是Ajinomoto微生物转谷氨酰胺酶TI。在某些实施方式中,蛋白质是载体蛋白质。在某些实施方式中,蛋白质是CRM<sub>197</sub>。在某些实施方式中,蛋白质选自:细菌毒素,细菌毒素片段,解毒的细菌毒素,抗体和抗体片段。

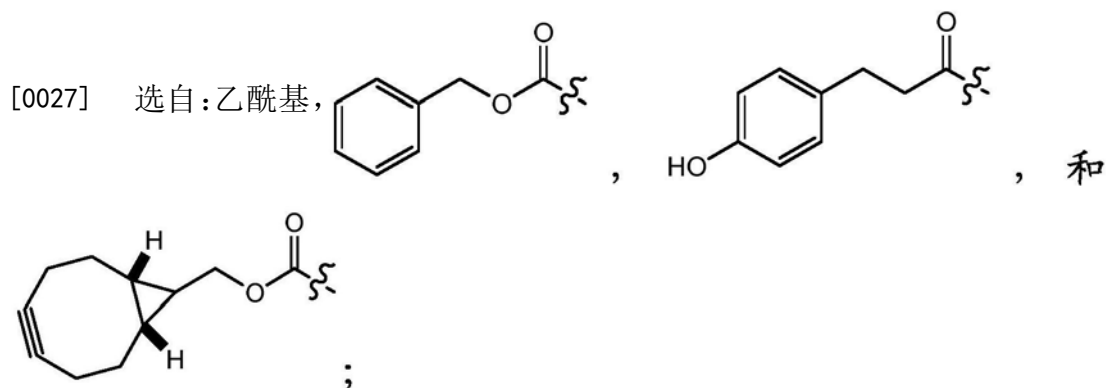
[0022] 在某些实施方式中,方法包括将R<sub>1</sub>基团与生物相互作用剂或分析试剂反应。

[0023] 在某些实施方式中,方法包括将R<sup>2</sup>基团与生物相互作用剂或分析试剂反应。在某些实施方式中,分析试剂是标记物。在某些实施方式中,方法包括检测标记物。

[0024] 在又一方面,也公开通过所公开的方法制备的缀合物。在又一方面,公开通过所公开方法制备的治疗性蛋白质。在又一方面,公开通过所公开的方法制备的成像试剂。在又一方面,公开通过所公开的方法制备的标记工具。

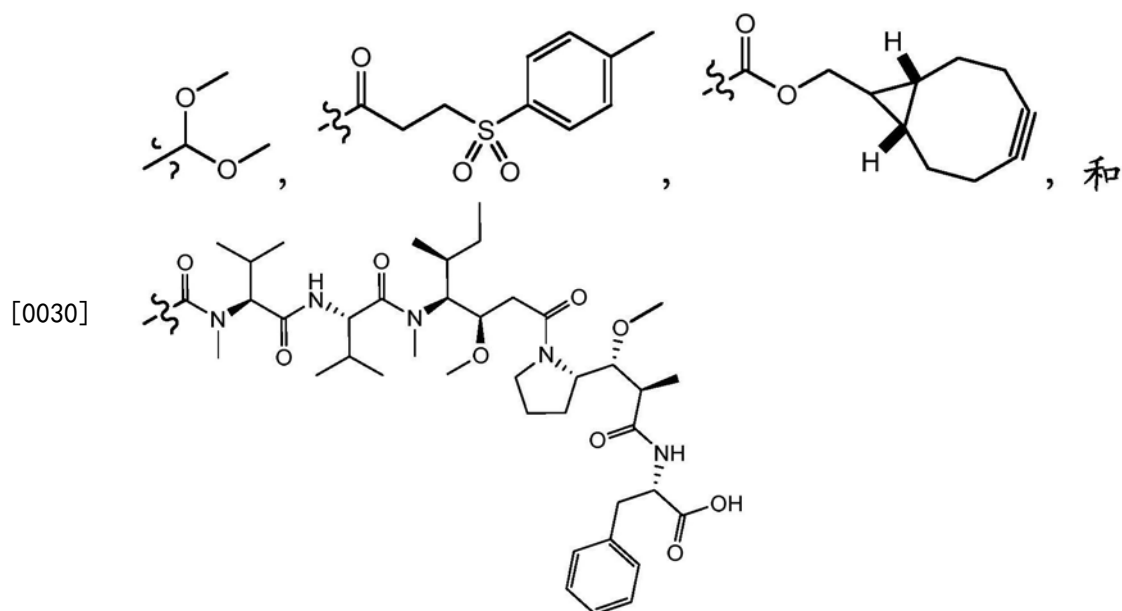
[0025] 在又一方面,公开式 $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$ 化合物,其中 $R^1, x, y, A, W, B, R^2$ 和 $z$ 具有本文描述的含义。

[0026] 在一方面,公开修饰蛋白质的方法。该方法包括提供具有至少一个赖氨酸残基的靶标蛋白质;将靶标蛋白质与具有式  $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{NH}-W-R^2)_z$  的修饰化合物在微生物转谷氨酰胺酶存在下接触,其中x是0或1;y是0或1;z是0或1; $R^1$



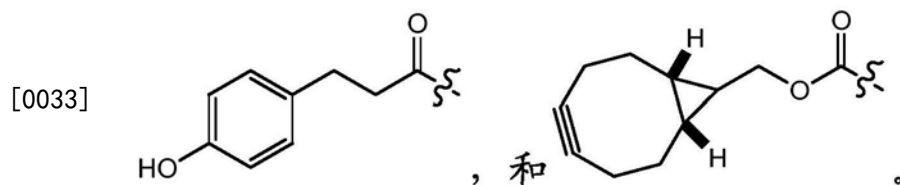
[0028] W选自 $C_1$ - $C_6$ 线性或支化的烷基或具有约40至约80,000amu分子量的聚乙二醇;

[0029]  $R^2$ 选自:线性或支化的 $C_1$ - $C_3$ 烷基- $N_3$ ,环辛炔基,荧光团,多糖,

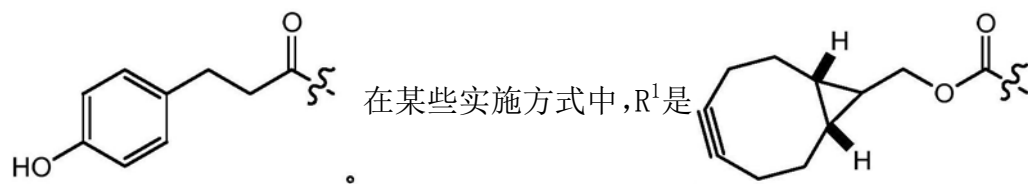


[0031] 以形成经修饰的蛋白质。

[0032] 在某些实施方式中,x是1。在某些实施方式中, $R^1$ 选自乙酰基,

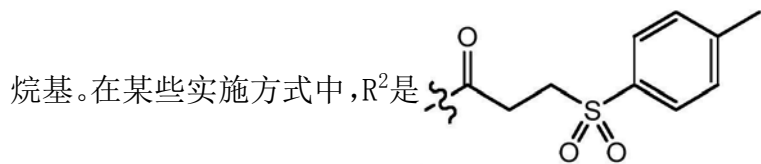


[0034] 在某些实施方式中, $R^1$ 是乙酰基。在某些实施方式中, $R^1$ 是

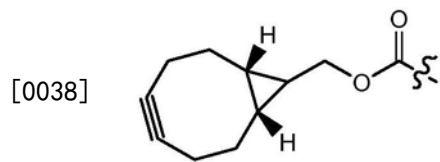


[0035] 在某些实施方式中,y是1和z是0。在某些实施方式中,其中y是1和z是1。

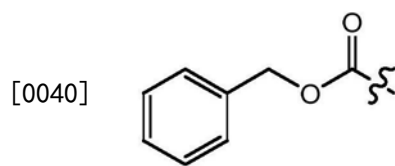
[0036] 在某些实施方式中,W选自C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>线性或支化的烷基。在某些实施方式中,W是C<sub>2</sub>线性



[0037] 在某些实施方式中,x是0,y是1,而R<sup>1</sup>是



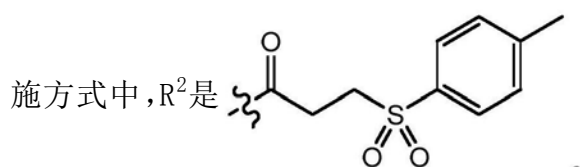
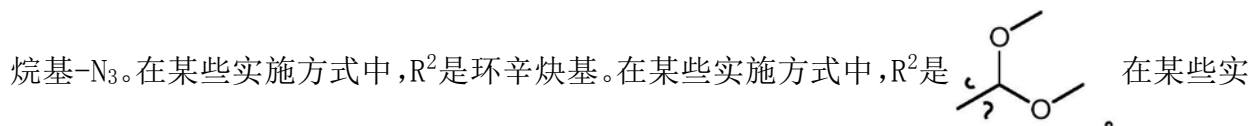
[0039] 在某些实施方式中,其中x是0而R<sup>1</sup>是



[0041] 在某些实施方式中,y是0而z是1。在某些实施方式中,y是1 而z是1。

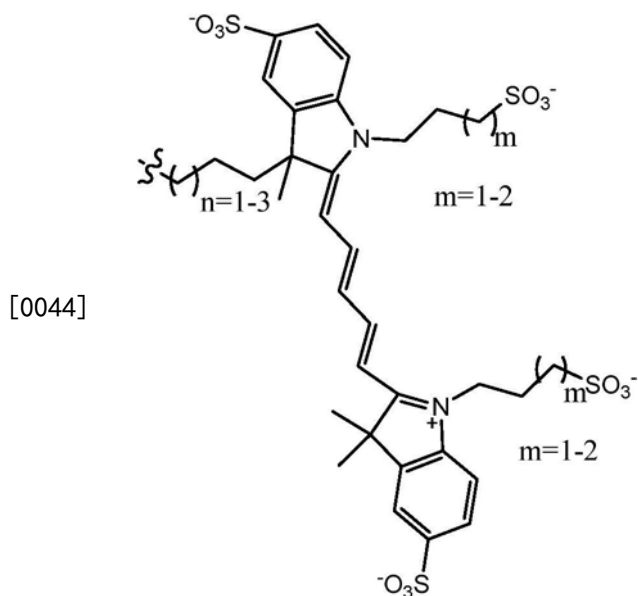
[0042] 在某些实施方式中,W是C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>线性或支化的烷基。在某些实施方式中,W是C<sub>2</sub>线性烷基。在某些实施方式中,W是C<sub>5</sub>线性烷基。在某些实施方式中,W是线性或支化的具有约40至约3000amu分子量的聚乙二醇。在某些实施方式中,W是具有约40至约80amu分子量的线性聚乙二醇。

[0043] 在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是线性或支化的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基-N<sub>3</sub>。在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是C<sub>2</sub>-

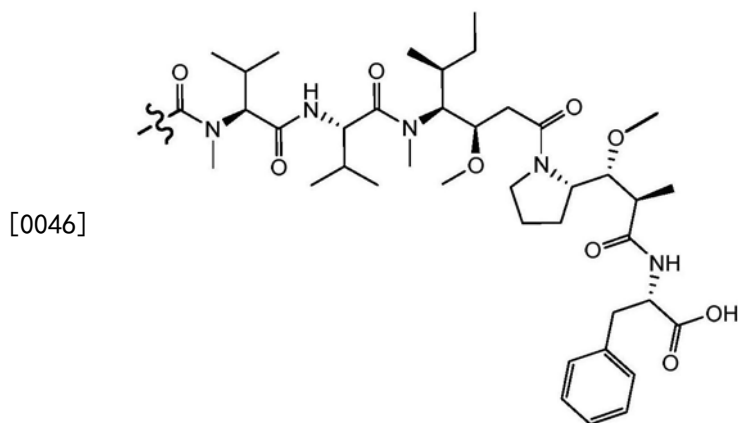


在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是荧光团。在某些实施方

式中,荧光团选自:alexa 647,alexa 750,alexa 488,Cy5,Cy7,罗丹明和荧光素。在某些实施方式中,荧光团为式



[0045] 其中n是1至3和各m是1至2。在某些实施方式中，n是1。在某些实施方式中，n是2。在某些实施方式中，n是3。在某些实施方式中，一个m是1而另一个m是2。在某些实施方式中，两个m是1。在某些实施方式中，两个m是2。在某些实施方式中，R<sup>2</sup>是



[0047] 在某些实施方式中，R<sup>2</sup>是多糖。在某些实施方式中，多糖选自 GBSII, GBSV和MenA。在某些实施方式中，R<sup>2</sup>是GBSII。在某些实施方式中，R<sup>2</sup>是GBSV。在某些实施方式中，R<sup>2</sup>是MenA。

[0048] 在某些实施方式中，方法包括控制靶标蛋白质的pH环境为pH大于7；和将修饰的蛋白质与具有半胱氨酸残基的分子接触。在某些实施方式中，具有半胱氨酸残基的分子是N<sup>5</sup>-((R)-1-((羧甲基)氨基)-3-巯基-1-氧代丙-2-基)-L-谷氨酰胺。

[0049] 在某些实施方式中，微生物转谷氨酰胺酶是Ajinomoto微生物转谷氨酰胺酶TI。

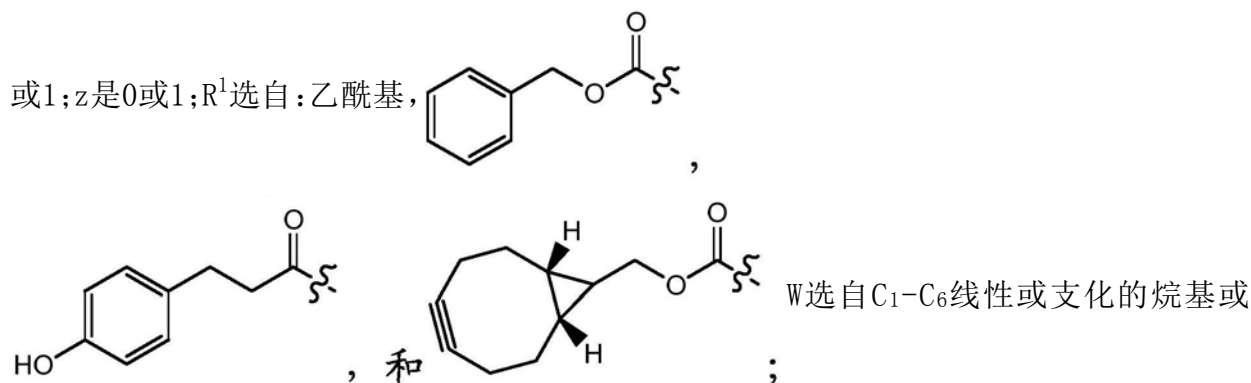
[0050] 在某些实施方式中，蛋白质是载体蛋白质。在某些实施方式中，蛋白质是CRM<sub>197</sub>。在某些实施方式中，蛋白质选自：细菌毒素，细菌毒素片段，解毒的细菌毒素，抗体和抗体片段。

[0051] 在某些实施方式中，方法也包括将R<sub>1</sub>基团与生物相互作用剂或分析试剂反应。在某些实施方式中，方法包括将R<sup>2</sup>基团与生物相互作用剂或分析试剂反应。在某些实施方式中，分析试剂是标记物。在某些实施方式中，方法也包括检测标记物。

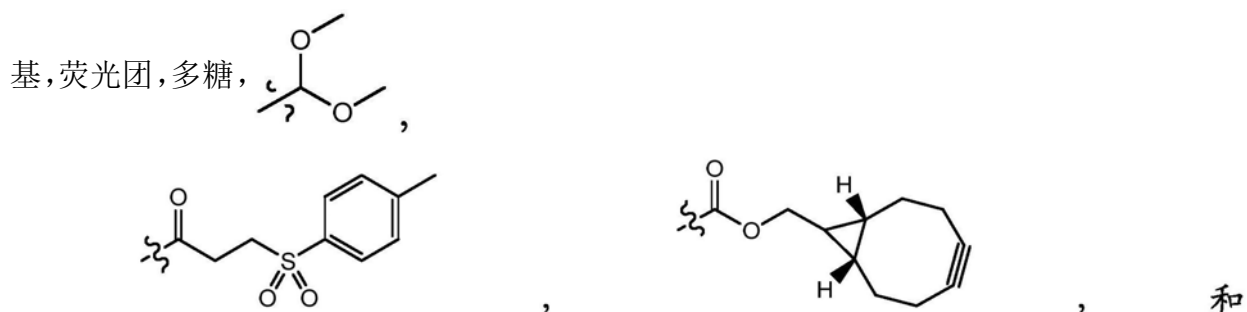
[0052] 在又一方面，公开制备自本文公开方法的缀合物。在又一方面，公开用本文公开的

缀合物或修饰蛋白质制备的疫苗。在又一方面，公开治疗性蛋白质，其具有本文公开的修饰蛋白质。在又一方面，公开成像试剂，其具有本文公开的修饰蛋白质。在又一方面，公开标记工具，其具有本文公开的修饰蛋白质。

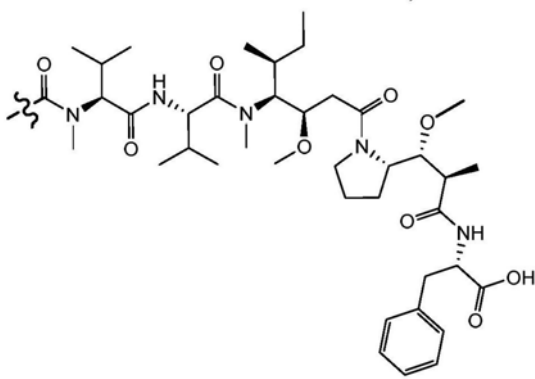
[0053] 在又一方面，公开式 $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{NH}-\text{W}-R^2)_z$ 化合物，其中 $x$ 是0或1； $y$ 是0



具有约40至约80,000amu分子量的聚乙二醇； $R^2$ 选自：线性或支化的 $C_1$ - $C_3$ 烷基- $N_3$ ，环辛炔

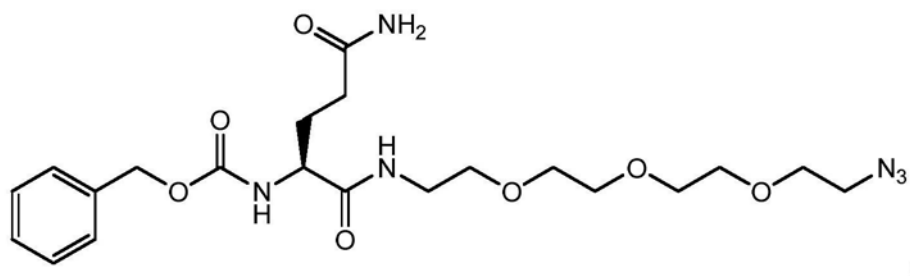
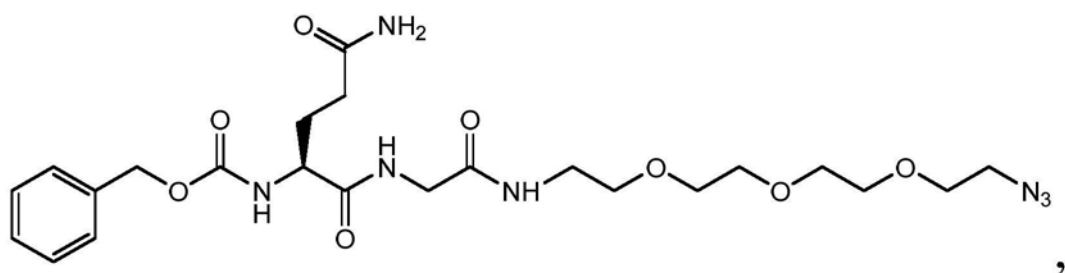


[0054]

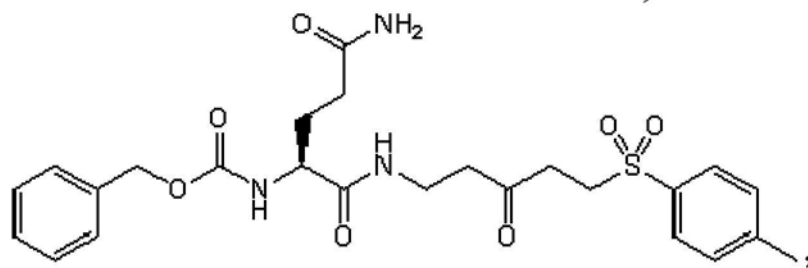
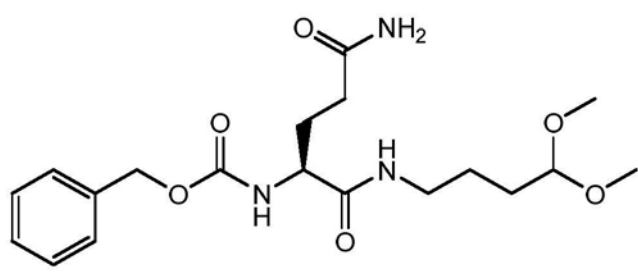


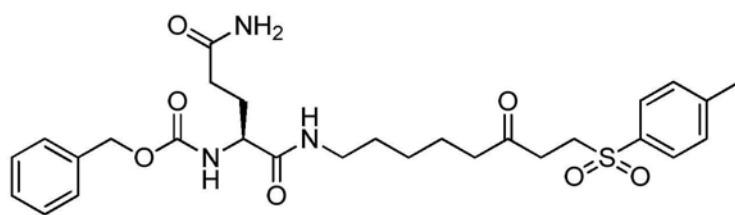
[0055] 在某些实施方式中，化合物选自：



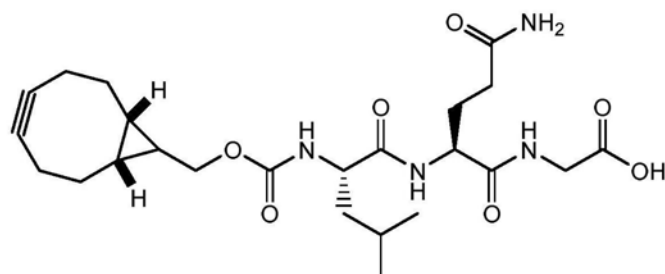


[0056]

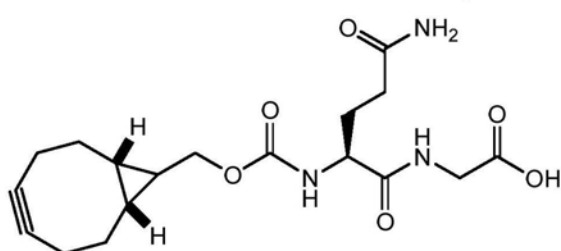




,

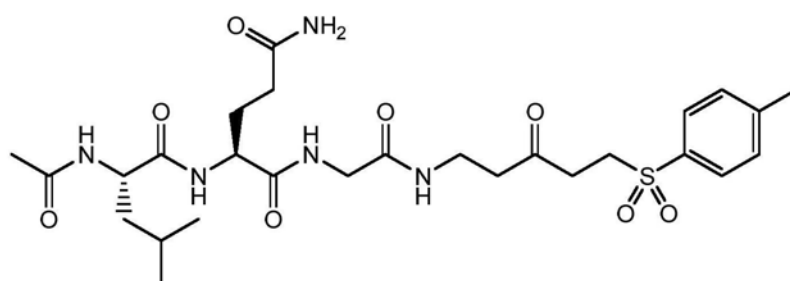
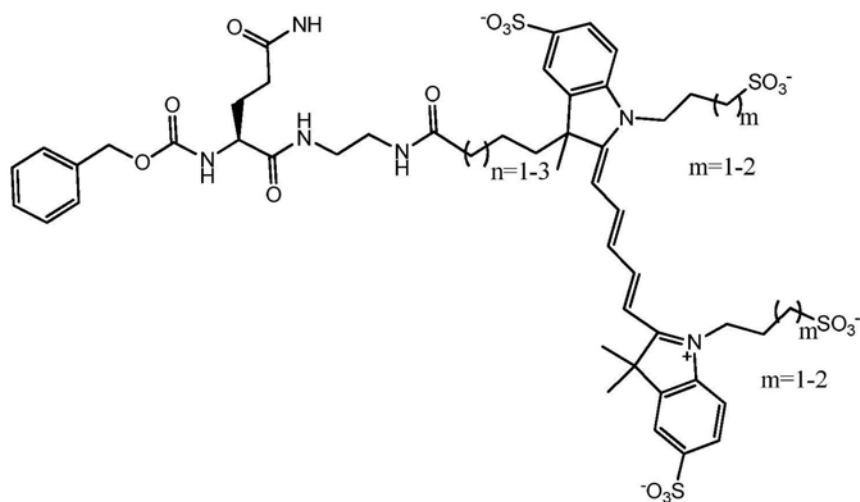


,

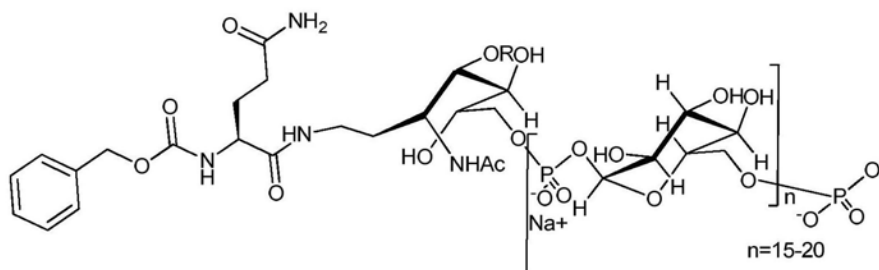
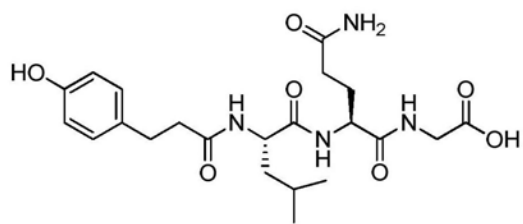


,

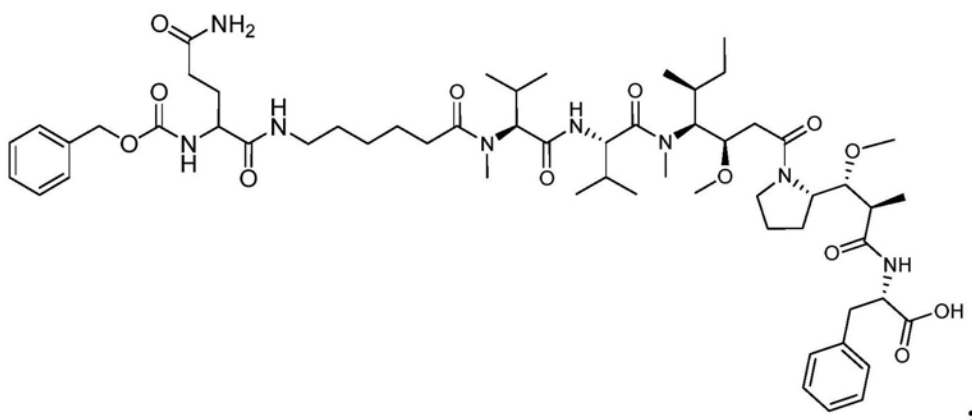
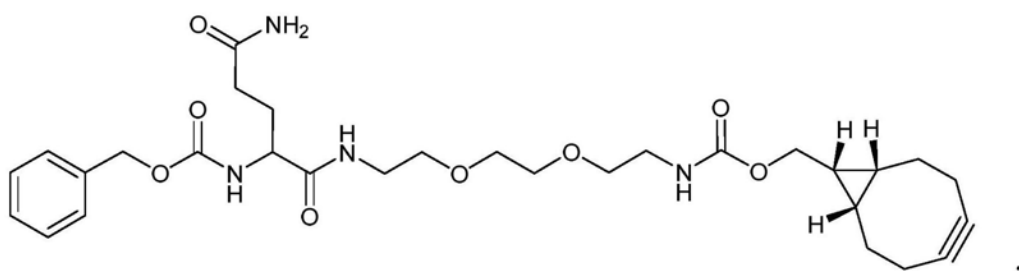
[0057]

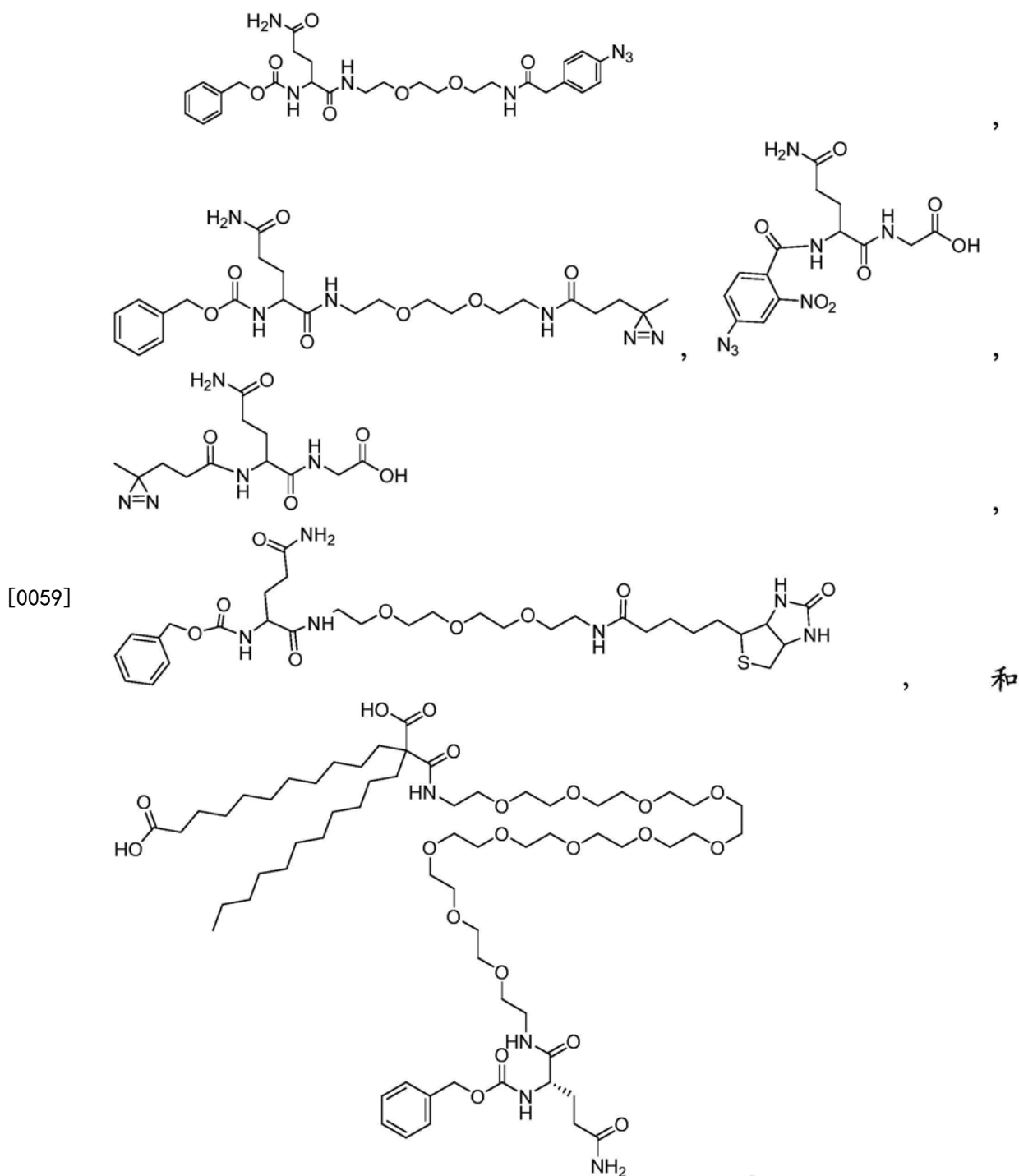


,



[0058]





[0060] 在某些实施方式中，公开化合物的缀合物，其中缀合物包括缀合物蛋白质和本文公开的化合物。在某些实施方式中，缀合物蛋白质是 CRM<sub>197</sub>。在某些实施方式中，缀合物蛋白质是 GBS<sub>80</sub>。

[0061] 在某些实施方式中，公开疫苗，其包含本文公开的缀合物。

#### 附图说明

[0062] 图1是合成方案，描述加入蛋白质修饰基团，其通过微生物转谷氨酰胺酶催化与蛋白质 (CRM197) 反应。

[0063] 图2是SDS-Page凝胶电泳,表征MenA多糖与CRM<sub>197</sub>缀合,使用本发明化合物。

[0064] 图3是SDS-Page凝胶电泳,表征GBS80抗原性多糖与CRM<sub>197</sub>的位点选择性缀合,采用本发明化合物,其中第1道是MW,第2道是 GBS80-K-N<sub>3</sub>,第3道是GBS80-K-N<sub>3</sub>/PSV 1mg蛋白质,第4道是 GBS80-K-N<sub>3</sub>/PSV 1mg蛋白质,和第5道是GBS80-K-N<sub>3</sub>/PSV 1mg蛋白质。

[0065] 图4是SDS-Page凝胶电泳,表征缀合的GBS80抗原性多糖与 CRM<sub>197</sub>的所得反应,采用本发明化合物,其中第1道是MW,第2道是GBS80-K-N<sub>3</sub>,第3道是GBS80-K-N<sub>3</sub>/PSII 1mg蛋白质,第4道是 GBS80-K-N<sub>3</sub>/PSII 1mg蛋白质,和第5道是GBS80-K-N<sub>3</sub>/PSII 1mg蛋白质。

[0066] 图5显示ELISA免疫测定结果,用于确定对GBS II多糖抗原的Ig 滴定度,其中ELISA抗PSII IgG和生存结果于1.0ug剂量的PS获得。

[0067] 图6显示ELISA免疫测定结果,用于确定对GBS V多糖抗原的Ig 滴定度,其中ELISA抗PSV IgG和生存结果于1.0ug剂量的PS获得。

[0068] 图7显示采用GBS菌株的调理吞噬测试结果。

[0069] 发明详述

[0070] 关于专利、专利公开和其它文献的全部参考文献以法律可允许的程度并入本文公开当中。

[0071] 本发明通过提供下述方法应对前述需要:经由与修饰化合物反应,以选择性方式将修饰化合物引入靶标蛋白质,同时使用常规的化学方法。方法一般地描述于图1。将靶标蛋白质(例如CRM<sub>197</sub>)的赖氨酸残基与式(I):  $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{A-W-B-R}^2)_z$  或式(II):  $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{NH-W-R}^2)_z$  修饰性化合物的谷氨酰胺残基(Gln)反应。所得产品是具有一个或多个能够进一步化学官能化的基团的蛋白质。

[0072] 在一方面,修饰蛋白质的方法包括:(a)通过微生物转谷氨酰胺酶的催化作用在辅助蛋白质与修饰化合物之间形成活化的复合物;(b)将修饰化合物从活化的复合物转移至靶标蛋白质,由此构成修饰的蛋白质。如此,“修饰的蛋白质”如本文所用,是指蛋白质或多肽,其已通过加入修饰化合物、使用微生物转谷氨酰胺酶被选择性地修饰。

[0073] 在某些实施方式中,方法包括具有至少两个赖氨酸残基的靶标蛋白质与修饰化合物的转谷氨酰胺酶催化的反应。修饰化合物是式(I):  $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{A-W-B-R}^2)_z$  或式(II):  $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{NH-W-R}^2)_z$  的含谷氨酰胺的蛋白质。

[0074] 在该方法中,通过将修饰化合物的谷氨酰胺残基与微生物转谷氨酰胺酶反应形成活化的酰基复合物,以便附着修饰化合物。在一种实施方式中,修饰化合物通过酰化转移至靶标蛋白质的赖氨酸残基。在一种实施方式中, $R^1$ 和 $R^2$ 是希望的取代基,其中它们当中至少一个具有适于进一步修饰的化学基团。从而,方法牵涉微生物转谷氨酰胺酶反应,以便选择性地修饰靶标蛋白质中的赖氨酸残基。

[0075] 如本文所用,术语“amu”是原子质量单位的缩写,也频繁地称为道尔顿单位。

[0076] 如本文所用,术语“多肽”是指通过肽键联接的氨基酸残基的聚合物,无论是天然或合成产生。小于约10个氨基酸残基的多肽一般称为“肽。”术语“肽”期望指出通过肽键联接的两个或更多个氨基酸的序列,其中所述氨基酸可以是天然或非天然的。该术语涵盖术语多肽和蛋白质,其可以由通过共价相互作用比如半胱氨酸桥或非共价相互作用连接在一起的两个或更多个肽组成。

[0077] “蛋白质”是包含一个或多个多肽链的大分子。蛋白质还可以包含非肽组分,比如

碳水化合物基团。碳水化合物和其它非肽取代基可以通过蛋白质在其中产生的细胞加至蛋白质,和将随细胞类型而变化。蛋白质在本文中按它们的氨基酸骨架结构来定义;一般不指定取代基比如碳水化合物基团,但是仍然可以存在。通过非宿主DNA分子编码的蛋白质或多肽是“异源的”蛋白质或多肽。

[0078] “分离的多肽”是本质上不含细胞组分比如碳水化合物、脂质或与天然多肽有关的其它蛋白质杂质的多肽。一般地,分离的多肽制剂含有高度纯化形式也即至少约80%纯的,至少约90%纯的,至少约95%纯的,大于95%纯的,比如96%、97%或98%或更多纯的或大于99%纯的多肽。显示特别蛋白质制剂含有分离的多肽的一种方式是在蛋白质制剂的十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳和凝胶的Coomassie Brilliant Blue染色之后出现单个带。然而,术语“分离的”不排除存在各种物理形式比如二聚体或另选糖基化的或衍生化形式的相同多肽。

[0079] 术语“氨基-末端”和“羧基-末端”在本文中用来表示多肽中的位置。在上下文允许的情况下,这些术语参照多肽的特别序列或部分用来表示邻近或相对位置。例如,位于在多肽中参照序列羧基末端的某些序列位于参比序列羧基末端的邻近,但是不一定在完整多肽的羧基末端。

[0080] “生物相互作用剂”如本文所用是指有机部分或化合物,其在引入活组织或细胞中时引起生物学应答。生物相互作用剂的实例包括抗原,毒素,治疗性蛋白质等。生物相互作用剂可以是小分子和大分子。

[0081] “分析试剂”如本文所用是指有机部分或化合物,其能够通过仪器方法检测以定性或定量表征所述分析试剂所结合或者联接的物质。所述分析试剂的实例包括标记例如荧光团或放射性标记物。

[0082] 如本文所用,术语“烷基”是线性或支化的C<sub>1</sub>-C<sub>45</sub>烷基。在某些实施方式中,烷基是C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>的。在某些实施方式中,烷基是C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>的。在某些实施方式中,烷基是C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>的。在烷基定义为基团的情况下、比如本文所述的式I和II中的W,应理解基团还可以称为亚烷基,其中存在具有邻接基团的一个取代或两个邻接基团之间的两个取代。

[0083] 如本文所用,术语“聚乙二醇”或“PEG”是指具有重复 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>亚单位的聚醚化合物,其具有约40至约80,000amu分子量,其中n是代表重复醚亚单位数的整数。在聚乙二醇定义为基团的情况下,比如本文所述式I和II中的W,应理解存在具有邻接基团的一个取代,在该情况下可以存在末端的游离醇基团或两个邻接基团之间的两个取代。

[0084] 转谷氨酰胺酶

[0085] 如上文所提及,催化剂必须用于将修饰化合物共价地连接至靶标蛋白质。催化剂必须是微生物转谷氨酰胺酶(也在本文中可互换地提作“mTGase”)。催化剂也称为微生物来源的蛋白质-谷氨酰胺-γ-谷氨酰转移酶,并且催化在蛋白质或蛋白质链中谷氨酰胺(Gln)残基的γ-羧基酰胺基与赖氨酸(Lys)残基或各种烷基胺的ε-氨基之间的酰基转移反应。

[0086] 待用于本发明方法中的转谷氨酰胺酶能够得自各种微生物来源,不存在特别的限制。有用微生物转谷氨酰胺酶的实例包括转谷氨酰胺酶,比如来自*Streptomyces mobaraense*,肉桂副球孢子菌(*Streptomyces cinnamoneum*)和*Streptomyces griseocarneum*(全部公开于U.S. 5,156,956,通过援引将其并入本文),和淡紫灰链霉菌

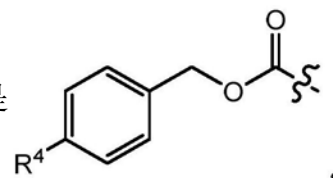
(*Streptomyces lavendulae*) (公开于U.S.5,252,469,通过援引将其并入本文) 和拉达卡链轮丝菌(*Streptomyces ladakanum*) (JP2003199569,通过援引将其并入本文)。应注意的是原先链轮丝菌属(*Streptoverticillium*)的成员现在包括在链霉菌属(*Streptomyces*)当中 [Kaempfer, J. Gen. Microbiol., 137, 1831-1892, 1991]。其它有用微生物转谷氨酰胺酶已分离自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (公开于U.S.5,731,183,通过援引将其并入本文) 和各种粘菌属 (*Myxomycetes*)。有用微生物转谷氨酰胺酶的其它实例是公开于 W0 96/06931 (例如来自利迪芽孢杆菌 (*Bacillus lydicus*) 的转谷氨酰胺酶) 和W0 96/22366那些, 通过援引将其两者并入本文。

[0087] 修饰化合物

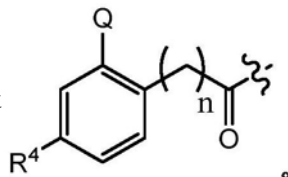
[0088] 可以用于所公开方法中的修饰化合物是通式: (I):  $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$  或式 (II):  $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(NH-W-R^2)_z$  的含谷氨酰胺的蛋白质, 其中Leu是指存在或不存在的 (即分别在x是1或0时) 氨基酸亮氨酸 (例如L-亮氨酸); Gln是指氨基酸谷氨酰胺 (例如L-谷氨酰胺); Gly是指存在或不存在 (即分别在y是1或0时) 氨基酸残基甘氨酸 (例如L-甘氨酸)。

[0089] 在某些实施方式中,x是0。在某些实施方式中,x是1。在某些实施方式中,y是0。在某些实施方式中y是1。在某些实施方式中,z是0。在某些实施方式中,z是1。

[0090] 在某些实施方式中, $R^1$ 是乙酰基。在某些实施方式中, $R^1$ 是

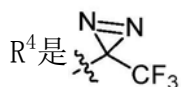


在某些实施方式中, $R^1$ 是

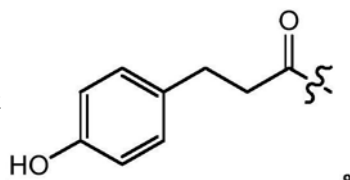


在某些实施方式中,Q是H。在某些实施方式

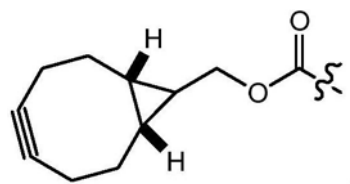
中,Q是-NO<sub>2</sub>。在某些实施方式中,n是0。在某些实施方式中,n是1。在某些实施方式中,n是2。在某些实施方式中,n是3。在某些实施方式中,n是4。在某些实施方式中,n是5。在某些实施方式中,n是6。在某些实施方式中, $R^4$ 是H。在某些实施方式中, $R^4$ 是-N<sub>3</sub>。在某些实施方式中,



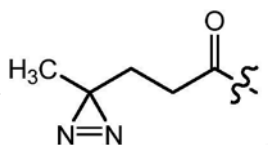
[0091] 在某些实施方式中, $R^1$ 是



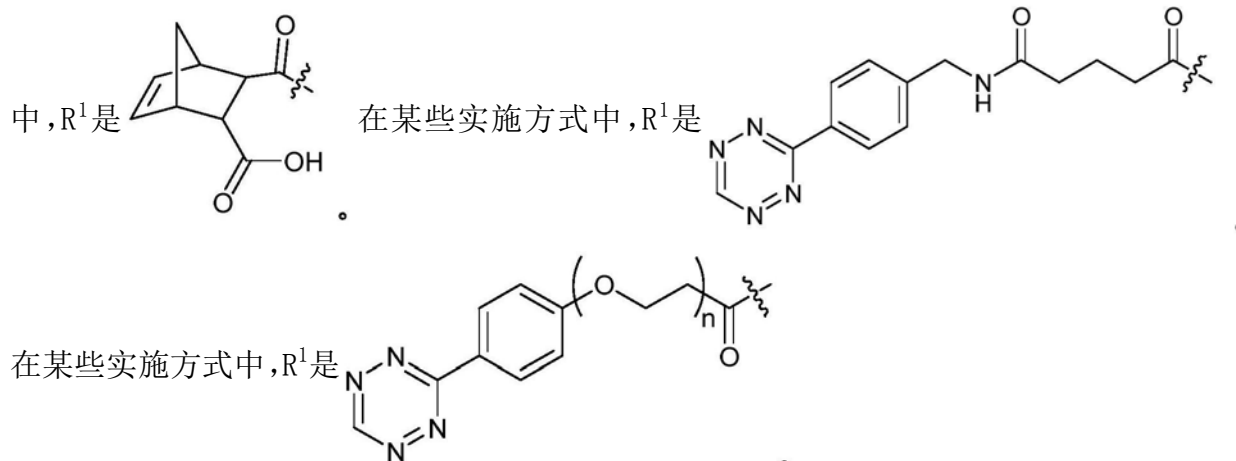
在某些实施方式中, $R^1$ 是



在某些实施方式中, $R^1$ 是



在某些实施方式

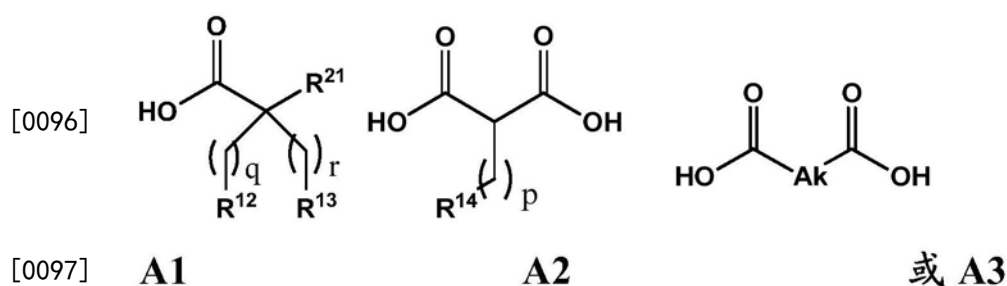


[0092] 在某些实施方式中,  $W$  是  $C_1$ - $C_6$  线性或支化的烷基。在某些实施方式中,  $W$  是具有约 40 至约 80,000 amu 分子量的聚乙二醇。

[0093] 在某些实施方式中,  $A$  是不存在。在某些实施方式中,  $A$  是  $-O-$ 。在某些实施方式中,  $A$  是  $-NH-$ 。在某些实施方式中,  $A$  是  $-S-$ 。

[0094] 在某些实施方式中,  $B$  是不存在。在某些实施方式中,  $B$  是  $-O-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-C(O)-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-NH-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-C(O)NH-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-NHC(O)-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-NHC(O)O-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-OC(O)NH-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-OC(O)O-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-C=N(OH)-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-S(O_2)-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-NHS(O_2)-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-S(O_2)NH-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-S(O)-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-NHS(O)-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-S(O)NH-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-C(O)O-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-OC(O)-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $-S-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $=NH-O-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $=NH-NH-$ 。在某些实施方式中,  $B$  是  $=NH-N(C_1-C_{20} \text{ 烷基})-$ 。

[0095] 在某些实施方式中,  $R^2$  是脂肪酸。在某些实施方式中, 脂肪酸可以是下式 A1, A2 或 A3:



[0098] 其中  $R^{11}$  是  $CO_2H$  或  $H$ ;

[0099]  $R^{12}$ ,  $R^{13}$  和  $R^{14}$  相互独立地是  $H$ ,  $OH$ ,  $CO_2H$ ,  $-CH=CH_2$  或

[0100]  $-C=CH$ ;

[0101]  $Ak$  是支化的  $C_6$ - $C_{30}$  亚烷基;

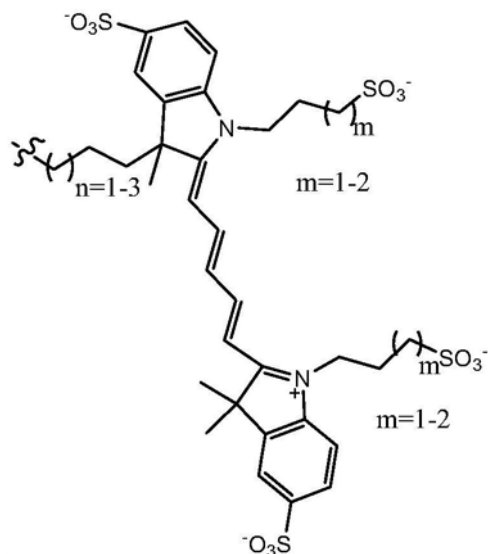
[0102]  $p$ ,  $q$  和  $r$  相互独立地是 6 至 30 的整数;

[0103] 或其酰胺, 酯或药学上可接受的盐。

[0104] 在某些实施方式中,  $R^2$  是线性或支化的  $C_1$ - $C_3$  烷基- $N_3$ 。在某些实施方式中,  $R^2$  是环辛

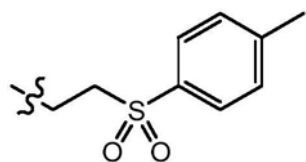


炔基。在某些实施方式中， $R^2$  是荧光团。在某些实施方式中，荧光团为式

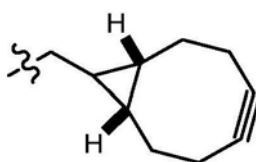


其中  $n$  是 1 至 3 和各  $m$  是 1 至 2。在某些实施方式中， $n$  是 1。

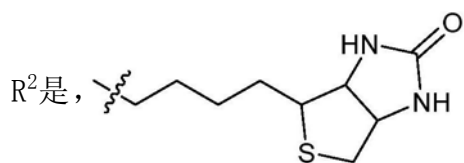
在某些实施方式中， $n$  是 2。在某些实施方式中， $n$  是 3。在某些实施方式中，一个  $m$  是 1 和另一个  $m$  是 2。在某些实施方式中，两个  $m$  是 1。在某些实施方式中，两个  $m$  是 2。在某些实施方式中， $R^2$  是多糖。在某些实施方式中， $R^2$  是  $-CH(OCH_3)_2$ 。在某些实施方式中， $R^2$  是



在某些实施方式中， $R^2$  是

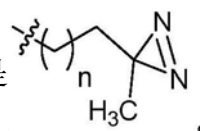


在某些实施方式中，

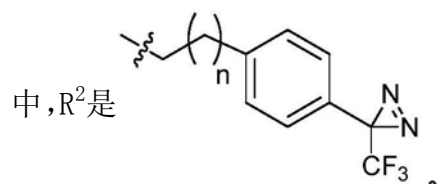


$R^2$  是，

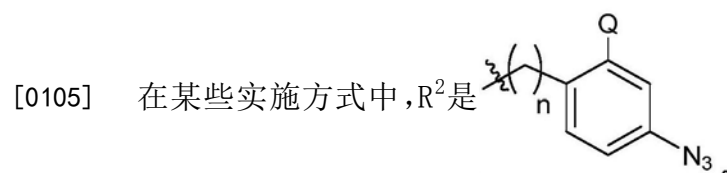
在某些实施方式中， $R^2$  是



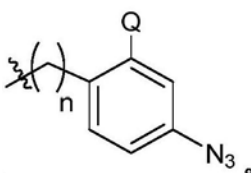
在某些实施方式



中， $R^2$  是



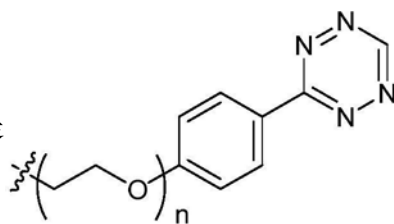
[0105] 在某些实施方式中， $R^2$  是



在某些实施方式中， $Q$  是  $H$ 。在某些实

施方式中， $Q$  是  $-NO_2$ 。在某些实施方式中， $n$  是 0。在某些实施方式中， $n$  是 1 至 6。在某些实施方式中， $n$  是 1。在某些实施方式中， $n$  是 2。在某些实施方式中， $n$  是 3。在某些实施方式中， $n$  是 4。在某些实施方式中， $n$  是 5。在某些实施方式中， $n$  是 6。

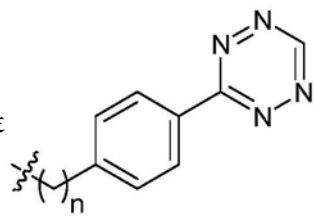
[0106] 在某些实施方式中,  $R^2$  是



在某些实施方式中,  $n$  是 0。

在某些实施方式中,  $n$  是 1 至 6。在某些实施方式中,  $n$  是 1。在某些实施方式中,  $n$  是 2。在某些实施方式中,  $n$  是 3。在某些实施方式中,  $n$  是 4。在某些实施方式中,  $n$  是 5。在某些实施方式中,  $n$  是 6。

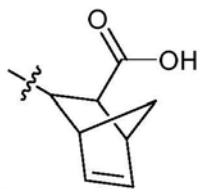
[0107] 在某些实施方式中,  $R^2$  是



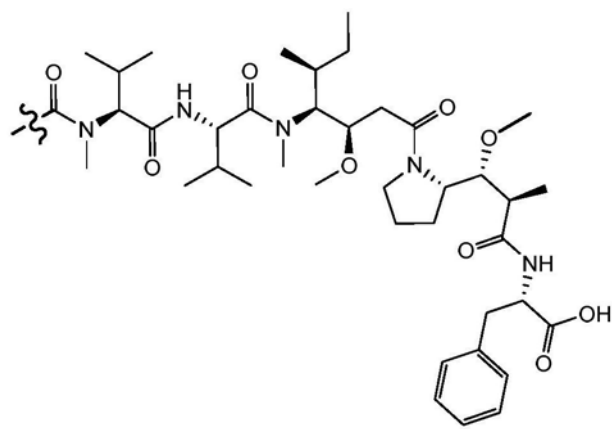
在某些实施方式中,  $n$  是 0。在

某些实施方式中,  $n$  是 1 至 6。在某些实施方式中,  $n$  是 1。在某些实施方式中,  $n$  是 2。在某些实施方式中,  $n$  是 3。在某些实施方式中,  $n$  是 4。在某些实施方式中,  $n$  是 5。在某些实施方式中,  $n$  是 6。

[0108] 在某些实施方式中,  $R^2$  是



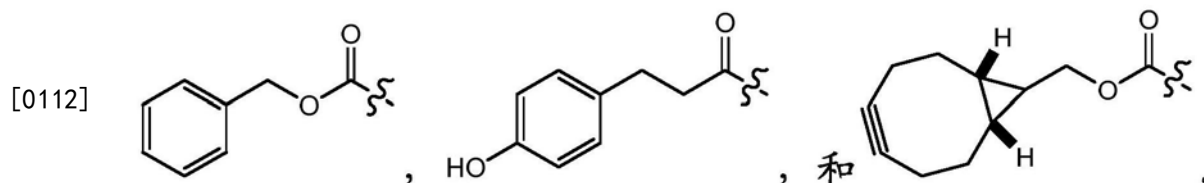
在某些实施方式中,  $R^2$  是



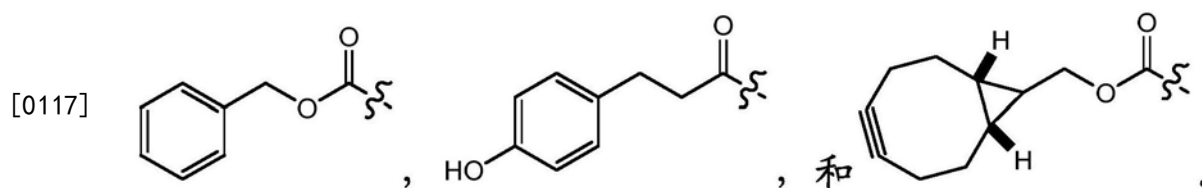
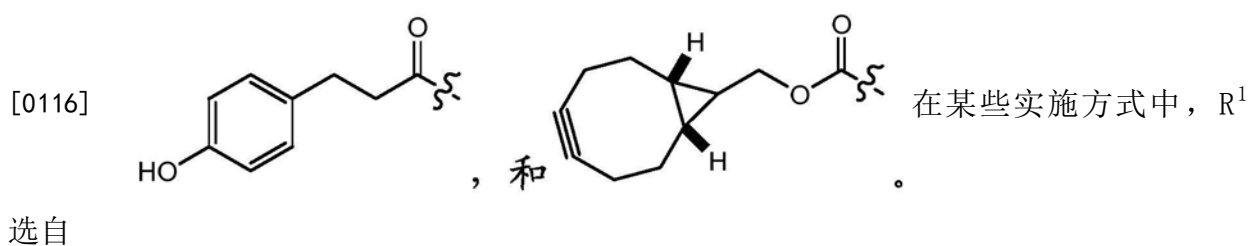
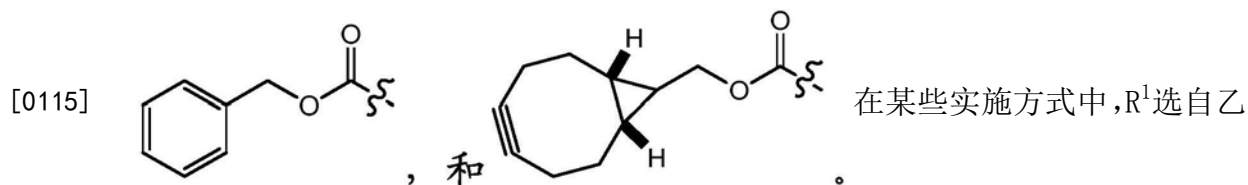
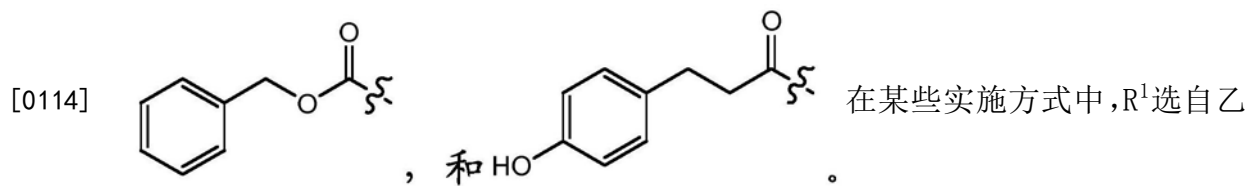
[0109] 在式II化合物中, 如下所示的  $R^2$  基团已经包括在上式I中引入B 的某些实施方式。

[0110] 在某些实施方式中,  $n$  是 0。在某些实施方式中,  $n$  是 1。在某些实施方式中,  $n$  是 2。在某些实施方式中,  $n$  是 3。在某些实施方式中,  $n$  是 4。在某些实施方式中,  $n$  是 5。在某些实施方式中,  $n$  是 6。

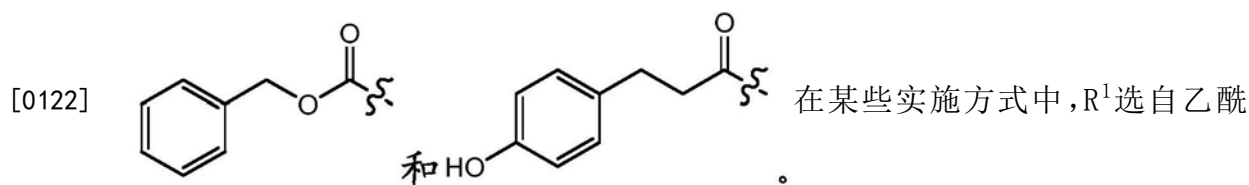
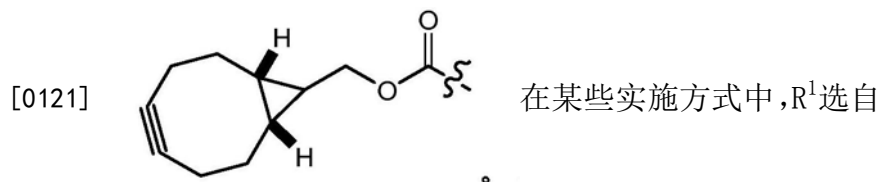
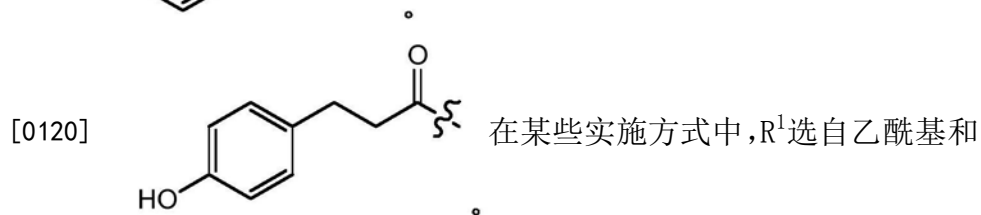
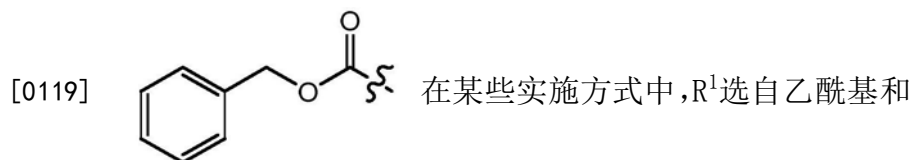
[0111] 在某些实施方式中,  $R^1$  选自乙酰基,



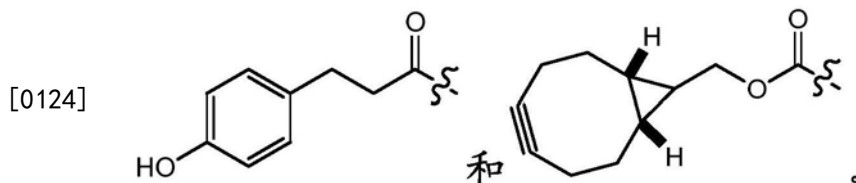
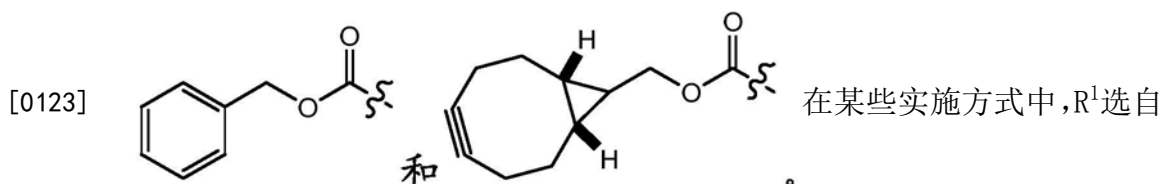
[0113] 在某些实施方式中,  $R^1$  选自乙酰基,



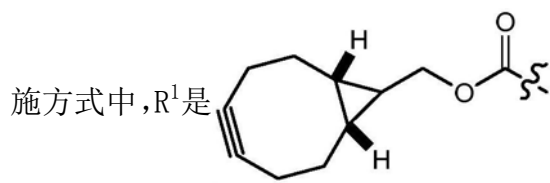
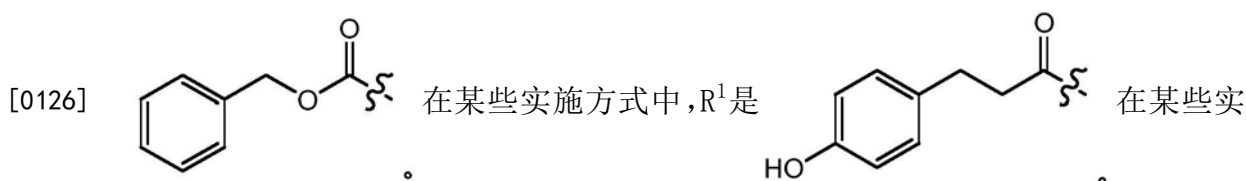
[0118] 在某些实施方式中,  $R^1$  选自乙酰基和



基,



[0125] 在某些实施方式中, R<sup>1</sup>是乙酰基。在某些实施方式中, R<sup>1</sup>是



[0127] 此外,多官能基团A-W-B-R<sup>2</sup>或NH-W-R<sup>2</sup>可以存在或不存在(即分别在z是1或0时)。在具有NH-W-R<sup>2</sup>的实施方式中,W选自C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>线性或支化的烷基或具有约40至约80,000amu分子量的线性或支化的聚乙二醇。在某些实施方式中,W选自C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>线性烷基。在某些实施方式中,W选自C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>支化的烷基。在某些实施方式中,W选自具有约40至约10,000amu分子量的线性聚乙二醇。在某些实施方式中,W选自具有约40至约3,000amu分子量的线性聚乙二醇。在某些实施方式中,W选自具有约40至约80amu分子量的线性聚乙二醇。在某些实施方式中,W选自具有约2,000至约80,000amu分子量的线性或支化的聚乙二醇。在某些实施方式中,聚乙二醇被杂原子(比如氧,氮或硫)官能化,所述杂原子能够和试剂反应与又一杂原子、碳、酰基(carbonyl),磺酰基,亚硫酸等形成键。

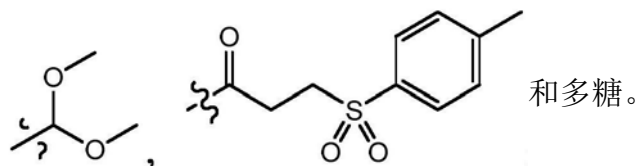
[0128] 在具有A-W-B-R<sup>2</sup>的实施方式中,W选自C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>线性或支化的烷基或具有约40至约80,000amu分子量的线性或支化的聚乙二醇。在某些实施方式中,W选自C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>线性烷基。在某些实施方式中,W选自C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>支化的烷基。在某些实施方式中,W选自具有约40至约10,000amu分子量的线性聚乙二醇。在某些实施方式中,W选自具有约40至约3,000amu分子量的线性聚乙二醇。在某些实施方式中,W选自具有约40至约80amu分子量的线性聚乙二醇。在某些实施方式中,W选自具有约2,000至约80,000amu分子量的线性或支化的聚乙二醇。

[0129] 在某些实施方式中,A是不存在。在某些实施方式中,A是-O-。在某些实施方式中,A是-NH-。在某些实施方式中,A是-S-。

[0130] 在某些实施方式中,B是不存在。在某些实施方式中,B是-O-。在某些实施方式中,B是-C(O)-。在某些实施方式中,B是-NH-。在某些实施方式中,B是-C(O)NH-。在某些实施方式中,B是-NHC(O)-。在某些实施方式中,B是-NHC(O)O-。在某些实施方式中,B是-OC(O)NH-。在

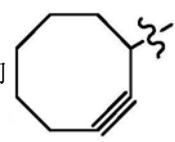
某些实施方式中,B是-OC(O)-。在某些实施方式中,B是-C=N(OH)-。在某些实施方式中,B是-S(O<sub>2</sub>)-。在某些实施方式中,B是-NHS(O<sub>2</sub>)-。在某些实施方式中,B是-S(O<sub>2</sub>)NH-。在某些实施方式中,B是-S(O)-。在某些实施方式中,B是-NHS(O)-。在某些实施方式中,B是-S(O)NH-。在某些实施方式中,B是-C(O)O-。在某些实施方式中,B是-OC(O)-。在某些实施方式中,B是-S-。在某些实施方式中,B是=NH-O-。在某些实施方式中,B是=NH-NH-。在某些实施方式中,B是=NH-N(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基)-。

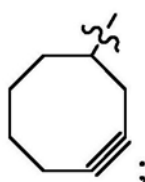
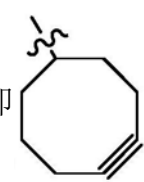
[0131] 在某些实施方式中,R<sup>2</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>线性或支化的烷基-N<sub>3</sub>,环辛炔基,荧光团,



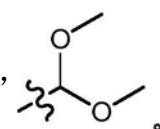
[0132] 在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是支化的或线性C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基-N<sub>3</sub>。在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是支化的C<sub>3</sub>烷基-N<sub>3</sub>。在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是线性C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基-N<sub>3</sub>。在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是C<sub>1</sub>烷基-N<sub>3</sub>。在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是C<sub>2</sub>烷基-N<sub>3</sub>。在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是支化的C<sub>3</sub>烷基-N<sub>3</sub>。

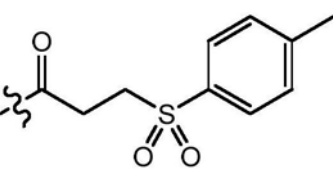
[0133] 在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是环辛炔基。相对炔官能基团的连接点可以在任意位置,只

要炔能够随后进行反应或官能化。例如,R<sup>2</sup>能够在第3位连接至W或B,也即  在

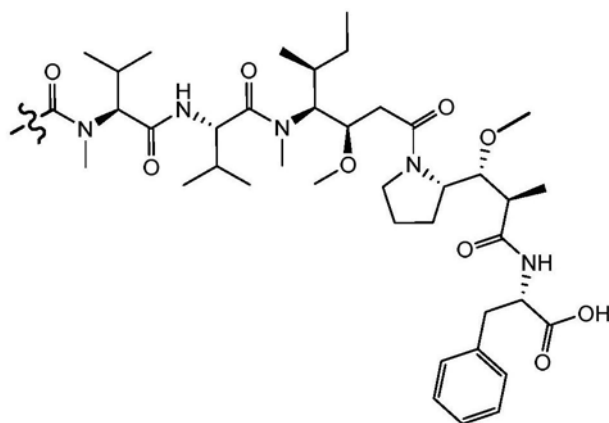
第4位连接至W或B,也即  ; 或在第5位连接至W或B,也即  。

[0134] 在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是荧光团。适宜的荧光团包括能够在光激发下重新发光的那些。一般地,荧光团含有数个共轭的pi-键,比如存在于芳族基团中。实例包括荧光素,罗丹明,Cy染料比如Cy5和Cy7,Alexa染料比如Alexa 750,Alexa 647和Alexa 488,香豆素,等。

[0135] 在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是,  。

[0136] 在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是  。

[0137] 在某些实施方式中,R<sup>2</sup>是



[0138]

[0139] 其相应于通过羰基连接至NH-W-R<sup>2</sup>中的W的细胞毒素的MMAF。

[0140] 在多官能基团A-W-B-R<sup>2</sup>或NH-W-R<sup>2</sup>是不存在的情况下,则相邻的氨基酸残基无论是谷氨酰胺或甘氨酸以残基羧酸终止(修饰化合物肽骨架的C-末端)。

[0141] 多糖

[0142] 在某些实施方式中, R<sup>2</sup>是多糖。多糖可以是任何抗原性多糖,特别是来自病原有机体的多糖。这些多糖的缀合物可以用于使受试者对由病原有机体引起的感染免疫。示范性多糖描述如下。尤其是,多糖可以是细菌多糖,例如细菌囊状多糖。代表性的细菌多糖描述于表1。

[0143] 表I.

多糖	重复单元
流感嗜血杆菌 ( <i>Haemophilus influenzae</i> )类型b (“PRP”)	→3)-β-D-Ribf-(1→1)-D- 核糖醇 -(5→OPO <sub>3</sub> →
脑膜炎奈瑟菌 ( <i>Neisseria meningitidis</i> )  A群 C群 W135群 Y群	→6)-α-D-ManpNAc(3OAc)-(1→OPO <sub>3</sub> → →9)-α-D-Neu5Ac(7/8OAc)-(2→ →6)-α-D-Galp-(1→4)-α-D-Neu5Ac(9OAc)-2→ →6)-α-D-Glcp-(1→4)-α-D-Neu5Ac(9OAc)-2→
肠沙门氏菌( <i>Salmonella enterica</i> )	→-α-D-GalpNAcA(3OAc)-(1→
肺炎链球菌( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )  1型 2型  3型 4型	→3)-D-AAT-α-Galp-(1→4)-α-D-GalpA(2/3OAc)-(1→3)-α-D-GalpA-(1→ →4-β-D-Glcp-(1→3)-[α-D-GlcpA-(1→6)-α-D-Glcp-(1→2)]-α-L-Rhap- (1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-β-L-Rhap-(1→ →3)-β-D-GlcA-(1→4)-β-D-Glcp-(1→ →3β-D-ManpNAc-(1→3)-α-L-FucpNAc-(1→3)-α-D-GalpNAc-(1→4)-α-

[0145] 多糖可以以低聚糖形式使用。这些通过裂解纯化的多糖(例如水解)方便地形成,其通常随后进行希望尺寸片段的纯化。

[0146] 多糖可以纯化自天然来源。作为纯化的备择,多糖可以通过全合成或部分合成获得。

[0147] 脑膜炎奈瑟氏球菌囊状多糖

[0148] 多糖可以是细菌囊状多糖。示范性细菌囊状多糖包括来自脑膜炎奈瑟氏球菌的那些。基于有机体的囊状多糖,各种脑膜炎奈瑟氏球菌的血清群已得以鉴定,包括A,B,C,H,I,K,L,29E,W135,X,Y 和Z。多糖可以来自这些血清群中任意种。一般地,多糖来自下述脑膜炎

双球菌血清群之一:A,C,W135和Y。

[0149] 囊状多糖一般地以低聚糖形式使用。这些方便地形成如下:裂解纯化的囊状多糖(例如水解),其通常随后进行希望尺寸片段的纯化。一般进行多糖的裂解以提供小于30的低聚糖最终平均聚合度(DP)(对血清群 A 为例如10至20,例如约10;对血清群W135和Y为15至25,例如 15至20;对血清群C为12至22;等)。DP能够方便地通过离子交换色谱法或比色测试测量(Ravenscroft等人Vaccine 17,2802-2816(1999))。

[0150] 如果进行水解,则水解产物一般进行尺寸筛选以便除去短-长度的低聚糖(Costantino等人Vaccine 17,1251-1263(1999))。这能够以各种方式实现,比如超滤、随后离子-交换色谱法。聚合度小于或等于约6的低聚糖能够从血清群A除去,而小于约4的那些能够从血清群W135和 Y除去。

[0151] 糖类的化学水解一般地牵涉在本领域标准条件下用酸或碱处理。囊状多糖解聚为其组分单糖的条件是本领域已知的。一种解聚方法牵涉使用过氧化氢(参见W002/058737,通过援引将其并入本文)。

[0152] 将过氧化氢加至糖类(例如提供1%的最终H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度),然后温育混合物(例如在约55°C)直至希望的链长减小已实现。在随时间的减小之后能够从混合物除去样品,然后测量样品中糖类的(平均)分子尺寸。然后,一旦达到希望链长,则能够通过快速冷却停止解聚。

[0153] 血清群C,W135和Y

[0154] 从脑膜炎双球菌制备囊状多糖的技术已知多年,和一般地牵涉包括下述步骤的方法:多糖沉淀(例如用阳离子洗涤剂),乙醇分级,冷苯酚萃取(除去蛋白质)和超离心(除去LPS)(例如,参见Frash,Advances in Biotechnological Processes 13,123-145(1990)(编者Mizrahi&Van Wezel)。

[0155] 一种所述方法牵涉多糖沉淀,随后用低级醇将沉淀多糖溶剂化(参见W003/007985,通过援引将其并入本文)。

[0156] 沉淀能够用阳离子洗涤剂比如四丁基铵和鲸蜡基三甲基铵盐(例如溴化物盐),或海美溴铵和肉豆蔻基三甲基铵盐来实现。鲸蜡基三甲基铵溴化物('CTAB')是特别优选的(Inzana,Infect.Immun.55,1573-1579 (1987)。沉淀物质的溶剂化能够用低级醇比如甲醇,丙-1-醇,丙-2-醇,丁烷-1-醇,丁烷-2-醇,2-甲基-丙-1-醇,2-甲基-丙-2-醇,二元醇等来实现,但是乙醇特别适于溶剂化CTAB-多糖复合物。乙醇可以加至沉淀多糖,提供50%至95%的最终乙醇浓度(基于乙醇和水的总含量)。

[0157] 在再溶剂化之后,多糖可以进一步处理以除去污染物。在至少少量污染都不可接受的情况(例如人疫苗生产)下,这是非常重要的。这一般地牵涉一个或多个过滤步骤例如深度过滤,可以使用活性炭过滤,尺寸过滤和/或超滤。一旦过滤除去污染物,多糖则可以沉淀以用于进一步的处理和/或加工。这能够通过交换阳离子(例如加入钙或钠盐)方便地实现。

[0158] 作为纯化的备择,本发明的囊状多糖可以通过全合成或部分合成获得,比如说Hib合成公开于Kandil et al.Glvcoconi J 14,13-17.(1997),和MenA synthesis in Berkin et al.Chemistry 8,4424-4433(2002)。

[0159] 多糖可以是化学上修饰的,也即其可以是O-乙酰化的或脱-O-乙酰化的。任何这种

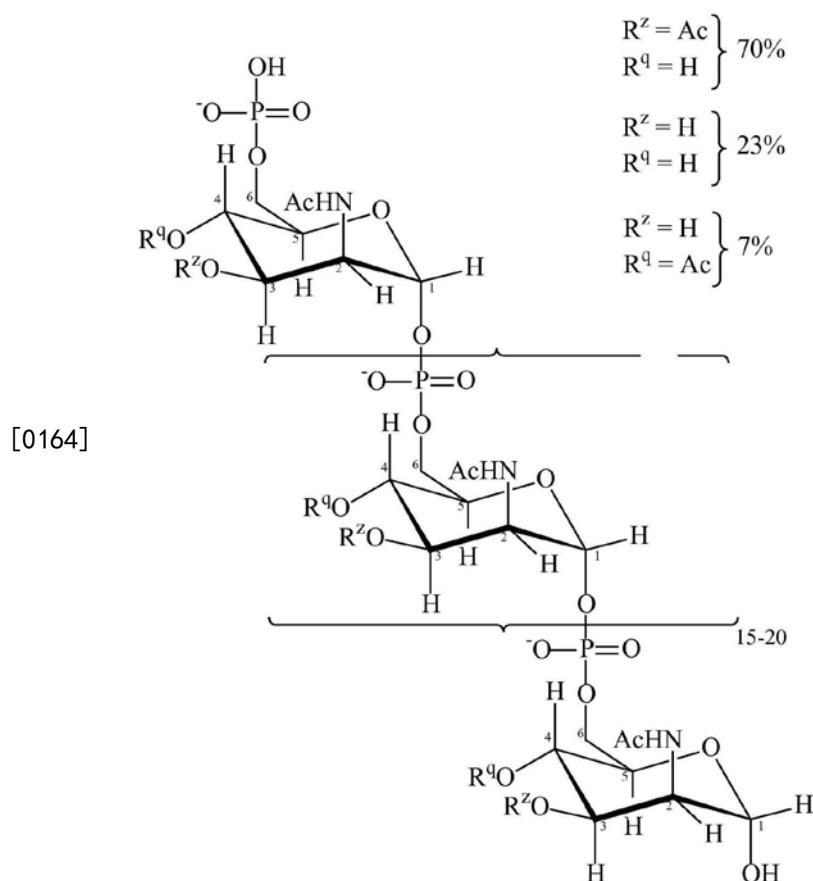
脱-O-乙酰化或超-乙酰化可以位于多糖中的特定位置。例如,绝大多数血清群C菌株在唾液酸残基的C-7和/或C-8位具有O-乙酰基,但是约15%的临床分离株缺少这些O-乙酰基(Glode等人J Infect Dis 139,52-56 (1979));也参见W094/05325和U.S. 专利号 5,425,946,将其通过援引并入本文)。乙酰化不显得影响保护性效力(例如与Menjugate™产品不同,NeisVac-C™产品使用脱-O-乙酰化的多糖,但疫苗均是有效的)。血清群W135多糖是唾液酸-半乳糖二糖单元的聚合物。血清群Y多糖类似血清群W135多糖,除了二糖重复单元包括葡萄糖而不是半乳糖。类似血清群C多糖,MenW135和MenY多糖具有可变的O-乙酰化,但是位于唾液酸7和9位(参见W02005/033148,通过援引将其并入本文)。任意所述化学修饰优选发生在缀合之前,但是可以另选或额外地发生在缀合期间。

[0160] 来自不同血清群的多糖能够分开地纯化,和可以然后在缀合之前或在缀合之后合并。

[0161] 血清群A

[0162] 多糖可以来自血清群A。多糖能够以与血清群C、W135和Y(参见上文)相同的方式纯化,尽管其是结构上不同的;而血清群C、W135 和Y的胶囊是基于唾液酸(N-乙酰基-神经氨酸,NeuAc),血清群A的胶囊是基于N-乙酰基-甘露糖胺,其是唾液酸的天然前体。血清群A多糖特别易于水解,和其在含水介质中的不稳定性意味着(a)液体疫苗对血清群A的免疫原性随时间下降,和(b)由于糖水解产物释放入疫苗中,品质控制更为困难。

[0163] 天然MenA囊状多糖是(a1→6)-连接的N-乙酰基-D-甘露糖胺-1-磷酸盐的均聚物,在C3和C4部分O-乙酰化。主要糖苷键是1-6磷酸二酯键,其牵涉D-甘露糖胺C1的半缩醛基团和C6的醇基团。平均链长是 93个单体。其具有下式:





[0165] 已制备修饰的多糖,其保留天然血清群A多糖的免疫原性活性,但其在水中显著更稳定。在单糖单元碳3和4连接的羟基被阻断(blocking)基团替换(参见W003/080678&W02008/084411)。

[0166] 具有代替羟基的阻断基团的单糖单元数能够变化。例如,全部或基本上全部单糖单元可以具有阻断基团。另选地,至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%或90%的单糖单元可以具有阻断基团。至少1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29或30个单糖单元可以具有阻断基团。

[0167] 类似地,单糖单元上的阻断基团数可以变化。例如,任意特别单糖单元上的阻断基团数可以是1或2。

[0168] 末端单糖单元可以或可以不具有代替其天然羟基的阻断基团。优选的是保留末端单糖单元上的自由的异头羟基,以提供进一步反应的位置(例如缀合)。异头羟基能够通过还原胺化(用例如 $\text{NaBH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{Cl}$ )转化为氨基( $-\text{NH}_2$ 或 $-\text{NH}-\text{E}$ ,其中E是氮保护基团),和能够然后在其它羟基已转化为阻断基团之后再产生。

[0169] 替换羟基的阻断基团可以经由羟基的衍生反应直接进行,即用又一基团替换羟基氢原子。充当阻断基团的羟基的适宜衍生物是例如氨基甲酸酯,磺酸酯,碳酸酯,酯,醚(例如甲硅烷基醚或烷基醚)和缩醛。所述阻断基团的一些特定实例是烯丙基,Aloe,苺基,BOM,叔丁基,三苯甲基,TBS,TBDPS,TES,TMS,TIPS,PMB,MEM,MOM,MTM,THP等。不可直接进行且完全替换羟基的其它阻断基团包括 $\text{C}_{1-12}$ 烷基, $\text{C}_{3-12}$ 烷基, $\text{C}_{5-12}$ 芳基, $\text{C}_{5-12}$ 芳基- $\text{C}_{1-6}$ 烷基, $\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$ ( $\text{R}^{21}$ 和 $\text{R}^{22}$ 定义于下文段落),H,F,Cl,Br, $\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CO}_2$ ( $\text{C}_{1-6}$ 烷基),CN, $\text{CF}_3$ , $\text{CCl}_3$ 等。

[0170] 典型的阻断基团具有式: $-\text{O}-\text{X}'-\text{Y}'$ 和 $-\text{OR}^{23}$ ,其中: $\text{X}'$ 是C(O),S(O)或 $\text{SO}_2$ ;Y是 $\text{C}_{1-12}$ 烷基, $\text{C}_{1-12}$ 烷氧基, $\text{C}_{3-12}$ 环烷基, $\text{C}_{5-12}$ 芳基或 $\text{C}_{5-12}$ 芳基- $\text{C}_{1-6}$ 烷基,其各自可以任选地用1、2或3个基团取代,所述基团独立地选自F,Cl,Br, $\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CO}_2$ ( $\text{C}_{1-6}$ 烷基),CN, $\text{CF}_3$ 或 $\text{CCl}_3$ ;或Y'是 $\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$ ;  $\text{R}^{21}$ 和 $\text{R}^{22}$ 独立地选自H, $\text{C}_{1-12}$ 烷基, $\text{C}_{3-12}$ 环烷基, $\text{C}_{5-12}$ 芳基, $\text{C}_{5-12}$ 芳基- $\text{C}_{1-6}$ 烷基;或 $\text{R}^{21}$ 和 $\text{R}^{22}$ 可以一起联接形成 $\text{C}_{3-12}$ 饱和杂环基团; $\text{R}^{23}$ 是 $\text{C}_{1-12}$ 烷基或 $\text{C}_{3-12}$ 环烷基,其各自可以任选地用1、2或3个基团取代,所述基团独立地选自F,Cl,Br, $\text{CO}_2$ ( $\text{C}_{1-6}$ 烷基),CN, $\text{CF}_3$ 或 $\text{CCl}_3$ ;或 $\text{R}^{23}$ 是 $\text{C}_{5-12}$ 芳基或 $\text{C}_{5-12}$ 芳基- $\text{C}_{1-6}$ 烷基,其各自可以任选地用1、2、3、4或5个基团取代,所述基团选自F,Cl,Br, $\text{CO}_2\text{H}$ , $\text{CO}_2$ ( $\text{C}_{1-6}$ 烷基),CN, $\text{CF}_3$ 或 $\text{CCl}_3$ 。在 $\text{R}^{23}$ 是 $\text{C}_{1-12}$ 烷基或 $\text{C}_{3-12}$ 环烷基的情况下,去一般地用1、2或3个如前文所定义的基团取代。在 $\text{R}^{21}$ 和 $\text{R}^{22}$ 是一起联接形成 $\text{C}_{3-12}$ 饱和杂环基团的情况下,其意指 $\text{R}^{21}$ 和 $\text{R}^{22}$ 与氮原子一起形成含有3至12的任意碳原子数(例如 $\text{C}_3$ , $\text{C}_4$ , $\text{C}_5$ , $\text{C}_6$ , $\text{C}_7$ , $\text{C}_8$ , $\text{C}_9$ , $\text{C}_{10}$ , $\text{C}_{11}$ , $\text{C}_{12}$ )的饱和杂环基团。杂环基团可以含有1或2个不同于其氮原子的杂原子(比如N,O或S)。 $\text{C}_{3-12}$ 饱和杂环基团的实例是吡咯烷基,哌啶基,吗啉基,哌嗪基,咪唑烷基,氮杂环丁烷基和氮丙啶基。

[0171] 阻断基团 $-\text{O}-\text{X}-\text{Y}$ 和 $-\text{OR}^{23}$ 能够通过标准衍生程序制备自 $-\text{OH}$ 基团,比如将羟基与酰卤、烷基卤,磺酰卤等反应。于是, $-\text{O}-\text{X}'-\text{Y}'$ 中的氧原子通常是羟基氧原子,而 $-\text{O}-\text{X}'-\text{Y}'$ 中的 $-\text{X}'-\text{Y}'$ 基团通常替换羟基的氢原子。

[0172] 另选地,阻断基团可以经由取代反应比如Mitsunobu-类型取代获得。从羟基制备阻断基团的这些和其它方法是熟知的。

[0173] 用于本发明的特定阻断基团是 $-\text{OC}(\text{O})\text{CF}_3$ (Nilsson&Svensson Carbohydrate Research 69,292-296(1979))和氨基甲酸酯基团 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$ ,其中 $\text{R}^{21}$ 和 $\text{R}^{22}$ 独立地选自

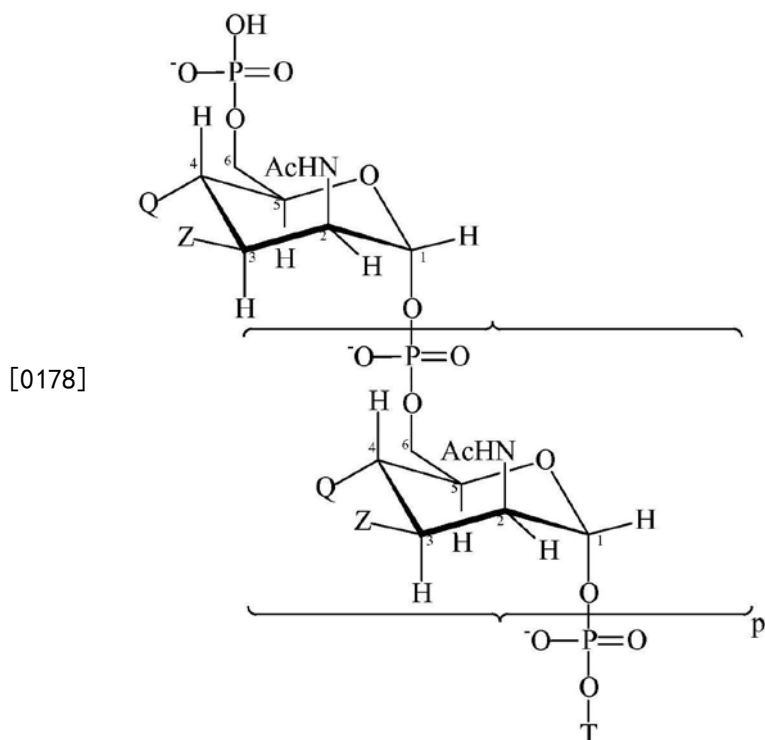
C<sub>1-6</sub>烷基。一般地, R<sup>21</sup>和 R<sup>22</sup>均是甲基, 也即阻断基团是-OC(O)NMe<sub>2</sub>。氨基甲酸酯阻断基团具有对糖苷键的稳定化效果和可以在温和条件下制备。

[0174] 特别优选的阻断基团是-OC(O)CH<sub>3</sub>(参见W02008/084411)。在具有该阻断基团的修饰Neisseria meningitidis血清群A多糖中的4-和/或 3-位比例可以变化。例如, 具有阻断基团的4-位的比例可以是约0%, 至少10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%或约100%, 优选至少80%和约100%。类似地, 具有阻断基团的3-位的比例可以是约0%, 至少10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%或约100%, 优选至少80%和约100%。一般地, 具有阻断基团的4-和3-位的比例在各位置大约相同。换言之, 具有阻断基团的4-位与具有阻断基团的3-位的比例是约1:1。然而, 在某些实施方式中, 具有阻断基团的4-位的比例可以相对具有阻断基团的3-位的比例变化。例如, 具有阻断基团的4-位与具有阻断基团的3-位的比率可以是1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3或1:2。类似地, 具有阻断基团的3-位与具有阻断基团的4-位的比率可以是1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3或1:2。

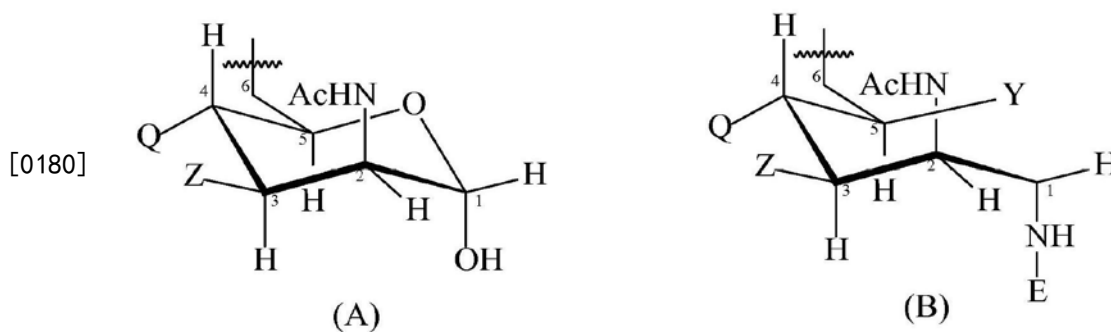
[0175] 典型的修饰MenA多糖含有n个单糖单元, 其中至少h%的单糖单元在3位和4位均不具有-OH基团。h值是24或更多(例如25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99或100)和通常是50或更多。不存在的-OH基团是如前文所定义的阻断基团。

[0176] 其它典型的修饰MenA多糖包含单糖单元, 其中至少单糖单元中个在3位不具有-OH且在4位不具有-OH。s值是至少1(例如2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90)。不存在的-OH基团是如前文所定义的阻断基团。

[0177] 适宜的修饰MenA多糖具有下式:



[0179] 其中p是1至100的整数(特别5至25,通常15-25的整数);T具有式(A)或(B):



[0181] 各Z基团独立地选自OH或如前文所定义的阻断基团;和

[0182] 各Q基团独立地选自OH或如前文所定义的阻断基团;

[0183] Y选自OH或如前文所定义的阻断基团;

[0184] E是H或氮保护基团;和其中超过约7%(例如8%,9%,10%或更多)的Q基团是阻断基团。在某些实施方式中,连接于式(A)碳1的羟基用如前文所定义的阻断基团替换。在某些实施方式中,式(B)中的E是下文讨论的连接体或载体分子。在E是连接体的情况下,连接体可以共价地键合至载体分子。

[0185] p+2个Z基团各自可以是相同或相互不同的。类似地,n+2个Q基团各自可以是相同或相互不同的。全部Z基团可以是OH。另选地,至少10%,20%,30%,40%,50%或60%的Z基团可以是OAc。一般地,约70%的Z基团是OAc,其中Z基团的残余部分是OH或如前文所定义的阻断基团。至少约7%的Q基团是阻断基团。一般地,至少10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%或甚至100%的Q基团是阻断基团。

[0186] 葡聚糖

[0187] 多糖可以是葡聚糖。葡聚糖是含葡萄糖的多糖,尤其存在于真菌的细胞壁。葡聚糖包括葡萄糖亚单位之间的一个或多个 $\alpha$ -连接,而 $\beta$ -葡聚糖包括葡萄糖亚单位之间的一个或多个 $\beta$ -连接。按照本发明所用的葡聚糖包括 $\beta$ 连接,和可以含有仅 $\beta$ 连接(也即无 $\alpha$ 连接)。

[0188] 葡聚糖可以包含一个或多个 $\beta$ -1,3-连接和/或一个或多个 $\beta$ -1,6-连接。其还可以包含一个或多个 $\beta$ -1,2-连接和/或 $\beta$ -1,4-连接,但通常其仅有的 $\beta$ 连接是 $\beta$ -1,3-连接和/或 $\beta$ -1,6-连接。葡聚糖可以是支化或线性的。完整长度的天然 $\beta$ -葡聚糖是不溶的和具有兆道尔顿范围的重均分子量。从而,更佳的是在缀合物中使用可溶的葡聚糖。溶剂化可以通过裂解长不溶葡聚糖来实现。这可以用葡聚糖酶(例如 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶或 $\beta$ -1,6-葡聚糖酶)通过水解或更方便地通过消化来实现。作为备择,短葡聚糖能够通过联接单糖构造单元来合成制备。

[0189] 低分子量葡聚糖是优选的,特别重均分子量小于100kDa(例如小于80,70,60,50,40,30,25,20或15kDa)的那些。也可能的是使用例如含有60或更少个(例如59,58,57,56,55,54,53,52,51,50,49,48,47,46,45,44,43,42,41,40,39,38,37,36,35,34,33,32,31,30,29,28,27,26,25,24,23,22,21,20,19,18,17,16,15,14,13,12,11,10,9,8,7,6,5,4)葡萄糖单糖单元的低聚糖。在该范围内,低聚糖具有10至50或20至40个单糖单元。葡聚糖可以是真菌葡聚糖。真菌葡聚糖一般地得自真菌,但是其中特别的葡聚糖结构存在于真菌和非真菌当中(例如细菌、低等植物或藻类中),于是非真菌有机体可以用作备择的来源。从

而,葡聚糖可以衍生自念珠菌属(*Candida*)比如白色念珠菌,或粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*),疣状毛癣菌(*Trichophyton verrucosum*),皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatidis*),新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*),荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*),酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),*Paracoccidioides brasiliensis*或*Pythium insidiosum*的细胞壁。

[0190] 存在各种来源的真菌 $\beta$ -葡聚糖。例如,纯的 $\beta$ -葡聚糖是可商购的,例如石脐素(Calbiochem)是纯化自*Umbilicaria papullosa*的 $\beta$ -1,6-葡聚糖。 $\beta$ -葡聚糖能够以各种方式纯化自真菌细胞壁。Tokunaka等人. *Carbohydrate Research* 316,161-172。(1999),例如,公开从念珠菌属(*Candida*)制备不含细胞壁甘露聚糖的水可溶 $\beta$ -葡聚糖提取物的2步程序,其牵涉NaClO氧化和DMSO萃取。所得产品('念珠菌属(*Candida*)可溶的 $\beta$ -D-葡聚糖'或'CSBG')主要由具有线性 $\beta$ -1,6-葡聚糖部分的线性 $\beta$ -1,3-葡聚糖构成。类似地,W003/097091公开从*Calbicans*制备 GG-zym。所述来自白色念珠菌的葡聚糖包括(a)  $\beta$ -1,6-葡聚糖,其具有 $\beta$ -1,3-葡聚糖侧链和约30的平均聚合度,和(b)  $\beta$ -1,3-葡聚糖,其具有 $\beta$ -1,6-葡聚糖侧链和约4的平均聚合度。

[0191] 在某些实施方式中,葡聚糖是具有一些 $\beta$ -1,6支化的 $\beta$ -1,3葡聚糖,如例如昆布糖中所见。昆布糖存在于褐藻和海藻中。昆布糖的 $\beta$ (1-3): $\beta$ (1-6)比率随不同来源变化,例如其中*Eisenia bicyclis*昆布多糖中低至 3:2,但是在掌状昆布昆布多糖中高至7:1(Pang等人*Biosci Biotechnol Biochem* 69,553-8(2005))。从而,葡聚糖可以具有1.5:1至7.5:1例如约 2:1,3:1,4:1,5:1,6:1或7:1的 $\beta$ (1-3): $\beta$ (1-6)比率。任选地,葡聚糖可以具有末端甘露醇亚单位,例如1,1-O-连接的甘露醇残基(Read et al. *Carbohydr Res.*281,187-201(1996)。葡聚糖还可以包含甘露糖亚单位。

[0192] 在其它实施方式中,葡聚糖排它地或主要地具有 $\beta$ -1,3连接,如热凝多糖所见。这些葡聚糖可以引起比包含其它连接的葡聚糖、特别是包含 $\beta$ -1,3连接和更高比例 $\beta$ -1,6连接的葡聚糖更佳的保护。从而,葡聚糖可以仅由 $\beta$ -1,3-连接的葡萄糖残基(例如排它地具有1,3连接的线性 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖)构成。但是,葡聚糖任选地可以包括并非 $\beta$ -1,3-连接的葡萄糖残基的单糖残基,例如其可以包括 $\beta$ -1,6-连接的葡萄糖残基。 $\beta$ -1,3-连接的葡萄糖残基与这些其它残基的比率应是至少8:1(例如>9:1,>10:1,>11:1,>12:1,>13:1,>14:1,>15:1,>16:1,>17:1,>18:1,>19:1,>20:1,>25:1,>30:1,>35:1,>40:1,>45:1,>50:1,>75:1,>100:1等)和/或存在一个或多个(例如>1,>2,>3,>4,>5,>6,>7,>8,>9,>10,>11,>12等)序列的至少5个(例如>5,>6,>7,>8,>9,>10,>11,>12,>13,>14,>15,>16,>17,>18,>19,>20,>30,>40,>50,>60等)仅通过 $\beta$ -1,3连接而连接至其它残基的相邻非末端残基。"非末端"意指残基并非存在于葡聚糖的自由端。在某些实施方式中,相邻的非末端残基可以不包括偶联至载体分子或连接体的任意残基。仅通过 $\beta$ -1,3连接而连接至其它残基的5个相邻非末端残基可以提供保护性抗体应答,例如对抗白色念珠菌(*C. albicans*)。

[0193] 在进一步实施方式中,缀合物可以包括两种不同的葡聚糖例如具有 1.5:1至7.5:1的 $\beta$ (1-3): $\beta$ (1-6)比率的第一葡聚糖,和排它地或主要地具有 $\beta$ -1,3连接的第二葡聚糖。例如,缀合物可以包括昆布糖葡聚糖和热凝多糖葡聚糖。在 $\beta$ -葡聚糖包括希望比率和/或序列的 $\beta$ -1,3和 $\beta$ -1,6连接的情况下,那么该葡聚糖可以存在于自然界中(例如昆布糖)或其可以人工制备。例如,其可以通过化学合成完整或部分地制备。

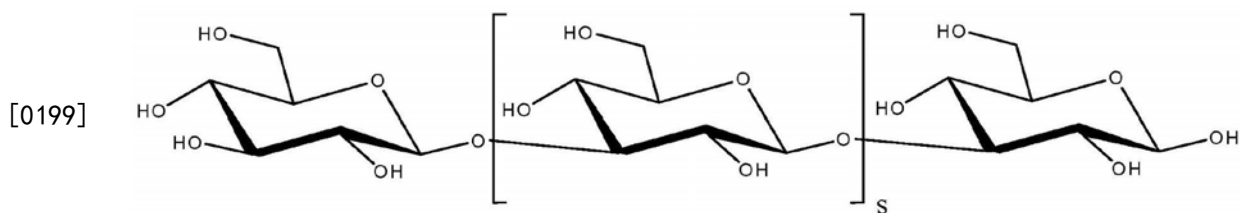
[0194] 化学合成 $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6葡聚糖的方法是已知的,例如来自Takeo and Tei Carbohyd. Res.145,293-306(1986),Tanaka et al.Tetrahedron Letters 44,3053-3057(2003),Ning et al.Tetrahedron Letters 43, 5545-5549(2002),Geurtsen et al.Journal of Organic Chemistry 64 (21):7828-7835(1999),Wu et al.Carbohyd. Res.338,2203-12(2003),Nicolaou et al.J.Am.Chem.Soc.119,449-450(1997),Yamada et al. Tetrahedron Letters 40,4581-4584(1999),Yamago et al.Org.Lett.24, 3867-3870(2001),Yuguo et al.Tetrahedron 60,6345-6351(2004),Amaya et al.Tetrahedron Letters 42:9191-9194(2001),Mei et al. Carbohyd. Res.340.2345-2351(2005)。

[0195] 以希望比率包括 $\beta$ -1,3和 $\beta$ -1,6连接的 $\beta$ -葡聚糖还可以制备如下:起始自可获得的葡聚糖并将其用 $\beta$ -1,6-葡聚糖酶(也称为葡聚糖内型-1,6- $\beta$ -葡糖苷酶,1,6- $\beta$ -D-葡聚糖葡聚糖水解酶,等;EC 3.2.1.75)或 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(比如外型-1,3-葡聚糖酶(EC 3.2.1.58)或内型-1,3-葡聚糖酶(EC 3.2.1.39)处理直至达到希望比率和/或序列。

[0196] 在希望含有仅 $\beta$ -1,3-连接葡萄糖的葡聚糖的情况下,那么 $\beta$ -1,6-葡聚糖酶处理可以进行至完成,而 $\beta$ -1,6-葡聚糖酶最终产生纯的 $\beta$ -1,3葡聚糖。然而,更方便地可以使用纯的 $\beta$ -1,3-葡聚糖。这些可以通过化学和/或酶促合成而合成制备,例如用(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖合成酶,其中数种已知自许多有机体(包括细菌,酵母,植物和真菌)。化学合成 $\beta$ -1,3葡聚糖的方法是已知的,例如来自Takeo et al.Carbohyd. Res.245,81-96(1993),Jamois et al.Glycobiology 15(4),393-407(2005),Lefebvre et al.Cem.Eur. J.7(20):4411-4421(2001)和Huang et al.Carbohyd. Res.340,603-608(2005)。作为合成的有用备择,可以使用天然 $\beta$ -1,3-葡聚糖比如热凝多糖(线性 $\beta$ -1,3-葡聚糖,来自农杆菌属(Agrobacterium),先前称为粪产碱菌变种myxogenes;可商购自例如Sigma-Aldrich目录C7821)或裸藻淀粉( $\beta$ -1,3-葡聚糖,来自Euglena)。产生高水平 $\beta$ -1,3-葡聚糖的有机体是本领域已知的,例如U.S.专利号5508191或MiKyoung et al.Biochemical Engineering Journal.16,163-8(2003)的农杆菌属(Agrobacterium),或者Barsanti et al.J.App.Phycology,13,59-65(2001)的眼虫藻(Euglena gracilis)。

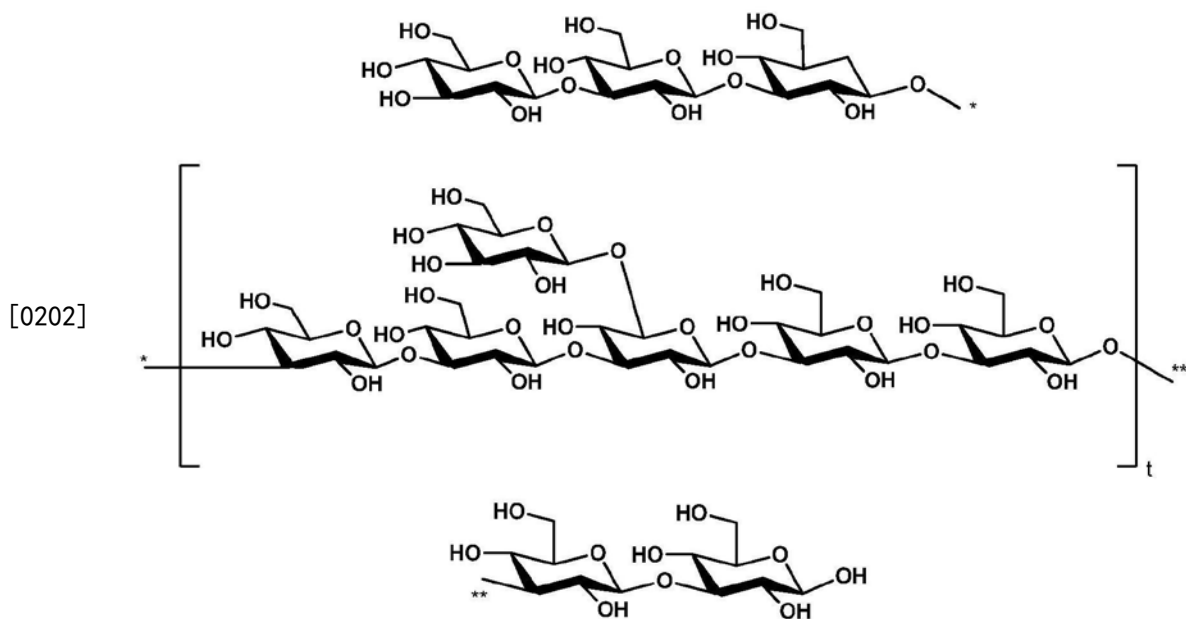
[0197] 昆布糖和热凝多糖一般地作为高分子量聚合物例如重均分子量至少100kDa存在于自然界。它们常常不溶于含水介质。因此,以其天然形式,它们并不良好地适于免疫。从而,在某些实施方式中,使用较短的葡聚糖例如含有60或更少个葡萄糖单糖单元(例如59,58,57,56,55,54,53,52,51,50,49,48,47,46,45,44,43,42,41,40,39,38,37,36,35,34,33,32,31,30,29,28,27,26,25,24,23,22,21,20,19,18,17,16,15,14,13,12,11,10,9,8,7,6,5,4)的那些。可以使用具有2-60葡萄糖残基数的葡聚糖,例如约10-50或约20-40个葡萄糖单元。具有25-30个葡萄糖残基的葡聚糖是特别有用的。适宜的葡聚糖可以例如通过酸水解天然葡聚糖,或通过例如用葡聚糖酶比如 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶酶促消化而形成。具有11-19个例如13-19个和特别15或17个葡萄糖单糖单元的葡聚糖也是有用的。尤其是,具有下述结构(A)或(B)的葡聚糖是特别预期使用的:

[0198] (A)



[0200] 其中 $s+2$ 为2-60例如10-50或2-40的范围。

[0201] 在某些实施方式中, $s+2$ 是25-30或11-19例如13-17的范围。尤其是, $s+2=15$ 是适宜的。此外, $s+2=6$ 是适宜的。



[0203] 其中 $t$ 是0-9,例如1-7或2-6的范围。优选, $t$ 是3-4或1-3的范围。尤其是, $t=2$ 是适宜的。\*和\*\*指出多糖单元各自的连接点。

[0204] 在某些实施方式中,葡聚糖含有5至7个葡萄糖单糖单元(也即5、6或7个)。尤其是,具有6个葡萄糖单糖单元的葡聚糖可以是优选的。例如,葡聚糖可以是具有6个葡萄糖单糖单元的热凝多糖。

[0205] 在某些实施方式中,葡聚糖是单一分子种类。在这些实施方式中,全部葡聚糖分子在序列方面是等同。

[0206] 相应地,全部葡聚糖分子在其结构特性包括分子量等方面是等同的。一般地,该形式的葡聚糖通过化学合成例如用上文描述的方法来获得。另选地,在其它实施方式中,葡聚糖可以得自天然葡聚糖例如来自 *L. digitata*,农杆菌属(*Agrobacterium*)或上述眼虫属(*Euglena*)的葡聚糖,其中将葡聚糖纯化直至获得需要单一分子种类。已以该方式纯化的天然葡聚糖是可商购的。具有单一分子种类的葡聚糖可以通过测量葡聚糖样品的多分散性( $M_w/M_n$ )来鉴定。该参数能够方便地通过SEC-MALLS来测量,例如描述于Bardotti et al. Vaccine 26,2284-96 (2008)。用于本发明该实施方式中的适宜葡聚糖具有约1例如1.01或更低的多分散性。

[0207] 天然葡聚糖比如热凝多糖的溶解度能够通过引入离子基团(例如硫酸化,特别在热凝多糖的0-6中)来增加。上述修饰可以用于本发明、但应理想地避免,原因在于它们可以改变葡聚糖的抗原性。

[0208] 在多糖是葡聚糖的情况下,其一般是昆布糖。

[0209] 肺炎链球菌囊状多糖

[0210] 如上文所讨论,多糖还可以是细菌囊状多糖。进一步示范性细菌囊状多糖包括来自肺炎链球菌的那些。在多糖是来自肺炎链球菌的囊状多糖的情况下,其一般地来自下述肺炎球菌血清型:1,2,3,4,5,6A, 6B,7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,14,15B,17F,18C,19A, 19F,20,22F,23F和33F。在某些实施方式中,其是1,5,6B,14, 19F和23F。来自肺炎链球菌的囊状多糖包含重复低聚糖单元,其可以含有多至8个糖残基。主要肺炎链球菌血清型的低聚糖单元描述于上表, Jones An.Acad.Bras.Cienc,77 (2) ,293-324 (2005) 和Jones,J Pharm Biomed Anal 38,840-850 (2005)。

[0211] 无乳链球菌囊状多糖

[0212] 进一步的示范性细菌囊状多糖包括来自无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) ("GBS") 的那些。囊状多糖共价地连接至GBS的肽聚糖骨架,并且不同于基团B抗原,其是连接至肽聚糖骨架的另一种多糖。

[0213] GBS囊状多糖是化学上有关的,但是抗原性上非常不同。全部GBS 囊状多糖共享下述三糖核心: $\beta$ -D-GlcpNAc (1 $\rightarrow$ 3)  $\beta$ -D-Galp (1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -D-Glcp

[0214] 各种GBS血清型的核心修饰方式不同。在血清型1a与III之间的差异例如产生自在该核心中用GlcNAc (1a) 或Gal (III) 来连接连续的三糖核。

[0215] 血清型1a和1b均具有连接至核心中GlcNAc的 [a-D-NeupNAc (2 $\rightarrow$ 3)  $\beta$ -D-Galp- (1 $\rightarrow$ )]二糖,但是该连接是1 $\rightarrow$ 4 (1a) 或1 $\rightarrow$ 3 (1b)。

[0216] GBS-相关性疾病主要来自血清型Ia,Ib,II,III,IV,V,VI, VII和VIII,其中超过85%由5种血清型:Ia,Ib,III&V引起。来自这4种血清型之一的多糖可以使用。这些4种血清型的囊状多糖各自包括:(a) 末端N-乙酰基-神经氨酸 (NeuNAc) 残基(一般称为唾液酸),其在全部情况下将2 $\rightarrow$ 3连接至半乳糖残基;和(b) 三糖核心中的N-乙酰基- 氨基葡萄糖残基 (GlcNAc)。

[0217] 全部4种多糖都包括在三糖核心中的半乳糖残基,但是血清型Ia, Ib,II&III在各重复单元中也包含额外的半乳糖残基。

[0218] 所用多糖可以为其自然形式或可以被修饰。例如,多糖可以比天然囊状多糖更短,或可以是化学上修饰的。尤其是,本发明中所用的血清型V囊状多糖可以如W02006/050341和Guttormsen et al.Proc Natl Acad Sci U S A.105 (15) ,5903-8 (2008) Epub 2008Mar 31的描述修饰。例如,已基本上脱水杨酸的 (desialylated) 血清型V囊状多糖。脱水杨酸的GBS血清型V囊状多糖可以制备如下:在温和酸性条件(例如0.1M 硫酸,在80℃下60分钟)下处理纯化的GBS血清型V囊状多糖或者用神经氨酸苷酶处理。从而,根据本发明所用的多糖可以是基本上完整长度的如自然界中存在的囊状多糖,或其可以比天然长度更短。完整长度的多糖可以进行解聚以提供用于本发明的较短片段,例如通过在温和酸中水解,通过加热,通过尺寸色谱法等。尤其是,本发明中所用的血清型II和/或III囊状多糖可以如W096/40795和Michon et al.Clin Vaccine Immunol. (2006) 13 (8) ,936-43的描述解聚。

[0219] 多糖可以相对自然界中存在的囊状多糖是化学修饰的。例如,多糖可以是脱-O-乙酰化的(部分或完全),脱-N-乙酰化的(部分或完全),N- 丙酸化的(部分或完全)等。脱-乙酰化可以在缀合之前、在缀合期间或在缀合之后发生,但是优选在缀合之前发生。取决于特

别的多糖,脱-乙酰化可以或可以不影响免疫原性。GBS多糖式的O-乙酰化在各种血清型中的相关性在Lewis et al.PNAS USA 101,11123-8(2004)中有讨论,并且在某些实施方式中7、8和/或9位的唾液酸残基的O-乙酰化在缀合之前、在缀合期间和在缀合之后例如通过保护/脱-保护、通过再乙酰化等保留。然而,本发明所用的GBS多糖一般地基本上不具有7、8和/或9位的唾液酸残基的O-乙酰化。尤其是,在GBS多糖已如下文描述通过碱萃取纯化的情况下,则O-乙酰化一般是失去的。脱-乙酰化效果等能够通过常规测试来评价。

[0220] 囊状多糖能够通过已知技术纯化,描述于Wessels等人Infect Immun 57,1089-94(1989)。典型过程牵涉碱萃取,离心,过滤, RNase/DNase处理,蛋白酶处理,浓度,尺寸排阻色谱法,超滤,阴离子交换色谱法,和进一步的超滤。用酶变溶菌素处理GBS细胞也是有用的,其裂解细菌的细胞壁为游离的细胞壁组分。

[0221] 作为备择,能够使用描述于W02006/082527的纯化过程。这牵涉碱萃取,乙醇/CaCl<sub>2</sub>处理,CTAB沉淀,和再溶剂化。进一步的备择过程描述于W02009/081276。

[0222] 金黄色葡萄球菌(S.aureus)囊状多糖

[0223] 进一步的示范性细菌囊状多糖包括来自金黄色葡萄球菌(S.aureus)的那些,特别是金黄色葡萄球菌(S.aureus)类型5和类型8的囊状多糖。类型5和类型8囊状多糖的结构描述于Moreau等人Carbohydrate Res. 339(5),285-91(1990)和Fournier等人。Infect.Immun.45(1),87-93(1984) as:

[0224] 类型5

[0225]  $\rightarrow 4) -\beta\text{-D-ManNAcA}(30\text{Ac}) - (1 \rightarrow 4) -\alpha\text{-L-FucNAc}(1 \rightarrow 3) -\beta\text{-D-FucNAc} - (1$

[0226] 类型8

[0227]  $\rightarrow 3) -\beta\text{-D-ManNAcA}(40\text{Ac}) - (1 \rightarrow 3) -\alpha\text{-L-FucNAc}(1 \rightarrow 3) -\beta\text{-D-FucNAc} - (1$

[0228] 最近的NMR光谱数据(Jones Carbohydrate Res.340(6),1097-106(2005))已经导致这些结构更正为:

[0229] 类型5

[0230]  $\rightarrow 4) -\beta\text{-D-ManNAcA} - (1 \rightarrow 4) -\alpha\text{-L-FucNAc}(30\text{Ac}) - (1 \rightarrow 3) -\beta\text{-D-FucNAc} - (1$

[0231] 类型8

[0232]  $\rightarrow 3) -\beta\text{-D-ManNAcA}(40\text{Ac}) - (1 \rightarrow 3) -\alpha\text{-L-FucNAc}(1 \rightarrow 3) -\alpha\text{-D-FucNAc} - (1 \rightarrow$

[0233] 多糖可以相对自然界存在的囊状多糖是化学修饰的。

[0234] 例如,多糖可以是脱-O-乙酰化的(部分或完全),脱-N-乙酰化的(部分或完全),N-丙酸化的(部分或完全)等。脱-乙酰化可以在缀合之前、在缀合期间或在缀合之后发生,但是一般地发生在缀合之前。脱-乙酰化效果等能够通过常规测试来评价。例如,金黄色葡萄球菌(S.aureus)类型5或类型8囊状多糖上的O-乙酰化在Fattom等人Infect Immun.66(10):4588-92(1998)中有讨论。该文献中称天然多糖具有75%的O-乙酰化。这些多糖将抗体诱导至多糖骨架和O-乙酰基。具有0%O-乙酰化的多糖仍然将抗体引至多糖骨架。两种类型的抗体是O-乙酰基含量不同的金黄色葡萄球菌菌株的调理素。相应地,本发明中所用的类型5或类型8囊状多糖可以具有0至100%的O-乙酰化。

[0235] 多糖的O-乙酰化度能够通过本领域已知的任意方法确定,例如通过质子NMR(例如描述于Lemercinier and Jones Carbohydrate Res.296,83-96(1996),Jones and Lemercinier,J Pharm BiomedAnal.30(4),1233-47(2002),W005/033148或W000/56357。



进一步的方法描述于 Hestrin J.Biol.Chem.180,249-261 (1949)。相似方法可以用来确定多糖的N-乙酰化度。O-乙酰基可以通过水解,例如通过用碱比如无水肼 (Konadu et al.Infect.Immun.62,5048-5054 (1994))或NaOH (Fattom et al.Infect Immun.66 (10): 4588-92 (1998))处理来除去。相似方法可以用来除去N-乙酰基。为了在类型5和/或8囊状多糖上保持高水平O-乙酰化,而将导致O-乙酰基水解的处理最小化,例如在极端pH下处理。

[0236] 囊状多糖能够通过已知技术纯化,如本文参考文献的描述。典型过程牵涉苯酚-乙醇灭活金黄色葡萄球菌细胞,离心,溶葡萄球菌酶处理, RNase/DNase处理,离心,透析,蛋白酶治疗,进一步透析,过滤,用乙醇/CaCl<sub>2</sub>沉淀,透析,冷冻-干燥,阴离子交换色谱法,透析,冷冻-干燥,尺寸排阻色谱法,透析和冷冻-干燥 (Fattom et al.Infect Immun. 58 (7), 2367-74 (1990))。备择过程牵涉高压灭菌金黄色葡萄球菌细胞,超滤含多糖的上清液,浓度,冻干,用偏高碘酸钠处理除去磷壁酸,进一步超滤,透析过滤,高效尺寸排阻液体色谱法,透析和冷冻-干燥 (Gilbert et al.J.Microb.Meth.20,39-46 (1994))。本发明并不局限于纯化自天然来源的多糖,然而多糖可以通过其它方法比如全合成或部分合成获得。

[0237] 其它细菌囊状多糖

[0238] 进一步示范性细菌囊状多糖包括来自流感杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 类型b,肠沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) Typhi Vi和艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 的那些。

[0239] 无乳链球菌碳水化合物:还可以使用非囊状细菌多糖。示范性非囊状细菌多糖是化脓性链球菌 (*S.pyogenes*) 气体碳水化合物 (也称为气体细胞壁多糖或GASP)。该多糖的特征是支化结构,其具有由交替 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) 和 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) 连接和 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-连接至交替鼠李糖环的D-N-乙酰基氨基葡萄糖 (GlcNAc) 残基构成的L-鼠李糖吡喃糖 (Rhap) 骨架 (Kreis et al.Int J Biol Macromol.17 (3-4), 117-30 (1995))。

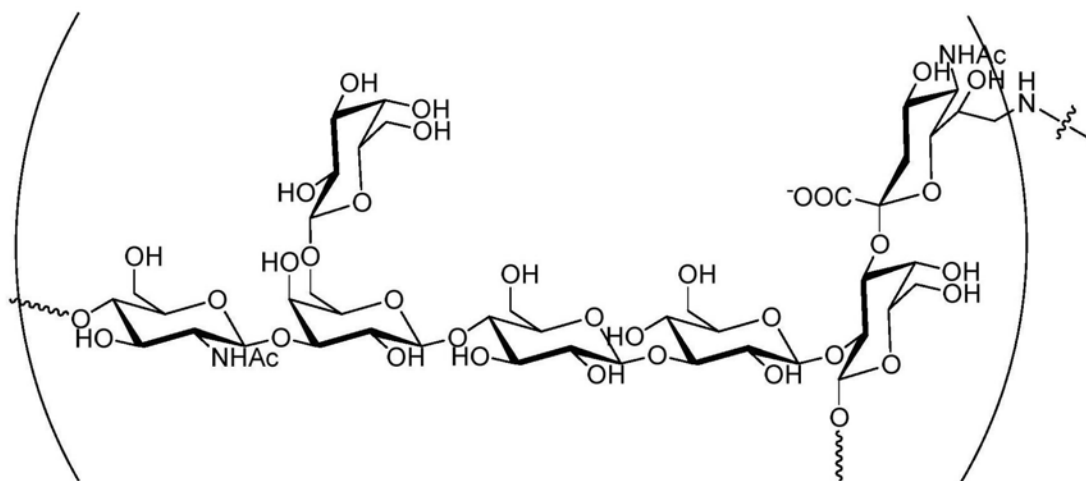
[0240] 气体碳水化合物一般呈其天然形式,但是其可以被修饰。例如,多糖可以比天然气体碳水化合物更短,或可以是化学上修饰的。

[0241] 从而,根据本发明使用的多糖可以是基本上完整长度的如自然界存在的气体碳水化合物,或其可以比天然长度更短。完整长度多糖可以解聚,提供用于本发明的较短片段,例如通过在温和酸中水解,通过加热,提供尺寸色谱法等。被认为相应于气体碳水化合物末端单元的短片段已被建议用于疫苗 (Hoog等人,Carbohydr Res.337 (21-23), 2023-36 (2002))。相应地,本发明预期短片段。然而,优选的是使用基本上完整长度的多糖。气体碳水化合物一般具有约10kDa,尤其是约7.5-8.5kDa 的重均分子量。分子质量能够通过HPLC例如SEC-HPLC测量,用TSK 凝胶G3000SW柱 (Sigma),相对出芽短梗孢糖标准比如可获自Polymer Standard Service ([www.polymer.de](http://www.polymer.de)) 的那些。

[0242] 多糖可以相对自然界存在的气体碳水化合物是化学上修饰的。例如,多糖可以是脱-N-乙酰化的 (部分或完全),N-丙酸化的 (部分或完全) 等。脱-乙酰化效果等例如对免疫原性的效果能够通过常规测试来评价。

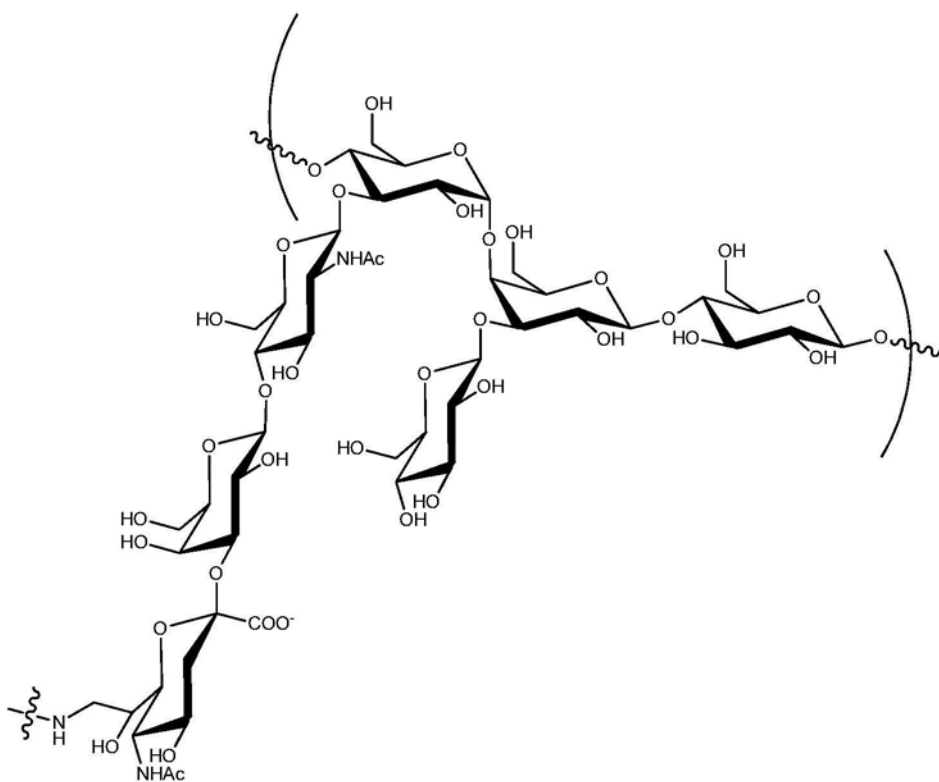
[0243] 在某些实施方式中,多糖是GBSII抗原性多糖,具有如下所示的结构:

[0244]



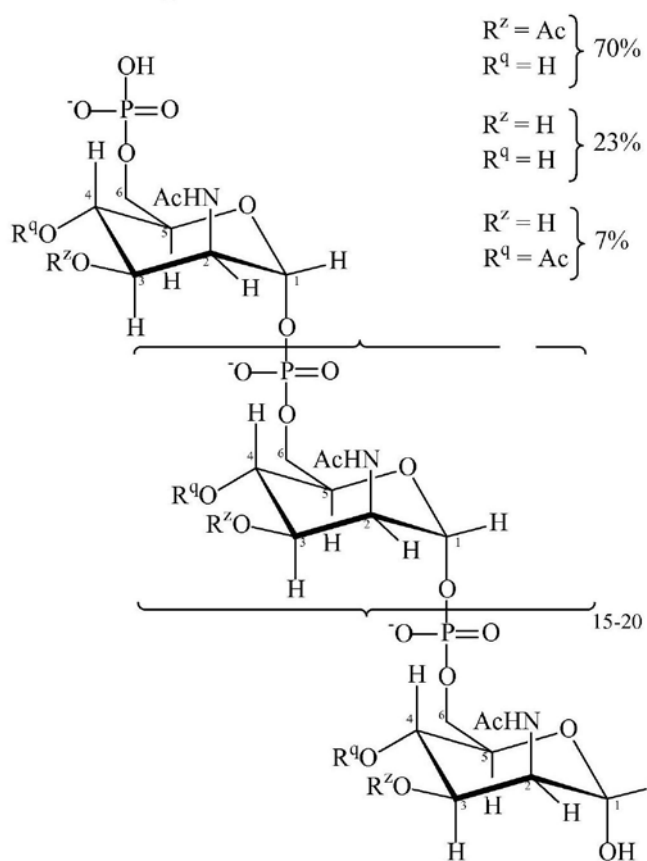
[0245] 在某些实施方式中,多糖是GBSV抗原性多糖,具有如下所示的结构:

[0246]



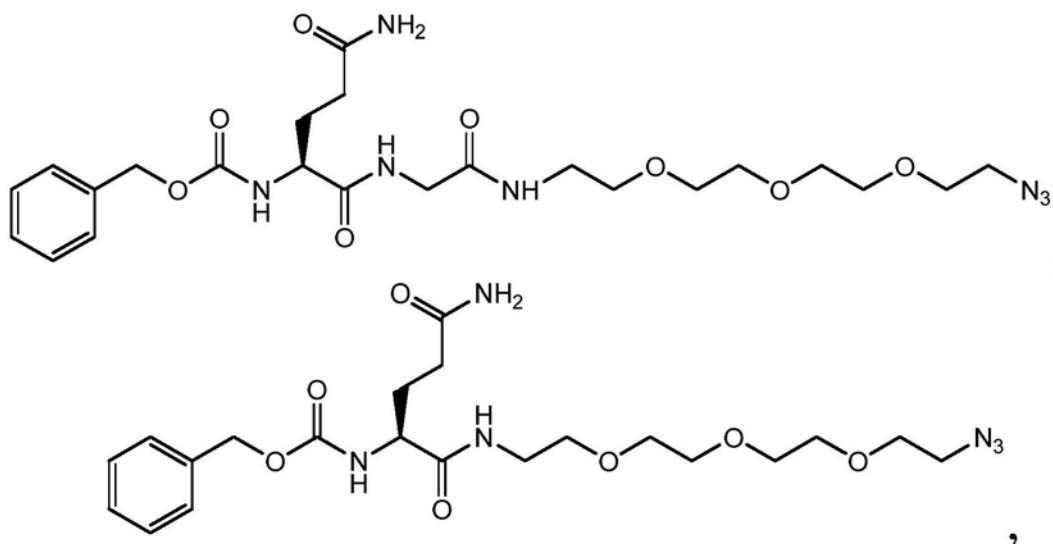
[0247] 在某些实施方式中,多糖是MenA抗原性多糖,具有如下所示的结构:

[0248]

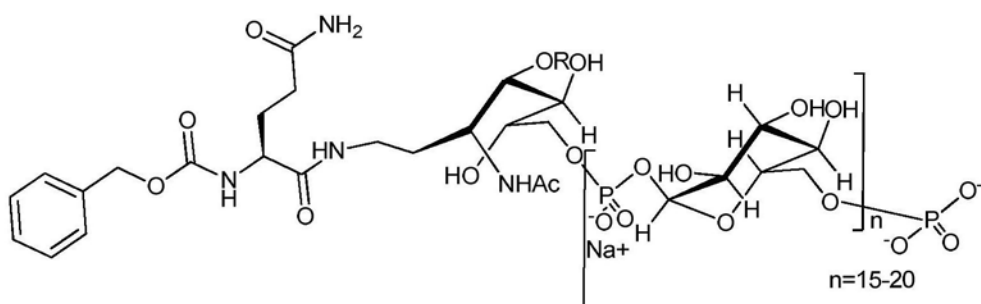
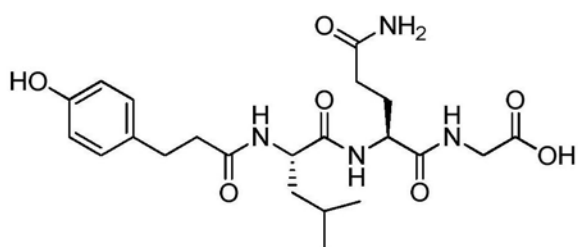
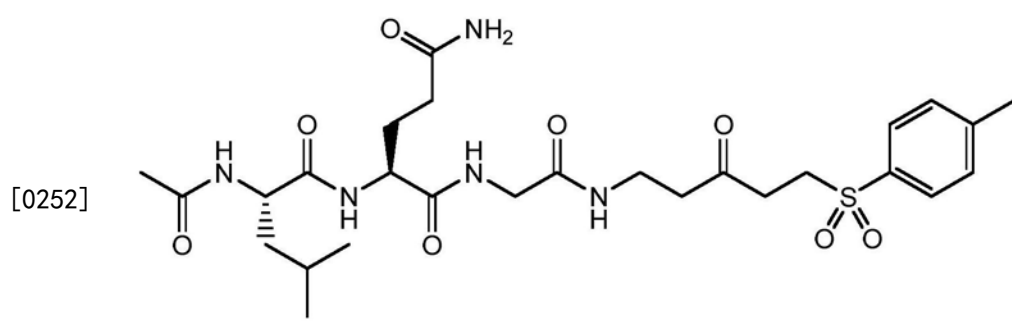
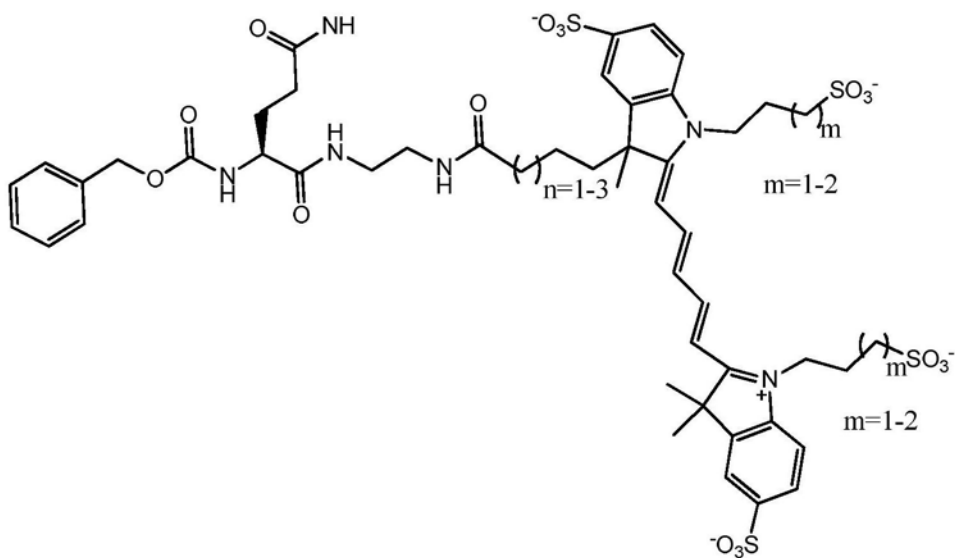


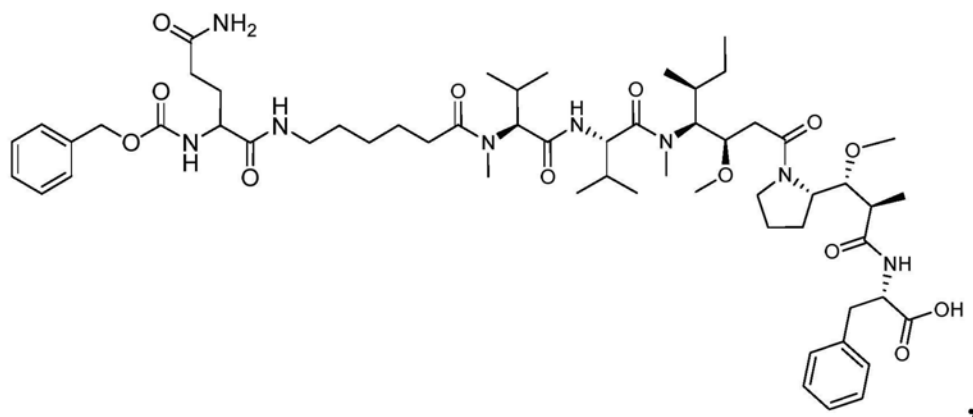
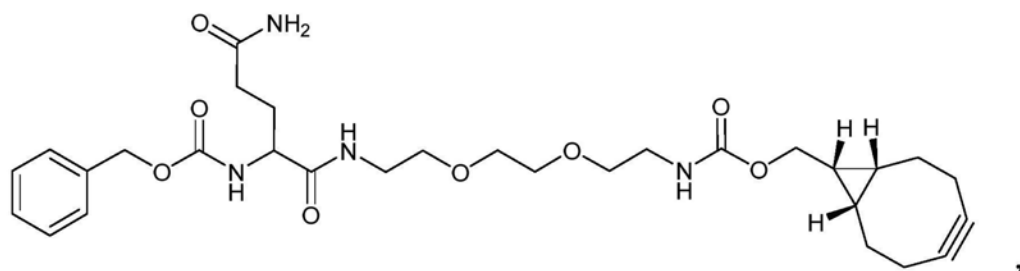
[0249] 在又一方面,公开式(I)化合物 $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{A-W-B-R}^2)_z$ 或(II) $R^1-(\text{Leu})_x-\text{Gln}-(\text{Gly})_y-(\text{NH-W-R}^2)_z$ ,其中 $x, y, z, R^1, R^2, A, B$ 和 $W$ 如上文所定义。在某些实施方式中,化合物下述中任一种:

[0250]

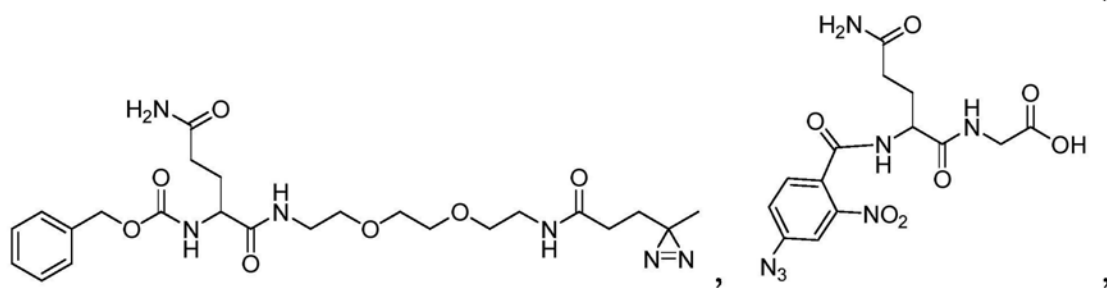
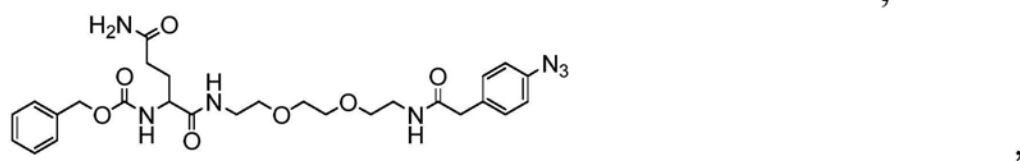


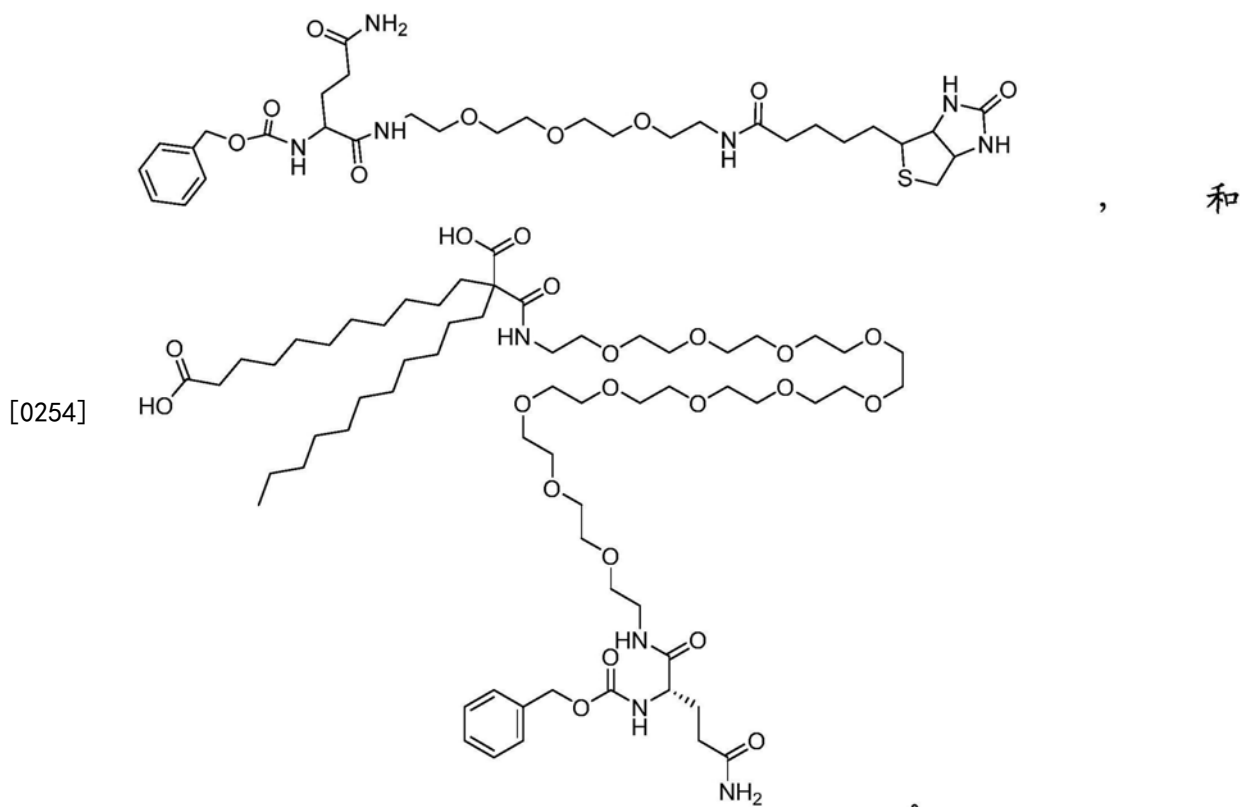






[0253]





[0255] 在具有八元环炔烃基团的实施方式中,该基团能够通过共价连接而连接至修饰基团。一般地,八元环炔烃基团通过间隔物连接并且在间隔物末端连接。间隔物的另一末端具有通过肽的氨基或羧酸末端连接至修饰基团的官能团,但不在谷氨酰胺的 $\epsilon$ -氨基连接。例如,如果连接在修饰基团的胺部分,那么间隔物能够包括允许连接至胺的任意官能团(例如琥珀酰亚胺基酯)。类似地,如果连接在修饰基团的羧酸部分,那么间隔物能够包括允许连接至羧酸的任意官能团(例如胺)。

[0256] 在某些实施方式中,八元环炔烃基团包括一个或多个氮原子比如1、2或3个氮原子。在某些实施方式中,八元环炔烃基团耦合至一个或多个其它环系比如环丙烷或苯。在一个优选实施方式中,八元环炔烃基团耦合至环丙烷基团。在又一优选的实施方式中,八元环炔烃基团耦合至2个苯基团。在最优选的实施方式中,八元环炔烃基团是环辛炔基团。

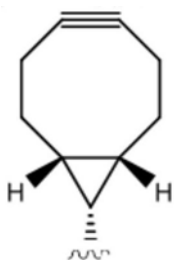
[0257] 在一种实施方式中,连接用具有式 $X^1-L-X^2$ 的化合物进行,其中 $X^1$ 是八元环炔烃基团和 $X^2-L$ 是间隔物。在这些实施方式中, $X^2$ 可以是能够与肽上的胺基团上的官能团反应的任意基团,并且L是间隔物中的连接部分。

[0258] 在一种实施方式中, $X^2$ 是N-氧基琥珀酰亚胺。该基团适于连接至肽上的胺。L可以是具有1至10个碳原子(例如 $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}$ )的直链烷基例如 $(CH_2)_4$ 或 $(CH_2)_3$ 。L一般地具有式 $-L^3-L^2-L^1$ ,其中 $L^1$ 是羰基, $L^2$ 是具有1至10个碳原子(例如 $C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_7, C_8, C_9, C_{10}$ )的直链烷基例如 $(CH_2)_4$ 或 $(CH_2)_5$ 或 $L^2$ 是不存在,和 $L^3$ 是 $-NHC(O)-$ ,羰基或 $-O(CH_3)-$ 。

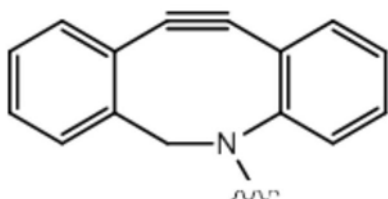
[0259] 在一种实施方式中, $L^1$ 是羰基, $L^2$ 是 $(CH_2)_5$ 和 $L^3$ 是 $-NHC(O)-$ 。在又一实施方式中, $L^1$ 是羰基, $L^2$ 是 $(CH_2)_4$ 和 $L^3$ 是羰基。在又一实施方式中, $L^1$ 是羰基, $L^2$ 是不存在和 $L^3$ 是 $-O(CH_3)-$ 。

[0260] 在一种实施方式中, $X^1$ 是

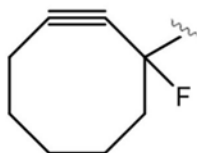
[0261]

[0262] 在又一实施方式中,  $X^1$  是:

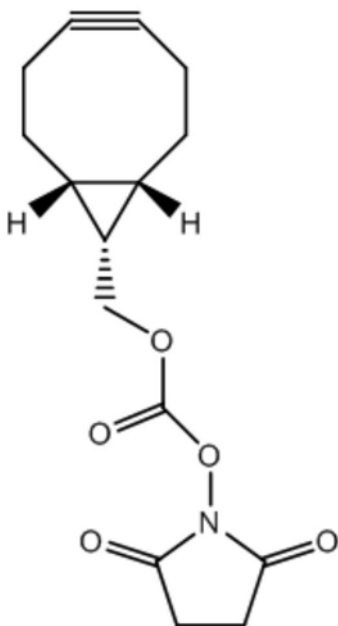
[0263]

[0264] 在又一实施方式中,  $X^1$  是

[0265]

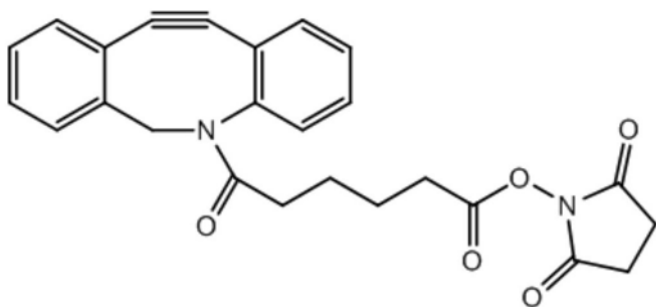
[0266] 在一种实施方式中, 具有式  $X^1-L-X^2$  的化合物是

[0267]

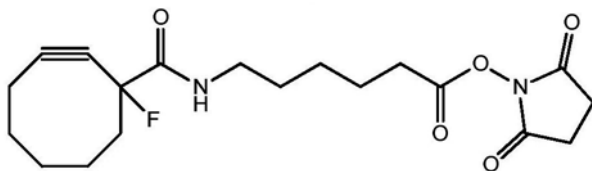
[0268] 在一种实施方式中, 具有式  $X^1-L-X^2$  的化合物是



[0269]

[0270] 在一种实施方式中,具有式X<sup>1</sup>-L-X<sup>2</sup>的化合物是:

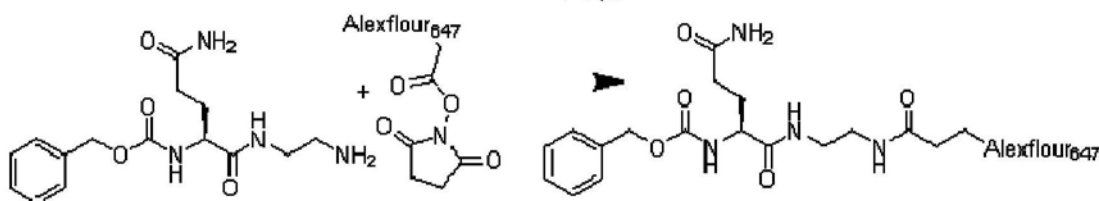
[0271]



[0272] 在R<sup>2</sup>基团包括荧光团的情况下,适宜的荧光团基团可以根据本领域熟知的技术制备。例如如方案I所示,举例说明用于制备荧光团官能化的修饰基团的一般方案。

### 方案 I.

[0273]



[0274] 靶标蛋白质

[0275] 靶标化合物能够是微生物转谷氨酰胺酶的底物,例如作为微生物转谷氨酰胺酶的底物的蛋白质。在一个方面,靶标化合物含有至少1个Lys 残基,和在某些实施方式中至少2个Lys残基。如果靶标化合物不是转谷氨酰胺酶底物本身,则可能在蛋白质中插入一个或多个Gln或Lys残基,和尤其是Lys残基以使得蛋白质成为转谷氨酰胺酶的底物。另选地,可以插入含有赖氨酸残基(肽标签)的肽序列。原则上,所述Gln或Lys 残基可以插入于序列中的任意位置。一般地,插入应位于蛋白质的可接触部分或在柔性环中。其还能够插入于生理学比如蛋白质治疗活性不被影响至蛋白质例如在治疗干预中不再有用的程度的位置。在蛋白质中插入氨基酸残基能够根据本领域技术人员已知的标准技术比如翻译后化学修饰或转基因技术来进行。

[0276] 作为转谷氨酰胺酶的底物的任意靶标化合物或蛋白质都能够通过本文公开的方法修饰,比如酶,蛋白质激素类,生长因子类,抗体和抗体片段,细胞因子,受体,淋巴因子和疫苗抗原。在某些实施方式中,多肽是抗原性肽。

[0277] 在某些实施方式中,特别在R是多糖的情况下,多肽是载体分子。通常,多糖与载体的共价缀合增强多糖的免疫原性,原因在于其将它们从T-独立性抗原转化至T-依赖性抗原,从而允许免疫学记忆的致敏。缀合是对儿科疫苗特别有用的,(参见例如Ramsay et al. Lancet 357 (9251): 195-196 (2001)) 标签是熟知技术(参见综述Lindberg Vaccine 17 Suppl 2: S28-36 (1999), Buttery & Moxon, J R Coll Physicians Lond 34, 163-168 (2000), Ahmad & Chapnick, Infect Dis Clin North Am 13: 113-33, vii (1999), Goldblatt

J. Med. Microbiol. 47, 563-567 (1998), 欧洲专利 477 508, U.S. 专利号 5,306,492, W098/42721, Dick et al. Conjugate Vaccines (eds. Cruse et al.) Karger, Basel, 10, 48-114 (1989) 和 Hermanson Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368。

[0278] 载体蛋白质可以是细菌毒素类毒素。有用载体蛋白质包括细菌毒素或类毒素, 比如白喉类毒素或破伤风类毒素, 白喉和霍乱毒素和它们的亚单位比如破伤风类毒素片段C和白喉毒素CRM197突变型。其它适宜的载体蛋白质包括脑膜炎奈瑟菌外膜蛋白质, 合成的肽, 热休克蛋白质, 百日咳蛋白质, 细胞因子, 淋巴因子, 激素类, 生长因子类, 人类血清白蛋白(包括重组), 人工蛋白质、包含多个人类CD4+T细胞表位、来自各种病原物-衍生的抗原比如N19, 来自流感嗜血杆菌的蛋白质D, 肺炎球菌的表面蛋白质PspA, 肺炎球菌自溶酶, 铁-摄取蛋白质, 来自艰难梭菌的毒素A或B, 重组绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 外源蛋白A (rEPA), GBS蛋白质等。在某些实施方式中, 靶标蛋白质是纤毛蛋白质比如GBS蛋白质, 例如GBS67和GBS80。

[0279] 进一步衍生化

[0280] 本发明修饰靶标蛋白质(即有关蛋白质)的需要可以产生自任意数量的原因, 并且这也反映在根据本发明方法可以选择性修饰的化合物种类当中。

[0281] 一般地, 本发明方法包含含有至少2个赖氨酸的蛋白质与含有式(I)  $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$  或(II)  $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(NH-W-R^2)_z$  肽的谷氨酰胺的微生物转谷氨酰胺酶催化的反应。

[0282] 在一种实施方式中, 方法由下述步骤组成: (a) 通过肽合成制备式(I) 化合物  $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$ , 和如本领域已知地纯化; (b) 将过量该化合物  $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(A-W-B-R^2)_z$  与含有至少1个赖氨酸和在某些实施方式中多于1个赖氨酸的靶标蛋白质在含水缓冲剂中混合, 任选地含有有机溶剂、洗涤剂或其它调节剂; (c) 向该混合物加入催化量的微生物转谷氨酰胺酶; (d) mTGase抑制剂能够任选地加至混合物; (e) 对混合物进行纯化过程, 一般地包含单元操作比如超滤或透析过滤和/或色谱法(离子交换, 尺寸排阻, 疏水相互作用等)。由此获得选择性修饰的蛋白质。蛋白质通过标准蛋白质分析方法表征, 包括色谱法, 电泳, 肽测绘和质谱。

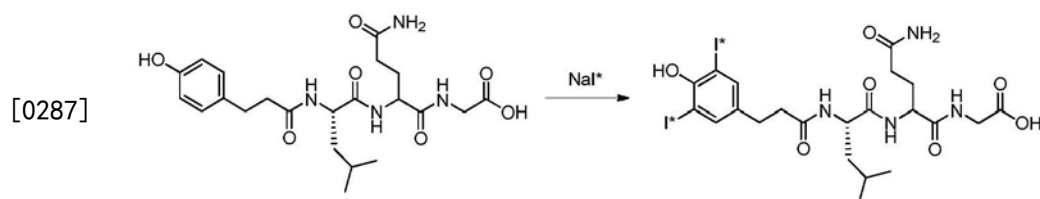
[0283] 在一种实施方式中, 方法由下述步骤组成: (a) 通过肽合成制备式(II) 化合物  $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(NH-W-R^2)_z$ , 和如本领域已知地纯化; (b) 将过量该化合物  $R^1-(Leu)_x-Gln-(Gly)_y-(NH-W-R^2)_z$  与含有至少1个赖氨酸和在某些实施方式中多于1个赖氨酸的靶标蛋白质在含水缓冲剂中混合, 任选地含有有机溶剂, 洗涤剂或其它调节剂; (c) 向该混合物加入催化量的微生物转谷氨酰胺酶; (d) mTGase抑制剂能够任选地加至混合物; (e) 对混合物进行纯化过程, 一般地包含单元操作比如超滤或透析-过滤和/或色谱法(离子交换, 尺寸排阻, 疏水相互作用等)。由此获得选择性修饰的蛋白质。蛋白质通过标准蛋白质分析方法表征, 包括色谱法, 电泳, 肽测绘和质谱。

[0284] 任选地, 在步骤(b)或(c)之后, 经修饰的蛋白质能够经由如果存在的官能团 $R^1$ 或 $R^2$ 或两者进一步修饰、例如用荧光团标记物修饰(除非已经存在一个)。如果加入标记, 修饰的蛋白质可以取决于标记物比如荧光或放射性标记的性质用各种技术检测。

[0285] 在某些实施方式中, 官能团 $R^1$ 或 $R^2$ 或两者能够是同位素标记的。例如, 碘放射性标

记物能够加至连接体,如方案II所示。

[0286] 方案II。



[0288] 作为mTGase-介导的转酰胺基化的机理的一部分,分子间硫代酯通过在MTGase活性位点中的Cys与Gln底物之间的反应形成。术语“转酰胺基化”期望指出反应,其中谷氨酰胺侧链的氮与来自又一化合物的氮、尤其是来自又一含氮亲核物质的氮交换。该中间体可以视为活化的Gln-残基,活性种类是与胺例如蛋白质赖氨酸残基反应的mTGase-硫代酯。反应的选择性是下述导致的结果:1)mTGase-硫代酯与携带Lys的蛋白质底物相互作用时的剪切(shear)立体位阻,和2)在mTGase-硫代酯与携带Lys的蛋白质底物之间更受限的非共价相互作用。其中间结果是,本发明中包括携带活化酰基的蛋白质即酰基-X-蛋白质,其中是X是为蛋白质-赖氨酸胺亲核进攻活化酰基的原子或基团。

[0289] 从而,可以希望的是修饰蛋白质以改变蛋白质的物理化学特性,例如增加(或降低)溶解度以修饰治疗性蛋白质的生物利用度。在又一实施方式中,可以希望的是通过将化合物缀合至蛋白质修饰体内清除速率,其结合至血浆蛋白质比如白蛋白,或者其增加蛋白质的尺寸以预防或延缓通过肾的排放。缀合还可以改变和尤其是降低蛋白质对水解例如体内蛋白水解的易感性。

[0290] 在又一实施方式中,可以希望的是缀合标记物以促进蛋白质的分析。所述标记的实例包括放射性同位素,荧光标记物比如已描述的荧光团和酶底物。

[0291] 在又一实施方式中,化合物缀合至蛋白质以促进蛋白质的分离。例如,对特别柱物质具有特定亲和力的化合物可以缀合至蛋白质。还可以希望的是修饰蛋白质的免疫原性,例如通过缀合蛋白质以隐藏、遮盖或掩蔽蛋白质的一个或多个免疫原性表位。术语“缀合物”作为名词期望指出修饰的肽,即肽具有键合以修饰所述肽特性的部分。作为动词,该术语期望指出将部分与肽成键以修饰所述肽的性质的过程。

[0292] 在一种实施方式中,本发明提供改善靶标蛋白质药理学特性的方。改善是与相应的未修饰蛋白质比较。所述药理学特性的实例包括功能性体内半衰期,免疫原性,肾过滤,蛋白酶保护和任意特定蛋白质的白蛋白结合。

[0293] 在一方面,本发明的经修饰蛋白质可以通过进一步衍生化 $R^1$ ,  $(A-W-B-R^2)_z$ 和/或 $NH-W-R^2$ 来进一步修饰。特别, $R^1$ 和/或 $R^2$ 可以包含适于进一步修饰的化学基团。所述进一步官能化的实例包括叠氮化物-炔Huisgen环加成,更一般称为点击(click)化学,条件是 $R^1$ 或 $R^2$ 包括叠氮化物或环辛炔基团。如果 $R^2$ 包括消除形成 $\alpha,\beta$ -不饱和酮的甲苯磺酰基磺,则能进行缀合物加成以进一步用亲核物质比如硫醇修饰。

[0294] 在上文描述的某些实施方式中,W可以选自:树状物(dendrimer),聚氧化烯烃,聚亚烷基二醇(PAG),聚乙二醇(PEG\聚丙二醇(PPG),支化的PEGs,聚乙烯醇(PVA,聚-羧酸酯,聚-乙炔基吡咯烷酮, polydhykne-co-马来酸酐,聚苯乙烯-c-makic酸酐,糊精,羧甲基-右旋糖酐;血清蛋白质结合-配体,比如结合至白蛋白的化合物比如脂肪酸,  $C_5$ - $C_{24}$ 脂肪酸,脂

族二酸(例如C<sub>5</sub>-C<sub>24</sub>),抑制glycans结合至受体(例如唾液酸糖-蛋白质受体和甘露糖受体)的结构(例如唾液酸衍生物或模拟物),含有改变生理学条件、改变电荷特性的部分的小有机分子比如羧酸或胺,或防止聚糖特异性识别的中性取代基比如低级烷基取代基(例如C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基),低分子有机带电残基(例如C<sub>1</sub>-C<sub>25</sub>),其可以含有一个或多个羧酸,胺,磺酸,膦酸或其组合;低分子中性亲水分子(例如C<sub>1</sub>-C<sub>25</sub>)比如环糊精,或可以任选地支化的聚乙烯链;平均分子量2-40Kda的聚乙二醇;充分限定的精度聚合物比如精确分子量的范围是700至20,000Da 或更优选700-10,000Da的树状物;和基本上非免疫原性多肽比如白蛋白或抗体或任选地含有Fc-区域的抗体部分。

[0295] 在一种实施方式中,W是具有约40至约10,000amu分子量的线性或支化的聚乙二醇,也称为“PEG。”术语“PEG”期望指出聚乙二醇、包括其类似物,例如其中支化末端OH-基团已用烷氧基比如甲氧基、乙氧基或丙氧基替换。

[0296] 由于产生mPEG的过程,这些分子常常具有分子量分布。该分布通过多分散性指数来描述。术语“多分散性指数”如本文所用意指在重均分子量与数均分子量的比率,如聚合物化学领域已知(参见例如“Polymer Synthesis and Characterization”,J.A.Nairn, University of Utah,2003)。多分散性指数是大于或等于1的数,并且其可以从凝胶渗透色谱数据估计。在多分散性指数是1的情况下,产品是单分散的并且从而由单一分子量的化合物组成。在多分散性指数大于1的情况下,其聚合物多分散性的度量,即不同分子量的聚合物的分布宽度。

[0297] 在式、化合物名词中或在分子结构中采用例如“mPEG2000”指出 mPEG残基,其中mPEG是多分散的并且具有大约2,000Da的分子量。

[0298] 多分散性指数一般地随PEG或mPEG分子量而增加。在提及2,000 Da PEG和尤其是2,000Da mPEG的情况下,期望指出(或实际上是化合物的混合物)化合物具有低于1.06,比如低于1.05,比如低于1.04,比如低于1.03,比如1.02至1.03的多分散性指数。在提及3,000Da PEG和尤其是3,000Da mPEG的情况下,期望指出化合物(或实际上是化合物的混合物)具有低于1.06,比如低于1.05,比如低于1.04,比如低于1.03,比如1.02至1.03的多分散性指数。

[0299] 在某些实施方式中,上述方法也包括下述步骤:控制蛋白质pH环境为pH大于7和将位点选择性标记的蛋白质与具有半胱氨酸残基的肽接触。在某些实施方式中,具有半胱氨酸残基的肽是N<sup>5</sup>-(R)-1-((羧甲基)氨基)-3-巯基-1-氧代丙-2-基)-L-谷氨酰胺。在某些实施方式中,具有半胱氨酸残基的肽能够用任意含硫醇分子比如含硫醇的多糖,含硫醇细胞毒素,硫醇-官能化的PEGs等取代。

[0300] 药物组合物

[0301] 在又一方面,药物组合物包含通过本文公开的任意方法修饰的蛋白质。在一方面,上述药物组合物包含修饰的蛋白质比如生长激素(GH),其以10-15mg/ml至200mg/ml例如10-10mg/ml至5mg/ml的浓度存在并且其中组合物具有2.0至10.0的pH。组合物可以还包含缓冲剂系统,防腐剂,张力剂,螯合剂,稳定剂和表面活性剂。在一种实施方式中,药物组合物是含水组合物。所述组合物一般地作为溶液或悬浮液存在。在又一实施方式中,药物组合物是水溶液。术语“含水组合物”定义为包含至少50%w/w水的组合物。类似地,术语“溶液”定义为包含至少50% w/w水的水溶液,和术语“含水悬浮液”定义为包含至少50%w/w水的

悬浮液。

[0302] 在又一实施方式中,药物组合物是冻干的组合物,在使用前医师、患者或药剂师向其添加溶剂和/或稀释剂。在又一实施方式中,药物组合物是干燥组合物(例如冻干或喷雾干燥的)不用任何事先溶解即可使用。

[0303] 在又一方面中,药物组合物包含修饰的蛋白质比如修饰的GH蛋白质、和缓冲剂的水溶液,其中修饰的蛋白质比如修饰的GH蛋白质以 0.1-100mg/ml或以上的浓度存在,和其中所述组合物具有约2.0至约10.0 的pH。

[0304] 在又一实施方式中,组合物pH选自由下述组成的列表:2.0,2.1,2.2,2.3,2.4,2.5,2.6,2.7,2.8,2.9,3.0,3.1,3.2,3.3,3.4,3.5,3.6,3.7,3.8,3.9,4.0,4.1,4.2,4.3,4.4,4.5,4.6,4.7,4.8,4.9,5.0,5.1,5.2,5.3,5.4,5.5,5.6,5.7,5.8,5.9,6.0,6.1,6.2,6.3,6.4,6.5,6.6,6.7,6.8,6.9,7.0,7.1,7.2,7.3,7.4,7.5,7.6,7.7,7.8,7.9,8.0,8.1,8.2,8.3,8.4,8.5,8.6,8.7,8.8,8.9,9.0,9.1,9.2,9.3,9.4,9.5,9.6,9.7,9.8,9.9和10.0。

[0305] 在又一实施方式中,缓冲剂选自碳酸氢铵,乙酸钠,碳酸钠,柠檬酸盐,双甘氨酸,组氨酸,甘氨酸,赖氨酸,精氨酸,磷酸二氢钠,磷酸氢二钠,磷酸钠,和三(羟基甲基)氨基甲烷,N-二羟乙基甘氨酸,曲辛,苹果酸,琥珀酸盐,马来酸,富马酸,酒石酸,天冬氨酸,TRIS或其混合物。

[0306] 在又一实施方式中,组合物还可以包括药学上可接受的防腐剂。例如,防腐剂可以是苯酚,邻-甲酚,间-甲酚,对-甲酚,对-羟基苯甲酸甲酯,对-羟基苯甲酸丙酯,2-苯氧乙醇,对-羟基苯甲酸丁酯,2-苯基乙醇,苯甲醇,三氯叔丁醇,和硫柳汞,溴硝丙二醇,苯甲酸,咪唑,氯己定,脱氢乙酸钠,氯甲酚,对-羟基苯甲酸乙酯,苄索氯铵,氯苯甘醚(3p-氯苯氧基丙烷-1,2-二醇),或其混合物。防腐剂可以以0.1mg/ml至20mg/ml或0.1mg/ml至5mg/ml的浓度存在。在又一实施方式中,防腐剂以5 mg/ml至10mg/ml或10mg/ml至20mg/ml的浓度存在。

[0307] 在又一实施方式中,组合物可以包括等渗剂。在又一实施方式中,等渗剂选自盐(例如氯化钠),糖或糖醇,氨基酸(例如L-甘氨酸,L-组氨酸,精氨酸,赖氨酸,异亮氨酸,天冬氨酸,色氨酸,苏氨酸),醛糖醇(例如甘油(甘油),1,2-丙二醇(丙二醇),1,3-丙二醇,1,3-丁二醇)聚乙二醇(例如PEG400),或其混合物。可以使用任何糖比如单糖、双糖或多糖,或水可溶的葡聚糖,包括例如果糖,葡萄糖,甘露糖,山梨糖,木糖,麦芽糖,乳糖,蔗糖,海藻糖,右旋糖酐,出芽短梗孢糖,糊精,环糊精,可溶的淀粉,羟乙基淀粉和羧甲基纤维素-Na。在一种实施方式中,糖添加剂是蔗糖。糖醇定义为C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>烃,具有至少一个-OH基团,和包括例如甘露醇,山梨醇,肌醇,半乳糖醇,半乳糖醇,木糖醇,阿拉伯糖醇,及其混合物。在一种实施方式中,糖醇添加剂是甘露醇。在一种实施方式中,糖或糖醇浓度是约1mg/ml至约150mg/ml,或1mg/ml至50mg/ml。等渗剂以1mg/ml至7mg/ml或8mg/ml至24mg/ml,或25mg/ml至50mg/ml的浓度存在。在药物组合物中使用等渗剂是技术人员熟知的。为方便起见,可参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20th版,2000。

[0308] 在本文上下文中,术语“药学上可接受的盐”期望指出对患者无害的盐。所述盐包括药学上可接受的酸加成盐,药学上可接受的金属盐,铵和烷基化的铵盐。酸加成盐包括无机酸以及有机酸的盐。适宜无机酸的代表性实例包括盐酸,氢溴酸,氢碘酸,磷酸,硫酸,硝酸等。适宜有机酸的代表性实例包括甲酸,乙酸,三氯乙酸,三氟乙酸,丙酸,苯甲酸,肉桂

酸,柠檬酸,富马酸,羟基乙酸,乳酸,马来酸,苹果酸,丙二酸,杏仁酸,草酸,苦味酸,丙酮酸,水杨酸,琥珀酸,甲磺酸,乙磺酸,酒石酸,抗坏血酸,双羟萘酸,二亚甲基水杨酸,乙烷二磺酸,葡萄糖酸,柠康酸,天冬氨酸,硬脂酸,棕榈酸,EDTA,羟基乙酸,对-氨基苯甲酸,谷氨酸,苯磺酸,对-甲苯-磺酸等。药学上可接受的无机或有机酸加成盐的进一步实例包括列于J.Phann.Sci.1977,66,2的药学上可接受的盐,通过援引将其并入本文。金属盐的实例包括锂,钠,钾,镁盐等。铵和烷基化的铵盐的实例包括铵,甲基铵,二甲基铵,三甲基铵,乙基铵,羟基乙基铵,二乙基铵,丁基铵,四甲基铵盐等。

[0309] 在又一实施方式中,组合物包括螯合剂。螯合剂选自亚乙基二胺四乙酸(EDTA),柠檬酸和天冬氨酸的盐,及其混合物。螯合剂以0.1mg/ml 至5mg/ml,0.1mg/ml至2mg/ml或2mg/ml至5mg/ml的浓度存在。在药物组合物中使用螯合剂是技术人员熟知的。为方便,可参见 Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20<sup>th</sup>版,2000。

[0310] 在又一实施方式中,组合物包括稳定剂。在药物组合物中使用稳定剂是技术人员熟知的。为方便,参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20<sup>th</sup>版,2000。更特别地,本发明组合物是稳定化的液体药物组合物,其治疗活性组分包括在液体药物组合物中贮藏期间可能展示聚集体形成的蛋白质。“聚集体形成”是指蛋白质分子的物理相互作用引起低聚物形成,其可以保持可溶或是从溶液沉淀的大的可视聚集体。“在贮藏期间”意指制备后并不立即给予受试者液体药物组合物或组合物。而是,在制备后,将其包装以液体形式、以冷冻状态或以干燥形式贮藏,以后续重构为液体形式或适于给药至受试者的其它形式。“干燥形式”意指液体药物组合物或组合物通过下述干燥:冻干(也即,冷冻干燥;参见例如Williams and Polli(1984)J.Parenteral Sci.Technol. 38:48-59),喷雾干燥(参见Masters(1991)in Spray-Drying Handbook (5th ed;Longman Scientific and Technical,Essez,U.K.),pp.491-676; Broadhead et al.(1992)Drug Devel.Ind.Phann.18:1169-1206;和 Mumenthaler et al.(1994)Phann.Res.11:12-20),或空气干燥(Carpenter and Crowe(1988)Cryobiology 25:459-470;和Roser(1991)Biopharm. 4:47-53)。在液体药物组合物贮藏期间的蛋白质聚集体形成能够不利地影响蛋白质的生物学活性,引起药物组合物疗效损失。另外,在含蛋白质药物组合物用输注系统给予的情况下,聚集体形成可以导致其它问题比如管道、膜或泵阻断。

[0311] 药物组合物还可以包括一定量的氨基酸碱,其足以降低在组合物贮藏期间的蛋白质聚集体形成。“氨基酸碱”意指氨基酸或氨基酸组合,其中任意给定氨基酸以其游离碱形式或其盐形式存在。在使用氨基酸组合的情况下,全部氨基酸可以以其游离碱形式存在,全部可以以其盐形式存在,或者某些可以以其游离碱形式存在而另一些以其盐形式存在。在一种实施方式中,用于制备本发明组合物的氨基酸是携带带电侧链的那些比如精氨酸,赖氨酸,天冬氨酸和谷氨酸。特定氨基酸(甲硫氨酸,组氨酸,精氨酸,赖氨酸,异亮氨酸,天冬氨酸,色氨酸,苏氨酸及其混合物)的任意立体异构体(也即L或D异构体或其混合物)或这些立体异构体的组合或甘氨酸或有机碱比如但不限于咪唑可以存在于药物组合物中,只要所述特定氨基酸或有机碱以其游离碱形式或其盐形式存在。在一种实施方式中,使用氨基酸的L-立体异构体。在一种实施方式中,使用L-立体异构体。本发明组合物还可以用这些氨基酸的类似物配制。“氨基酸类似物”意指天然氨基酸的衍生物,其引起减少在本发明液体药物组合物贮藏期间蛋白质聚集体形成的希望效果。适宜的精氨酸类似物包括例如氨基胍、

鸟氨酸和N-乙基-L-精氨酸,适宜的甲硫氨酸类似物包括乙硫氨酸和buthionine而适宜的半胱氨酸类似物包括S-甲基-L-半胱氨酸。对于其它氨基酸,氨基酸类似物以其游离碱形式或其盐形式掺入组合物。在又一实施方式中,氨基酸或氨基酸类似物以一定浓度使用,其足以预防或延缓蛋白质团聚。

[0312] 在又一实施方式中,可以加入甲硫氨酸(或其它硫酸氨基酸)或类似的氨基酸以抑制甲硫氨酸残基氧化为甲硫氨酸亚砷,在充当治疗剂的蛋白质是包含至少一个易被这样氧化的甲硫氨酸残基的蛋白质。“抑制”意指甲硫氨酸氧化种类随时间的最低聚集。抑制甲硫氨酸氧化引起蛋白质更多地保留为其合适分子形式。能够使用甲硫氨酸(L或D异构体)的任意立体异构体或其任意组合。应加入的量是足以抑制甲硫氨酸残基氧化而使得甲硫氨酸亚砷的量是管理机构可接受的量。一般地,这意指组合物含有不超过约10%至约30%甲硫氨酸亚砷。一般地,这能够通过加入甲硫氨酸来获得,加至甲硫氨酸残基的甲硫氨酸比率范围是约1:1至约 1000:1,比如10:1至约100:1。

[0313] 在又一实施方式中,组合物可以包括选自高分子量聚合物或低分子化合物的稳定剂。稳定剂可以选自聚乙二醇(例如PEG 3350),聚乙烯醇(PV A),聚乙烯基吡咯烷酮,羧基-/羟基纤维素或其衍生物(例如HPC, HPC-SL, HPC-L和HPMC),环糊精,含硫的物质比如硫代甘油、巯基乙酸和2-甲硫基乙醇,和不同的盐(例如氯化钠)。

[0314] 药物组合物还可以包括额外的稳定剂,其进一步增强其中的治疗活性蛋白质的稳定性。稳定剂包括但不限于甲硫氨酸和EDTA,其保护蛋白质免于甲硫氨酸氧化;和非离子表面活性剂,其保护蛋白质免于与冷冻-解冻或机械剪切有关的团聚。

[0315] 在又一实施方式中,组合物也包括表面活性剂。表面活性剂可以选自洗涤剂,乙氧基化的蓖麻油,聚乙二醇化的甘油酯,乙酰化的甘油单酯,脱水山梨糖醇脂肪酸酯,聚氧丙烯聚氧乙烯嵌段聚合物(例如泊洛沙姆比如**普流罗尼克®**F68,泊洛沙姆188和407, Triton X-100),聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯,聚氧乙烯和聚乙烯衍生物比如烷基化的和烷氧基化的衍生物(吐温例如吐温-20,吐温-40,吐温-80和Brij-35),甘油单酯或其乙氧基化的衍生物,甘油二酯或其聚氧乙烯衍生物,醇,甘油,凝集素和磷脂(例如磷脂酰丝氨酸,磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺,磷脂酰肌醇,二磷脂酰甘油和鞘脂),磷脂的衍生物(例如二棕榈酰基磷脂酸)和溶血磷脂(例如棕榈酰基溶血磷脂酰-L-丝氨酸和乙醇胺的1-酰基-sn-甘油-3-磷酸酯,胆碱,丝氨酸或苏氨酸)和烷基,溶血磷脂酰和磷脂酰胆碱的烷氧基(烷基酯)、烷氧基(烷基醚)-衍生物,例如溶血磷脂酰胆碱、二棕榈酰基磷脂酰胆碱的月桂酰和肉豆蔻酰衍生物,和极性头基的修饰,即胆碱,乙醇胺,磷脂酸,丝氨酸,苏氨酸,甘油,肌醇,和带正电的 DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, 溶血磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰苏氨酸,和甘油磷脂(例如脑磷脂),甘油糖脂(例如半乳吡喃糖苷),鞘糖脂(例如神经酰胺,神经节苷脂),十二烷基磷酸胆碱,鸡蛋溶血卵磷脂,夫西地衍生物-(例如牛磺酸-二氢夫西地酸钠等),长链脂肪酸及其盐 C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>(例如油酸和辛酸),酰基肉碱和衍生物,赖氨酸、精氨酸或组氨酸的N<sup>α</sup>-酰化衍生物,或赖氨酸或精氨酸的侧链酰化的衍生物,包含赖氨酸、精氨酸或组氨酸和中性或酸性氨基酸的任意组合的二蛋白的N<sup>α</sup>-酰化衍生物,包含中性氨基酸和两种带电氨基酸的任意组合的三蛋白的 N<sup>α</sup>-酰化衍生物,DSS(多库酯钠,CAS登录号[577-11-7]),多库酯钙,CAS登录号[128-49-4]),多库酯钾,CAS登录号[7491-09-0]),SDS(十二烷基硫酸钠或月桂基硫酸钠),辛酸钠,胆酸或其衍生物,胆汁酸及其盐和甘氨酸或牛磺酸缀合物,熊去氧

胆酸,胆酸钠,脱氧胆酸钠,牛磺胆酸钠,甘氨酸胆酸钠,N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵基-1-丙烷磺酸酯, amomc (烷基-芳基磺酸酯) 一价表面活性剂,两性离子表面活性剂(例如 N-烷基-N,N-二甲基铵基-1-丙烷磺酸盐,3-胆酰胺基-1-丙基二甲基铵基 -1-丙烷磺酸盐,阳离子表面活性剂(季铵碱)(例如鲸蜡基-三甲基铵溴化物,西吡氯铵),非离子表面活性剂(例如十二烷基P-D-葡萄糖吡喃糖苷),泊洛沙胺(poloxamines)(例如特窗酸的泊洛沙胺),其是衍生自依次将氧化丙烯和氧化乙烯加至乙二胺的四官能嵌段共聚物,或者表面活性剂可以选自咪唑啉衍生物或其混合物。

[0316] 在药物组合物中使用表面活性剂是技术人员熟知的。为方便,参见 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>th</sup>版, 2000。

[0317] 可能的是,其它成分可以存在于药物组合物中。所述额外成分可以包括润湿剂,乳化剂,抗氧化剂,填充剂,张力调节剂,螯合剂,金属离子,含油的媒介物,蛋白质(例如人类血清白蛋白,明胶或蛋白质)和两性离子(例如氨基酸比如内铵盐,牛磺酸,精氨酸,甘氨酸,赖氨酸和组氨酸)。当然,所述额外成分不应不利地影响药物组合物的总体稳定性。

[0318] 含有修饰蛋白质比如修饰的GH蛋白质的药物组合物可以给予在数种场所需要所述治疗的患者,例如在局部场所例如皮肤和粘膜场所,在绕过吸收的场所例如在动脉中、静脉中、心脏中给药,和在牵涉吸收的场所例如在皮肤中、在皮下、在肌肉中或在腹中给药。

[0319] 药物组合物的给药可以通过数种给药途径例如舌、舌下、颊、口中、口服、胃和肠中、鼻、肺例如通过细支气管和肺泡或其组合、表皮、皮肤、透皮、阴道、直肠、眼例如通过结膜、尿道和肠胃外,给予需要上述治疗的患者。

[0320] 组合物可以以数种剂型给予例如作为溶液,悬浮液,乳液,微乳剂,多乳液(multiple emulsion),泡沫剂,油膏剂,糊剂,硬膏剂,软膏剂,片剂,包覆片剂,冲洗,胶囊,例如硬明胶胶囊和软明胶胶囊,栓剂,直肠胶囊,滴剂,凝胶剂,喷雾剂,粉末,气雾剂,吸入剂,滴眼剂,眼软膏剂,洗眼剂,阴道子宫托,阴道环,阴道软膏剂,注射溶液,原位转化溶液例如原位胶凝化、原位沉降、原位沉淀、原位结晶的溶液,输注溶液,和植入物。

[0321] 本发明组合物可以进一步例如通过共价、疏水和静电相互作用化合在或连接至药物载体、药物递送系统和高级药物递送系统中,以便进一步增强修饰的GH蛋白质的稳定性,增加生物利用度,增加溶解度,减少不良作用,实现本领域技术人员熟知的的治疗,和提高患者顺从或其任意组合。载体,药物递送系统和高级药物递送系统的实例包括但不限于聚合物例如纤维素和衍生物,多糖例如右旋糖酐和衍生物,淀粉和衍生物,聚(乙烯基醇),丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯聚合物,聚乳酸和聚乙醇酸及其嵌段共聚物,聚乙二醇,载体蛋白质例如白蛋白,凝胶例如热凝胶化系统,例如本领域技术人员熟知的嵌段共聚物系统,胶束,脂质体,微球,纳米颗粒,液体晶体及其分散体,L2相及其分散体,本领域技术人员熟知的脂质-水系统中的相行为,聚合物胶束,复合型乳液,自乳化乳液,自微乳化乳液,环糊精及其衍生物,和树状物。

[0322] 组合物可用于固体、半固体、粉末和溶液组合物中,用于肺给药修饰的蛋白质比如修饰的GH蛋白质;给药采用例如定量吸入器、干粉吸入器和雾化器,全部是本领域技术人员熟知的装置。

[0323] 修饰的蛋白质的治疗用途

[0324] 在未修饰蛋白质是治疗性蛋白质的情况下,本发明也涉及修饰蛋白质在治疗中的



用途,和尤其是包含修饰蛋白质的药物组合物。从而,如本文所用,术语“治疗”和“治疗”意指管理和护理患者以抗击病症比如疾病或障碍。该术语期望包括患者所患的给定病症的全部治疗,比如给予活性化合物以减轻症状或并发症,延缓疾病、障碍或病症进展,减轻或缓解症状和并发症,和/或治愈或消除疾病、障碍或条件以及预防病症,其中预防理解为管理和护理患者以抗击病症、条件或障碍;和包括给予活性化合物以预防症状或并发症的发作。待治疗的患者优选是哺乳动物,尤其是人类,但还可以包括动物比如犬、猫、牛、羊和猪。尽管如此,应认识到的是治疗方案和预防(预防性)方案代表本文公开和治疗医师或兽医预期的用途的不同方面。

[0325] “治疗有效量”的修饰蛋白质如本文所用意指足以治愈、减轻或部分中断给定疾病及其并发症的临床表现的量。足以实现其的量定义为“治疗有效量”。用于各意图的有效量取决于例如疾病或伤害的严重性以及受试者的体重、性别、年龄和一般状况。应理解,确定适当剂量可以用常规实验实现,构建各值的矩阵并测试矩阵中的不同点,这全部属于训练有素的医师或兽医的常规技术。

[0326] 本文公开的方法和组合物提供用于治疗的修饰蛋白质。如此,典型肠胃外剂量范围是10~9mg/kg至约100mg/kg体重/给药。典型给药剂量是约0.0000001至约10mg/kg体重/给药。精确剂量取决于例如适应症,药物,给药频率和模式,待治疗受试者的性别、年龄和一般条件,待治疗疾病或病症的性质和严重性,治疗的希望效果和本领域技术人员明了的其它因素。典型剂量给药频率是2次/日,1次/日,隔天1次(bi-daily),2次/周,1次/周或甚至更长的剂量给药间隔。由于活性化合物与相应未缀合蛋白质相比延长的半寿期,具有长剂量给药间隔的剂量给药方案是具体实施方式,比如2次/周,1次/周或甚至更长的剂量给药间隔。许多疾病在治疗中是用多于1种药物来治疗的,其同时给予或按顺序地给予。因此预期的是,用于治疗疾病中的一种的治疗方法中的修饰蛋白质能够与一种或多种通常用于治疗疾病的其它治疗活性化合物组合使用。也预期的是,修饰蛋白质与通常用于治疗疾病的其它治疗活性化合物组合在制备用于该疾病的药物中的用途。

## 实施例

[0327] 修饰化合物的一般制备方法

[0328] 除非另有指定,原料一般获自商业来源比如Aldrich Chemicals Co. (Milwaukee,Wis.),Lancaster Synthesis,Inc. (Windham,N.H.),Acros Organics (Fairlawn,N.J.)。微生物转谷氨酰胺酶提供自Ajinomoto North America,Inc. (Itasca, IL)。CRM<sub>197</sub> (CAS编号92092-36-9) 获自Aldrich Chemicals Co. (Milwaukee,Wisconsin)。一甲基阿里他汀(auristatin)F 是购自Concortis (San Diego,CA)。环辛炔试剂购自Synaffix (Nijmegen, The Netherlands)。MenA抗原性多糖由Novartis NV&D供给。

[0329] 修饰化合物通过柱色谱法(Interchim puriflash 430)纯化和通过 NMR光谱(400MHz Bruker),LCMS (Waters Acquity UPLC-UV-CAD-MS) 和LCUV (Agilent 1200series UPLC-UV) 分析。标记的CRM<sub>197</sub>通过LCMS (UPLC-UV-TOF-MS HRMS Waters Acquity UPLC Qtof) 表征。标记的CRM<sub>197</sub>通过amicon过滤器(3kDa或10kDa MWC0) 和/或SEC (General ElectricÄKTA纯化器) 纯化。

[0330] 蛋白质修饰位点的鉴定(位点选择性)通过蛋白质测绘来表征。用于实施例中的

mTGase是来自Anjinomoto North America, Inc. (Itasca, IL) 的微生物转谷氨酰胺酶。

[0331] 用于下文实施例的下述首字母缩拼词具有相应含义：

[0332] MMAF:单甲基阿里他汀F

[0333] mTGase:微生物转谷氨酰胺酶

[0334] MWC0:分子量截断

[0335] NHS:N-羟基琥珀酰亚胺

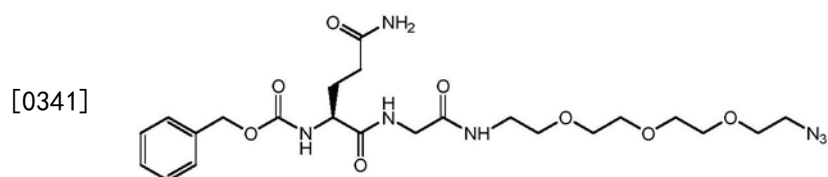
[0336] BCN-NHS: (1R,8S,9s)-二环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基N-琥珀酰亚胺基碳酸酯

[0337] HATU: (O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐)

[0338] RT:室温

[0339] Rt:保留时间

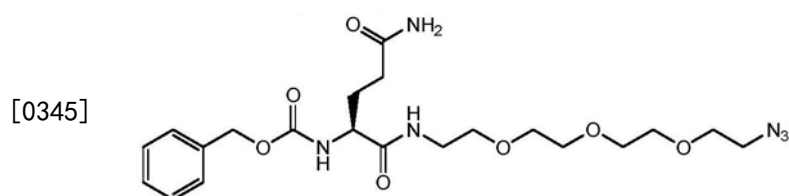
[0340] Z-Q-G-NH- (PEG)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>:



[0342] 将可商购的ZQG (1g, 2.96mmol), 胺-PEG-叠氮化物 (0.882mL, 4.45mmol), DIPEA (1.553mL, 8.89mmol), 和HATU (1.127g, 2.96 mmol) 一起加入DMF, 在RT搅拌16小时。将溶液直接加载至55g C-18 RP柱和通过柱色谱法用5-80% MeCN/水纯化。由于需要大量MeOH来加载样品, 观察坏峰形。减少希望峰的体积并再加载于柱上。产品通过柱色谱法用5-80% MeCN/水第二次纯化。收率: 300mg (19%收率)。

[0343] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 1.65-1.79 (m, 1H) 1.82-1.95 (m, 1H) 2.07-2.17 (m, 2H) 3.14-3.26 (m, 2H) 3.36-3.44 (m, 4H) 3.46 -3.56 (m, 8H) 3.57-3.62 (m, 2H) 3.68 (d, J=5.81Hz, 2H) 3.91-4.04 (m, 1H) 5.03 (d, J=2.27Hz, 2H) 6.77 (br. s., 1H) 7.23-7.34 (m, 2H) 7.34-7.39 (m, 4H) 7.55 (d, J=7.58Hz, 1H) 7.82 (t, J=5.56Hz, 1H) 8.16 (t, J=5.68Hz, 1H); HRMS计算值 (C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>): 537.2547 实测值: (M+1) 538.2623。

[0344] ZQ-NH- (PEG)<sub>3</sub>N<sub>3</sub>

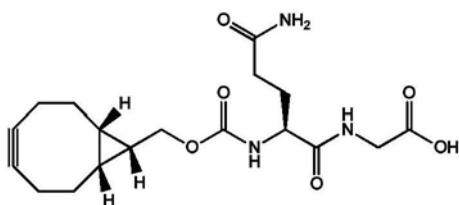


[0346] 将可商购的NH<sub>2</sub>- (PEG)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (0.087mL, 0.318mmol), Huenig碱 (0.069mL, 0.398mmol), 和可商购的ZQ-NHS (100mg, 0.265mmol) 组合于DMSO和在RT混合16小时。将反应直接加载至35g C-18柱以纯化, 采用10-75% MeCN/H<sub>2</sub>O。收率: 90mg (70%收率)。

[0347] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 1.62-1.75 (m, 1H) 1.77-1.91 (m, 1H) 2.08 (dt, J=9.14, 5.88Hz, 2H) 3.11-3.27 (m, 2H) 3.35-3.43 (m, 4H) 3.48-3.56 (m, 8H) 3.57-3.62 (m, 2H) 3.94 (td, J=8.31, 5.38 Hz, 1H) 5.01 (s, 2H) 6.73 (br. s., 1H) 7.23 (br. s., 1H) 7.28-7.41 (m, 6H) 7.88 (t, J=5.62Hz, 1H); HRMS计算值 (C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>): 480.2332 实测值: (M+1) 481.2440。

[0348] 环辛炔-环丙基-CH<sub>2</sub>-OC(O)NH-Q-G

[0349]

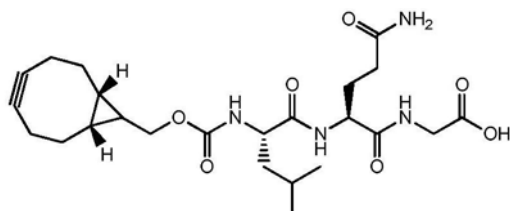


[0350] 将可商购的QG (92mg, 0.316mmol) 和Huenig碱 (64.5μL, 0.369 mmol) 溶于2mL的1:1 水:DMSO, 温热至35℃。将可商购的click-easy™ BCN N-羟基琥珀酰亚胺酯I (50mg, 0.246mmol) 溶于2mL DMSO和缓慢加至反应。反应于40℃混合1小时。产物通过柱色谱法 (20g C-18, 0-70MeCN/水) 纯化。产物用约50%MeCN洗脱。收率: 46mg (49%收率)。

[0351] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 0.87 (t, J=9.66Hz, 2H) 1.27 (quin, J=8.53Hz, 1H) 1.52 (d, J=10.88Hz, 2H) 1.62-1.75 (m, 1H) 1.81-1.95 (m, 1H) 2.04-2.25 (m, 8H) 3.14 (br.s., 1H) 3.49-3.73 (m, 2H) 3.89-3.99 (m, 1H) 4.05 (d, J=7.95Hz, 2H) 6.72 (br.s., 1H) 7.21-7.31 (m, 2H) 7.88 (br.s., 1H); HRMS计算值 (C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>): 379.1743 实测值: (M+1) 380.1811。

[0352] 环辛炔-环丙基-CH<sub>2</sub>-OC(O)NH-L-Q-G

[0353]

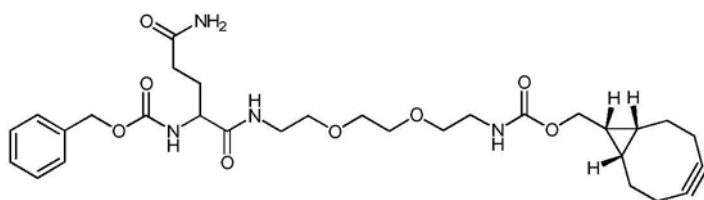


[0354] 亮氨酸-谷氨酰胺-甘氨酸肽用肽合成器制备。合成器编程用于亮氨酸-谷氨酰胺-甘氨酸序列。回收树脂, 用TFA除去肽。溶液缓慢加至醚 (冷), 沉淀产物。离心溶液, 倾析醚。将固体溶于水, 通过柱色谱法 (35g RP C-18柱) 纯化。产物用100%水洗脱, 84%收率。

[0355] 将亮氨酸谷氨酰胺甘氨酸肽 (30mg, 0.07mmol), Huenig碱 (0.030 mL, 0.174mmol), 和可商购的click-easy™ BCN N-羟基琥珀酰亚胺酯 I (20mg, 0.070mmol) 组合在DMF中, 室温搅拌五小时。将反应直接加载至20g C-18柱 (0-20%MeCN/水) 和在10CV上纯化, 产生20mg (58%收率) 产物。HRMS计算值 (C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>): 492.2584实测值: (M+1) 493.2682。

[0356] Z-Q-NH-(PEG)<sub>2</sub>-NHC(O)O-CH<sub>2</sub>-环丙基环辛炔

[0357]



[0358] 将DMSO中的商业BocNH-(PEG)<sub>3</sub>-胺 (0.308mL, 0.994mmol) 加入可商购的ZQ-NHS (250mg, 0.663mmol), 在RT搅拌3小时。将反应直接加载至30g C-18柱上, 进行纯化 (0-50% MeCN/水)。产物用45%MeCN洗脱。除去溶剂, 产生白色残余物 (200mg, 59.1%收率)。LCMS 计算值 (C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>): 510.27实测值: (M+1) 511.4。

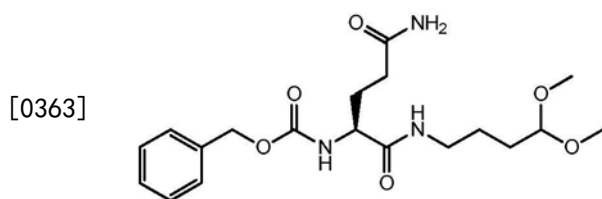
[0359] 将Boc-保护的产物 (200mg, 0.392mmol) 用TFA (3mL, 38.9mmol) 处理, 在RT振摇10分钟。反应在高真空干燥过夜, 将粗制 ZQ-NH-(PEG)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>直接用于后续反应。

[0360] 将Huenig碱 (2mL, 11.45mmol) 加入1mL DMSO中的 ZQ-NH-(PEG)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (150mg,

0.365mmol)。然后加入可商购的 BCN-NHS (106mg, 0.365mmol), 搅拌反应数小时。产物通过柱色谱法 (35g C-18柱15-75%MeCN/水) 纯化。产物在DMSO峰下以及在~60% MeCN洗脱。合并级分, 浓缩至10mL。于20-50%MeCN/水运行第二柱。产物用45%MeCN洗脱。减压除去溶剂, 产生50mg (23%收率) 产物。

[0361]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ ppm 0.78-0.91 (m, 2H) 1.26 (quin,  $J=8.53\text{Hz}$ , 1H) 1.41-1.59 (m, 2H) 1.62-1.75 (m, 1H) 1.77-1.90 (m, 1H) 1.95-2.30 (m, 8H) 3.11 (q,  $J=5.95\text{Hz}$ , 2H) 3.20 (td,  $J=12.87, 6.66\text{Hz}$ , 2H) 3.36-3.42 (m, 4H) 3.49 (s, 4H) 3.88-3.98 (m, 1H) 4.02 (d,  $J=8.07\text{Hz}$ , 2H) 5.01 (s, 2H) 6.73 (br. s., 1H) 7.07 (t,  $J=5.44\text{Hz}$ , 1H) 7.23 (br. s., 1H) 7.29-7.37 (m, 6H) 7.88 (t,  $J=5.62\text{Hz}$ , 1H)。HRMS计算值 ( $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_8$ ): 586.3003 实测值: (M+1) 587.3092。

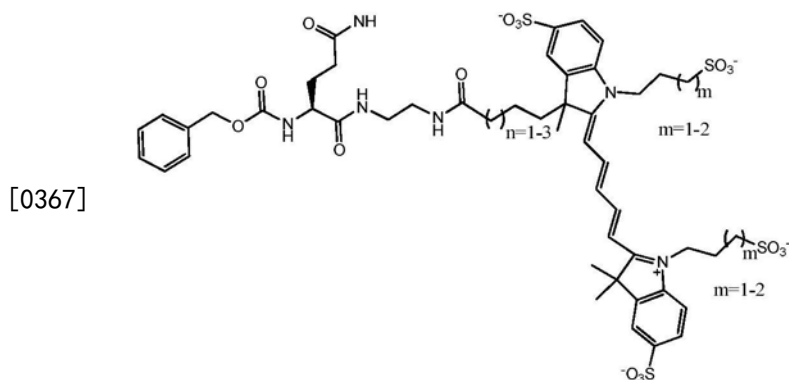
[0362] Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-二甲基缩醛



[0364] 将ZQNHS (100mg, 0.265mmol), 4,4-二甲氧基丁烷-1-胺 (0.049 mL, 0.292mmol), 和Huenig碱 (0.046mL, 0.265mmol) 溶于DMF, 在 RT混合1小时。将反应直接加载至35g C-18柱以纯化 (0-40% MeCN/H<sub>2</sub>O)。减压除去溶剂, 产生50mg (48%收率) 产物。

[0365]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ ppm 1.30-1.43 (m, 2H) 1.43-1.54 (m, 2H) 1.58-1.75 (m, 1H) 1.76-1.89 (m, 1H) 2.01-2.16 (m, 2H) 3.04 (dt,  $J=12.57, 6.47\text{Hz}$ , 2H) 3.19 (s, 6H) 3.89 (td,  $J=8.46, 5.31\text{Hz}$ , 1H) 4.32 (t,  $J=5.56\text{Hz}$ , 1H) 5.00 (s, 2H) 6.76 (br. s., 1H) 7.26 (br. s., 1H) 7.28-7.42 (m, 6H) 7.86 (t,  $J=5.68\text{Hz}$ , 1H) LCMS计算值 ( $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$ ): 395.21 实测值: (M+1) 396.5。

[0366] Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-C(=O)-CH<sub>2</sub>-Alexafluor647

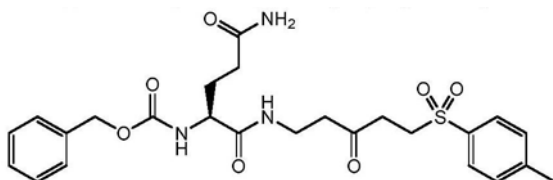


[0368] 将可商购的ZQ-NHS (286mg, 0.758mmol), Huenig碱 (0.5mL, 2.86mmol) 和 (2-氨基乙基) 氨基甲酸叔丁酯 (0.3mL, 1.498mmol) 组合在 DCM中并超声。溶液搅拌16小时。过滤反应, 用DCM洗涤随后蒸发。残余物溶于MeOH/DCM 1:10, 通过HCO<sub>3</sub>捕捉和释放柱以除去酸副产物。所得产物用15mL DCM中的TFA (1mL, 12.98mmol) 加入处理。反应混合30分钟, 然后在旋蒸仪上蒸发。残余物溶于MeOH/DCM 1:10和通过HCO<sub>3</sub>捕捉和释放柱以除去酸副产物。除去溶剂, 产生300mg (91%收率) 产物。

[0369] 所得胺连接体 (5.1mg, 0.016mmol) 溶于DMSO (0.5mL), 加入 Huenig碱 (3.66μl, 0.021mmol)、随后Alexflour647 (5mg, 5.24μmol)。反应在室温搅拌。反应直接加载至35g C-18柱, 进行柱色谱法纯化 (5-35% MeCN/水)。产物用~10% MeCN洗脱。冻干产物, 产生深紫色粉末。收率: 3.5mg (57%收率)。HRMS计算值 ( $C_{51}H_{67}N_6O_{17}S_4^+$ ): 质量期望值: 1163.34 质量实测值: M+1, 1164。

[0370] Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-Tol

[0371]



[0372] 将3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸 (2g), HATU (4.42g), Huenig碱 (4.62mL) 和N,0-二甲基盐酸羟胺 (1.134g) 组合在DCM中, 在RT搅拌 2小时。反应倾至水中, 萃取有机物。蒸发有机层, 产生粗制黄色油状物。产物通过柱色谱法纯化 (50g C-18, 10-70% MeCN/水)。收集级分, 浓缩, 产生黄色油状物, 收率: 1.3g, 53%收率。期望质量: 232, 实测 M+1: 233。

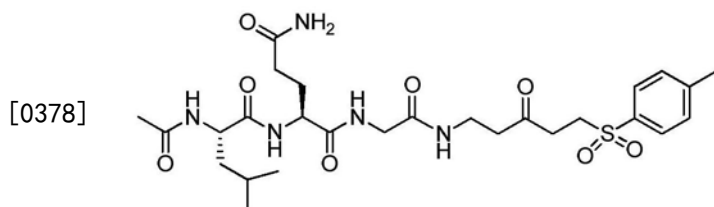
[0373] 将(3-(甲氧基(甲基)氨基)-3-氧代丙基)氨基甲酸叔丁酯 (1.3g, 5.60 mmol) 溶于无水THF, 烧瓶用氮吹扫。将溶液冷却至0℃, 然后缓慢加入THF中的乙烯基镁溴化物 (20mL, 20.00mmol)。反应温热至RT过夜。将反应倾至冷饱和NH<sub>4</sub>Cl中, 用乙酸乙酯萃取。干燥有机物, 在旋蒸仪上除去溶剂。粗制物质直接使用。

[0374] 将(3-氧代戊-4-烯-1-基)氨基甲酸叔丁酯和4-甲基苯硫酚组合在 MeOH中, 在RT搅拌3天。甲醇通过旋蒸仪除去, 产生粘稠油状黄色残余物。残余物溶于DCM, 用水洗涤2x。干燥有机层, 在旋蒸仪上除去溶剂, 产生黄色油状物。该产物 (1g, 3.09mmol) 溶于DCM和冷却至0℃。缓慢加入TFA (3mL, 38.9mmol), 然后温热至RT和搅拌1小时。除去溶剂, 将残余物溶于DCM, 通过碳酸盐捕捉和释放柱、随后羧酸捕捉和释放柱。产物通过两者。洗涤各柱, 合并溶剂, 然后通过旋蒸仪蒸发溶剂。产物通过柱色谱法 (50g C-18 10-70% MeCN/水) 纯化。收集产物, 蒸发除去溶剂, 产生黄色油状物。收集产物, 蒸发除去溶剂, 产生黄色油状物。产物直接使用, 不加进一步纯化。850mg, 定量收率。

[0375] 将1-氨基-5-(对-甲基苯基硫基)戊烷-3-酮 (100mg, 0.448mmol) 和 Huenig碱 (0.130mL, 0.746mmol) 溶于DMF, 然后加入可商购的 ZQ-NHS (141mg, 0.373mmol), 在RT混合。产物通过柱色谱法 (25g C-18柱 10-75% MeCN/水) 纯化。收集产物, 有机物通过旋蒸仪蒸发。将MeOH加至水中的硫化物连接体。加入过一硫酸氢钾 (229mg, 0.373 mmol), 反应在RT搅拌过夜。过滤反应, 通过柱色谱法 (25g C-18柱 10-75% MeCN/水) 纯化, 将产物冻干至75mg (39%收率)。

[0376] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 1.59-1.72 (m, 1H) 1.75-1.89 (m, 1H) 2.06 (dt, J=8.99, 5.90Hz, 1H) 2.42 (s, 3H) 2.60 (t, J=6.60 Hz, 2H) 2.77 (t, J=7.40Hz, 2H) 3.11-3.26 (m, 2H) 3.39-3.48 (m, 2H) 3.86 (td, J=8.28, 5.32Hz, 1H) 5.01 (d, J=1.83Hz, 3H) 6.74 (br. s., 1H) 7.23 (br. s., 1H) 7.28-7.42 (m, 6H) 7.47 (d, J=8.19Hz, 2H) 7.78 (d, J=8.19Hz, 2H) 7.83 (t, J=5.50Hz, 1H)。HRMS计算值 ( $C_{25}H_{31}N_3O_7S$ ): 质量期望值: 517.1883 质量实测值: M+1, 518.1974。

[0377] Ac-L-Q-G-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-Tol



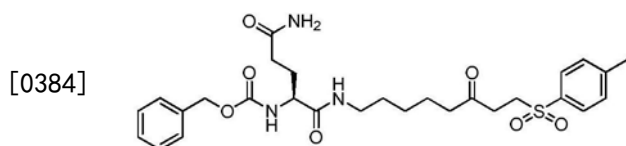
[0379] 1-氨基-5-(对-甲苯基磺基)戊烷-3-酮按上文合成 Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-Tol的描述制备。LQG按上文合成环辛炔-环丙基-CH<sub>2</sub>-OC(O)NH-L-Q-G描述制备。LQG在N-末端乙酰化:将LQG(27mg,0.085mmol),Ac<sub>2</sub>O(9.66μl,0.102mmol)和Huenig碱(0.045mL,0.256mmol)组合于DCM,在RT搅拌数小时。蒸发溶剂和加水。产物冻干,直接用于后续反应。LCMS实测质量:(M+1)359.2;希望质量:358.4

[0380] 将Ac-LQG(38mg,0.106mmol),1-氨基-5-(对-甲苯基磺基)戊烷-3-酮(47.4mg,0.212mmol),和Huenig碱(0.074mL,0.424mmol)组合在DMF中。加入HATU(40.3mg,0.106mmol),反应在RT搅拌过夜。通过柱色谱法(35g C-18柱10-50%MeCN/水)纯化以产生产物。

[0381] 将硫化物(13.5mg,0.024mmol)溶于1:1水:MeOH。加入过一硫酸氢钾(44.2mg,0.072mmol),反应在RT搅拌过夜。产物通过柱色谱法(25g C-18柱10-60%MeCN/水)纯化。

[0382] <sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 0.85(dd,J=16.08,6.54Hz,6H) 1.36-1.45(m,2H) 1.59(dt,J=13.27,6.57Hz,1H) 1.69-1.79(m,1H) 1.83(s,3H) 2.00-2.14(m,2H) 2.41(s,3H) 2.57-2.64(m,2H) 2.75(t,J=7.40Hz,2H) 3.18(q,J=6.52Hz,1H) 3.27(s,2H) 3.41(t,J=7.40Hz,2H) 3.59(dd,J=5.75,3.18Hz,2H) 4.07-4.17(m,1H) 4.21-4.30(m,1H) 6.74(br.s.,1H) 7.24(br.s.,1H) 7.46(d,J=7.95Hz,2H) 7.68(t,J=5.50Hz,1H) 7.76(d,J=8.31Hz,2H) 7.93-8.05(m,2H) 8.11(d,J=7.09Hz,1H) HRMS计算值(C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S)希望质量:595.2676实测质量:(M+1)596.2755。

[0383] Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-Tol



[0385] 将6-((叔丁氧基羰基)氨基)己酸(1g,4.32mmol)溶于DCM,然后加入N,N-二甲基盐酸羟胺(0.464g,4.76mmol),HATU(1.808g,4.76mmol),和TEA(0.723mL,5.19mmol)。反应在RT搅拌数小时,因反应并未完成,加入额外的胺、HATU和TEA。反应搅拌16小时。过滤反应,蒸发溶剂。加入醚,再次过滤反应。产物通过柱色谱法(25g柱0-45%EtOAc/Hep)纯化至385mg(32.5%收率)。

[0386] 将(6-(甲氧基(甲基)氨基)-6-氧代己基)氨基甲酸叔丁酯(385mg,1.403mmol)溶于无水THF,冷却至0℃。缓慢加入乙烯基镁溴化物(4.210mL,4.21mmol)。让反应温热至RT过夜。将反应倾至饱和NH<sub>4</sub>Cl中,有机物用EtOAc萃取。有机层用水和盐水洗涤,干燥和蒸发。产物通过柱色谱法纯化(Sunfire RP HPLC 10-40%MeCN/水0.1%TFA,在10分钟内,226nm UV),提供280mg(83%收率)。

[0387] 将(6-氧代辛-7-烯-1-基)氨基甲酸叔丁酯(280mg,1.160mmol)和4-甲基苯磺酰(173mg,1.392mmol)溶于MeOH,在RT搅拌16小时。除去甲醇,产物通过色谱法(25g柱0-30%

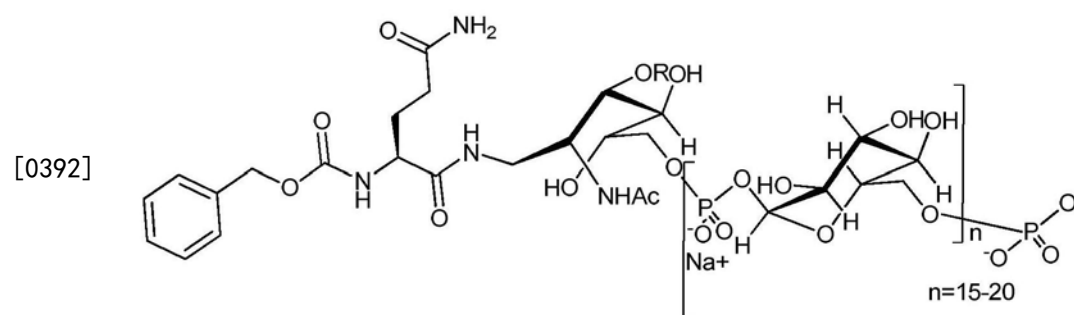
EtOAc/Hep) 纯化, 产生160mg (38% 收率)。

[0388] 将(6-氧代-8-(对-甲苯基硫基)辛基)氨基甲酸叔丁酯(160mg, 0.438 mmol)和过一硫酸氢钾(807mg, 1.313mmol)一起组合在MeOH/水50/50 中, 在RT搅拌16小时。反应倾至水中, 用DCM萃取。蒸发干燥有机层, 加入4摩尔浓度的HCl二噁烷溶液, 在RT搅拌数小时。蒸发除去溶剂, 产生灰白色残余物。产物通过Sunfire RP HPLC(10-40%MeCN/ 水0.1%TFA) 纯化, 产生33mg (25% 收率)。

[0389] 将8-氨基-1-甲苯磺酰基辛烷-3-酮(20mg, 0.067mmol)和可商购的 ZQNHS(23.07mg, 0.061mmol)组合在DMSO中, 于37℃混合1小时。反应并未完成, 在数小时后未观察到进程。加入Huenig碱(5.34μl, 0.031 mmol), 反应推进。将反应直接加载至柱(6g C-180-75%MeCN/水)以纯化。过柱两次直至2.4mg (7% 收率)。

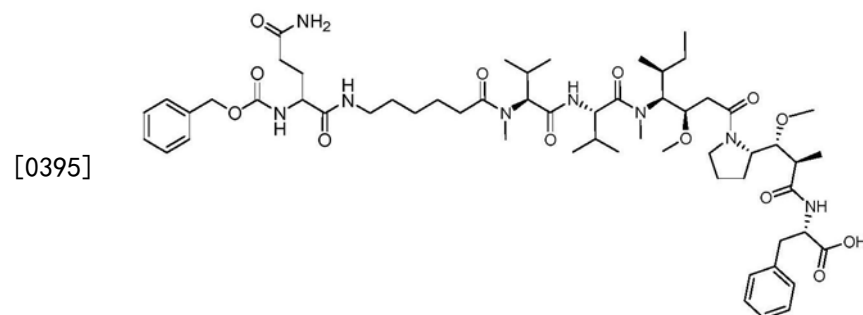
[0390]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{ppm}}$  1.17 (q,  $J=7.58\text{Hz}$ , 2H) 1.28 -1.44 (m, 4H) 1.61-1.75 (m, 1H) 1.77-1.90 (m, 1H) 2.00-2.16 (m, 2H) 2.37-2.43 (m, 5H) 2.74 (t,  $J=7.34\text{Hz}$ , 2H) 2.92-3.08 (m, 2H) 3.43 (t,  $J=7.34\text{Hz}$ , 2H) 3.90 (td,  $J=8.31, 5.50\text{Hz}$ , 1H) 5.01 (s, 2H) 6.74 (br.s., 1H) 7.25 (br.s., 1H) 7.28-7.40 (m, 6H) 7.46 (d,  $J=7.82\text{Hz}$ , 2H) 7.77 (d,  $J=8.31\text{Hz}$ , 2H) 7.78-7.84 (m, 1H)。HRMS计算值 ( $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ ): 559.2352实测值: (M+1) 560.2426。

[0391] Z-Q-NH-MenA多糖



[0393] 将胺官能化的MenA抗原性多糖(10mg)加入DMSO中的可商购的 ZQNHS(10mg 26.4μmol)和碱, 搅拌数小时。冻干反应, 溶于水, 和通过10KD Amicon滤器纯化4x。然后, 将流过物通过3KD Amicon以回收额外产物。粗制品用于后续, 估计收率为~50%。

[0394] Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(0)-单甲基阿里他汀F



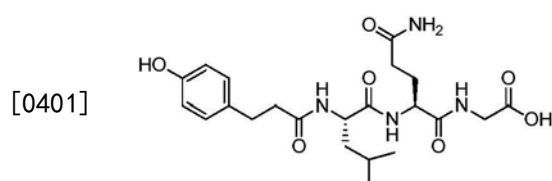
[0396] 将6-((叔丁氧基羰基)氨基)己酸(46.5mg, 0.201mmol)溶于DMSO (1mL), 加入Huenig碱(0.08mL, 0.458mmol)和HATU(76mg, 0.201 mmol)。反应在RT搅拌30分钟, 随后将反应混合物加入MMAF(50mg, 0.067mmol)。反应然后在RT搅拌4小时。将反应混合物直接加载至35 g C-18柱, 以通过柱色谱法(5-75%MeCN/水0.1%甲酸)纯化。在旋蒸仪上除去溶剂, 置于高真空下过夜。

[0397] 所得产物用TFA (2mL) 于0℃处理,升至室温搅拌5分钟。将反应直接加载至35g C-18柱进行柱纯化。减压除去溶剂,产生30mg (52%收率)。

[0398] 将脱保护的胺 (20mg, 0.023mmol) 溶于THF, 然后加入LiOH (1 mL, 4.00mmol)。反应在RT搅拌30分钟, 然后直接加载至柱 (35g C-18 柱) 以纯化 (0% MeCN随后20-40% MeCN/水)。产物用THF洗脱, 在上述条件下再过柱, 产生10mg, 51%收率。

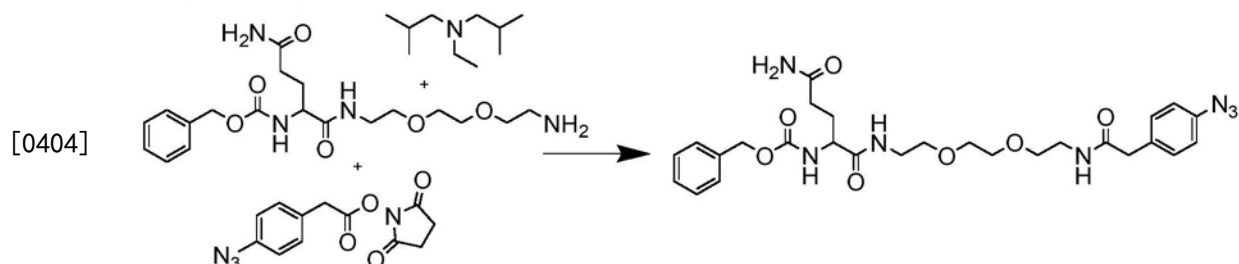
[0399] 将所得产物 (5mg, 5.92μmol) 溶于DMSO, 加至可商购的ZQNHS (4.4mg, 0.012mmol), 于37℃搅拌20分钟。反应混合物直接加载至25 g C-18柱进行柱色谱法纯化 (20-75% MeCN/水)。减压除去溶剂, 产生3 mg, 46%收率。LCMS计算值 (C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>): 1106.6627实测值: (M+1) 1107.9。

[0400] 苯酚-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(=O)-L-Q-G



[0402] LQG按上文“合成环辛炔-环丙基-CH<sub>2</sub>-OC(=O)-NH-L-Q-G”的描述制备。将可商购的2, 5-二氧化吡咯烷-1-基-3-(4-羟基苯基) 丙酸酯 (14.65 mg, 55.6μmol) 加至DMSO中的LQG (16mg, 50.6μmol) 和Huenig碱 (18 uL, 101μmol), 室温搅拌反应过夜。将反应直接加载至20g柱上进行纯化 (10-50% MeCN/水), 产生13mg产物, 55%收率。HRMS计算值 (C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>): 464.2271实测值: (M+1) 465.2356。

[0403] ZQ (PEG) 2叠氮基苄基酰胺

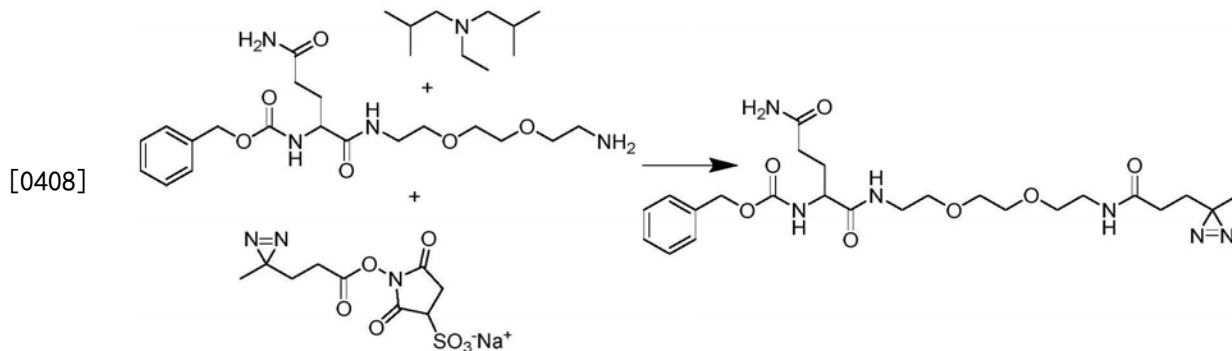


[0405] 将4-叠氮基苯乙酸N-琥珀酰亚氨基酯 (ChemPacfic, 26.7mg, 0.073 mmol) 溶于DMF (1mL), 与 (5-氨基-1-((2-(2-(2-氨基乙氧基) 乙氧基) 乙基) 氨基)-1,5-二氧化戊烷-2-基) 氨基甲酸苄酯 (20mg, 0.049mmol) 的DMF (2.3mL) 溶液组合。加入DIPEA (0.121mL, 0.585mmol), 反应在室温混合4小时, 此时加入DIPEA (61μL, 6当量) 和4-叠氮基苯乙酸N-琥珀酰亚氨基酯 (9mg, 0.024mmol)。反应在室温混合2天。加入4-叠氮基苯乙酸N-琥珀酰亚氨基酯 (89mg, 0.24mmol), 反应在室温搅拌2小时。溶液经由MS-触发的HPLC纯化 (100-Prep3; 酸法3; Sunfire 30x50 mm 5μm柱ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1% TFA 75ml/min, A: 水 (0.1% 甲酸); B: ACN, 梯度: 0分钟5%B; 1.70分钟5%至95%B; 2.0分钟95%B; 2.1分钟5%B, 流速2ml/min

[0406] 1.5ml注射; 管触发M=570)。汇集具有希望产物的级分, 冻干, 提供3.6mg浅黄色粉末 (13%) 的ZQ (PEG) 2叠氮基-苄基酰胺 ((17-氨基 -1-(4-叠氮基苯基)-2,13,17-三氧代-6,9-二氧杂-3,12-二氮杂十七烷-14-基) 氨基甲酸苄酯)。LCMS SQ2; 产物分析-酸性; R<sub>t</sub>=1.79; MS [M+H]<sup>+</sup> 实测值: 570.3, 计算值: 569.6。

[0407] ZQ (PEG) 2酰胺基乙基甲基二氮丙因



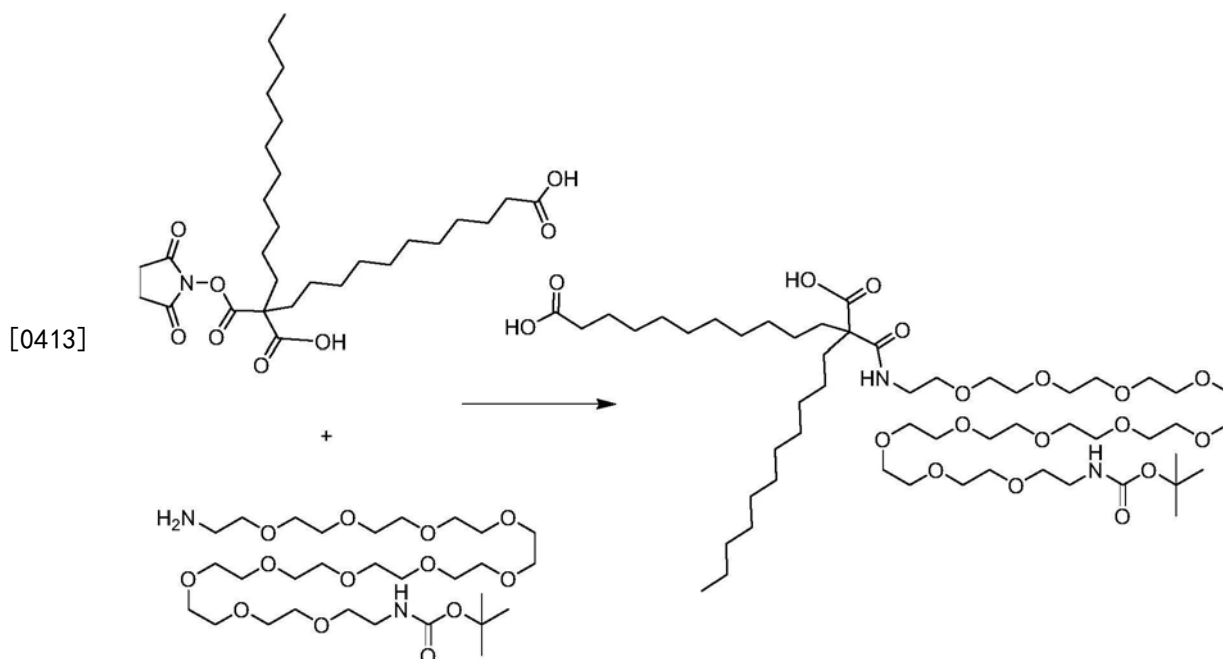


[0409] 将磺基-NHS-二氮丙因(Thermo Scientific, 23.92mg, 0.073mmol) 溶于DMF (1mL), 与(5-氨基-1-((2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基)-1,5-二氧代戊烷-2-基)氨基甲酸苄酯(20mg, 0.049mmol)的DMF (2.3 mL) 溶液组合。搅拌组合反应物, 加入DIPEA (0.121mL, 0.585mmol)。反应在室温搅拌2小时, 此时反应变得混浊和加入0.5mL DMF。搅拌反应额外2小时, 加入DIPEA (61μL) 和磺基-NHS-二氮丙因(8mg)。反应在室温混合16小时, 此时通过LCMS分析观察原料消耗。溶液经由 MH-触发的HPLC纯化(100-Prep3; 酸法3; Sunfire 30x50mm 5μm柱 ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1%TFA 75ml/min, 1.5ml注射; 管触发M=521)。汇集具有希望产物的级分, ZQ (PEG)<sub>2</sub>酰胺基乙基甲基二氮丙因((18-氨基 -1-(3-甲基-3H-二氮丙因-3-基)-3,14,18-三氧代-7,10-二氧杂-4,13-二氮杂十八烷-15-基)氨基甲酸苄酯), 冻干, 提供2mg希望化合物, 是白色粉末(8%)。LCMS SQ2; 产物分析-酸性; R<sub>t</sub>=1.49; MS [M+H]<sup>+</sup>实测值: 521.4, 计算值: 520.6。

[0410] 2-(((2,5-二氧代吡咯烷-1-基)氧基)羰基)-2-十一烷基十三烷二酸



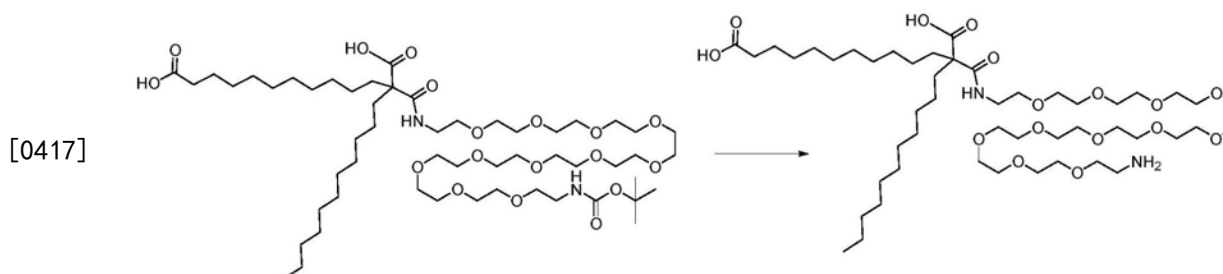
[0412] 在N<sub>2</sub>下将DCC (126mg, 0.610mmol) 的DCM (1.57mL) 溶液加至中间体4和N-羟基琥珀酰亚胺的DCM (5mL) 和THF (5mL) 溶液。在3.5 小时之后, 蒸发溶剂, 残余物通过超临界流体色谱法(SFC; Princeton 2- 乙基-吡啶, 20x150mm, 20-30%MeOH/CO<sub>2</sub>) 纯化, 产生标题化合物, 是无色油状物(138mg, 0.256mmol, 50%): LCMS方法B R<sub>t</sub>=1.21min, M+H 540.5; <sup>1</sup>H NMR (600MHz, 乙腈-d<sub>3</sub>) δppm 0.91 (t, J=7.20Hz, 3H) 1.22-1.42 (m, 34H) 1.57 (quin, J=7.34Hz, 2H) 1.93-1.96 (m, 2H) 2.28 (t, J=7.47Hz, 2H) 2.79 (br.d, J=6.30Hz, 4H)。



[0414] 2-((2,2-二甲基-4-氧代-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-十二氧杂-5-氮杂四十烷-40-基)氨基甲酰基)-2-十一烷基十三烷二酸。

[0415] 将叔-Boc-N-酰胺基-**dPEG®<sub>11</sub>**-胺(100mg,0.155mmol,Quanta Biodesign)和2-(((2,5-二氧代吡咯烷-1-基)氧基)羰基)-2-十一烷基十三烷二酸(80mg,0.148mmol)溶于THF(3mL),在室温下、在氮下搅拌。在30分钟之后,加入DIPEA(0.05mL,0.286mmol),反应混合物在室温下搅拌过夜。通过LCMS观察到完全转化(酸性洗脱液A:水+0.05%三氟乙酸,洗脱液B:ACN,柱Sunfire C183.5 $\mu$ m 3.0x30mm-40 $^{\circ}$ C, 5-95%梯度2分钟,保留时间1.92分钟)。减压浓缩反应混合物,然后溶于约1.5mL乙腈。在MS-触发的HPLC上纯化(Sunfire 30x50mm 5 $\mu$ m 柱,ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1%TFA,75ml/min,1.5ml注射,65-95%ACN, 3.5分钟梯度,保留时间3.23分钟),汇集级分,冻干提供85mg清洁产物,54%收率。透明油状物。LCMS:SQ4, RXNMON-酸性-非极性R<sub>t</sub>= 1.18min,M+H 1070.1;<sup>1</sup>H NMR(400MHz,乙腈-d<sub>3</sub>) $\delta$ ppm 0.82-1.03(m,1H) 1.11-1.37(m,10H) 1.37-1.51(m,2H) 1.51-1.64(m,1H) 1.69-1.82(m,1H) 1.90-2.04(m,66H) 2.05-2.21(m,8H) 2.21-2.42(m, 1H) 3.17-3.28(m,1H) 3.40-3.68(m,13H)。

[0416] 2-((35-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十一氧杂三十五烷基)氨基甲酰基)-2-十一烷基十三烷二酸

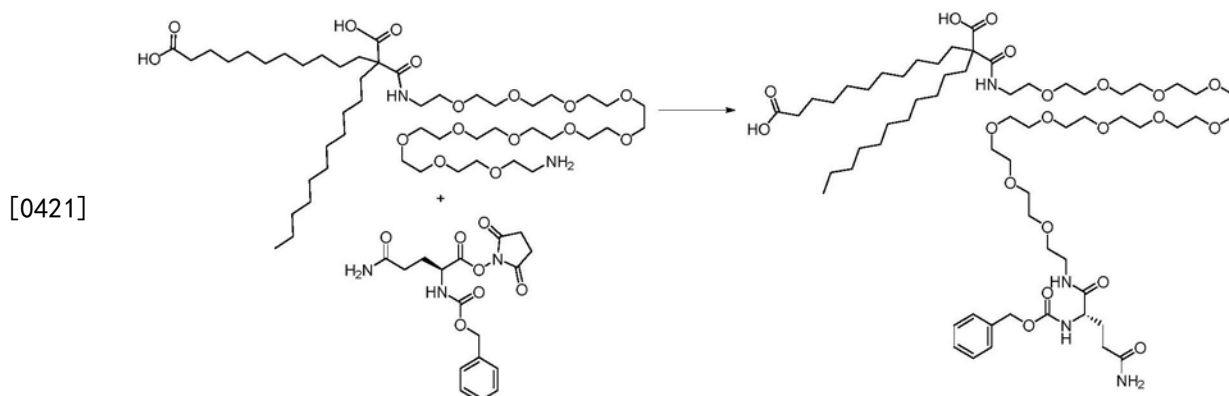


[0418] 将2-((2,2-二甲基-4-氧代-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-十二氧杂-5-氮杂四十烷-40-基)氨基甲酰基)-2-十一烷基十三烷二酸(5mg, 4.68 $\mu$ mol)溶于DCM(体积:2mL),然后加入三氟乙酸(25 $\mu$ l,0.324 mmol)。在室温下、在氮气氛下搅拌反应混合物约2小

时。通过LCMS 观察到完全转化(酸性洗脱液A:水+0.05%三氟乙酸,洗脱液B:ACN,柱Sunfire C183.5 $\mu$ m 3.0x30mm-40 $^{\circ}$ C,5-95%梯度2分钟,保留时间 1.45分钟)。减压浓缩反应混合物,然后用DCM冲洗,再浓缩3次。溶于乙腈和DMSO的混合物。在MS-触发的HPLC上纯化(Sunfire 30x50mm 5 $\mu$ m柱,ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1%TFA 75ml/min,1.5ml注射,45-70%ACN 3.5分钟梯度,保留时间2.50分钟),汇集级分,冻干提供2.5mg清洁产物,55%收率。透明油状物。

[0419] LCMS ZQ1RXNMON\_酸性Rt=1.45min,M+H 969.9;<sup>1</sup>H NMR (400MHz,乙腈-d<sub>3</sub>)  $\delta$ ppm 0.62-0.91 (m,2H) 0.91-1.10 (m,3H) 1.10 -1.31 (m,18H) 1.46 (quin,J=7.21Hz,2H) 1.59-1.89 (m,35H) 1.94 -2.09 (m,1H) 2.16 (t,J=7.40Hz,2H) 2.97-3.11 (m,1H) 3.24-3.37 (m,1H) 3.37-3.61 (m,28H) 3.61-3.89 (m,2H) 7.85 (br.s.,1H)。

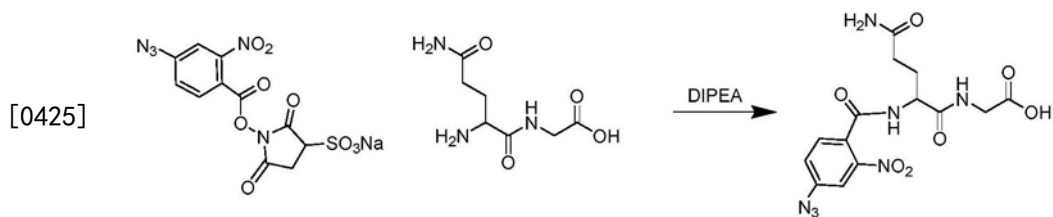
[0420] 2-(((S)-5-(3-氨基-3-氧代丙基)-3,6-二氧代-1-苯基-2,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-十二氧杂-4,7-二氮杂四十二烷-42-基)氨基甲酰基)-2-十一烷基十三烷二酸(ZQ-FA)



[0422] 将2-((2,2-二甲基-4-氧代-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-十二氧杂-5-氮杂四十烷-40-基)氨基甲酰基)-2-十一烷基十三烷二酸(20mg, 0.018mmol)的THF(体积:2mL)溶液加至Z-L-Gln-Osu(Santa Cruz Biotechnology,CAS 34078-85-8,11mg, 0.029mmol),然后加入DIPEA (75 $\mu$ l,0.429mmol)。在室温下、于氮气氛围下搅拌过夜。通过LCMS 观察到完全转化(酸性洗脱液A:水+0.05%三氟乙酸,洗脱液B:ACN,柱Sunfire C183.5 $\mu$ m 3.0x30mm-40 $^{\circ}$ C,5-95%梯度2分钟,保留时间 1.77分钟)。减压浓缩反应混合物,然后溶于乙腈。在MS-触发的HPLC上纯化(Sunfire 30x50mm 5 $\mu$ m柱ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1%TFA 75ml/min, 1.5ml注射,55-80%ACN 3.5分钟梯度,保留时间2.70分钟),汇集级分,冻干以提供10.5mg清洁产物ZQ-FA,46%收率,是透明无色油状物。

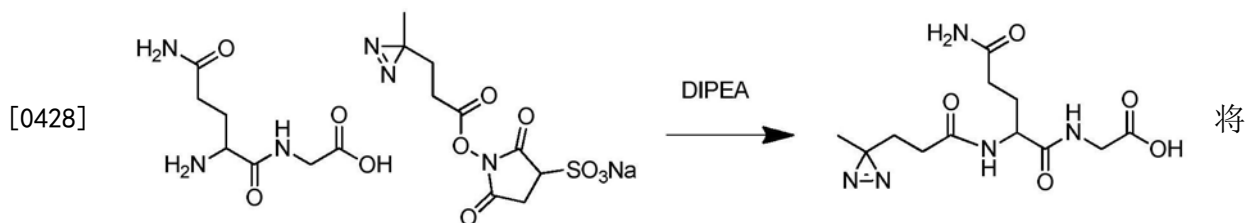
[0423] LCMS SQ4RXNMON\_酸性Rt=1.60min,M+H 1232.4;<sup>1</sup>H NMR (400MHz,乙腈-d<sub>3</sub>)  $\delta$ ppm 0.67-0.93 (m,2H) 0.93-1.10 (m,2H) 1.10 -1.32 (m,15H) 1.45 (quin,J=7.24Hz,1H) 1.59-1.69 (m,1H) 1.75- 1.93 (m,30H) 1.94-2.21 (m,20H) 3.23 (quin,J=5.26Hz,1H) 3.28- 3.51 (m,23H) 3.95 (td,J=7.73,5.44Hz,1H) 4.92-5.22 (m,1H) 5.78 (br.s.,1H) 6.13-6.42 (m,1H) 6.88 (br.s.,1H) 7.20-7.36 (m,2H) 7.42 (t,J=5.07Hz,1H)。

[0424] 叠氮基-硝基苯基-谷氨酰胺-甘氨酸



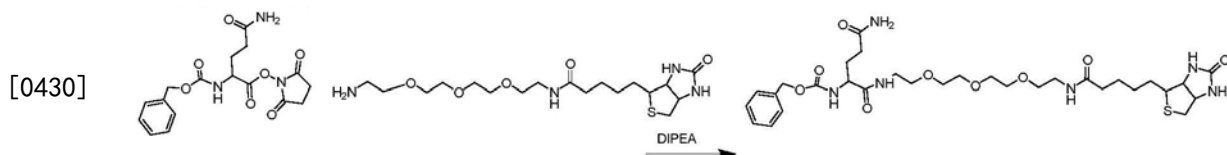
[0426] 将QG (30mg, 0.148mmol) 溶于DMF (体积: 1mL, 比率: 1.000), 将1-((4-叠氮基-2-硝基苯甲酰基)氧基)-2,5-二氧化吡咯烷-3-磺酸钠 (60.1 mg, 0.148mmol) 加入H<sub>2</sub>O (体积: 1.000mL, 比率: 1.000), 随后加入 DIPEA (0.177mmol)。反应搅拌16小时, 此时通过HPLC纯化产物 (Sunfire 30x50mm 5um柱, ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1% TFA 75ml/min, 1.5ml 注射, *rt*=1.53), 提供希望产物, 62%收率。LCMS SQ4RXNMON\_酸性 *Rt*=0.68分钟, *M*+*H* 394.3; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δppm <sup>1</sup>H NMR (甲醇-d<sub>4</sub>, 400MHz): 8.12-8.26 (m, 1H), 7.21-7.40 (m, 2H), 4.60 (dd, *J*=8.3, 5.7Hz, 1H), 3.83-4.15 (m, 2H), 2.36-2.54 (m, 2H), 2.21 (d, *J*=7.5Hz, 1H), 2.07 (d, *J*=6.6Hz, 1H)。

[0427] 二氮丙因-QG



QG (30mg, 0.148mmol) 溶于DMF (体积: 1mL, 比率: 1.000), 将1-((3-(3-甲基-3H-二氮丙因-3-基)丙酰基)氧基)-2,5-二氧化吡咯烷-3-磺酸钠 (50 mg, 0.153mmol) 加入H<sub>2</sub>O (体积: 1.000mL, 比率: 1.000), 随后DIPEA (0.031mL, 0.177mmol)。反应搅拌16小时, 此时产物通过HPLC直接纯化 (Sunfire 30x50mm 5um柱 15-20% 梯度ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1% TFA 75ml/min, 1.5ml注射, *rt*=2.46), 提供希望产物, 52%收率。LCMS SQ4 RXNMON\_酸性 *Rt*=0.61分钟, *M*+*H* 314.2; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇 -d<sub>4</sub>) δppm <sup>1</sup>H NMR (甲醇-d<sub>4</sub>, 400MHz): 4.39 (dd, *J*=8.3, 5.7Hz, 1H), 3.76-4.04 (m, 2H), 2.34 (m, 2H), 2.11-2.19 (m, 2H), 2.07-2.11 (m, 1H), 1.89-2.00 (m, 1H), 1.62-1.74ppm (m, 2H), 1.01 (s, 3H)。

[0429] ZQ (PEG)<sub>3</sub>生物素

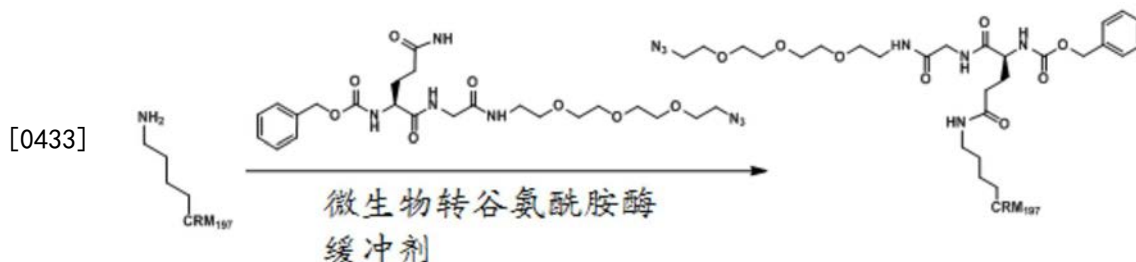


将 ZQ NHS (45.1mg, 0.119mmol), 生物素胺 (穿入猫#21347, 50mg, 0.119 mmol), 和DIPEA (23uL, 0.131mmol) 组合在DMF (2mL) 中, 在室温搅拌2小时, 此时LCMS显示主要产物。将反应加载在HPLC上 (Sunfire 30x50mm 5um柱, 15-20% 梯度ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1% TFA 75ml/min, 1.5ml 注射, *rt*=2.46), 提供希望产物, 43%收率。LCMS SQ4RXNMON\_酸性 *Rt*=0.79分钟, *M*+*H* 681.4; <sup>1</sup>H NMR (甲醇-d<sub>4</sub>, 400MHz): δ=7.33-7.41 (m, 4H), 7.27-7.33 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.48 (dd, *J*=7.8, 4.4Hz, 1H), 4.29 (dd, *J*=7.9, 4.5Hz, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.57-3.67 (m, 8H), 3.49-3.57 (m, 4H), 3.34-3.43 (m, 4H), 3.15-3.23 (m, 1H), 2.92 (dd, *J*=12.8,

5.1Hz, 1H), 2.70 (d, J=12.8Hz, 1H), 2.26-2.36 (m, 2H), 2.21 (t, J=7.4Hz, 2H), 2.04 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.53-1.77 (m, 4H), 1.44ppm (m, 2H)。

[0431] 修饰化合物与CRM<sub>197</sub>的缀合

[0432] Z-Q-G-NH-(PEG)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>

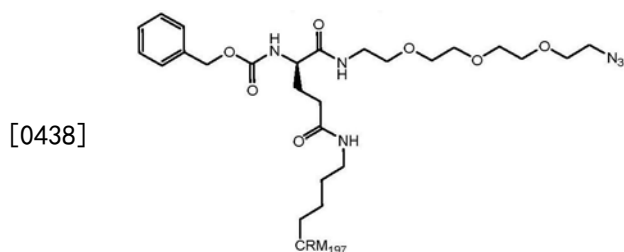


[0434] 在100mM pH 8Tris缓冲剂中,将32μL CRM197 (32mg/mL) 加至 1000μL Z-Q-G-NH-(PEG)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (2mg/mL),加入100μL微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x,制备自商业1% mTGase/麦芽糖环糊精)。反应于25℃温育30分钟。反应经由SEC纯化,采用PBS运行缓冲剂1x,1.5CV。通过质谱观察到一个连接体加入。LCMS计算值:58929;实测值:(M+1) 58930。收率:700ug,68%收率。

[0435] 在100mM pH 8Tris缓冲剂中,将32μL CRM197 (32mg/mL) 加至 1000μL Z-Q-G-NH-(PEG)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (2mg/mL),加入100μL微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x,制备自商业1% mTGase/麦芽糖环糊精)。反应于25℃温育18小时。反应经由SEC纯化,采用PBS运行缓冲剂1x,1.5CV。通过质谱观察到两个连接体加入。LCMS计算值:59450;实测值:(M+1) 59451。收率:700ug,68%收率。

[0436] 在100mM pH 6乙酸钠缓冲剂中,将32uL CRM197 (32mg/mL) 加至1000μL Z-Q-G-NH-(PEG)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (2mg/mL),加入100uL微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x,制备自商业1% mTGase/麦芽糖环糊精)。反应于25℃温育3天。反应经由SEC纯化,采用PBS运行缓冲剂1x,1.5CV。通过质谱观察到三和四个加成。LCMS计算值:59971,60492;实测值:(M+1) 59972,60493。收率:700ug,68%收率。

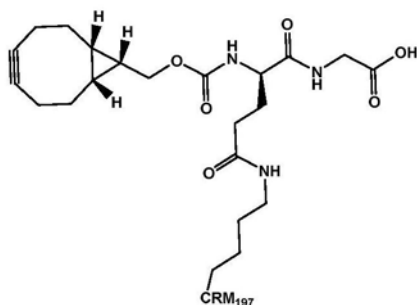
[0437] ZQ-NH-(PEG)<sub>3</sub>N<sub>3</sub>



[0439] 在100mM pH 8Tris缓冲剂中,将63μL CRM197 (32mg/mL) 加至 1800μL ZQ-NH-(PEG)<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (2mg/mL),加入150uL微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x,制备自商业1% mTGase/麦芽糖环糊精)。反应于25℃温育1小时。反应经由SEC纯化,采用PBS运行缓冲剂1x,1.5CV。通过质谱观察到一个连接体加入。LCMS计算值:58872;实测值:(M+1) 58875。收率:1.3mg (67%)。

[0440] 环辛炔-环丙基-CH<sub>2</sub>-OC(O)NH-Q-G

[0441]

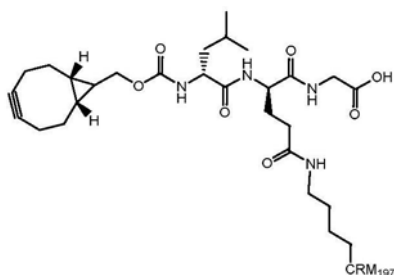


[0442] 在100mM pH 8Tris缓冲剂中,将32 $\mu$ L CRM197 (32mg/mL) 加至 1000 $\mu$ L环辛炔-环丙基-CH<sub>2</sub>-OC(O)NH-Q-G (2mg/mL),加入100 $\mu$ L微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x,制备自商业1% mTGase/ 麦芽糖环糊精)。反应于25℃温育3小时。反应经由SEC纯化,采用PBS运行缓冲剂1x,1.5CV

[0443] 通过质谱观察到一个连接体加入。LCMS计算值:58771实测值: (M+1) 58771。收率: 0.475mg, 50%收率。

[0444] 环辛炔-环丙基-CH<sub>2</sub>-OC(O)NH-L-Q-G

[0445]

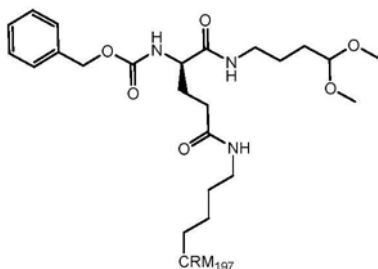


[0446] 在100mM pH 8Tris缓冲剂中,将1 $\mu$ L CRM197 (32mg/mL) 加至 30 $\mu$ L环辛炔-环丙基-CH<sub>2</sub>-OC(O)NH-L-Q-G (2mg/mL),加入3 $\mu$ L微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x,制备自商业1% mTGase/ 麦芽糖环糊精)。反应于25℃温育1小时。通过质谱观察到一个连接体加入。LCMS计算值:58884实测值: (M+1) 58885。

[0447] 在100mM pH 8Tris缓冲剂中,将1 $\mu$ L CRM197 (32mg/mL) 加至 30 $\mu$ L环辛炔-环丙基-CH<sub>2</sub>-OC(O)NH-L-Q-G (2mg/mL),加入3 $\mu$ L微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x,制备自商业1% mTGase/ 麦芽糖环糊精)。反应于25℃温育24小时。通过质谱观察到两个连接体加入。LCMS计算值:59360实测值: (M+1) 59361。

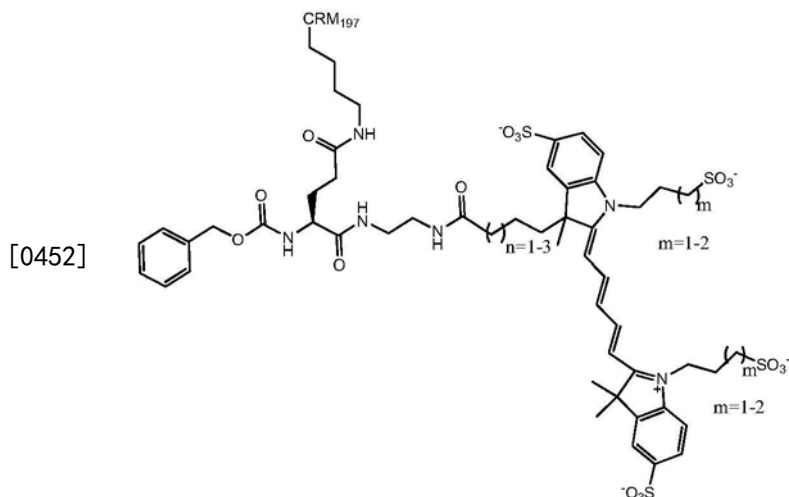
[0448] Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-二甲基缩醛

[0449]



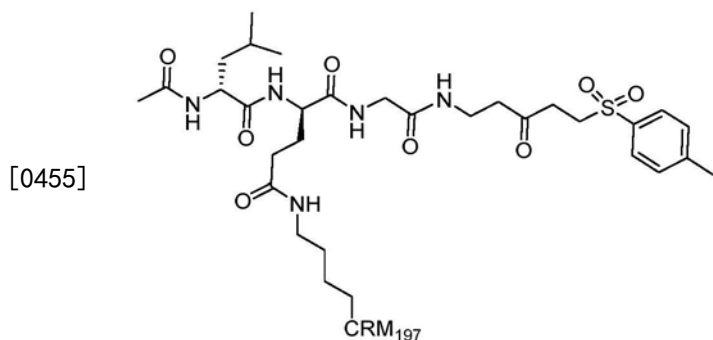
[0450] 在100mM pH 8Tris缓冲剂中,将1 $\mu$ L CRM197 (32mg/mL) 加至 50 $\mu$ L Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-二甲基缩醛 (8mg/mL),加入3 $\mu$ L微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x,制备自商业1% mTGase/麦芽糖环糊精)。反应温育于22℃for 1小时。通过质谱观察到一个连接体加入。LCMS 计算值:58787;实测值: (M+1) 58788。

[0451] Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-Alexafluor647



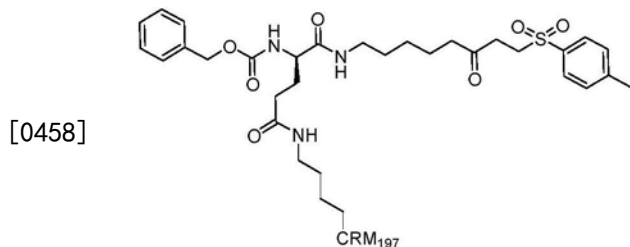
[0453] 在100mM pH 8Tris缓冲剂中,将100μL CRM197 (32mg/mL) 加至3000μL Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-Alexafluor647 (1mg/mL), 加入300uL微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x,制备自商业 1% mTGase/麦芽糖环糊精)。反应于25℃温育18小时。反应经由 SEC 纯化,采用PBS运行缓冲剂1x,1.5CV。通过质谱观察到一个荧光团加入。LCMS计算值: 59554;实测值: (M+1) 59556收率:2.6mg,81%收率。

[0454] Ac-L-Q-G-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-Tol



[0456] 向Ac-L-Q-G-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-Tol (50μL,0.084μmol) (大致1mg/mL) 的溶液加入CRM (0.5μL,0.00027μmol) 和TGase (1.5μL, 1.97E-05μmol),于25℃混合1小时。反应完成~60%。LCMS计算值: 58987实测值: (M+1) 58988。反应直接进行采用谷胱甘肽的进一步修饰 (程序如下)。

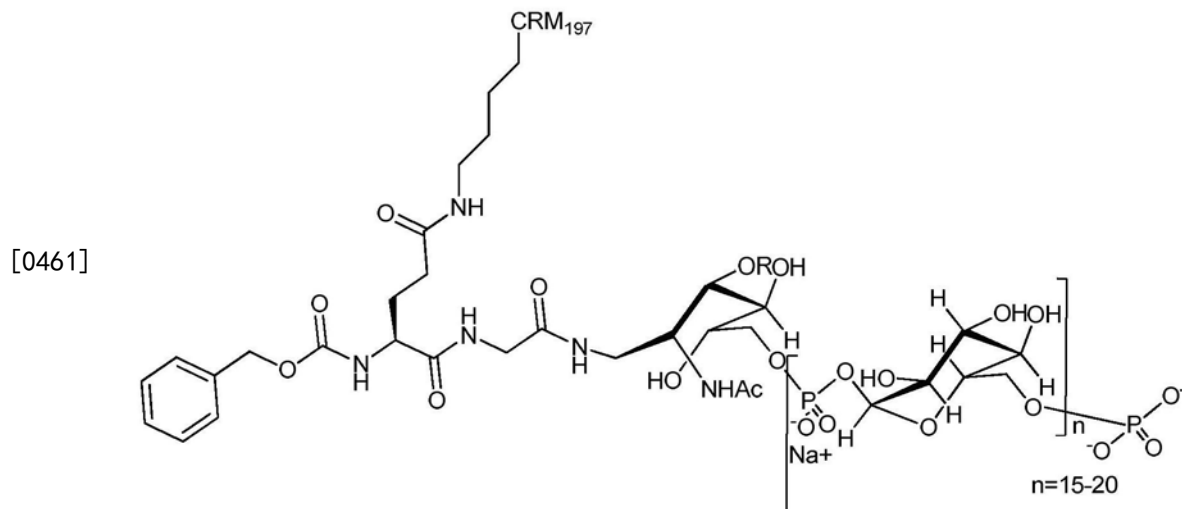
[0457] Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-Tol



[0459] 在100mM pH 6乙酸钠缓冲剂中,将1μL CRM197 (32mg/mL) 加至30μL Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-Tol (1mg/mL), 加入3μL微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x,制备自商业1% mTGase/ 麦芽糖环糊精)。反应于25℃温育3小时。反应经由10kDa

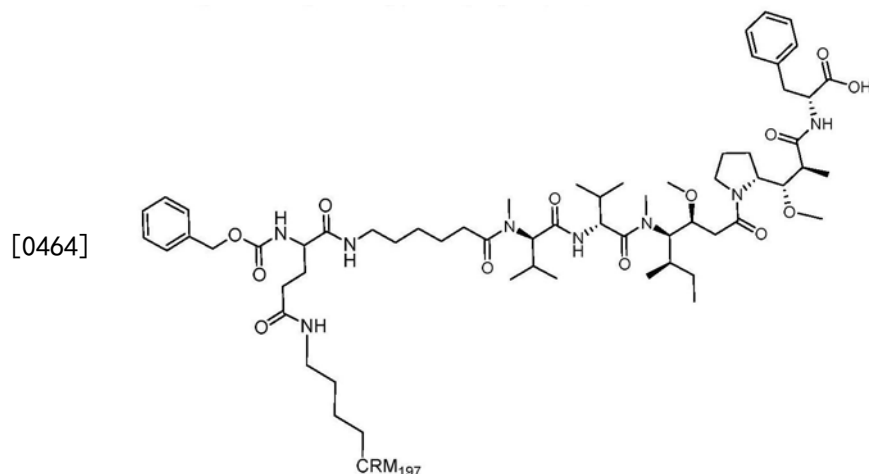
Amicon滤器纯化。通过质谱观察到一个连接体加入。LCMS计算值:58951实测值:(M+1) 58953。

[0460] Z-Q-NH-MenA多糖



[0462] 在100mM pH 8Tris缓冲剂中,将156 $\mu$ L CRM197 (32mg/mL) 加至5000 $\mu$ L Z-Q-NH-MenA多糖 (1mg/mL), 加入488 $\mu$ L微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x, 制备自商业1% mTGase/麦芽糖环糊精)。反应于25 $^{\circ}$ C温育18小时。反应经由50kDa Amicon滤器纯化, 最终获得2mg产物 (38%收率)。产物由SDS page确认 (上文附图段落006), 原因在于产物由于多糖的异质性是异质混合物。

[0463] Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(0)-单甲基阿里他汀F



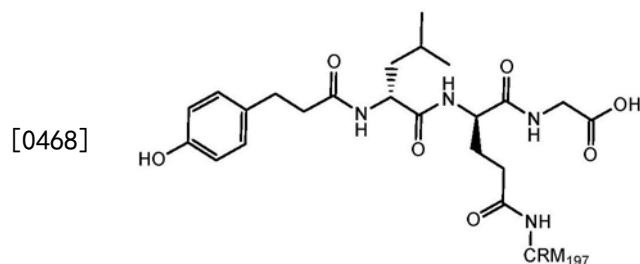
[0465] 在100mM pH 8Tris缓冲剂中,将50 $\mu$ L CRM197 (32mg/mL) 加至 1500 $\mu$ L Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(0)-单甲基阿里他汀F (1mg/mL), 加入150 $\mu$ L 微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x, 制备自商业1% mTGase /麦芽糖环糊精)。反应于25 $^{\circ}$ C温育45分钟。反应经由SEC纯化, 采用 PBS运行缓冲剂1x, 1.5CV。在质谱上观察到一个MMAF加入。LCMS 计算值:59499实测值:59498收率:659ug, 38%收率。

[0466] 在100mM pH 8Tris缓冲剂中,将60 $\mu$ L CRM197 (32mg/mL) 加至 1500 $\mu$ L Z-Q-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(0)-单甲基阿里他汀F (1mg/mL), 加入170 $\mu$ L 微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x, 制备自商业1% mTGase /麦芽糖环糊精)。反应于25 $^{\circ}$ C温育24小时。加入额外的60 $\mu$ L



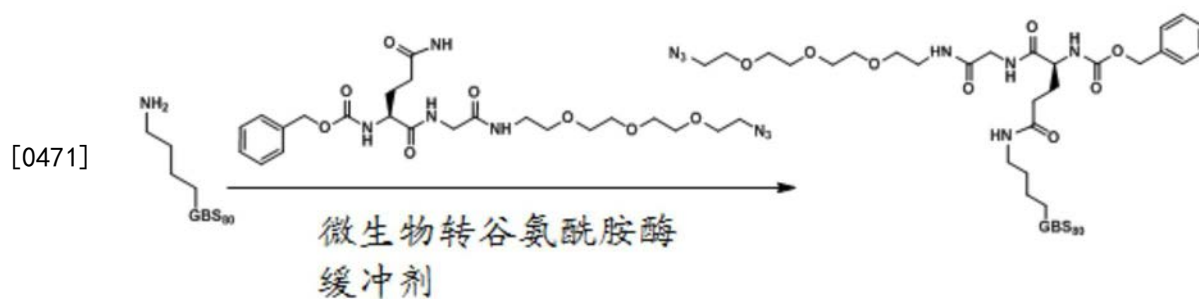
mTGase, 反应再温育18小时。反应经由SEC纯化, 采用PBS运行缓冲剂1x, 1.5 CV。通过质谱观察到两个MMAF加成。LCMS计算值: 60590 实测值: 60589 收率: 700ug, 36% 收率。

[0467] 苯酚-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-L-Q-G



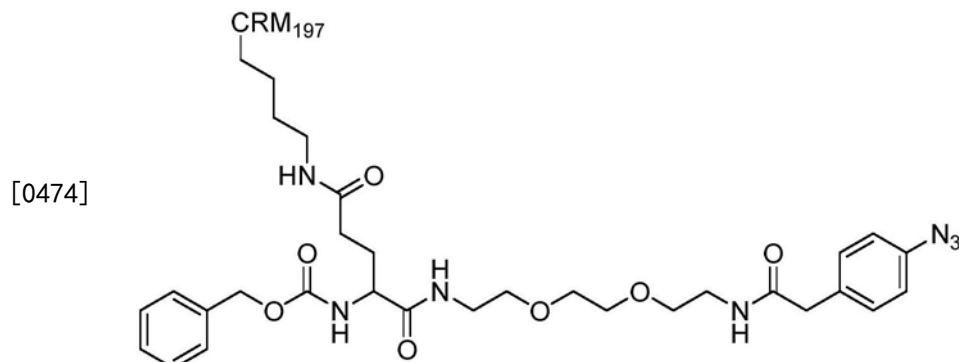
[0469] 在100mM pH 8 Tris缓冲剂中, 将1μL CRM197 (32mg/mL) 加至 22μL 苯酚-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-L-Q-G (0.5mg/mL), 加入3μL 微生物转谷氨酰胺酶 (50mg/mL PBS储备液1x, 制备自商业1% mTGase/麦芽糖环糊精)。反应于25℃温育1小时。通过质谱观察到一个小分子加入。期望质量: 58856。实测质量: 58857。

[0470] 用Z-Q-G-NH-(PEG)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>修饰GBS80



[0472] 在100mM 乙酸钠 pH 6 中, 将2.32mL GBS80 蛋白质 (3.49mg/mL) 加至14mL Z-Q-G-NH-(PEG)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (8mg/mL), 加入50μL mTGase (50mg/mL, 在PBS中)。反应在37℃温育过夜。LCMS 显示加入1和2 个加合物和少量的+3。反应用0.8mL 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基) 丙酸 (10mg/mL) 淬灭, 在室温温育1小时。反应然后通过 zeba spin 柱3X。通过LCMS分析回收物质, 获得经修饰的GBS80, 78% 总收率。LCMS计算值: 53355, 53880, 54405; 实测值: (M+1) 53355, 53877, 54398。

[0473] CRM197+ZQ (PEG2) 叠氮基苄基酰胺的mTGase-介导标记



[0475] 向ZQ (PEG2) 叠氮基苄基酰胺 ((17-氨基-1-(4-叠氮基苄基)-2,13,17-三氧代-6,9-二氧杂-3,12-二氮杂十七烷-14-基) 氨基甲酸苄酯) 的Tris缓冲剂 pH 8 (3.5mg/mL, 86μL, 0.527μmol) 溶液加入CRM197 (33mg/mL, 7.55μL, 0.0043μmol), 随后转谷氨酰胺酶的PBS

(50mg/mL, 7.61 $\mu$ L, 0.0100 $\mu$ mol) 溶液。反应在37℃搅拌16小时, 此时LCMS分析显示转化为+1、+2和+3产物。LCMS QT2; 蛋白质\_35-70kDa\_3分钟:  $R_t$  = 1.48 分钟; MS [M+连接体]: 实测值: 58958, 计算值: 58962; MS [M+ (2 连接体)]: 实测值: 59513, 计算值: 59514; MS [M+ (3连接体)]: 实测值: 60067, 计算值: 60066。

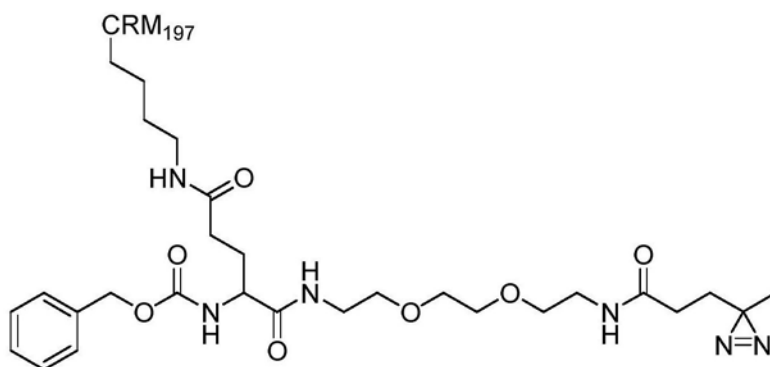
[0476]

标记度	计算	实测	%	$R_t$ (min)
CRM197	58410	58408	19	1.48
CRM197+1ZQ-连接体	58962	58958	36	1.48
CRM197+2ZQ-连接体	59514	59513	25	1.48
CRM197+3ZQ-连接体	60066	60067	20	1.48

[0477]

CRM197+ZQ (PEG)<sub>2</sub> 酰胺基乙基甲基二氮丙因的mTGase-介导标记

[0478]



[0479]

向 (18-氨基-1-(3-甲基-3H-二氮丙因-3-基)-3,14,18-三氧代-7,10-二氧杂-4,13-二氮杂十八烷-15-基) 氨基甲酸苄酯的Tris缓冲剂pH 8 (3.5 mg/mL, 50 $\mu$ L, 0.336 $\mu$ mol) 溶液加入CRM197 (33mg/mL, 4.82 $\mu$ L, 0.0027 $\mu$ mol), 随后转谷氨酰胺酶的PBS (50mg/mL, 4.85 $\mu$ L, 0.0064 $\mu$ mol) 溶液。反应在室温搅拌2天, 此时LCMS分析显示转化为+1、+2和+3 产物。LCMS QT2; 蛋白质\_35-70kDa\_3分钟:  $R_t$  = 1.69分钟; MS [M+ 连接体]: 实测值: 58912, 计算值: 58913; MS [M+ (2x连接体)]: 实测值: 59415, 计算值: 59416; MS [M+ (3x连接体)]: 实测值: 59918, 计算值: 59919。

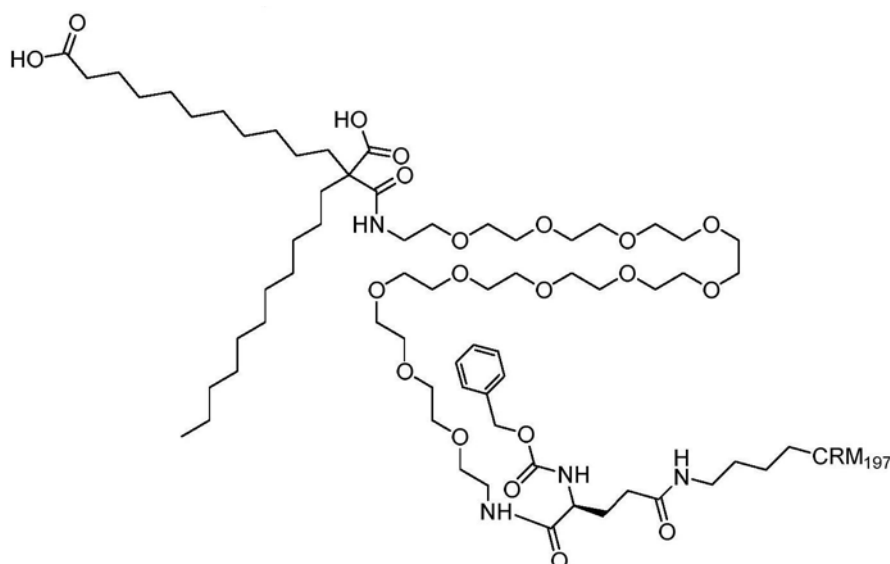
[0480]

标记度	计算	实测	%	$R_t$ (min)
CRM197	58410	58408	11	1.69
CRM197+1ZQ-连接体	58913	58912	45	1.69
CRM197+2ZQ-连接体	59416	59415	32	1.69
CRM197+3ZQ-连接体	59919	59918	12	1.69

[0481]

CRM197+ZQ-FA的mTGase-介导标记

[0482]



[0483] 向ZQ-FA的100mM Tris缓冲剂pH 8 (8mg/mL, 203 $\mu$ L, 1.316 $\mu$ mol) 溶液加入CRM197 (33mg/mL, 1.515 $\mu$ L, 0.00086 $\mu$ mol), 随后转谷氨酰胺酶的PBS (50mg/mL, 0.455 $\mu$ L, 0.00060 $\mu$ mol) 溶液。反应在室温搅拌16小时。用10kDa MWC0 Amicon离心滤器、通过稀释并浓缩反应5次至100 $\mu$ L体积, 将反应混合物转变为100mM Tris缓冲剂 pH 8。LCMS分析显示转化为+1、+2、+3和+4产物。LCMS QT2; 蛋白质\_35-70kDa\_3分钟:  $R_t$  = 1.45分钟; MS[M+ZQ-FA]: 实测值: 59625, 计算值: 59624; MS[M+(2x ZQ-FA)]: 实测值: 60839, 计算值: 60838; MS[M+(3x ZQ-FA)]: 实测值: 62054, 计算值: 62052; MS[M+(4x ZQ-FA)]: 实测值: 63270, 计算值: 63266。

[0484]

标记度	计算	实测	%	$R_t$ (min)
CRM197	58410	n/a	0	n/a
CRM197+1ZQ-FA	59624	59625	14	1.45
CRM197+2ZQ-FA	60838	60839	23	1.45
CRM197+3ZQ-FA	62052	62054	35	1.45
CRM197+4ZQ-FA	63266	63270	28	1.45

[0485] CRM197+叠氮基硝基苯基QG的mTGase-介导标记:

[0486] 向叠氮基硝基苯基-QG的100mM Tris缓冲剂pH 8 (8mg/mL, 100 $\mu$ L) 溶液加入CRM197 (33mg/mL, 1.0 $\mu$ L, 33 $\mu$ g), 随后转谷氨酰胺酶的PBS (50mg/mL, 1.0 $\mu$ L, 0.1% TGase/麦芽糖环糊精) 溶液。反应温育在室温16小时。LCMS分析显示转化为+1, +2, 和+3产物。LCMS QT1; 蛋白质\_20-70kDa\_3分钟:  $R_t$  = 1.67分钟; MS[M+1叠氮基硝基苯基QG]: 实测值: 58815, 计算值: 58803; MS[M+2叠氮基硝基苯基QG]: 实测值: 59191, 计算值: 59196; MS[M+3叠氮基硝基苯基QG]: 实测值: 59585, 计算值: 59589。

[0487]

标记度	计算	实测	%	R <sub>t</sub> (min)
<b>CRM197</b>	<b>58410</b>	<b>58428</b>	<b>5</b>	<b>n/a</b>
<b>CRM197 +1 叠氮基硝基苯基 QG</b>	<b>58803</b>	<b>58815</b>	<b>50</b>	<b>1.67</b>
<b>CRM197 +2 叠氮基硝基苯基 QG</b>	<b>59196</b>	<b>59191</b>	<b>40</b>	<b>1.67</b>
<b>CRM197 +3 叠氮基硝基苯基 QG</b>	<b>59589</b>	<b>59585</b>	<b>5</b>	<b>1.67</b>

[0488] CRM197+二氮丙因-QG的mTGase-介导标记:

[0489] 向二氮丙因-QG的100mM Tris缓冲剂pH 8 (8mg/mL, 100μL) 溶液加入CRM197 (33mg/mL, 1.0μL, 33ug), 随后转谷氨酰胺酶的PBS (50mg/mL, 1.0μL, 0.1% TGase/麦芽糖环糊精) 溶液。反应温育在室温 2小时。LCMS分析显示转化为+1产物。LCMS QT1; 蛋白质\_20-70 kDa\_3分钟: R<sub>t</sub> = 1.67分钟; MS [M+二氮丙因-QG]: 实测值: 58705, 计算值: 59706。

[0490]

标记度	计算	实测	%	R <sub>t</sub> (min)
CRM197	58410	n/a	0	n/a
CRM197+1二氮丙因-QG	58706	58705	100	1.67

[0491] CRM197+ZQ (PEG)<sub>3</sub>生物素的mTGase-介导标记

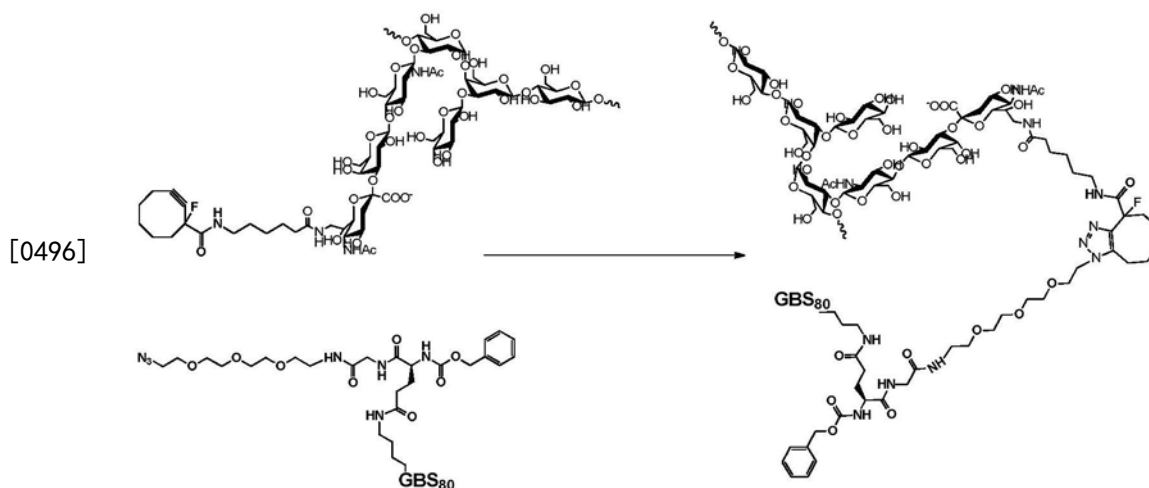
[0492] 向ZQ (PEG)<sub>3</sub>Biotin的100mM Tris缓冲剂pH 8 (8mg/mL, 100μL) 溶液加入CRM197 (33mg/mL, 1.0μL, 33ug), 随后转谷氨酰胺酶的PBS (50mg/mL, 1.0μL, 0.1% TGase/麦芽糖环糊精) 溶液。反应温育在室温 16小时。LCMS分析显示转化为+1产物。LCMS QT1; 蛋白质\_20-70 kDa\_3分钟: R<sub>t</sub> = 1.67分钟; MS [M+1ZQ (PEG)<sub>3</sub>Biotin]: 实测值: 59073, 计算值: 59074; MS [M+2ZQ (PEG)<sub>3</sub>Biotin]: 实测值: 59737, 计算值: 59738; MS [M+3ZQ (PEG)<sub>3</sub>Biotin]: 实测值: 60403, 计算值: 60402。

[0493]

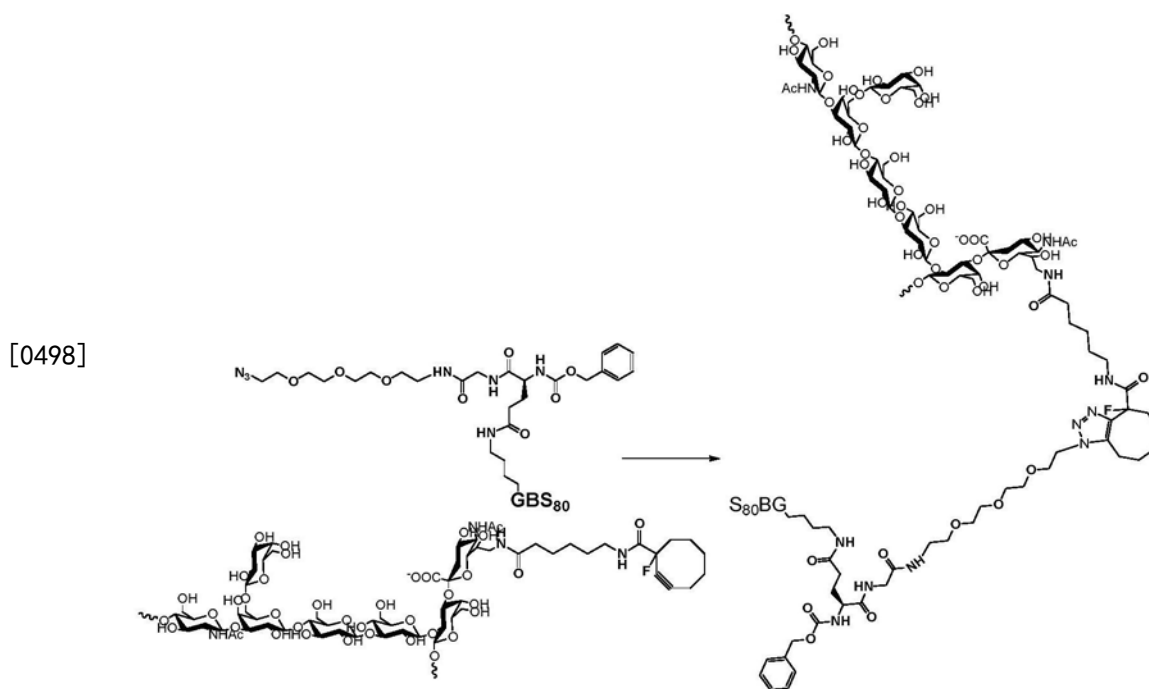
标记度	计算	实测	%	R <sub>t</sub> (min)
CRM197	58410	none	0	n/a
CRM197+1ZQ (PEG) <sub>3</sub> Biotin	59074	59073	40	1.75
CRM197+2ZQ (PEG) <sub>3</sub> Biotin	59738	59737	55	1.75
CRM197+3ZQ (PEG) <sub>3</sub> Biotin	60402	60403	5	1.75

[0494] 标记mTGase催化的蛋白质选择性赖氨酸标记的官能化实施例:

[0495] Z-Q-G-NH- (PEG)<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>



[0497] 将3.2mg叠氮基标记的蛋白质与多糖以缀合比率PS/Prot 6:1w/w 组合。产物通过2X HA柱纯化。第一次运行 (BLOCK 1=NaPi 2mM pH 7.2,BLOCK 2=NaPi 400mM pH 7.2) 除去游离蛋白质。第二次运行 (BLOCK 1=NaPi 2mM/NaCl 550mM pH 7.2,BLOCK 2=NaPi 10mM pH 7.2,BLOCK 3=NaPi 35mM pH 7.2,BLOCK 4=NaPi 400mM pH 7.2) 除去游离多糖。



[0499] 将3.3mg叠氮基标记的蛋白质与多糖以缀合比率PS/Prot 6:1w/w 组合。产物通过2X HA柱纯化。第一次运行 (BLOCK 1=NaPi 2mM pH 7.2,BLOCK 2=NaPi 400mM pH 7.2) 除去游离蛋白质。第二次运行 (BLOCK 1=NaPi 2mM/NaCl 550mM pH 7.2,BLOCK 2=NaPi 10mM pH 7.2,BLOCK 3=NaPi 35mM pH 7.2,BLOCK 4=NaPi 400mM pH 7.2) 除去游离多糖。

[0500] 如附图2-4所示,获得这些实验产物的SDS page凝胶表征。各自收率也示于下表3。

[0501] 表3。

样品	蛋白质	缀合化学	Sacch/ Prot (w/w)	游离糖类% (dionex)	蛋 白 质 TOT mg	糖类/蛋白 质, 用于缀合 (w/w)	收率 (% 最终蛋 白质)
[0502] GBS PSV(alk)-GBS80( K-N3)	X	CFCC	4.3	6.7	570.7	6:1	20.6
GBS PSII(alk)-GBS80( K-N3)	X	CFCC	1.5	< 3.3	1685.7	6:1	24.0

[0503] 通过mTGase标记方法获得的这些点击(clicked) GBS80缀合物各自进行如下所述的生物学测试。

[0504] ELISA免疫测试,确定对GBS II或V多糖抗原的Ig滴定度

[0505] 对在免疫动物血清中的GBS多糖II或V的IgG滴定度测量如下。

[0506] 将微量滴定板(Nunc Maxisorp)用100μl在磷酸缓冲盐水(PBS)中的 1.0μg/mL HSA-adh(人类血清白蛋白-肥酸二酰肼)缀合的多糖II或V涂覆。板在室温下温育过夜,然后在洗涤缓冲剂(0.05%吐温20,在PBS 中)中洗涤3次。在分配250μl PBS,2%BSA,0.05%吐温20每孔之后,板在37℃温育90分钟,然后抽吸以除去涂覆后的溶液。试验血清以1:400 稀释于PBS,2%BSA,0.05%吐温20。标准血清通过汇合超免疫血清制备,并且选择标准池的初始稀释,获得于405nm约2.000的光密度(OD)。板在37℃温育1小时,然后用洗涤缓冲剂洗涤,在各孔中将100μL 碱性磷酸酶-缀合的抗小鼠IgG以1:1000分配在稀释缓冲剂中。板在37℃温育90分钟,然后用洗涤缓冲剂洗涤。在各孔中,分配100μL对-硝基苯基磷酸(对-NPP) 4.0mg/mL的底物缓冲剂溶液。板在室温下温育30 分钟,然后将100μL EDTA 7%(w/v)二钠盐和Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>3.5%pH 8.0的溶液加至各孔以停止酶促反应。于405nm测量光密度(OD)。对GBS多糖抗原(II或V)的总IgG滴定度通过用参比线测试方法来计算,并且结果表示为人为指定的ELISA单元/mL(EU/mL)。对于各自3种抗原,标准血清IgG滴定度人为赋予1.0EU/mL的值。各血清的IgG滴定度通过用标准池获得的ODs内插滴定曲线(偏差和斜率)来估计。结果显示于图 5和6。

[0507] 小鼠活性母体免疫模型

[0508] 八只CD-1雌性小鼠(6-8周龄)的组在第1、21和35天用20μg在明矾助剂中配制的抗原或缓冲剂(PBS)免疫。然后让小鼠交配,用经计算诱导90%幼鼠死亡的GBS剂量经腹膜内攻击它们的子代。保护值计算为  $[(\% \text{对照中死亡} - \% \text{疫苗中死亡}) / \% \text{对照中死亡}] \times 100$ 。每日监测小鼠并在它们展示定义的人性化终点的情况下处死,所述人性化终点是在符合Novartis Animal Welfare Policies符合的研究中预先建立的。统计学分析用Fisher's精确检验进行。结果显示在下表4和5中。

[0509] 表4.

[0510]

抗原		保护\治疗	%保护
	PBS	18/60	30
	CRM-II	32/50	64
	TT-II	19/30	63
	GBS80-II	37/70	53
	GBS59-1523-II	59/70	84
-	GBS80-K-N3/PSII	58/69	84
攻击品系类型 II 5401			

[0511] 表5.

[0512]

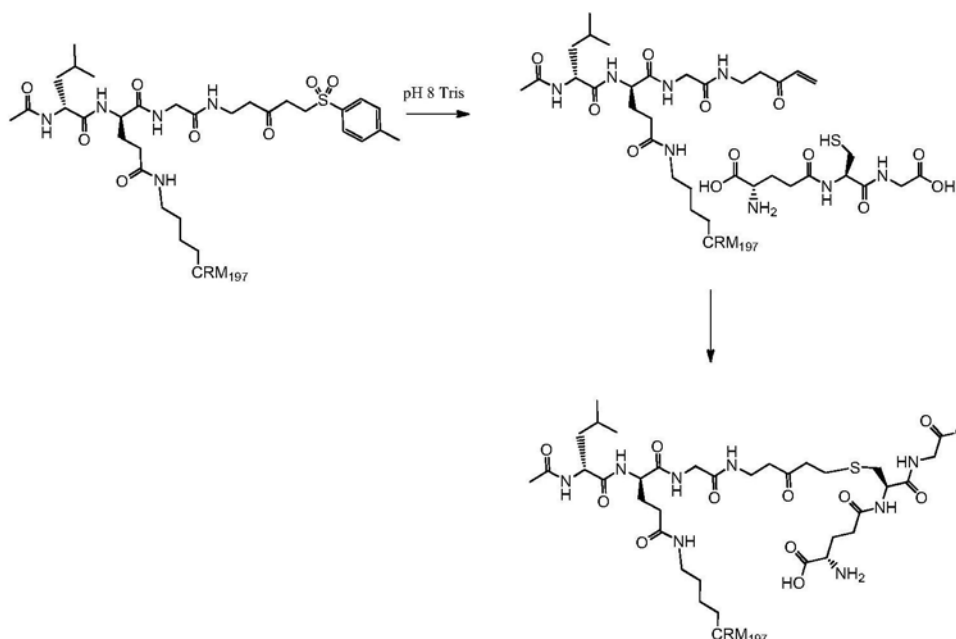
抗原	保护\治疗	%保护
PBS	19/40	47
CRM-V	61/70	87
TT-V	-	-
GBS80-V	54/57	95
GBS59-1523-V	69/79	87
GBS80-K-N3/PSV	53/60	88
攻击品系类型 V CJB111		

[0513] 调理吞噬测试

[0514] 调理吞噬测试用GBS菌株作为靶标细胞和分化为粒细胞状细胞的 HL-60细胞系(ATCC;CCL-240)来进行:将100mM N,N二甲基甲酰胺(Sigma)加至生长培养基,持续4d。在吞噬细胞、10%幼兔补体(Cedarlane)和热灭活的小鼠抗血清存在下,将中指数细菌细胞在37℃温育1小时。阴性对照由与免疫前血清,或不含HL-60,或与热灭活补体的反应组成。调理吞噬性杀灭的量确定如下:从log零时间点CFU数扣除log 1-h测试存活的菌落数。

[0515] 实验结果示于图7。GBS80-K-N<sub>3</sub>/PSII OPKA和IgG滴定度是在统计学上可与通过随机K缀合制备的GBS80-II缀合物比拟。OPKA和IgG 滴定度显示与攻击动物模型中%存活的良好关联。

[0516]  $\text{Ac-L-Q-G-NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{SO}_2-\text{ToI}$



[0517]

[0518] 加入L-谷胱甘肽 (5 $\mu$ L, 0.813 $\mu$ mol)、随后50 $\mu$ L 250mM Tris HCl 缓冲剂pH 8, 提高反应pH至8。在4小时之后, 全部CRM被一个连接体标记, 由质谱表征所确认。在于25 $^{\circ}$ C再过16小时之后, 全部CRM 被L-谷胱甘肽标记。加入L-谷胱甘肽: 期望质量: 59138, 实测质量: 59139。

[0519] 肽测绘实验概要:

[0520] 肽测绘消化: 5 $\mu$ g修饰的CRM197和阳性对照CRM197样品用20 mM DTT还原, 并用胰蛋白酶以1/30 (w/w) 酶/蛋白质在26 $^{\circ}$ C消化过夜。将胰蛋白酶消化的蛋白质的等分试样用GluC酶以1/20酶/蛋白质比率在 26 $^{\circ}$ C进一步消化4hr; 注: 全部酶购自Roche Diagnostics (GmbH, 德国)。

[0521] 反相LC-MS/MS分析: 所得消化肽用液体色谱法电喷雾串联质谱 (LC-ESI MS/MS) 分析: Thermo LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) 与Agilent CapLC (Santa Clara, CA) 联用。所加载的 $\sim$ 10-15pmole CRM对照和修饰的CRM197在柱上于 40 $^{\circ}$ C消化 (Waters Acuity BEH C18, 1.7 $\mu$ m, 1 $\times$ 100mm柱)。于10 $\mu$ L/min 进行80分钟的总梯度: 开始于0-1分钟的4%B, 于1.1分钟增加至7% B, 于55分钟45%B, 然后于63分钟95%B, 随后洗涤和柱平衡。质谱参数包括完整扫描事件, 采用FTMS分析仪于30000分辨率, 从m/z 300-2000, 进行30ms。在离子阱分析仪中对MS/MS在7个强度最高离子 (排除1 $^{+}$ 离子) 进行碰撞诱导的解离, 于500 (全部事件) 信号强度阈值激活, 计数30ms。

[0522] 数据分析和数据库检索: 全部质量谱图在Qual Browser V 2.0.7 (Thermo Scientific) 中处理。Mascot普通文件 (mgf) 用MS DeconTools (R.D.Smith Lab, PPNL) 产生和用Mascot V2.3.01 (Matrix Science Inc., Boston, MA) 数据库检索, 检索所提供的蛋白质序列以及专用自定义数据库和SwissProt数据库 (V57, 具有513,877序列) 的污染性蛋白质。检索参数包括: 酶: 半胰蛋白酶或胰蛋白酶/Glu-C, 允许多至三个错过的裂解; 变量修饰: 将期望小分子质量 (362.147787Da和463.206698Da) 加入数据库, 其称为"CRM Tgase+炔 362Da mod (CKR), CRM Tgase+炔 362Da mod (N-term), CRM Tgase+叠氮化物463Da mod (CKR), CRM Tgase+叠氮化物463Da mod (N-term)"; 肽耐受:  $\pm$ 20ppm; MS/MS耐受:  $\pm$ 0.6Da。



以>95%的置信度对离子得分完成的序列覆盖和小分子修饰进行评价。然后选择高分肽离子用于用Qual Browser手工MS/MS 分析。

[0523] CRM+环辛炔-环丙基-CH<sub>2</sub>-OC(O)NH-Q-G的结果

[0524] 胰蛋白酶消化:83%序列覆盖;在该离子计分阈值未检测到修饰。胰蛋白酶/GluC消化:97%序列覆盖;在Lys37或Lys39上检测到修饰。

[0525] CRM Exp095胰蛋白酶/GluC消化

[0526] 序列覆盖:91%,匹配的肽以加粗文字显示

[0527] K37或K39以CRM Tgase+叠氮化物463Da mod (CKR) 修饰

[0528] GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYY

[0529] 51 KEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAE

[0530] 101 TIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYI

[0531] 151 NNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEQMAQACAGNRVRRSVGSSLS

[0532] 201 CINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEF

[0533] 251 HQTALHPSELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKT

[0534] 301 TAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGEL

[0535] 351 VDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNT

[0536] 401 VEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTPGKLDVNSKSKTHI

[0537] 451 SVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNVHANLNVAFHRSSSEKIN

[0538] 501 SNEISSDSIGVLGYQKTVTDHTKVNSKLSLFFFEIKS

[0539] SEQ ID NO:1

[0540] CRM+ZQ-NH-(PEG)<sub>3</sub>N<sub>3</sub>的结果

[0541] 胰蛋白酶消化:69%序列覆盖;在该离子计分阈值未检测到修饰。胰蛋白酶/GluC消化:91%序列覆盖;在Lys37或Lys39上检测到修饰。

[0542] CRM Exp083胰蛋白酶/GluC消化

[0543] 序列覆盖:97%,匹配的肽以加粗文字显示

[0544] K37或K39以CRM Tgase+炔362Da mod (CKR) 修饰

[0545] 1 GADDVVDSSKSFVMENFSSYHGTPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYYYY

[0546] 51 KEFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKVTYPGLTKVLALKVDNAE

[0547] 101 TIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYI

[0548] 151 NNWEQAKALSVELEINFETRGRGQDAMYEQMAQACAGNRVRRSVGSSLS

[0549] 201 CINLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTVSEEKAKQYLEEF

[0550] 251 HQTALHPSELSELKTVTGTNPVFAGANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKT

[0551] 301 TAALSILPGIGSVMGIADGAVHHNTEEIVAQSIALSSLMVAQAIPLVGEL

[0552] 351 VDIGFAAYNFVESIINLFQVVHNSYNRPAYSPGHKTQPFLHDGYAVSWNT

[0553] 401 VEDSIIRTGFQGESGHDIKITAENTPLPIAGVLLPTIPGKLDVNSKSKTHI

[0554] 451 SVNGRKIRMRCRAIDGDVTFCRPKSPVYVGNVHANLHVAFHRSSSEKIH

[0555] 501 SNEISSDSIGVLGYQKTVTDHTKVNSKLSLFFFEIKS

[0556] SEQ ID NO:2

[0557] CRM对照

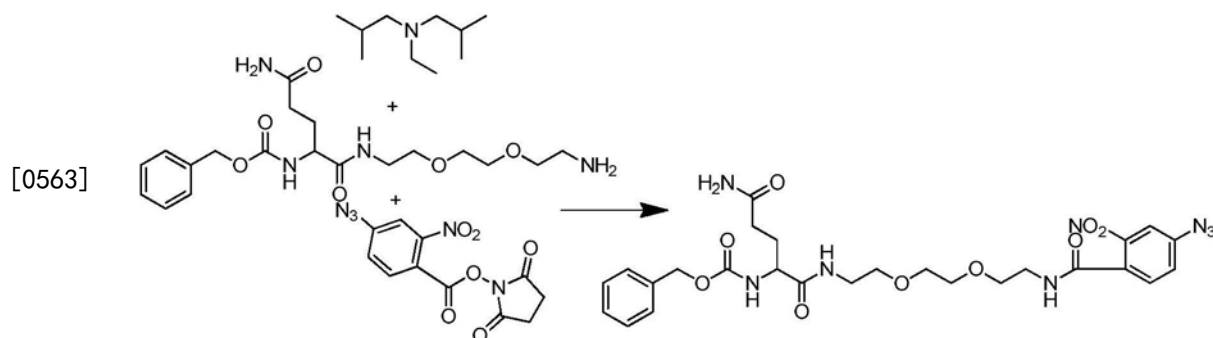
[0558] 胰蛋白酶消化:85%序列覆盖。

[0559] 胰蛋白酶/GluC消化:79%序列覆盖。

[0560] 应理解本发明并不局限于本文示例描述的实施方式,而是包涵在上述公开范围内的其全部所述形式。

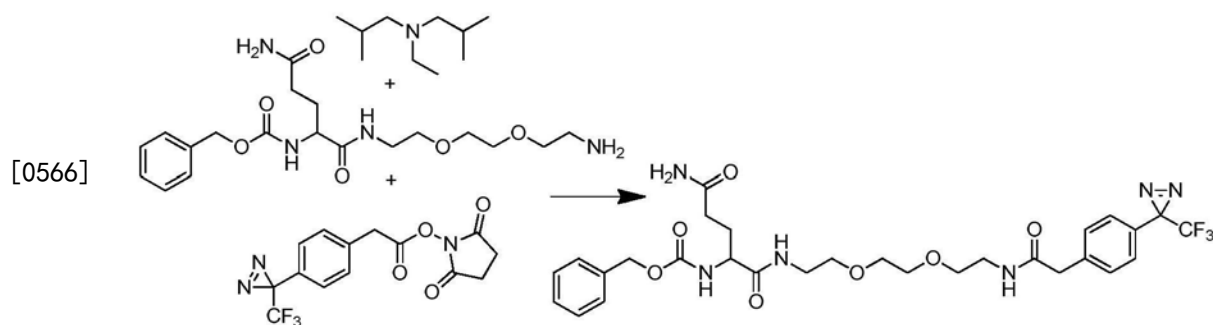
[0561] 预测性实施例

[0562] (17-氨基-1-(4-叠氮基-2-硝基苯基)-2,13,17-三氧代-6,9-二氧杂-3,12-二氮杂十七烷-14-基)氨基甲酸苄酯



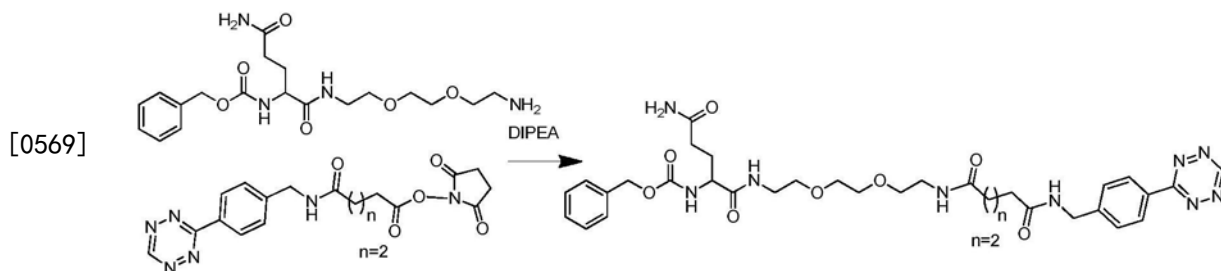
[0564] 将4-叠氮基-2-硝基苯乙酸N-琥珀酰亚氨基酯(0.073mmol)溶于DMF(1mL),与(5-氨基-1-((2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基)-1,5-二氧代戊烷-2-基)氨基甲酸苄酯(20mg,0.049mmol)的DMF(2.3mL)溶液合并。加入DIPEA(0.121mL,0.585mmol),反应在室温混合4小时。溶液经由MS-触发的HPLC纯化(100-Prep3;酸法3;Sunfire 30x50mm 5um柱ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1%TFA 75ml/min,1.5ml注射;管触发M=570)。汇集具有希望产物的级分,冻干。

[0565] ZQ-(PEG2)苯基三氟甲基二氮丙因



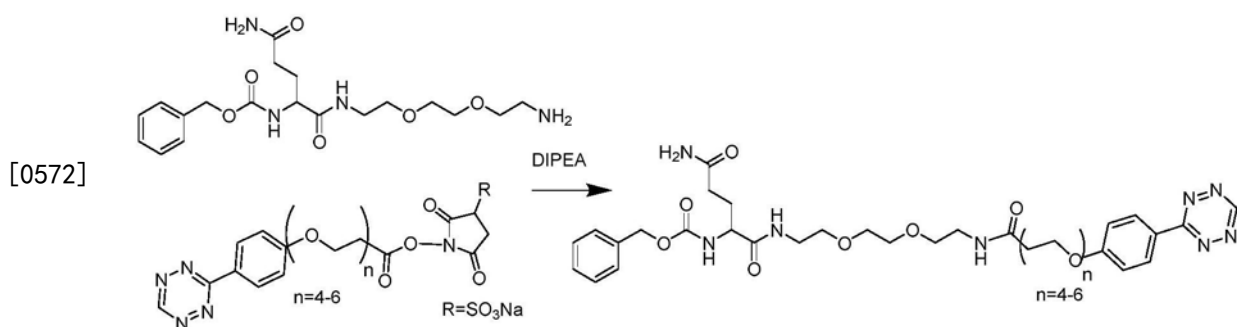
[0567] 将4-三氟甲基二氮丙因苯乙酸N-琥珀酰亚氨基酯(0.073mmol)溶于DMF(1mL),与(5-氨基-1-((2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基)-1,5-二氧代戊烷-2-基)氨基甲酸苄酯(20mg,0.049mmol)的DMF(2.3 mL)溶液合并。加入DIPEA(0.121mL,0.585mmol),反应在室温混合4小时。溶液经由MS-触发的HPLC纯化(100-Prep3;酸法3;Sunfire 30x50mm 5um柱ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1%TFA 75ml/min,1.5ml注射;管触发M=570)。汇集具有希望产物的级分,冻干。

[0568] ZQ-(PEG2)-四嗪



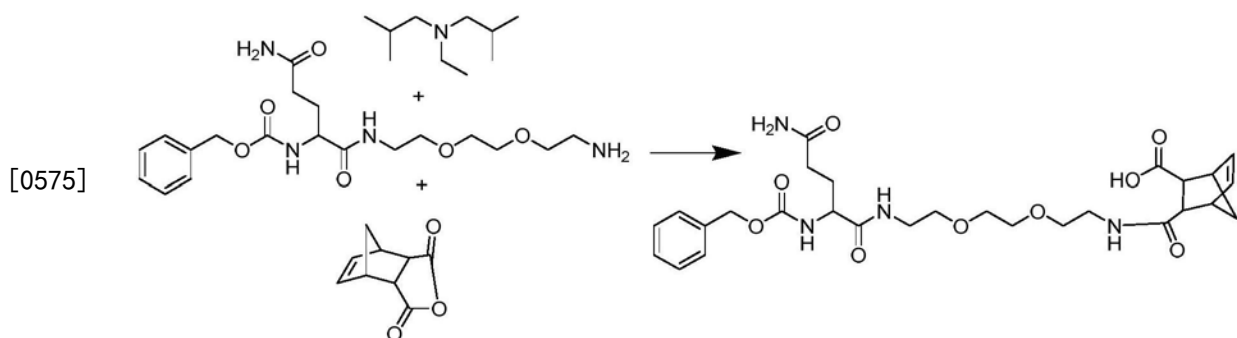
[0570] 将二氮丙因N-琥珀酰亚氨基酯 (0.073mmol) 溶于DMF (1mL), 与 (5-氨基-1-((2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基)-1,5-二氧代戊烷-2-基)氨基甲酸苄酯 (20mg, 0.049mmol) 的DMF (2.3mL) 溶液合并。加入 DIPEA (0.121mL, 0.585mmol), 反应在室温混合4小时。溶液经由 MS-触发的HPLC纯化 (100-Prep3; 酸法3; Sunfire 30x50mm 5um柱 ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1% TFA 75ml/min, 1.5ml注射; 管触发M=570)。汇集具有希望产物的级分, 冻干。

[0571] ZQ-(PEG2)-四嗪



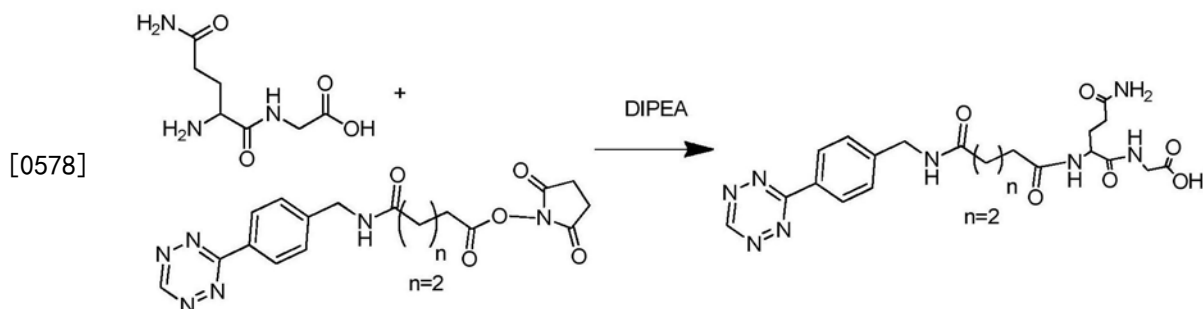
[0573] 将四嗪 (PEG) N-琥珀酰亚氨基酯 (0.073mmol) 溶于DMF (1mL), 与 (5-氨基-1-((2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基)-1,5-二氧代戊烷-2-基)氨基甲酸苄酯 (20mg, 0.049mmol) 的DMF (2.3mL) 溶液组合。加入 DIPEA (0.121mL, 0.585mmol), 反应在室温混合4小时。溶液经由MS-触发的HPLC纯化 (100-Prep3; 酸法3; Sunfire 30x50mm 5um柱ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1% TFA 75ml/min, 1.5ml注射; 管触发M=570)。汇集具有希望产物的级分, 冻干。

[0574] ZQ (PEG2) - (3aR, 4S, 7R) -3a, 4, 7, 7a-四氢-4, 7-桥亚甲基异苯并呋喃 -1, 3-二酮

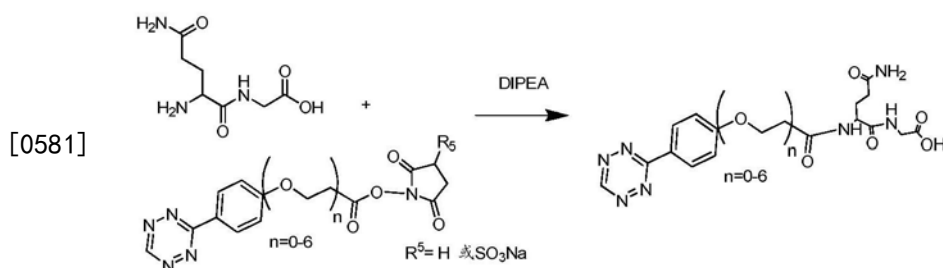


[0576] 将 (3aR, 4S, 7R) -3a, 4, 7, 7a-四氢-4, 7-桥亚甲基异苯并呋喃-1, 3-二酮 (0.162mmol) (0.073mmol) 溶于DMF (1mL), 与 (5-氨基-1-((2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙基)氨基)-1,5-二氧代戊烷-2-基)氨基甲酸苄酯 (0.049 mmol) 的DMF (2.3mL) 溶液合并。加入DIPEA (0.585mmol), 反应在室温混合4小时。溶液经由MS-触发的HPLC纯化 (100-Prep3; 酸法3; Sunfire 30x50mm 5um柱ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1% TFA 75ml/min, 1.5ml注射; 管触发M=570)。汇集具有希望产物的级分, 冻干。

[0577] 四嗪-QG



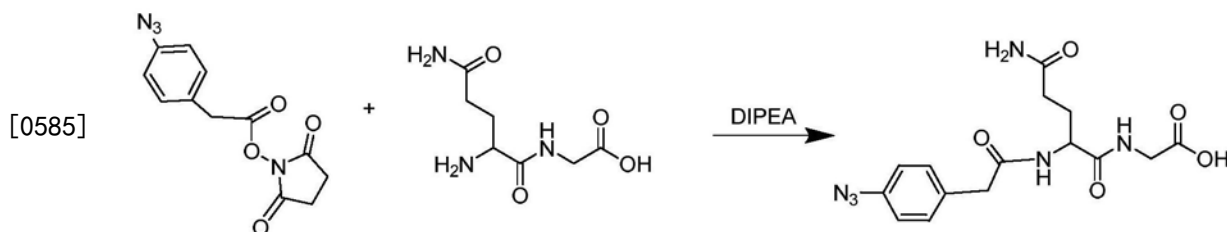
[0579] 将QG (30mg, 0.148mmol) 溶于DMF (体积:1mL, 比率:1.000), 将NHS四嗪 (0.148mmol) 加入H<sub>2</sub>O (体积:1.000mL, 比率:1.000), 随后加入DIPEA (0.177mmol)。反应搅拌16小时, 此时产物通过HPLC 纯化 (Sunfire 30x50mm 5um柱ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1%TFA 75ml/min, 1.5ml 注射), 提供希望产物。汇集级分并冻干。

[0580] 四嗪 (PEG)<sub>n</sub>QG

[0582] 将QG (30mg, 0.148mmol) 溶于DMF (体积:1mL, 比率:1.000), 将NHS PEG<sub>n</sub>四嗪 (0.148mmol) 加入H<sub>2</sub>O (体积:1.000mL, 比率:1.000), 随后加入DIPEA (0.177mmol)。反应搅拌16小时, 此时产物通过HPLC 纯化 (Sunfire 30x50mm 5um柱ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1%TFA 75ml/min, 1.5ml 注射), 提供希望产物。汇集级分并冻干。

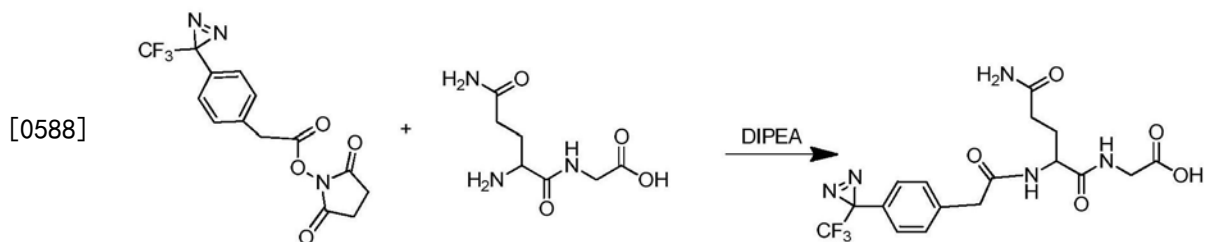
[0583] 将QG (30mg, 0.148mmol) 溶于DMF (体积:1mL, 比率:1.000), 将NHS四嗪 (0.148mmol) 加入H<sub>2</sub>O (体积:1.000mL, 比率:1.000), 随后加入DIPEA (0.177mmol)。反应搅拌16小时, 此时产物通过HPLC 纯化 (Sunfire 30x50mm 5um柱ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1%TFA 75ml/min, 1.5ml 注射), 提供希望产物。汇集级分并冻干。

[0584] 4-叠氮基-苄基-谷氨酰胺-甘氨酸



[0586] 将QG (30mg, 0.148mmol) 溶于DMF (体积:1mL, 比率:1.000), 将4-叠氮基-苄乙酸N-琥珀酰亚氨基酯 (0.148mmol) 加入H<sub>2</sub>O (体积: 1.000mL, 比率:1.000), 随后加入DIPEA (0.177mmol)。反应搅拌16 小时, 此时产物通过HPLC纯化 (Sunfire 30x50mm 5um柱ACN/H<sub>2</sub>O w/ 0.1%TFA 75ml/min, 1.5ml注射), 提供希望产物。希望的汇集级分并冻干。

[0587] 三氟甲基二氮丙因-苄基-谷氨酰胺-甘氨酸



[0589] 将QG (30mg, 0.148mmol) 溶于DMF (体积: 1mL, 比率: 1.000), 将4-三氟甲基-二氮丙因-苯乙酸N-琥珀酰亚氨基酯 (0.148mmol) 加入 H<sub>2</sub>O (体积: 1.000mL, 比率: 1.000), 随后加入DIPEA (0.177mmol)。反应搅拌16小时, 此时产物通过HPLC纯化 (Sunfire 30x50mm 5um柱 ACN/H<sub>2</sub>O w/0.1% TFA 75ml/min, 1.5ml注射), 提供希望产物。希望的汇集级分并冻干。

[0590] mTGase-介导的CRM197标记的一般程序

[0591] 向连接体的Tris缓冲剂pH 8 (3.5mg/mL, 0.527μmol或其它量, 并且相对微摩尔浓度取决于上文鉴定的连接体) 溶液加入CRM197 (33 mg/mL, 7.55μL, 0.0043μmol), 随后是转谷氨酰胺酶的PBS (50mg/mL, 7.61μL, 0.0100μmol) 溶液。反应在RT或37℃搅拌16小时。

[0592] 既然已描述本发明的示范性实施方式, 则本领域普通技术人员应注意到本文的公开仅是示范性的, 并且可以在本发明范围内进行各种其它的备择对象、调整 and 修饰。相应地, 本发明并不局限于本文说明的特定实施方式。

## 序列表

<110> Usera, Aimee  
Robinson, Zachary  
Cobb, Jennifer

<120> 位点特异性化学酶法蛋白质修饰

<130> 14293-223

<140> 未分配

<141> 2014-07-11

<150> 61/845,273

<151> 2013-07-11

<150> 62/016,044

<151> 2014-06-23

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 535

<212> PRT

<213> 白喉杆菌

<400> 1

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn  
1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln  
20 25 30

[0001]

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp  
35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly  
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val  
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val  
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu  
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly  
115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser  
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser  
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp  
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg  
180 185 190

[0002]

Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Cys	Ile	Asn	Leu	Asp	Trp	Asp	Val	195	200	205	
Ile	Arg	Asp	Lys	Thr	Lys	Thr	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	His	Gly	210	215	220	
Pro	Ile	Lys	Asn	Lys	Met	Ser	Glu	Ser	Pro	Asn	Lys	Thr	Val	Ser	Glu	225	230	235	240
Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Tyr	Leu	Glu	Glu	Phe	His	Gln	Thr	Ala	Leu	Glu	245	250	255	
His	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Pro	Val	260	265	270	
Phe	Ala	Gly	Ala	Asn	Tyr	Ala	Ala	Trp	Ala	Val	Asn	Val	Ala	Gln	Val	275	280	285	
Ile	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Thr	Thr	Ala	Ala	Leu	290	295	300	
Ser	Ile	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	Ser	Val	Met	Gly	Ile	Ala	Asp	Gly	Ala	305	310	315	320
Val	His	His	Asn	Thr	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Gln	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser	325	330	335	
Ser	Leu	Met	Val	Ala	Gln	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Leu	Val	Asp	340	345	350	
Ile	Gly	Phe	Ala	Ala	Tyr	Asn	Phe	Val	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Leu	Phe	355	360	365	
Gln	Val	Val	His	Asn	Ser	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ala	Tyr	Ser	Pro	Gly	His	370	375	380	
Lys	Thr	Gln	Pro	Phe	Leu	His	Asp	Gly	Tyr	Ala	Val	Ser	Trp	Asn	Thr	385	390	395	400
Val	Glu	Asp	Ser	Ile	Ile	Arg	Thr	Gly	Phe	Gln	Gly	Glu	Ser	Gly	His	405	410	415	
Asp	Ile	Lys	Ile	Thr	Ala	Glu	Asn	Thr	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Gly	Val	420	425	430	
Leu	Leu	Pro	Thr	Ile	Pro	Gly	Lys	Leu	Asp	Val	Asn	Lys	Ser	Lys	Thr	435	440	445	
His	Ile	Ser	Val	Asn	Gly	Arg	Lys	Ile	Arg	Met	Arg	Cys	Arg	Ala	Ile	450	455	460	
Asp	Gly	Asp	Val	Thr	Phe	Cys	Arg	Pro	Lys	Ser	Pro	Val	Tyr	Val	Gly	465	470	475	480
Asn	Gly	Val	His	Ala	Asn	Leu	His	Val	Ala	Phe	His	Arg	Ser	Ser	Ser	485	490	495	

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu  
 500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser  
 515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser  
 530 535

<210> 2  
 <211> 535  
 <212> PRT  
 <213> 白喉杆菌

<400> 2

Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn  
 1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln  
 20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp  
 35 40 45

Asp Trp Lys Glu Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly  
 50 55 60

[0003] Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val  
 65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val  
 85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu  
 100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly  
 115 120 125

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser  
 130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser  
 145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp  
 165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg  
 180 185 190

Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val  
 195 200 205

Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly  
 210 215 220



	Pro	Ile	Lys	Asn	Lys	Met	Ser	Glu	Ser	Pro	Asn	Lys	Thr	Val	Ser	Glu
	225					230					235					240
	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Tyr	Leu	Glu	Glu	Phe	His	Gln	Thr	Ala	Leu	Glu
				245						250					255	
	His	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Pro	Val
			260						265					270		
	Phe	Ala	Gly	Ala	Asn	Tyr	Ala	Ala	Trp	Ala	Val	Asn	Val	Ala	Gln	Val
		275						280					285			
	Ile	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Thr	Thr	Ala	Ala	Leu
	290						295					300				
	Ser	Ile	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	Ser	Val	Met	Gly	Ile	Ala	Asp	Gly	Ala
	305					310					315					320
	Val	His	His	Asn	Thr	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Gln	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser
				325						330					335	
	Ser	Leu	Met	Val	Ala	Gln	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Leu	Val	Asp
			340						345					350		
	Ile	Gly	Phe	Ala	Ala	Tyr	Asn	Phe	Val	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Leu	Phe
		355						360					365			
[0004]	Gln	Val	Val	His	Asn	Ser	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ala	Tyr	Ser	Pro	Gly	His
	370						375					380				
	Lys	Thr	Gln	Pro	Phe	Leu	His	Asp	Gly	Tyr	Ala	Val	Ser	Trp	Asn	Thr
	385					390					395					400
	Val	Glu	Asp	Ser	Ile	Ile	Arg	Thr	Gly	Phe	Gln	Gly	Glu	Ser	Gly	His
				405						410					415	
	Asp	Ile	Lys	Ile	Thr	Ala	Glu	Asn	Thr	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Gly	Val
			420						425					430		
	Leu	Leu	Pro	Thr	Ile	Pro	Gly	Lys	Leu	Asp	Val	Asn	Lys	Ser	Lys	Thr
		435						440					445			
	His	Ile	Ser	Val	Asn	Gly	Arg	Lys	Ile	Arg	Met	Arg	Cys	Arg	Ala	Ile
		450					455					460				
	Asp	Gly	Asp	Val	Thr	Phe	Cys	Arg	Pro	Lys	Ser	Pro	Val	Tyr	Val	Gly
	465					470					475					480
	Asn	Gly	Val	His	Ala	Asn	Leu	His	Val	Ala	Phe	His	Arg	Ser	Ser	Ser
				485						490					495	
	Glu	Lys	Ile	His	Ser	Asn	Glu	Ile	Ser	Ser	Asp	Ser	Ile	Gly	Val	Leu
			500						505					510		
	Gly	Tyr	Gln	Lys	Thr	Val	Asp	His	Thr	Lys	Val	Asn	Ser	Lys	Leu	Ser
		515						520					525			
[0005]	Leu	Phe	Phe	Glu	Ile	Lys	Ser									
	530						535									

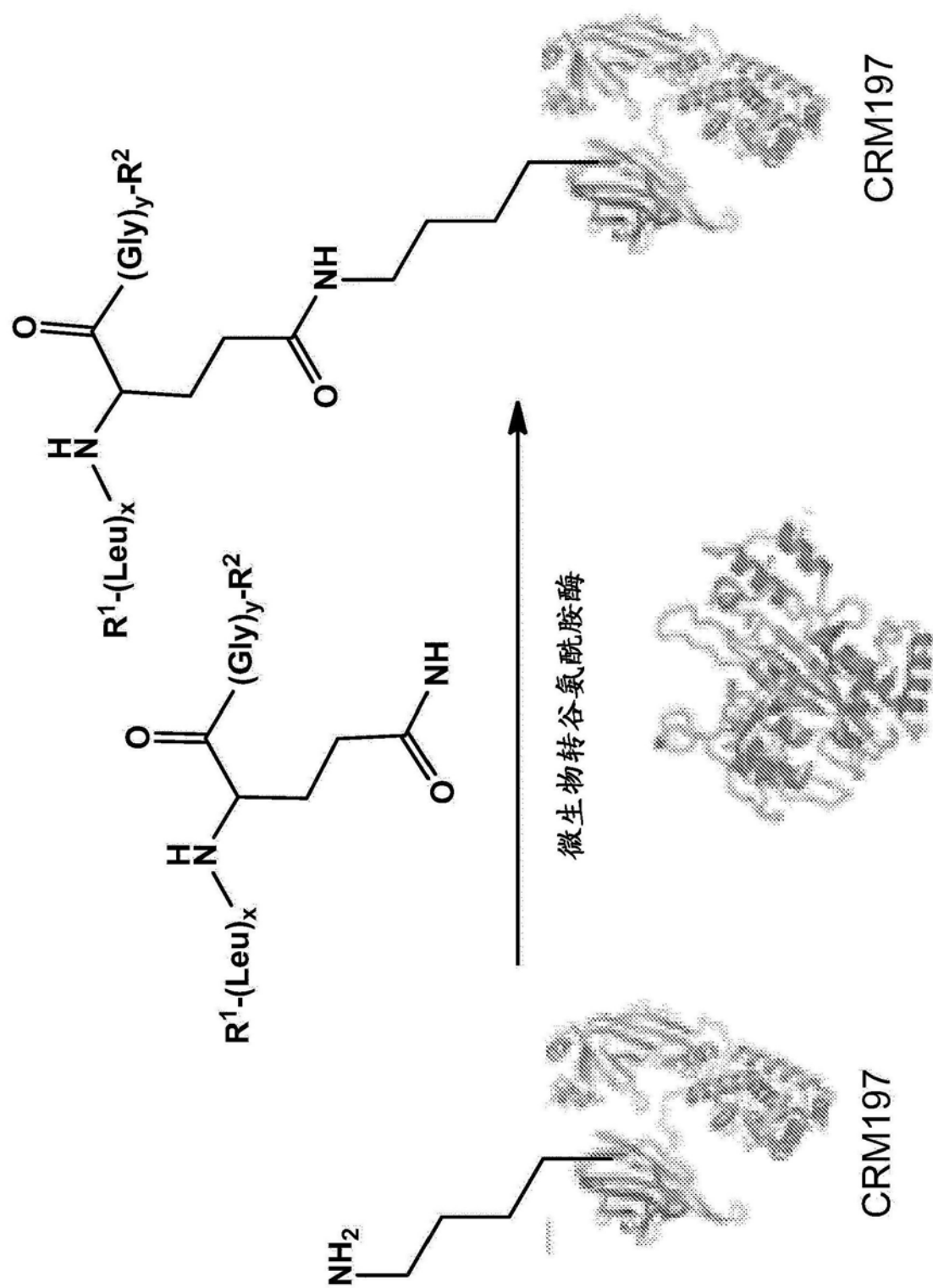


图1

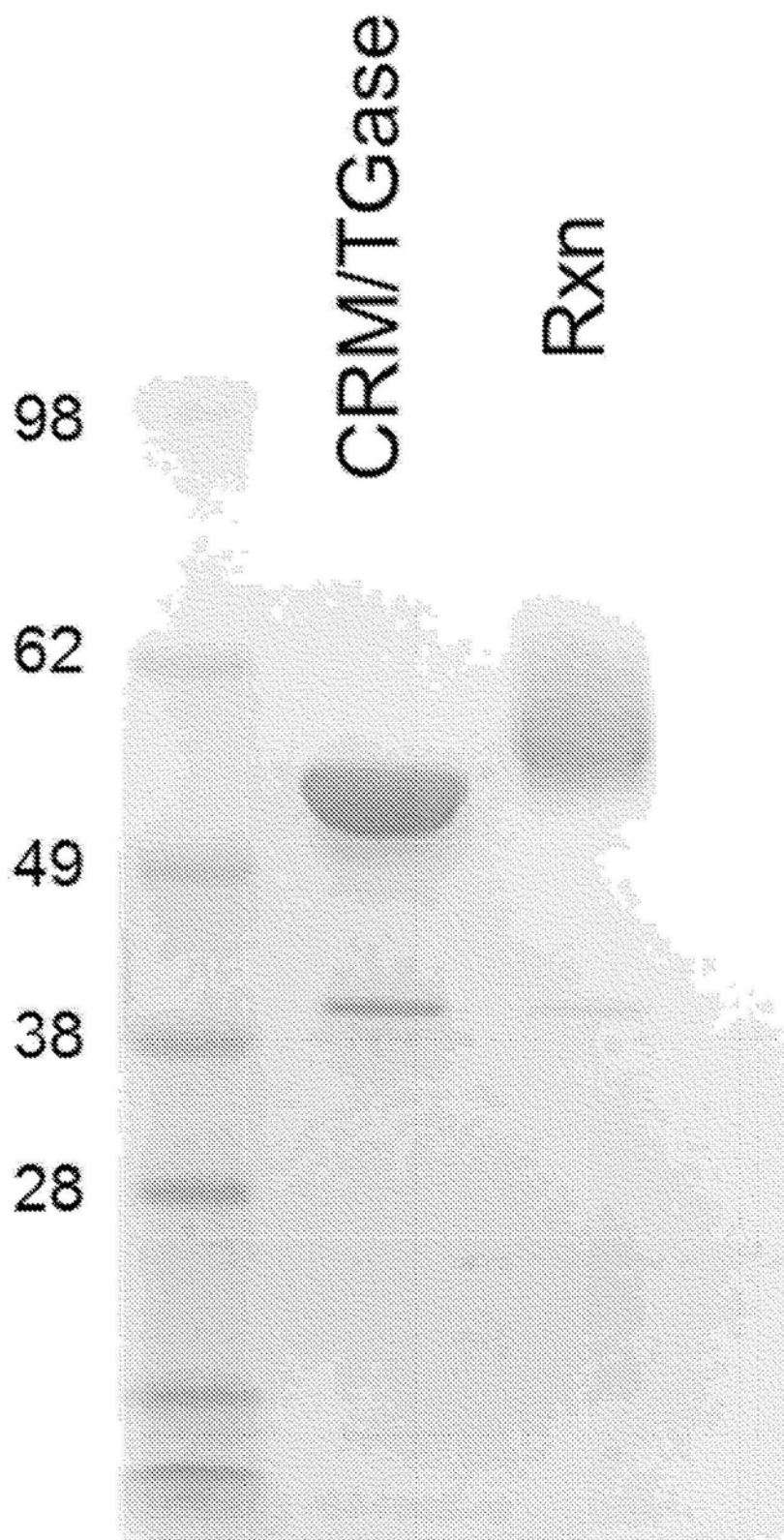


图2

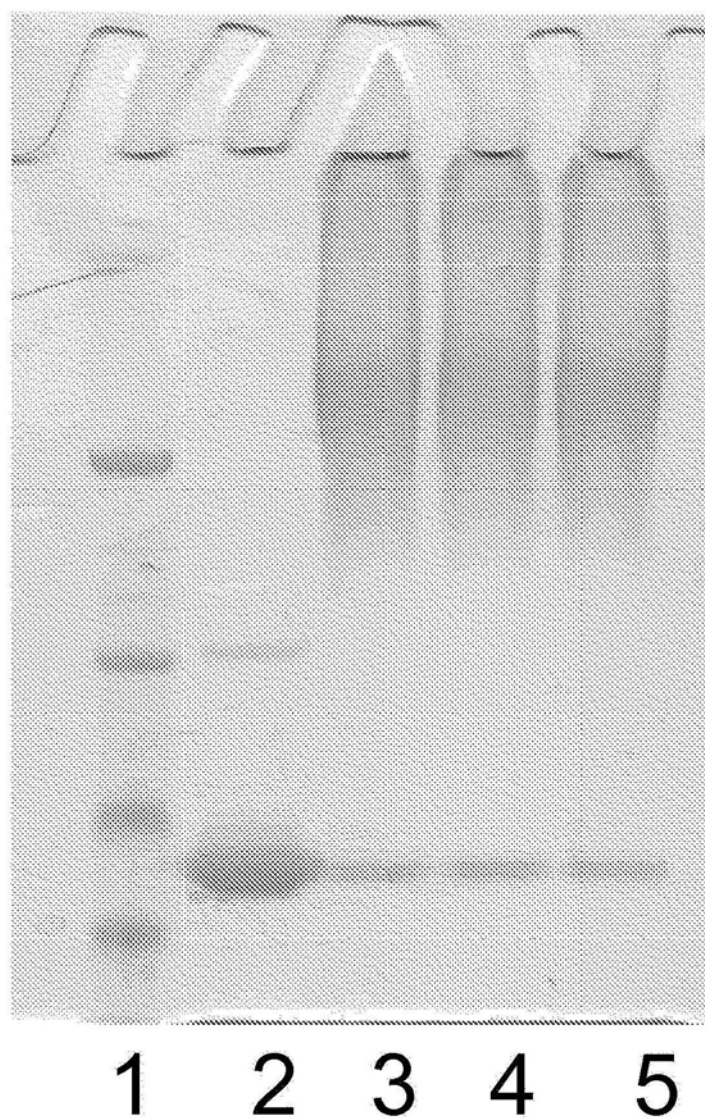


图3

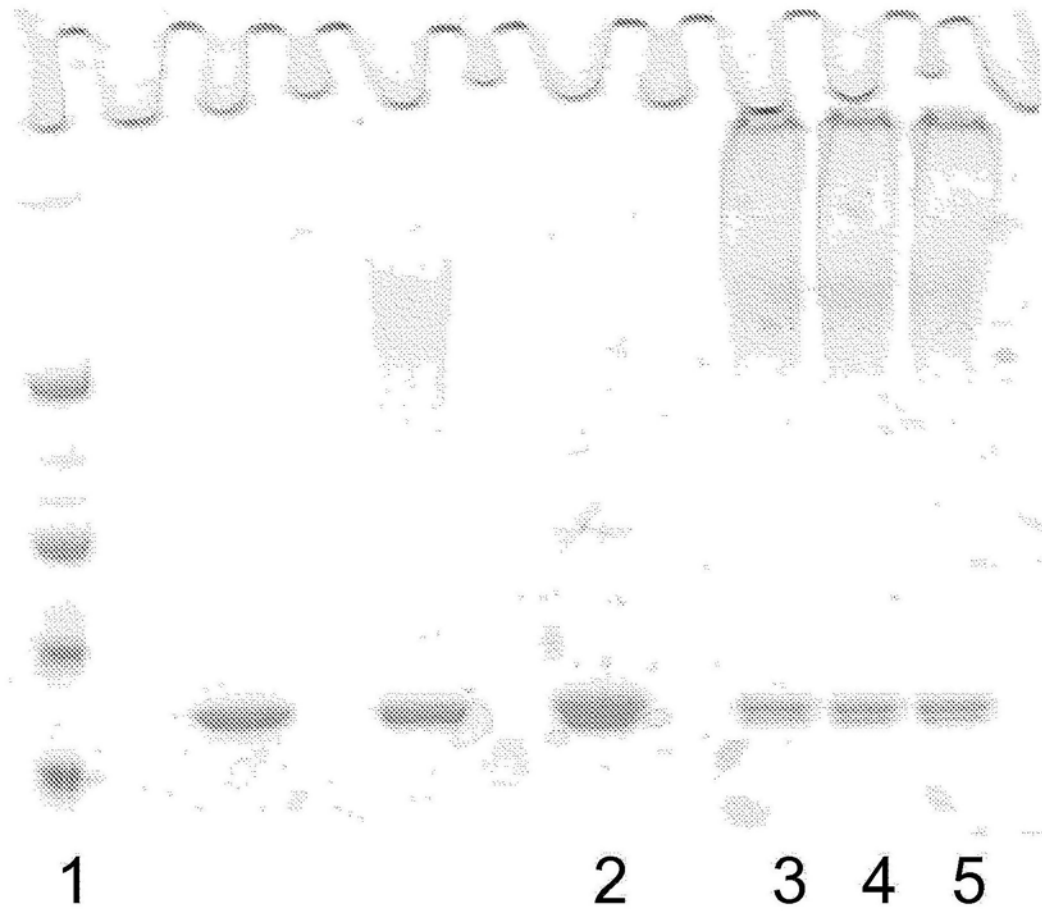


图4

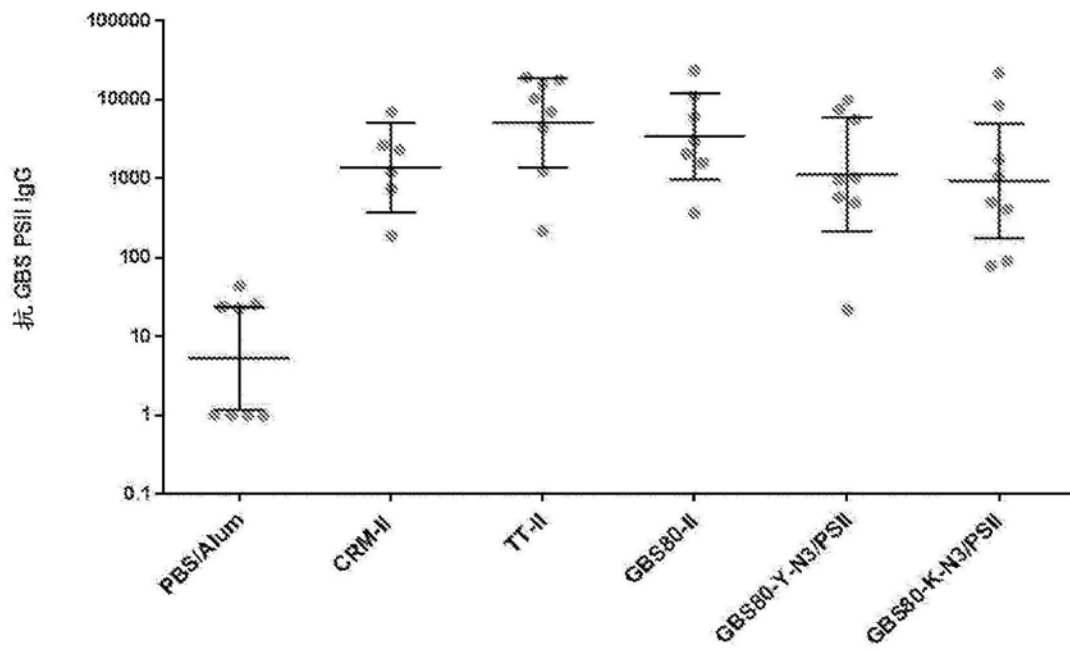


图5

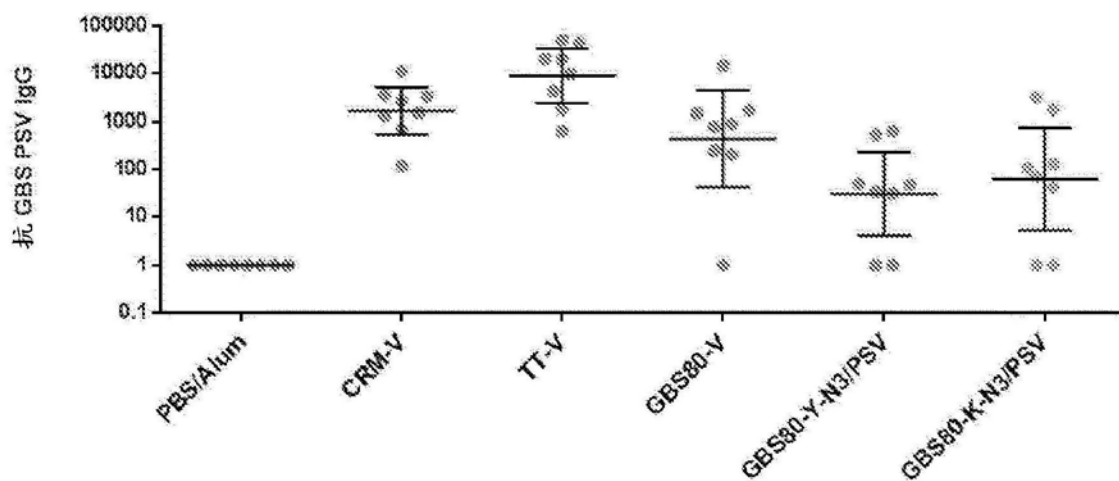


图6

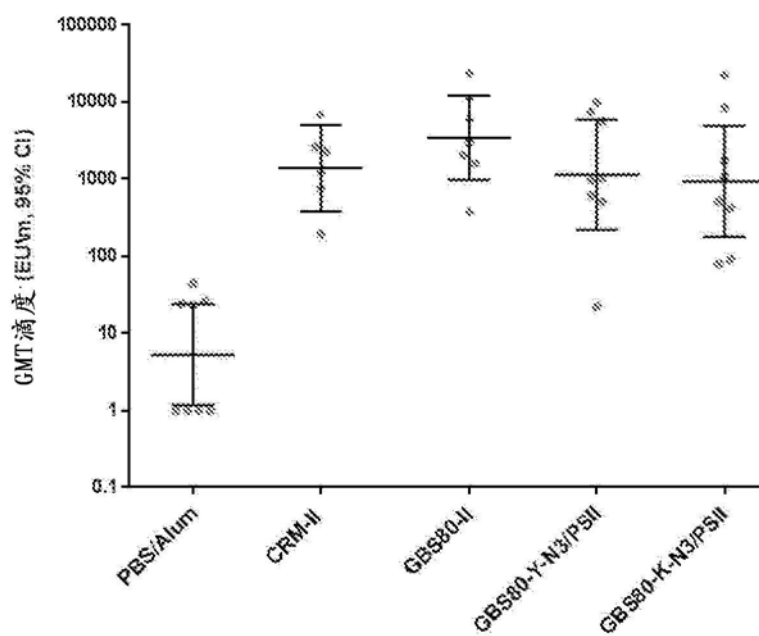


图7